



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월14일  
(11) 등록번호 10-2409246  
(24) 등록일자 2022년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 7/08 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)  
C07K 7/56 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 7/08 (2013.01)  
A61K 39/39 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7028087  
(22) 출원일자(국제) 2017년03월02일  
심사청구일자 2020년03월02일  
(85) 번역문제출일자 2018년09월28일  
(65) 공개번호 10-2018-0118724  
(43) 공개일자 2018년10월31일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/020304  
(87) 국제공개번호 WO 2017/151830  
국제공개일자 2017년09월08일  
(30) 우선권주장  
62/303,673 2016년03월04일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
JP2015520179 A\*  
KR1020150133215 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니  
미국 뉴저지 (우편번호 08540-4000) 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 피.오. 박스 4000  
(72) 발명자  
알렌, 마틴 패트릭  
미국 08543 뉴저지주 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니 내  
길리스, 에릭 피.  
미국 06410 코네티컷주 체셔 사우스 메인 스트리트 245  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 면역조절제

(57) 요약

본 개시내용은 PD-1/PD-L1 및 PD-L1/CD80 단백질/단백질 상호작용을 억제하며, 따라서 암 및 감염성 질환을 포함한 다양한 질환의 호전에 유용한 신규 마크로시클릭 화합물을 제공한다.

(52) CPC특허분류

**A61K 45/06** (2013.01)

**C07K 7/56** (2013.01)

**A61K 2039/55516** (2013.01)

(72) 발명자

**랭글리, 데이비드 알.**

미국 06450 코네티컷주 메리던 알렉산더 드라이브 29

**밀러, 마이클 매튜**

미국 08543 뉴저지주 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니 내

**멀, 에릭**

미국 06437 코네티컷주 길포드 쿡스 레인 173

**순, 리-치앙**

미국 06492 코네티컷주 월링포드 리서치 파크웨이 5 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니 내

**융, 캡-선**

미국 06492 코네티컷주 월링포드 리서치 파크웨이 5 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니 내

**그랜트-영, 캐서린 에이.**

미국 00765 푸에르토리코 비에케스 노스 쇼어 로드 365

**민웰, 니콜라스 에이.**

미국 08543 뉴저지주 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니 내

**스콜라, 폴 마이클**

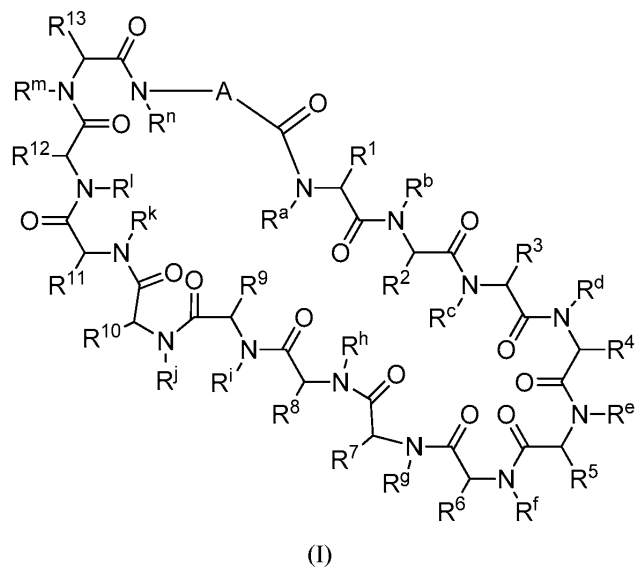
미국 06492 코네티컷주 월링포드 리서치 파크웨이 5 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니 내

## 명세서

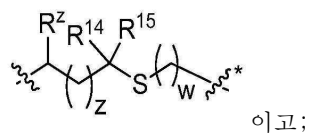
## 청구범위

## 청구항 1

화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.



여기서

$$A \cong$$


여기서

$\omega_{\text{C}}$ 는 카르보닐 기에 대한 부착 지점을 나타내고,  $\omega_{\text{Si}}$ 는 질소 원자에 대한 부착 지점을 나타내고;

 $z$ 는 0이고;

$w$ 는 1이고;

R<sup>14</sup> 및 R<sup>15</sup>는 수소이고;

$$R^z \text{는 } -\text{CONHR}^{16} \text{ 이고 ;}$$

R<sup>a</sup> 및 R<sup>j</sup>는 각각 독립적으로 수소 및 메틸로부터 선택되고;

 $R^c, R^f, R^h, R^i, R^m$ , 및  $R^n$ 은 수소이고;

R<sup>1</sup>이 페닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬이고, 여기서 페닐은 비치환되거나 히드록시로 치환되고;

R<sup>8</sup>이 -(CH<sub>2</sub>)인돌릴이고;

R<sup>10</sup> 이 각각 비치환되거나 -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H로 치환된, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>인돌릴 및 -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>벤조티에닐로부터 선택되고;

$R^3$ 이  $-CH_2CONH_2$ 이면서;

$R^5$ 가  $C_1-C_7$ 알킬, 및 비치환되거나  $CF_3CO-$ 로 치환된  $-CH_2$ (이미다졸릴)로부터 선택되면서;

$R^6$ 이  $C_1-C_7$ 알킬 또는  $-(CH_2)_2CONH_2$ 이거나, 또는

$R^3$ 이  $R^5$  및  $R^6$  중 하나와 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 0개 또는 1개의 이중 결합, 및 0개 또는 1개의  $-CONH-$  또는  $-NHCO-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

$R^9$ 가 히드록시메틸 및  $-CH_2CH_2CO_2H$ 로부터 선택되면서;

$R^{13}$ 이  $C_1-C_7$ 알킬 및  $-(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$ 로부터 선택되거나, 또는  $R^9$  및  $R^{13}$ 이 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 0개 또는 1개의 이중 결합, 및 0개 또는 1개의  $-CONH-$  또는  $-NHCO-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

$R^{16}$ 은 수소,  $-CHR^{17}CONH_2$ ,  $-CHR^{17}CONHCHR^{18}CONH_2$ , 및  $-CHR^{17}CONHCHR^{18}CONHCH_2CONH_2$ 로부터 선택되고; 여기서  $R^{17}$ 은 수소 및  $-CH_2OH$ 로부터 선택되고,  $R^{18}$ 은 수소 및 메틸로부터 선택되고;

$R^7$ 이 수소이거나; 또는  $R^7$  및  $R^{16}$ 이 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 0개 또는 1개의 이중 결합, 및 0개 또는 1개의  $-CONH-$  또는  $-NHCO-$  기를 함유하는 브리지를 형성하거나; 또는  $R^7$  및  $R^8$ 가 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 비치환되거나 히드록시 기로 치환된 피롤리딘 고리를 형성하고;

단  $R^3$ ,  $R^9$  및  $R^7$  중 적어도 1개는 브리지를 형성하고;

$R^2$ 가  $C_1-C_7$ 알킬이고;

$R^{11}$  및  $R^{12}$ 가  $C_1-C_7$ 알킬이고;

$R^b$ 는 메틸이거나, 또는  $R^b$  및  $R^2$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성하고; 여기서 각각의 고리는 비치환되거나 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 치환되고;

$R^d$  및  $R^4$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 피롤리딘 고리를 형성하고; 여기서 고리는 비치환되거나 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 히드록시, 및 페닐로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 치환되고;

$R^e$ 는 수소 또는 메틸이거나, 또는  $R^e$  및  $R^5$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성하고; 여기서 각각의 고리는 비치환되거나 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 치환되고;

$R^g$ 는 수소 또는 메틸이거나, 또는  $R^g$  및  $R^7$ 은 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성할 수 있고; 여기서 각각의 고리는 비치환되거나 아미노, 비치환되거나 할로 기로 치환된 벤질, 벤질옥시, 시아노, 시클로헥실, 메틸, 할로, 히드록시, 비치환되거나 메톡시 기로 치환된 이소퀴놀리닐옥시, 비치환되거나 할로 기로 치환된 퀴놀리닐옥시, 및 테트라졸릴로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 치환되고; 여기서 피롤리딘 및 피페리딘 고리는 모노시클릭이거나, 시클로헥실, 페닐, 또는 인돌 기에 융합되어 비시클릭 고리계를 형성하고;

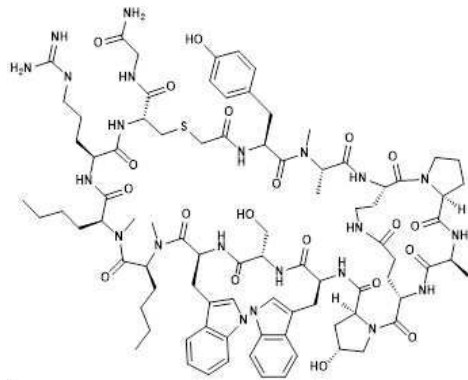
$R^k$ 는 수소 또는 메틸이거나, 또는  $R^k$  및  $R^{11}$ 은 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성하고; 여기서 각각의 고리는 비치환되거나 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 치환되고;

$R^l$ 은 메틸이거나, 또는  $R^l$  및  $R^{12}$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘 및 피롤리딘으로부터 선택된 고리를 형성하고, 여기서 각각의 고리는 비치환되거나 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적

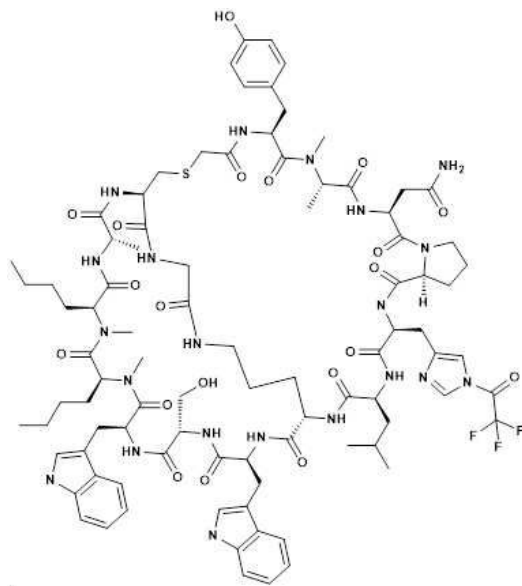
로 선택된 1 내지 4개의 기로 치환된다.

## 청구항 2

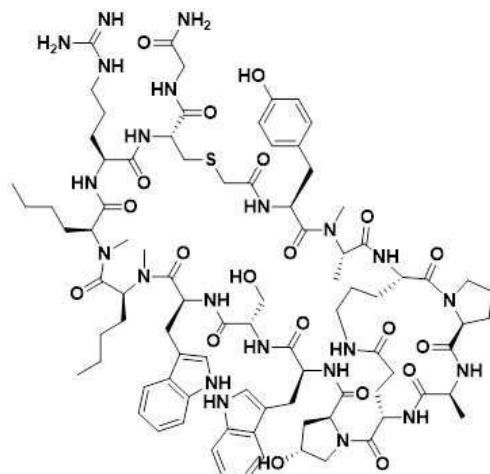
하기로부터 선택된 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염:



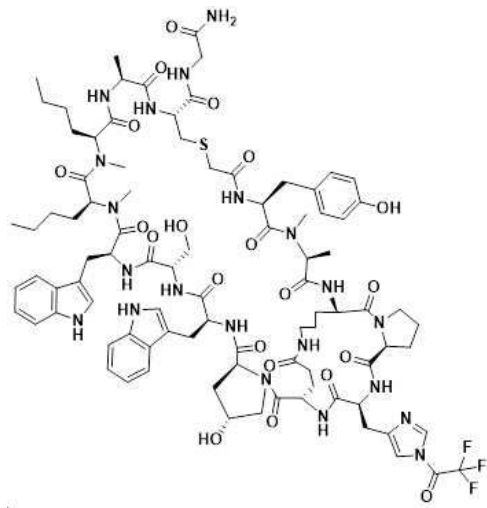
실시예 1400;



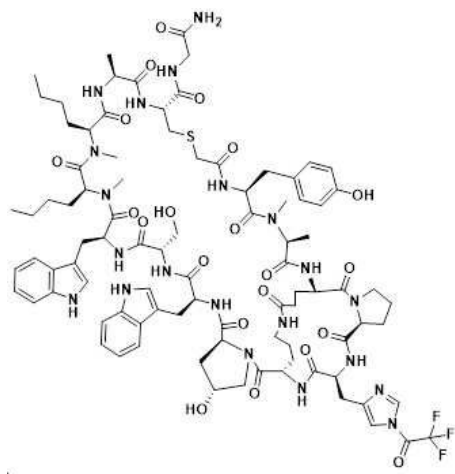
실시예 1401;



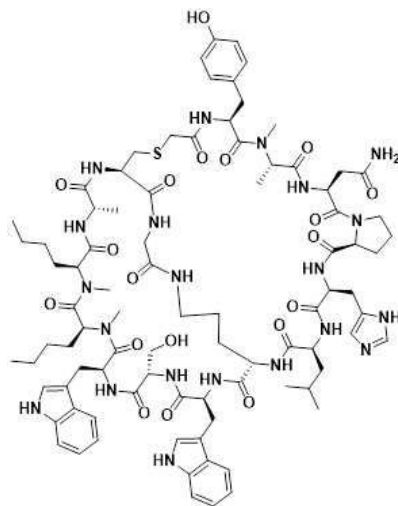
실시예 1402;



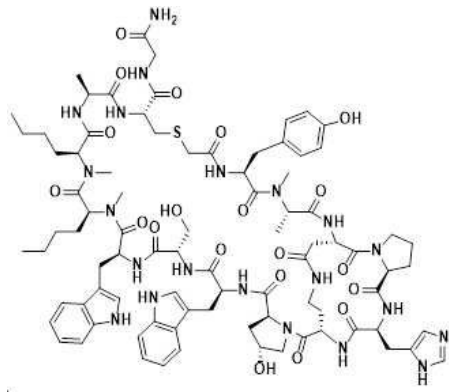
실시예 1403;



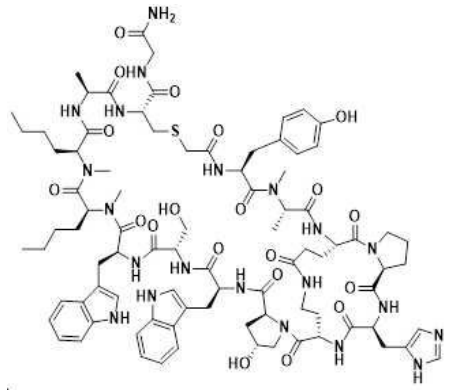
실시예 1404;



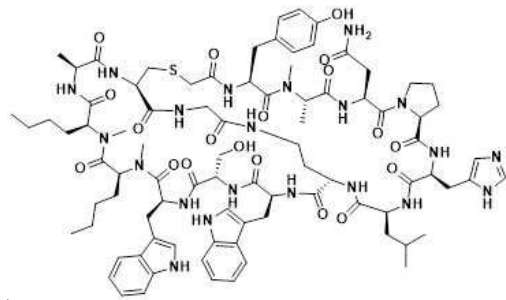
실시예 1405;



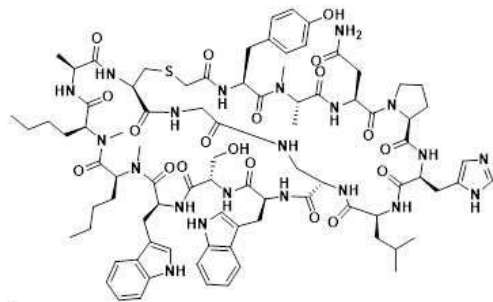
실시예 1500;



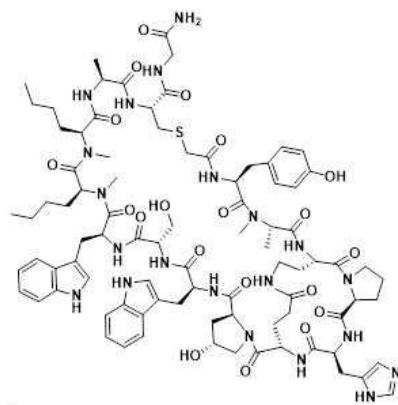
실시예 1501;



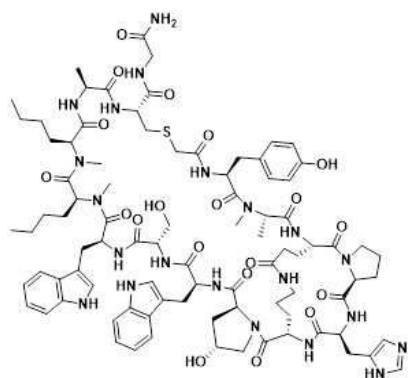
실시예 1502;



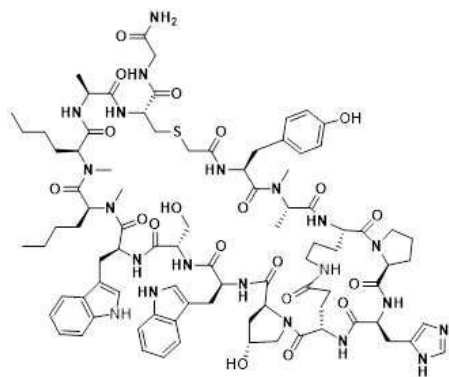
실시예 1503;



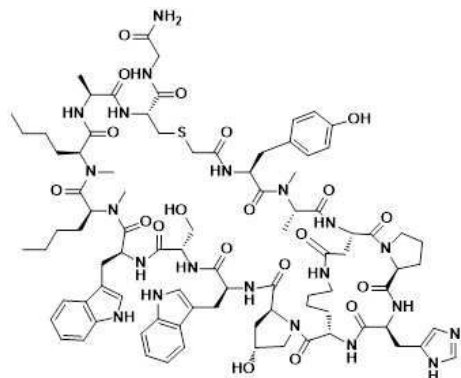
실시예 1504;



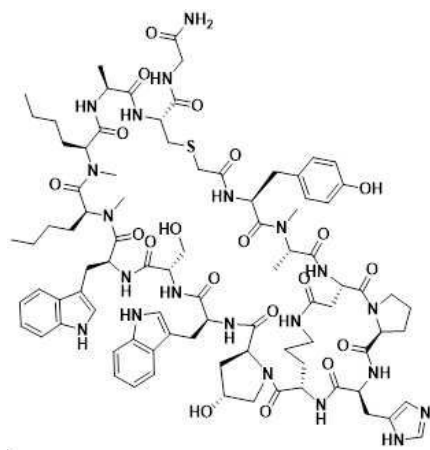
실시예 1505;



실시예 1506;

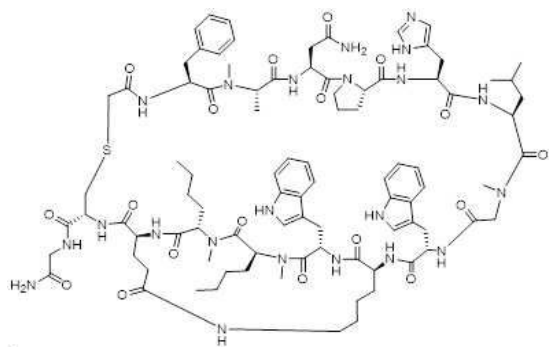


실시예 1507;

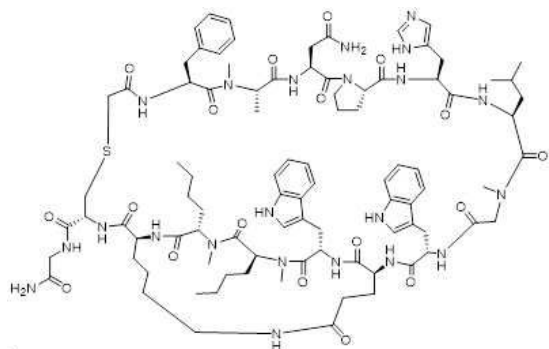


실시예 1508;

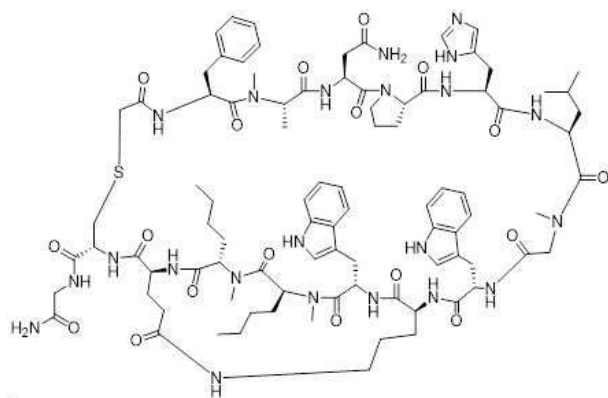




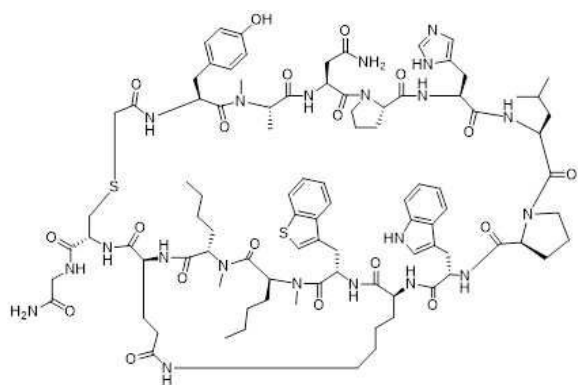
실시예 5001;



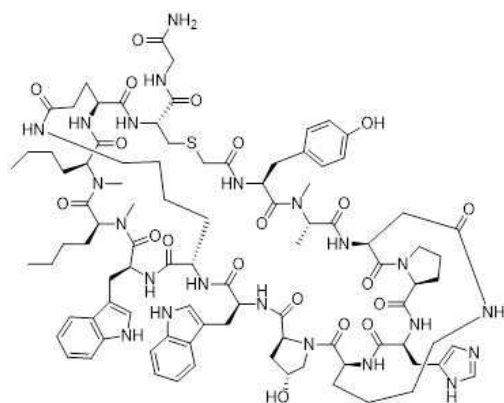
실시예 5002;



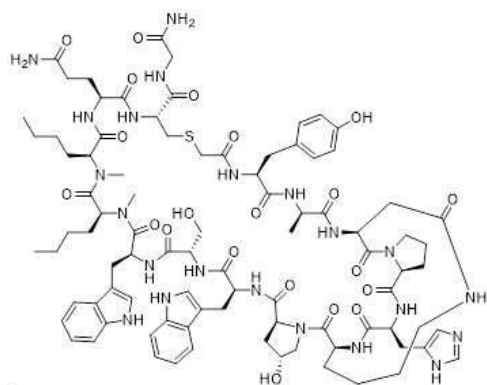
실시예 5003;



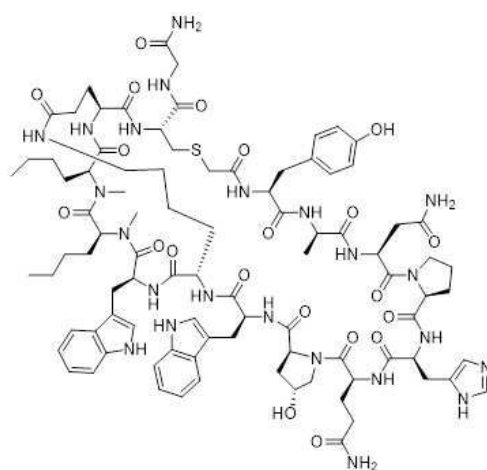
실시예 5004;



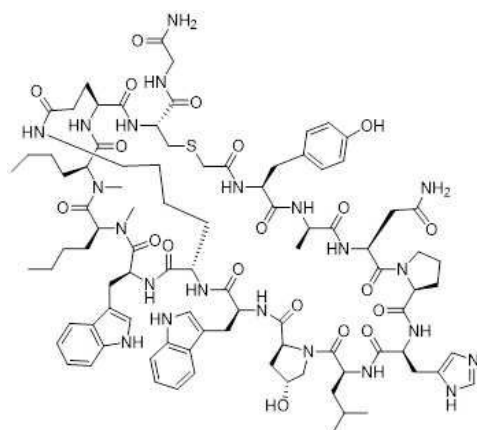
실시예 5005;



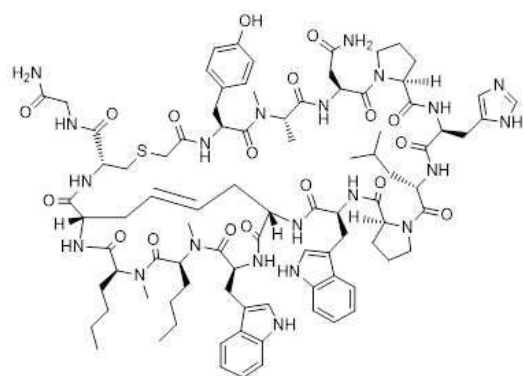
실시예 5006;



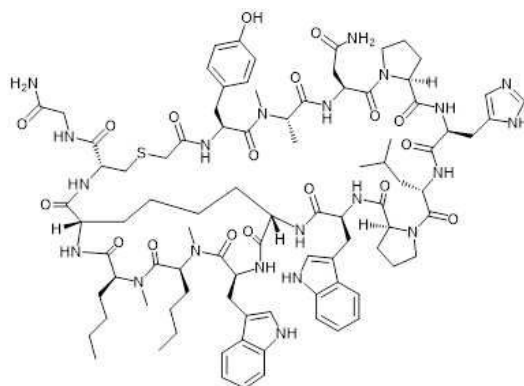
실시예 5007;



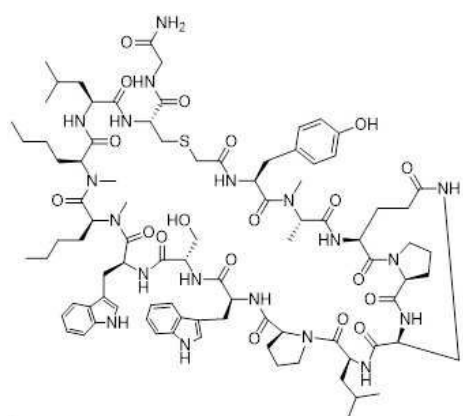
실시예 5008;



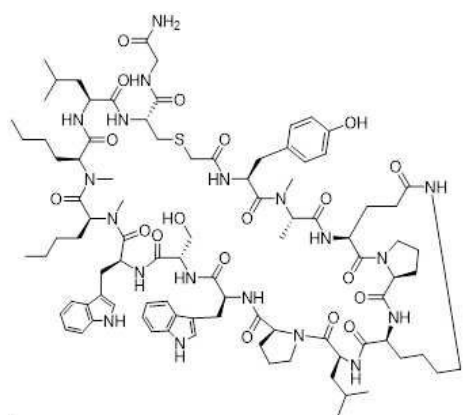
실시예 7155;



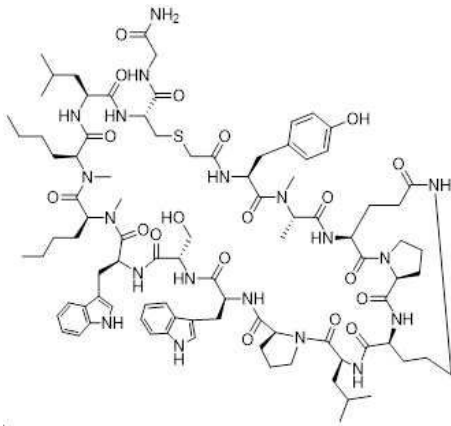
실시예 7156;



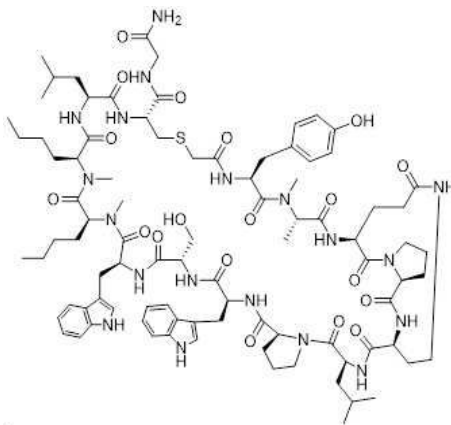
실시예 10500;



실시예 10501;



실시예 10502; 및



실시예 10503

### 청구항 3

제1항 또는 제2항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 암 세포의 성장, 증식 또는 전이의 억제를 필요로 하는 대상체에서 암 세포의 성장, 증식 또는 전이를 억제하기 위한 제약 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제약 조성물의 전에, 그 후에 또는 그와 동시에 추가의 작용제가 더 투여되는 것인, 제약 조성물.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 추가의 작용제가 항미생물제, 항바이러스제, 및/또는 세포독성제인 제약 조성물.

### 청구항 6

제4항에 있어서, 추가의 작용제가 HDAC 억제제인 제약 조성물.

### 청구항 7

제3항에 있어서, 암이 흑색종, 신세포 암종, 편평 비소세포 폐암 (NSCLC), 비-편평 NSCLC, 결장직장암, 거세-저항성 전립선암, 난소암, 위암, 간세포성 암종, 췌장 암종, 두경부의 편평 세포 암종, 식도, 위장관 및 유방의 암종, 및 혈액 악성종양으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

### 청구항 8

제1항 또는 제2항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, HIV, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 포진 바이러스 및 인플루엔자로부터 선택된 바이러스에 의해 유발된 감염성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 감염성 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

### 청구항 9

제1항 또는 제2항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 패혈성 쇼크의 치료를 필요로 하는 대상체에서 패혈성 쇼크를 치료하기 위한 제약 조성물.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2016년 3월 4일에 출원된 미국 일련 번호 62/303,673의 이익을 청구하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 개시내용은 PD-1/PD-L1 및 CD80/PD-L1 단백질/단백질 상호작용을 억제하며, 따라서 암 및 감염성 질환을 포함한 다양한 질환의 호전에 유용한 신규 마크로시클릭 화합물을 제공한다.

### 배경 기술

[0004] 단백질 프로그래밍된 사멸 1 (PD-1)은 수용체의 CD28 패밀리의 억제 구성원이며, 상기 패밀리는 또한 CD28, CTLA-4, ICOS 및 BTLA를 포함한다. PD-1은 활성화 B 세포, T 세포 및 골수 세포 상에서 발현된다 (Agata et al., supra; Okazaki et al., Curr. Opin. Immunol., 14:779-782 (2002); Bennett et al., J. Immunol., 170:711-718 (2003)).

[0005] PD-1 단백질은 Ig 유전자 슈퍼패밀리의 일부인 55 kDa 유형 I 막횡단 단백질이다 (Agata et al., Int. Immunol., 8:765-772 (1996)). PD-1은 막 근위 면역수용체 티로신 억제 모티프 (ITIM) 및 막 원위 티로신-기반 스위치 모티프 (ITSM)를 함유한다 (Thomas, M.L., J. Exp. Med., 181:1953-1956 (1995); Vivier, E. et al., Immunol. Today, 18:286-291 (1997)). CTLA-4와 구조적으로 유사할지라도, PD-1은 CD80 CD86 (B7-2) 결합에 중요한 MYPPY 모티프가 결여되어 있다. PD-1에 대한 2개의 리간드, PD-L1 (B7-H1) 및 PD-L2 (b7-DC)가 확인되었다. PD-1을 발현하는 T 세포의 활성화는 PD-L1 또는 PD-L2를 발현하는 세포와의 상호작용 시 하향조절되는 것으로 밝혀졌다 (Freeman et al., J. Exp. Med., 192:1027-1034 (2000); Latchman et al., Nat.

Immunol., 2:261-268 (2001); Carter et al., Eur. J. Immunol., 32:634-643 (2002)). PD-L1 및 PD-L2 둘 다는 PD-1에 결합하는 B7 단백질 패밀리의 구성원이지만, 다른 CD28 패밀리의 구성원에는 결합하지 않는다. PD-L1 리간드는 다양한 인간 암에서 풍부하다 (Dong et al., Nat. Med., 8:787-789 (2002)). PD-1 및 PD-L1 사이의 상호작용은 종양 침윤 림프구에서의 감소, T-세포 수용체 매개 증식에서의 감소, 및 암성 세포에 의한 면역 회피를 초래한다 (Dong et al., J. Mol. Med., 81:281-287 (2003); Blank et al., Cancer Immunol. Immunother., 54:307-314 (2005); Konishi et al., Clin. Cancer Res., 10:5094-5100 (2004)). 면역 억제는 PD-1과 PD-L1의 국부 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있고, 그 효과는 PD-1과 PD-L2의 상호작용이 또한 차단되는 경우에 부가된다 (Iwai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:12293-12297 (2002); Brown et al., J. Immunol., 170:1257-1266 (2003)).

[0006] PD-L1은 또한 CD80과 상호작용하는 것으로 밝혀졌다 (Butte MJ et al., Immunity;27:111-122 (2007)). 발현 면역 세포 상에서의 상호작용 PD-L1/CD80은 억제적인 것으로 밝혀졌다. 이러한 상호작용의 차단은 이러한 억제 상호작용을 제거하는 것으로 밝혀졌다 (Paterson AM, et al., J Immunol., 187:1097-1105 (2011); Yang J, et al. J Immunol. Aug 1;187(3):1113-9 (2011)).

[0007] PD-1 발현 T 세포가 그의 리간드를 발현하는 세포와 접촉하면, 증식, 시토킨 분비, 및 세포독성을 포함한, 항원 자극에 반응하는 기능적 활성이 감소된다. PD-1/PD-L1 또는 PD-L2 상호작용은 감염 또는 종양의 해소 동안, 또는 자기 관용성의 발생 동안의 면역 반응을 하향 조절한다 (Keir, M.E. et al., Annu. Rev. Immunol., 26:Epub (2008)). 종양 질환 또는 만성 감염 동안 발생하는 것과 같은 만성 항원 자극은 상승된 수준의 PD-1을 발현하고 만성 항원에 대한 활성에 대해 기능장애를 갖는 T 세포를 생성한다 (문헌 [Kim et al., Curr. Opin. Imm. (2010)]에서 검토됨). 이는 "T 세포 소진"으로 칭해진다. B 세포는 또한 PD-1/PD-리간드 억제 및 "소진"을 나타낸다.

[0008] PD-L1에 대한 항체를 사용한 PD-1/PD-L1 라이제이션의 차단은 많은 시스템 내에서 T 세포 활성화를 회복 및 증대시키는 것으로 밝혀졌다. 진행성 암을 갖는 환자는 PD-L1에 대한 모노클로날 항체를 사용한 요법으로부터 이익을 얻는다 (Brahmer et al., New Engl. J. Med. (2012)). 종양 및 만성 감염의 전임상 동물 모델은 모노클로날 항체에 의한 PD-1/PD-L1 경로의 차단이 면역 반응을 증진시킬 수 있고, 종양 거부 또는 감염의 제어를 발생시킬 수 있음을 보여주었다. PD-1/PD-L1 차단을 통한 항종양 면역요법은 다수의 조직학적으로 별개의 종양에 대한 치료 면역 반응을 증대시킬 수 있다 (Dong, H. et al., "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity", J. Mol. Med., 81(5):281-287 (2003); Dong, H. et al., "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion", Nat. Med., 8(8):793-800 (2002)).

[0009] PD-1/PD-L1 상호작용의 간섭은 만성 감염을 갖는 시스템 내에서 증진된 T 세포 활성을 유발한다. PD-L1의 차단은 만성 림프구성 맥락 수막염 바이러스 감염을 갖는 마우스에서 바이러스 클리어런스가 개선되게 하고 면역을 회복시켰다 (Barber, D.L. et al., "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", Nature, 439(7077):682-687 (2006)). HIV-1로 감염된 인간화 마우스는 바이러스혈증에 대한 증진된 보호 및 CD4+ T 세포의 바이러스 고갈을 보여준다 (Palmer et al., J. Immunol. (2013)). PD-L1에 대한 모노클로날 항체를 통한 PD-1/PD-L1의 차단은 HIV 환자 (Day, Nature (2006); Petrovas, J. Exp. Med. (2006); Trautman, Nature Med. (2006); D'Souza, J. Immunol. (2007); Zhang, Blood (2007); Kaufmann, Nature Imm. (2007); Kasu, J. Immunol. (2010); Porichis, Blood (2011)), HCV 환자 (Golden-Mason, J. Virol. (2007); Jeung, J. Leuk. Biol. (2007); Urbani, J. Hepatol. (2008); Nakamoto, PLoS Path. (2009); Nakamoto, Gastroenterology (2008)) 및 HBV 환자 (Boni, J. Virol. (2007); Fisticaro, Gastro. (2010); Fisticaro et al., Gastroenterology (2012); Boni et al., Gastro. (2012); Penna et al., J. Hep. (2012); Raziorrough, Hepatology (2009); Liang, World J. Gastro. (2010); Zhang, Gastro. (2008))로부터의 T 세포에 대한 시험관내 항원-특이적 기능성을 회복시킬 수 있다.

[0010] PD-L1/CD80 상호작용의 차단은 또한 면역을 자극하는 것으로 밝혀졌다 (Yang J., et al., J Immunol. Aug 1;187(3):1113-9 (2011)). PD-L1/CD80 상호작용의 차단으로부터 발생한 면역 자극은 추가의 PD-1/PD-L1 또는 PD-1/PD-L2 상호작용의 차단과의 조합을 통해 증진되는 것으로 밝혀졌다.

[0011] 면역 세포 표현형에서의 변경은 패혈성 쇼크에서 중요한 인자인 것으로 가설화된다 (Hotchkiss, et al., Nat Rev Immunol (2013)). 이들은 PD-1 및 PD-L1의 증가된 수준을 포함하고 (Guignant, et al., Crit. Care (2011)), PD-1 및 PD-L1의 증가된 수준을 갖는 패혈성 쇼크 환자로부터의 세포는 T 세포 아포토시스의 증가된 수준을 나타낸다. PD-L1에 대한 항체는 면역 세포 아포토시스의 수준을 감소시킬 수 있다 (Zhang et al.,

Crit. Care (2011)). 게다가, PD-1 발현 결핍 마우스는 야생형 마우스보다 패혈성 쇼크 증상에 대해 보다 내성이 있다. (Yang J., et al. J Immunol. Aug 1;187(3):1113-9 (2011)). 연구는 항체를 사용한 PD-L1의 상호작용의 차단이 부적절한 면역 반응을 억제할 수 있고, 질환 징후를 호전시킬 수 있음을 밝혀내었다.

[0012] 만성 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 것에 더하여, PD-1/PD-L1 경로의 차단은 또한 만성 감염의 맥락에서 치료 백신접종을 포함한 백신접종에 대한 반응을 증진시키는 것으로 밝혀졌다 (Ha, S.J. et al., "Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection", J. Exp. Med., 205(3):543-555 (2008); Finnefrock, A.C. et al., "PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination", J. Immunol., 182(2):980-987 (2009); Song, M.-Y. et al., "Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8+ t-cell responses by soluble PD-1", J. Immunother., 34(3):297-306 (2011)).

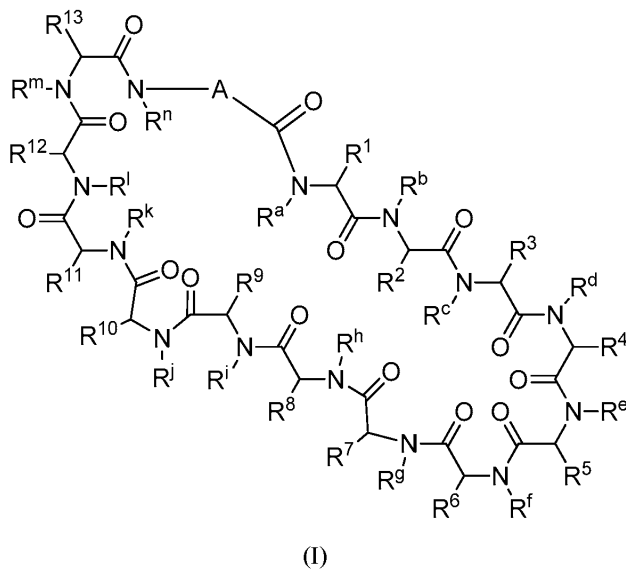
### 발명의 내용

[0013] 본원에 기재된 분자는 생화학적 및 세포-기반 실험 시스템 둘 다에서, PD-L1과 PD-1의 상호작용을 차단하는 능력을 입증한다. 이들 결과는 치료 백신을 포함한, 암 또는 만성 감염에서 면역을 증진시키기 위한 치료적 투여에 대한 잠재력과 일치한다.

[0014] 본원에 기재된 마크로시클릭 화합물은 PD-L1과 PD-1 및 CD80의 상호작용을 억제할 수 있다. 이들 화합물은 PD-L1에 대한 매우 효과적인 결합, PD-L1과 PD-1 또는 CD80의 상호작용의 차단을 입증하였고, 증진된 T 세포 기능적 활성을 촉진할 수 있으며, 따라서 이는 이들이 비경구, 경구, 폐, 비강, 협측 및 지속 방출 제제를 위한 후보가 되도록 한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

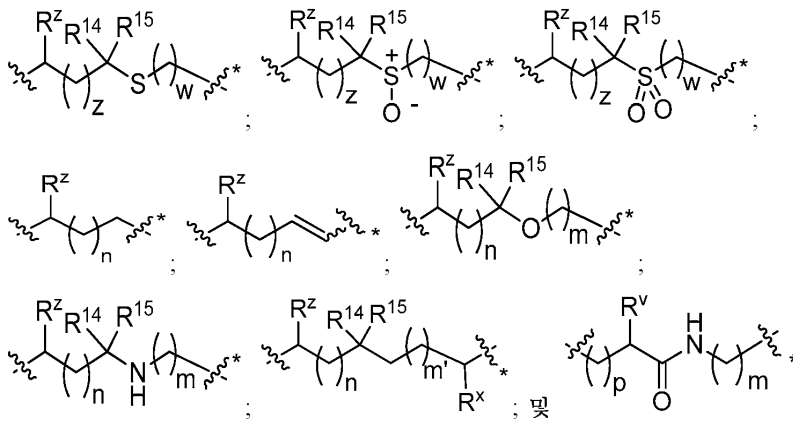
[0015] 한 측면에서, 본 개시내용은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.



[0016]

[0017] 여기서

[0018] A는 결합,



[0019] 로부터 선택되고,

[0020] 여기서

[0021]  $\sim^*$  는 카르보닐 기에 대한 부착 지점을 나타내고,  $\sim^N$  는 질소 원자에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0022] z는 0, 1, 또는 2이고;

[0023] w는 1 또는 2이고;

[0024] n은 0 또는 1이고;

[0025] m은 1 또는 2이고;

[0026] m'는 0 또는 1이고;

[0027] p는 0, 1, 또는 2이고;

[0028]  $R^X$ 는 수소, 아미노, 히드록시, 및 메틸로부터 선택되고;

[0029]  $R^{14}$  및  $R^{15}$ 는 독립적으로 수소 및 메틸로부터 선택되고;

[0030]  $R^Z$ 는 수소 및  $-C(O)NHR^{16}$ 으로부터 선택되고; 여기서  $R^{16}$ 은 수소,  $-CHR^{17}C(O)NH_2$ ,  $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ , 및  $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$ 로부터 선택되고; 여기서  $R^{17}$ 은 수소 및  $-CH_2OH$ 로부터 선택되고,  $R^{18}$ 은 수소 및 메틸로부터 선택되고;

[0031]  $R^V$ 는 수소 또는 천연 아미노산 측쇄이고;

[0032]  $R^a$  및  $R^j$ 는 각각 독립적으로 수소 및 메틸로부터 선택되고;

[0033]  $R^c$ ,  $R^f$ ,  $R^h$ ,  $R^i$ ,  $R^m$ , 및  $R^n$ 은 수소이고;

[0034]  $R^1$ ,  $R^8$ , 및  $R^{10}$ 은 독립적으로 천연 아미노산 측쇄 및 비천연 아미노산 측쇄로부터 선택되고;

[0035]  $R^3$  및  $R^6$ 은 독립적으로 천연 아미노산 측쇄 및 비천연 아미노산 측쇄로부터 선택되거나, 또는  $R^3$  및  $R^6$ 은 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

[0036]  $R^9$  및  $R^{13}$ 은 독립적으로 천연 아미노산 측쇄 및 비천연 아미노산 측쇄로부터 선택되거나, 또는  $R^9$  및  $R^{13}$ 은 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

[0037]  $R^7$ 은 천연 아미노산 측쇄 및 비천연 아미노산 측쇄로부터 선택되거나; 또는  $R^7$  및  $R^{16}$ 은 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하거나;



또는  $R^7$  및  $R^8$ 는 하기 기재된 바와 같이 고리를 형성할 수 있고;

[0038] 단  $R^3$  및  $R^6$ ;  $R^9$  및  $R^{13}$ ; 및  $R^7$  및  $R^{16}$  중 적어도 1개는 브리지를 형성하고;

[0039]  $R^5$ 는 천연 아미노산 측쇄 또는 비천연 아미노산 측쇄이거나, 또는  $R^3$  및  $R^5$ 는 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하거나; 또는  $R^5$  및  $R^6$ 는 하기 기재된 바와 같이 고리를 형성할 수 있고;

[0040]  $R^2$ ,  $R^4$ ,  $R^{11}$ , 및  $R^{12}$ 는 독립적으로 천연 아미노산 측쇄 및 비천연 아미노산 측쇄로부터 선택되거나 또는 하기 기재된 바와 같이 상응하는 이웃자리 R 기와 함께 고리를 형성하고;

[0041]  $R^b$ 는 메틸이거나, 또는  $R^b$  및  $R^2$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성하고; 여기서 각각의 고리는 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 임의로 치환되고;

[0042]  $R^d$ 는 수소 또는 메틸이거나, 또는  $R^d$  및  $R^4$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성할 수 있고; 여기서 각각의 고리는 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 히드록시, 및 페닐로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 임의로 치환되고;

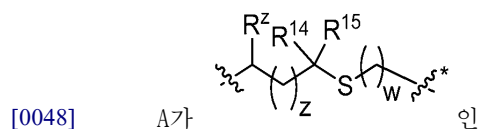
[0043]  $R^e$ 는 수소 또는 메틸이거나, 또는  $R^e$  및  $R^5$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성하고; 여기서 각각의 고리는 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 임의로 치환되고;

[0044]  $R^f$ 는 수소 또는 메틸이거나, 또는  $R^f$  및  $R^7$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성할 수 있고; 여기서 각각의 고리는 아미노, 할로 기로 임의로 치환된 벤질, 벤질옥시, 시아노, 시클로헥실, 메틸, 할로, 히드록시, 메톡시 기로 임의로 치환된 이소퀴놀리닐옥시, 할로 기로 임의로 치환된 퀴놀리닐옥시, 및 테트라졸릴로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 임의로 치환되고; 여기서 피롤리딘 및 피페리딘 고리는 시클로헥실, 페닐, 또는 인돌 기에 임의로 융합되고;

[0045]  $R^k$ 는 수소 또는 메틸이거나, 또는  $R^k$  및  $R^{11}$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘, 피롤리딘, 모르폴린, 피페리딘, 피페라진, 및 테트라히드로티아졸로부터 선택된 고리를 형성하고; 여기서 각각의 고리는 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 임의로 치환되고;

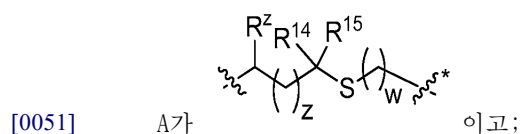
[0046]  $R^l$ 는 메틸이거나, 또는  $R^l$  및  $R^{12}$ 는 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 아제티딘 및 피롤리딘으로부터 선택된 고리를 형성하고, 여기서 각각의 고리는 아미노, 시아노, 메틸, 할로, 및 히드록시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 기로 임의로 치환된다.

[0047] 제1 측면의 제1 실시양태에서 본 개시내용은



[0049] 화학식 (I)의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0050] 제1 측면의 제2 실시양태에서 본 개시내용은



[0052] z가 0이고;

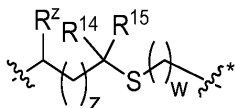
[0053] w가 1이고;

[0054]  $R^{14}$  및  $R^{15}$ 가 수소이고;

[0055]  $R^z$ 가  $-C(O)NHR^{16}$ 인

[0056] 화학식 (I)의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0057] 제1 측면의 제3 실시양태에서 본 개시내용은



[0058] A가 이고;

[0059] z가 0이고;

[0060] w가 1이고;

[0061]  $R^{14}$  및  $R^{15}$ 가 수소이고;

[0062]  $R^z$ 가  $-C(O)NHR^{16}$ 이고;

[0063]  $R^1$ 이 페닐- $C_1-C_3$ 알킬이고, 여기서 페닐은 히드록시로 임의로 치환되고;

[0064]  $R^2$ 가  $C_1-C_7$ 알킬이고;

[0065]  $R^3$ 이  $-CH_2C(O)NH_2$ 이거나, 또는  $R^3$  및  $R^6$ 이 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하거나, 또는  $R^3$  및  $R^5$ 가 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고,

[0066]  $R^4$  및  $R^d$ 가 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 피롤리딘 고리를 형성하고;

[0067]  $R^5$ 가  $C_1-C_7$ 알킬, 및  $CF_3C(O)-$ 로 임의로 치환된  $-CH_2$ (이미다졸릴)로부터 선택되거나, 또는  $R^3$  및  $R^5$ 가 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

[0068]  $R^6$ 이  $C_1-C_7$ 알킬 및  $-(CH_2)_2C(O)NH_2$ 로부터 선택되거나, 또는  $R^3$  및  $R^6$ 이 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

[0069]  $R^7$ 이 수소이거나, 또는  $R^7$  및  $R^g$ 가 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 히드록시 기로 임의로 치환된 피롤리딘 고리를 형성하거나, 또는  $R^7$  및  $R^{16}$ 이 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

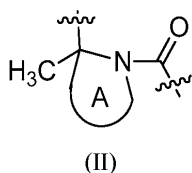
[0070]  $R^8$ 이  $-(CH_2)$ 인돌릴이고;

[0071]  $R^9$ 가 히드록시메틸 및  $-CH_2CH_2CO_2H$ 로부터 선택되거나, 또는  $R^9$  및  $R^{13}$ 이 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하고;

[0072]  $R^{10}$ 이 각각  $-CH_2CO_2H$ 로 임의로 치환된  $-(CH_2)$ 인돌릴 및  $-(CH_2)$ 벤조티에닐로부터 선택되고;

[0073]  $R^{11}$ 이  $C_1-C_7$ 알킬이고;

- [0074]  $R^{12}$ 가  $C_1$ - $C_7$ 알킬이고;
- [0075]  $R^{13}$ 이  $C_1$ - $C_7$ 알킬 및  $-(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$ 로부터 선택되거나, 또는  $R^9$  및  $R^{13}$ 이 함께 2 내지 7개의 탄소 원자, 임의로 1개의 이중 결합, 및 임의로 1개의  $-C(O)NH-$  또는  $-NHC(O)-$  기를 함유하는 브리지를 형성하는 것인
- [0076] 화학식 (I)의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.
- [0077] 제2 측면에서 본 개시내용은 면역 반응의 증진, 자극 및/또는 증가를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 치료상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 면역 반응을 증진, 자극 및/또는 증가시키는 방법을 제공한다. 제2 측면의 제1 실시양태에서 방법은 추가의 작용제를 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 치료상 허용되는 염 전에, 그 후에 또는 그와 동시에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 제2 측면의 제2 실시양태에서 추가의 작용제는 항미생물제, 항바이러스제, 세포독성제 및/또는 면역 반응 조절제이다. 제2 측면 실시양태의 제3 실시양태에서 추가의 작용제는 HDAC 억제제이다. 제2 측면의 제4 실시양태에서 추가의 작용제는 TLR7 및/또는 TLR8 효능제이다.
- [0078] 제3 측면에서 본 개시내용은 암 세포의 성장, 증식 또는 전이의 억제를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 치료상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암 세포의 성장, 증식 또는 전이를 억제하는 방법을 제공한다. 상기 억제는 직접 또는 간접적일 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 제3 측면의 제1 실시양태에서 암은 흑색종, 신세포 암종, 편평 비소세포 폐암 (NSCLC), 비-편평 NSCLC, 결장직장암, 거세-저항성 전립선암, 난소암, 위암, 간세포성 암종, 췌장 암종, 두경부의 편평 세포 암종, 식도, 위장관 및 유방의 암종, 및 혈액 악성종양으로부터 선택된다.
- [0079] 제4 측면에서 본 개시내용은 감염성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 치료상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 제4 측면의 제1 실시양태에서 감염성 질환은 바이러스에 의해 유발된다. 제4 측면의 제2 실시양태에서 바이러스는 HIV, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 포진 바이러스 및 인플루엔자로부터 선택된다.
- [0080] 제5 측면에서 본 개시내용은 패혈성 쇼크의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 1종 이상의 마크로시클릭 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 패혈성 쇼크를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0081] 제6 측면에서 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 적어도 1종의 마크로시클릭 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 PD-L1과 PD-1 및/또는 CD80의 상호작용을 차단하는 방법을 제공한다.
- [0082] R 측쇄가 메틸로 치환된 고리의 부분인 화학식 (I)의 화합물에서, 메틸 기는 마크로시클릭 모 구조의 부분인 탄소를 포함한, 고리 내 임의의 치환가능한 탄소 원자 상에 위치할 수 있는 것으로 이해된다. 본 개시내용의 화합물에서, 수소 이외의 4개의 치환기를 갖고 화학식 (II)의 알파-메틸-치환된 고리가 아닌 고리의 백본 상에 적어도 1개의 탄소가 있다.

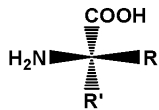


- [0083]
- [0084] 여기서 A는 청구범위에 기재된 바와 같은 고리이고,  $\sim$ 는 마크로시클릭 구조의 나머지 부분에 대한 부착 지점을 나타낸다.
- [0085] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^1$  측쇄는 페닐알라닌, 티로신, 3-티엔-2-일, 4-메틸페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 3-메톡시페닐알라닌, 이소트립토판, 3-메틸페닐알라닌, 1-나프틸알라닌, 3,4-디플루오로페닐알라닌, 4-플루오로페닐알라닌, 3,4-디메톡시페닐알라닌, 3,4-디클로로페닐알라닌, 4-디플루오로메틸페닐알라닌, 2-메틸페닐알라닌, 2-나프틸알라닌, 트립토판, 4-피리디닐, 4-브로모페닐알라닌, 3-피리디닐, 4-트리플루오로메틸페닐알라닌, 4-카르복시페닐알라닌, 4-메톡시페닐알라닌, 비페닐알라닌, 및 3-클로로페닐알라닌; 및 2,4-디아미노부탄이다.

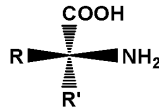
- [0086]  $R^2$ 가 고리의 부분이 아닌 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^2$  측쇄는 알라닌, 세린, 및 글리신이다.
- [0087] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^3$  측쇄는 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 글루타민, 세린, 오르니틴, 리신, 히스티딘, 트레오닌, 류신, 알라닌, 2,3-디아미노프로판, 및 2,4-디아미노부탄이다.
- [0088]  $R^4$ 가 고리의 부분이 아닌 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^4$  측쇄는 발린, 알라닌, 이소류신, 및 글리신이다.
- [0089] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^5$  측쇄는 아미노메탄, 히스티딘, 아스파라긴, 2,3-디아미노프로판, 세린, 글리신, 2,4-디아미노부탄, 트레오닌, 알라닌, 리신, 아스파르트산, 알라닌, 및 3-티아졸릴알라닌이다.
- [0090] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^6$  측쇄는 류신, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 세린, 리신, 3-시클로헥산, 트레오닌, 오르니틴, 2,4-디아미노부탄, 알라닌, 아르기닌, 및 오르니틴 ( $\text{COCH}_3$ )이다.
- [0091]  $R^7$ 이 고리의 부분이 아닌 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^7$  측쇄는 글리신, 2,4-디아미노부탄, 세린, 리신, 아르기닌, 오르니틴, 히스티딘, 아스파라긴, 글루타민, 알라닌, 및 2,4-디아미노부탄 ( $\text{C}(0)$ 시클로부탄)이다.
- [0092] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^8$  측쇄는 트립토판 및 1,2-벤즈이소티아졸리닐알라닌이다.
- [0093] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^9$  측쇄는 세린, 히스티딘, 리신, 오르니틴, 2,4-디부틸아민, 트레오닌, 리신, 글리신, 글루탐산, 발린, 2,3-디아미노프로판, 아르기닌, 아스파르트산, 및 티로신이다.
- [0094] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^{10}$  측쇄는 임의로 치환된 트립토판, 벤즈이소티아졸릴알라닌, 1-나프틸알라닌, 및 메티오닌이다.
- [0095] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^{11}$  측쇄는 노르류신, 류신, 아스파라긴, 페닐알라닌, 메티오닌, 에톡시메탄, 알라닌, 트립토판, 이소류신, 페닐프로판, 글루탐산, 헥산, 및 헵탄이다.
- [0096]  $R^{12}$ 가 고리의 부분이 아닌 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^{12}$  측쇄는 노르류신, 알라닌, 에톡시메탄, 메티오닌, 세린, 페닐알라닌, 메톡시메탄, 류신, 트립토판, 이소류신, 글루탐산, 헥산, 헵탄, 및 글리신이다.
- [0097] 화학식 (I)의 화합물에서, 바람직한  $R^{13}$  측쇄는 아르기닌, 오르니틴, 알라닌, 2,4-디아미노부탄, 2,3-디아미노프로판, 류신, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 리신, 트레오닌, 시클로프로필메탄, 글리신, 발린, 이소류신, 히스티딘, 및 2-아미노부탄이다.
- [0098] 본 개시내용에 따르면, 본 발명자들은 PD-L1에 특이적으로 결합하고 PD-L1과 PD-1 및 CD80의 상호작용을 억제할 수 있는 화합물을 발견하였다. 이들 마크로시클릭 화합물은 시험관내 면역조정 효능을 나타내었으며, 따라서 이는 이들이 암 및 감염성 질환을 포함한 다양한 질환의 치료를 위한 치료 후보가 되게 한다.
- [0099] 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는 단백질 및 결합 분자, 예컨대 화합물 또는 리간드 사이의 상호작용을 지칭한다. 상호작용은 결합 분자에 의해 인지되는 단백질의 특정한 구조 (즉, 효소 결합 부위, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다. 예를 들어, 화합물이 단백질 결합 부위 "A"에 대해 특이적 결합을 갖는 경우에, 결합 부위 A를 포함한 단백질을 함유하는 반응물 중 화합물, 및 단백질 결합 부위 A에 특이적으로 결합하는 표지된 화합물의 존재는 단백질에 결합되는 표지된 화합물의 양을 감소시킬 것이다. 대조적으로, 단백질에 대한 화합물의 비특이적 결합은 단백질로부터 표지된 화합물의 농도-의존성 변위를 발생시키지 않는다.
- [0100] 본 개시내용은 본 화합물에서 발생하는 원자의 모든 동위원소를 포함하는 것으로 의도된다. 동위원소는 동일한 원자 번호를 갖지만 상이한 질량수를 갖는 원자를 포함한다. 일반적 예로서 및 비제한적으로, 수소의 동위원소는 중수소 및 삼중수소를 포함한다. 탄소의 동위원소는  $^{13}\text{C}$  및  $^{14}\text{C}$ 를 포함한다. 본 발명의 동위원소-표지된 화합물은 일반적으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 기술에 의해 또는 본원에 기재된 것들과 유사한 방법에 의해, 달리 사용되는 비-표지된 시약 대신 적절한 동위원소-표지된 시약을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 화합물은, 예를 들어 생물학적 활성을 결정하는데 있어서 표준물 및 시약으로서의, 다양한 잠재적 용도를 가질 수 있다. 안정한 동위원소의 경우에, 이러한 화합물은 생물학적, 약리학적, 또는 약동학적

특성을 유리하게 변형시키는 잠재력을 가질 수 있다.

- [0101] 본원에 기재된 대상의 추가의 측면은 리간드 결합 검정의 개발을 위한 또는 생체내 흡착, 대사, 분포, 수용체 결합 또는 점유, 또는 화합물 배치를 모니터링하기 위한 방사성표지된 리간드로서의 개시된 화합물의 용도이다. 예를 들어, 본원에 기재된 마크로시클릭 화합물은 방사성 동위원소 <sup>125</sup>I를 사용하여 제조될 수 있고, 생성된 방사성표지된 화합물은 결합 검정을 개발하거나 또는 대사 연구를 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 및 동일한 목적상, 본원에 기재된 마크로시클릭 화합물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 촉매 삼중수소화에 의해 방사성표지된 형태로 전환될 수 있다.
- [0102] 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 방사성 추적자를 첨가함으로써 PET 영상화제로서 사용될 수 있다.
- [0103] 바람직한 화합물은 본원에 제공된 마크로시클릭 화합물 중 적어도 1종을 포함하고, 이들 화합물은 제약 조성물 및 조합물에 포함될 수 있다.
- [0104] 본원에 제공된 정의는, 특정 경우에 달리 제한되지 않는 한, 비제한적으로, 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어에 적용된다.
- [0105] 아미노산 및 펩티드 화학 기술분야의 통상의 기술자는 아미노산이 하기 일반 구조에 의해 나타내어지는 화합물을 포함한다는 것을 알고 있다.



**L- 또는 S- $\alpha$ -아미노산**  
(R=H의 경우)



**D- 또는 R- $\alpha$ -아미노산**  
(R=H의 경우)

- [0106]
- [0107] 여기서 R 및 R'는 본원에 논의된 바와 같다.
- [0108] 달리 나타내지 않는 한, 본원에서 단독으로 또는 또 다른 기의 부분으로서 사용된 용어 "아미노산"은, 비제한적으로, "α" 탄소로서 지칭되는 동일한 탄소에 연결된 아미노 기 및 카르복실 기를 포함하고, 여기서 R 및/또는 R'는 수소를 포함한 천연 또는 비천연 측쇄일 수 있다. "α" 탄소에서의 절대 "S" 배위는 통상적으로 "L" 또는 "천연" 배위로서 지칭된다. "R" 및 "R'"(프라임) 치환기 둘 다가 수소로 동일한 경우에, 아미노산은 글리신이며, 키랄이 아니다.
- [0109] 본원에 사용된 용어 "천연 아미노산 측쇄" 및 "천연 발생 아미노산 측쇄"는 통상적으로 S-배위 (즉, L-아미노산)에서의 임의의 천연 발생 아미노산 (즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린)의 측쇄를 지칭한다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "비천연 아미노산 측쇄" 및 "비-천연 발생 아미노산 측쇄"는 통상적으로 R-배위 (즉, D-아미노산)에서의 임의의 천연 발생 아미노산의 측쇄 또는 하기로부터 선택된 R- 또는 S-배위 (즉, 각각 D- 또는 L-아미노산)에서의 천연 발생 아미노산 측쇄 이외의 기를 지칭한다:
- [0111] C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>알케닐, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알콕시C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알콕시카르보닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬술폰아닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 아미도C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 아미노C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 아자인돌릴C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 벤조티아졸릴C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 벤조티에닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 벤질옥시C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 카르복시C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>시클로알킬C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 디페닐메틸, 푸라닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 이미다졸릴C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 나프틸C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 피리디닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 티아졸릴C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 티에닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬;
- [0112] 비페닐이 메틸 기로 임의로 치환된 것인 비페닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬;
- [0113] C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알콕시, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬술폰아닐아미노, 아미도, 아미노, 아미노C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 아미노술폰아닐, 카르복시, 시아노, 할로, 할로C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 히드록시, -NC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 니트로, 및 -OP(O)(OH)<sub>2</sub>로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 기로 임의로 치환된 헤테로시클릴;
- [0114] 인돌릴 부분이 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 카르복시C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 할로, 히드록시, 및 페닐로부터 선택된 1개의 기로 임의로 치환되

고, 여기서 페닐이 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알콕시, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 및 할로로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기에 의해 추가로 임의로 치환된 것인 인돌릴 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬;

[0115] C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알콕시, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬술포닐아미노, 아미도, 아미노, 아미노C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 아미노술포닐, 카르복시, 시아노, 할로, 할로C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 히드록시, -NC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 니트로 및 -OP(O)(OH)<sub>2</sub>로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 기로 임의로 치환된 것인 페닐;

[0116] R<sup>a'</sup> 및 R<sup>b'</sup>가 독립적으로 수소, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>알케닐옥시카르보닐, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬카르보닐, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>시클로알킬카르보닐, 푸라닐카르보닐, 및 페닐카르보닐로부터 선택된 것인 NR<sup>a'</sup>R<sup>b'</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>알킬). 알킬 링커가 1개 초과인 탄소를 함유하는 경우에, 추가의 NR<sup>a'</sup>R<sup>b'</sup>기가쇄 상에 존재할 수 있음.

[0117] R<sup>c'</sup> 및 R<sup>d'</sup>가 독립적으로 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 및 트리페닐메틸로부터 선택된 것인 NR<sup>c'</sup>R<sup>d'</sup>카르보닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬;

[0118] 페닐 부분이 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알콕시, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬술포닐아미노, 아미도, 아미노, 아미노C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 아미노술포닐, 카르복시, 시아노, 할로, 할로C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬, 히드록시, -NC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 니트로 및 -OP(O)(OH)<sub>2</sub>로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 기로 임의로 치환된 것인 페닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬; 및

[0119] 페닐이 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기로 임의로 치환된 것인 페녹시C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬.

[0120] 본원에 사용된 용어 "C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>알케닐"은 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는 2 내지 4개의 탄소 원자의 직쇄 또는 분지쇄 기를 지칭한다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>알케닐"은 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는 2 내지 7개의 탄소 원자의 직쇄 또는 분지쇄 기를 지칭한다.

[0122] 본원에 사용된 용어 "C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>알케닐옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>알케닐 기를 지칭한다.

[0123] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 지칭한다.

[0124] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬 기를 지칭한다.

[0125] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알킬 기를 지칭한다.

[0126] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알콕시C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알콕시 기를 지칭한다.

[0127] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알콕시카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알콕시 기를 지칭한다.

[0128] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알콕시카르보닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알콕시카르보닐 기를 지칭한다.

[0129] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 1 내지 3개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 포화 탄화수소로부터 유래된 기를 지칭한다.

[0130] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬"은 1 내지 4개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 포화 탄화수소로부터 유래된 기를 지칭한다.

[0131] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>알킬"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 포화 탄화수소로부터 유래된 기를 지칭한다.

[0132] 본원에 사용된 용어 "C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬아미노"는 R<sup>1</sup>이 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기인 -NHR<sup>1</sup>을 지칭한다.



- [0133] 본원에 사용된 용어 " $C_1-C_3$ 알킬카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $C_1-C_3$ 알킬 기를 지칭한다.
- [0134] 본원에 사용된 용어 " $C_1-C_3$ 알킬술파닐"은 황 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $C_1-C_3$ 알킬 기를 지칭한다.
- [0135] 본원에 사용된 용어 " $C_1-C_3$ 알킬술파닐 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $C_1-C_3$ 알킬술파닐 기를 지칭한다.
- [0136] 본원에 사용된 용어 " $C_1-C_3$ 알킬술폴닐"은 술폴닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $C_1-C_3$ 알킬 기를 지칭한다.
- [0137] 본원에 사용된 용어 " $C_1-C_3$ 알킬술폴닐아미노"는 아미노 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $C_1-C_3$ 알킬술폴닐 기를 지칭한다.
- [0138] 본원에 사용된 용어 "아미도"는  $-C(O)NH_2$ 를 지칭한다.
- [0139] 본원에 사용된 용어 "아미도 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 아미도 기를 지칭한다.
- [0140] 본원에 사용된 용어 "아미노"는  $-NH_2$ 를 지칭한다.
- [0141] 본원에 사용된 용어 "아미노 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 아미노 기를 지칭한다.
- [0142] 본원에 사용된 용어 "아미노술폴닐"은 술폴닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 아미노 기를 지칭한다.
- [0143] 본원에 사용된 용어 "아자인돌릴 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자에 부착된 아자인돌릴 기를 지칭한다. 아자인돌릴 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0144] 본원에 사용된 용어 "벤조티아졸릴 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자에 부착된 벤조티아졸릴 기를 지칭한다. 벤조티아졸릴 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0145] 본원에 사용된 용어 "벤조티에닐 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자에 부착된 벤조티에닐 기를 지칭한다. 벤조티에닐 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0146] 본원에 사용된 용어 "벤질옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 벤질 기를 지칭한다.
- [0147] 본원에 사용된 용어 "벤질옥시 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 벤질옥시 기를 지칭한다.
- [0148] 본원에 사용된 용어 "비페닐 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 비페닐 기를 지칭한다. 비페닐 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0149] 본원에 사용된 용어 "카르보닐"은  $-C(O)-$ 를 지칭한다.
- [0150] 본원에 사용된 용어 "카르복시"는  $-CO_2H$ 를 지칭한다.
- [0151] 본원에 사용된 용어 "카르복시 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 카르복시 기를 지칭한다.
- [0152] 본원에 사용된 용어 "시아노"는  $-CN$ 을 지칭한다.
- [0153] 본원에 사용된 용어 " $C_3-C_{14}$ 시클로알킬"은 3 내지 14개의 탄소 원자 및 0개의 헤테로원자를 갖는 포화 모노시클릭, 비시클릭, 또는 트리시클릭 탄화수소 고리계를 지칭한다. 비시클릭 및 트리시클릭 고리는 융합되거나, 스피로시클릭이거나, 또는 브리지될 수 있다. 시클로알킬 기의 대표적인 예는 시클로프로필, 시클로펜틸, 비시클로[3.1.1]헵틸, 및 아다만틸을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0154] 본원에 사용된 용어 " $C_3-C_{14}$ 시클로알킬 $C_1-C_3$ 알킬"은  $C_1-C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $C_3-C_{14}$ 시클로알킬 기를 지칭한다.
- [0155] 본원에 사용된 용어 " $C_3-C_{14}$ 시클로알킬카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $C_3-C_{14}$  시클로

알킬 기를 지칭한다.

- [0156] 본원에 사용된 용어 " $C_1$ - $C_3$ 디알킬아미노"는  $R^1$  및  $R^2$ 가 각각 1 내지 3개의 탄소 원자를 함유하는 알킬 기인  $-NR^1R^2$ 를 지칭한다. 기는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0157] 본원에 사용된 용어 "푸라닐 $C_1$ - $C_3$ 알킬"은  $C_1$ - $C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 푸라닐 기를 지칭한다. 푸라닐 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0158] 본원에 사용된 용어 "푸라닐카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 푸라닐 기를 지칭한다.
- [0159] 본원에 사용된 용어 "할로" 및 "할로젠"은 F, Cl, Br 또는 I를 지칭한다.
- [0160] 본원에 사용된 용어 "할로 $C_1$ - $C_3$ 알킬"은 1, 2 또는 3개의 할로젠 원자로 치환된  $C_1$ - $C_3$ 알킬 기를 지칭한다.
- [0161] 본원에 사용된 용어 "할로메틸"은 1, 2 또는 3개의 할로젠 원자로 치환된 메틸 기를 지칭한다.
- [0162] 본원에 사용된 용어 "헤테로시클릴"은 질소, 산소, 및 황으로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 또는 3개의 헤테로 원자를 함유하는 5-, 6-, 또는 7-원 고리를 지칭한다. 5-원 고리는 0 내지 2개의 이중 결합을 갖고, 6- 및 7-원 고리는 0 내지 3개의 이중 결합을 갖는다. 용어 "헤테로시클릴"은 또한 헤테로시클릴 고리가 4- 내지 6-원 방향족 또는 비-방향족 카르보시클릭 고리 또는 또 다른 모노시클릭 헤테로시클릴 기에 융합된 비시클릭 기를 포함한다. 본 개시내용의 헤테로시클릴 기는 기 내의 탄소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된다. 헤테로시클릴 기의 예는 벤조티에닐, 푸릴, 이미다졸릴, 인돌리닐, 인돌릴, 이소티아졸릴, 이소사졸릴, 모르폴리닐, 옥사졸릴, 피페라지닐, 피페리디닐, 피라졸릴, 피리디닐, 피롤리디닐, 피롤로피리디닐, 피롤릴, 티아졸릴, 티에닐, 및 티오모르폴리닐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0163] 본원에 사용된 용어 "히드록시"는  $-OH$ 를 지칭한다.
- [0164] 본원에 사용된 용어 "이미다졸릴 $C_1$ - $C_3$ 알킬"은  $C_1$ - $C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 이미다졸릴 기를 지칭한다. 이미다졸릴 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0165] 본원에 사용된 용어 "인돌릴 $C_1$ - $C_3$ 알킬"은  $C_1$ - $C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 인돌릴 기를 지칭한다. 인돌릴 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0166] 본원에 사용된 용어 "나프틸 $C_1$ - $C_3$ 알킬"은  $C_1$ - $C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 나프틸 기를 지칭한다. 나프틸 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0167] 본원에 사용된 용어 "니트로"는  $-NO_2$ 를 지칭한다.
- [0168] 본원에 사용된 용어 " $NR^{a'}R^{b'}$ "는 질소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 2개의 기,  $R^{a'}$  및  $R^{b'}$ 를 지칭한다.  $R^{a'}$  및  $R^{b'}$ 는 독립적으로 수소,  $C_2$ - $C_4$ 알케닐옥시카르보닐,  $C_1$ - $C_3$ 알킬카르보닐,  $C_3$ - $C_6$ 시클로알킬카르보닐, 푸라닐카르보닐 및 페닐카르보닐로부터 선택된다.
- [0169] 본원에 사용된 용어 " $NR^{a'}R^{b'}(C_1-C_3)$ 알킬"은  $C_1$ - $C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $NR^{a'}R^{b'}$  기를 지칭한다.
- [0170] 본원에 사용된 용어 " $NR^{c'}R^{d'}$ "는 질소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 2개의 기,  $R^{c'}$  및  $R^{d'}$ 를 지칭한다.  $R^{c'}$  및  $R^{d'}$ 는 독립적으로 수소,  $C_1$ - $C_3$ 알킬 및 트리페닐메틸로부터 선택된다.
- [0171] 본원에 사용된 용어 " $NR^{c'}R^{d'}$  카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $NR^{c'}R^{d'}$  기를 지칭한다.
- [0172] 본원에 사용된 용어 " $NR^{c'}R^{d'}$  카르보닐 $C_1$ - $C_3$ 알킬"은  $C_1$ - $C_3$ 알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된  $NR^{c'}R^{d'}$  카르보닐 기를 지칭한다.
- [0173] 본원에 사용된 용어 "페녹시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 페닐 기를 지칭한다.



- [0174] 본원에 사용된 용어 "페녹시C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 페녹시 기를 지칭한다.
- [0175] 본원에 사용된 용어 "페닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 페닐 기를 지칭한다.
- [0176] 본원에 사용된 용어 "페닐카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 페닐 기를 지칭한다.
- [0177] 본원에 사용된 용어 "피리디닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 피리디닐 기를 지칭한다. 피리디닐 기는 기 내의 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0178] 본원에 사용된 용어 "술폰닐"은 -S-를 지칭한다.
- [0179] 본원에 사용된 용어 "술폰닐"은 -SO<sub>2</sub>-를 지칭한다.
- [0180] 본원에 사용된 용어 "티아졸릴C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 티아졸릴 기를 지칭한다. 티아졸릴 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0181] 본원에 사용된 용어 "티에닐C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬"은 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>알킬 기를 통해 모 분자 모이어티에 부착된 티에닐 기를 지칭한다. 티에닐 기는 기 내 임의의 치환가능한 원자를 통해 알킬 모이어티에 부착될 수 있다.
- [0182] 용어 "치료하는"은 (i) 질환, 장애, 및/또는 상태에 대한 소인이 있을 수 있지만, 아직 이를 갖는 것으로 진단되지 않은 환자에서 질환, 장애, 또는 상태가 발생하는 것을 예방하는 것; (ii) 질환, 장애, 또는 상태를 억제하는 것, 즉 그의 진행을 저지하는 것; 및 (iii) 질환, 장애, 또는 상태를 경감시키는 것, 즉, 질환, 장애, 및/또는 상태, 및/또는 상기 질환, 장애, 및/또는 상태와 연관된 증상의 퇴행을 유발하는 것을 지칭한다.
- [0183] PD-L1에 대한 마크로시클릭 화합물의 결합은, 예를 들어 균질 시간-분해 형광 (HTRF), 표면 플라즈몬 공명 (SPR), 등은 적정 열량측정법 (ITC), 핵 자기 공명 분광분석법 (NMR) 등과 같은 방법에 의해 측정될 수 있다. 추가로, 세포 표면 상에서 발현된 PD-L1에 대한 마크로시클릭 화합물의 결합은 본원에 기재된 바와 같이 세포 결합 검정에서 측정될 수 있다.
- [0184] 본원에 기재된 치료제의 투여는, 비제한적으로, 치료 유효량의 치료제의 투여를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치료 유효량"은, 비제한적으로, 본원에 기재된 PD-1/PD-L1 결합 억제제의 조성물의 투여에 의해 치료가능한 상태를 치료 또는 예방하기 위한 치료제의 양을 지칭한다. 그러한 양은 검출가능한 치료 또는 예방 또는 호전 효과를 나타내는데 충분한 양이다. 효과는, 예를 들어 및 비제한적으로, 본원에 열거된 상태의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다. 대상체에 대한 정확한 유효량은 대상체의 크기 및 건강, 치료될 상태의 성질 및 정도, 치료 의사의 권고, 투여를 위해 선택된 치료제 또는 치료제의 조합물에 의존할 것이다. 따라서, 미리 정확한 유효량을 구체화하는 것은 유용하지 않다.
- [0185] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 사용하여 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. 본원에 입증된 바와 같이, 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 PD-L1에 결합할 수 있고, PD-L1 및 PD-1 사이의 상호작용을 방해할 수 있고, PD-1과의 상호작용을 차단하는 것으로 공지되어 있는 항-PD-1 모노클로날 항체와 PD-L1의 결합에 대해 경쟁할 수 있고, CMV-특이적 T 세포 IFN $\gamma$  분비를 증진시킬 수 있고, HIV-특이적 T 세포 IFN $\gamma$  분비를 증진시킬 수 있다. 그 결과, 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 면역 반응을 조정하거나, 암 또는 감염성 질환과 같은 질환을 치료하거나, 보호적 자가면역 반응을 자극하거나, 또는 항원-특이적 면역 반응을 자극하는데 (예를 들어, PD-L1 차단 화합물과 관심 항원의 공투여에 의함) 유용하다.
- [0186] 본 개시내용을 보다 용이하게 이해할 수 있도록, 특정 용어를 먼저 정의한다. 추가의 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 제시된다.
- [0187] 용어 "프로그램화된 사멸 리간드 1", "프로그램화된 세포 사멸 리간드 1", "단백질 PD-L1", "PD-L1", "PDL1", "PDCDL1", "hPD-L1", "hPD-LI", "CD274" 및 "B7-H1"은 상호교환가능하게 사용되며, 인간 PD-L1의 변이체, 이소형, 중 상동체, 및 PD-L1과 적어도 1종의 공동 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 PD-L1 서열은 진뱅크(GENBANK)® 수탁 번호 NP\_054862 하에 발견될 수 있다.
- [0188] 용어 "프로그램화된 사멸 1", "프로그램화된 세포 사멸 1", "단백질 PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" 및 "hPD-I"는 상호교환가능하게 사용되며, 인간 PD-1의 변이체, 이소형, 중 상동체, 및 PD-1과 적어도 1종의 공동 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 PD-1 서열은 진뱅크® 수탁 번호 U64863 하에 발견될 수 있다.

- [0189] 용어 "세포독성 T 림프구-연관 항원-4", "CTLA-4", "CTLA4", "CTLA-4 항원" 및 "CD152" (예를 들어, 문헌 [Murata, Am. J. Pathol., 155:453-460 (1999)] 참조)는 상호교환가능하게 사용되며, 인간 CTLA-4의 변이체, 이소형, 중 상동체, 및 CTLA-4와 적어도 1종의 공통 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Balzano, Int. J. Cancer Suppl., 7:28-32 (1992)] 참조). 완전한 CTLA-4 핵산 서열은 진뱅크® 수탁 번호 L15006 하에 발견될 수 있다.
- [0190] 용어 "면역 반응"은 병원체가 침입한 인간 신체, 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암성 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적 염증의 경우에 정상 인간 세포 또는 조직에 대한 선택적인 손상, 그의 파괴 또는 그로부터의 제거를 유발하는, 예를 들어 림프구, 항원 제시 세포, 식세포, 과립구 및 상피 세포 또는 간에 의해 생산되는 가용성 거대분자 (마크로사이클, 시토카인 및 보체 포함)의 작용을 지칭한다.
- [0191] 본원에 사용된 "유해 사건" (AE)은 의학적 치료의 사용과 연관된 임의의 불리하고 일반적으로 의도되지 않는, 심지어 바람직하지 않은, 징후 (비정상적 실험실 발견 포함), 증상 또는 질환이다. 예를 들어, 유해 사건은 치료에 반응하여 면역계의 활성화 또는 면역계 세포 (예를 들어, T 세포)의 확장과 연관될 수 있다. 의학적 치료는 하나 이상의 연관 AE를 가질 수 있고, 각각의 AE는 동일하거나 상이한 수준의 중증도를 가질 수 있다. "유해 사건을 변경할" 수 있는 방법에 대한 언급은 상이한 치료 요법의 사용과 연관된 한 가지 이상의 AE의 발생 및/또는 중증도를 감소시키는 치료 요법을 의미한다.
- [0192] 본원에 사용된 "과다증식성 질환"은 세포 성장이 정상 수준을 초과하여 증가된 상태를 지칭한다. 예를 들어, 과다증식성 질환 또는 장애는 악성 질환 (예를 들어, 식도암, 결장암, 담도암) 및 비-악성 질환 (예를 들어, 아테롬성동맥경화증, 양성 증식증 및 양성 전립선 비대)을 포함한다.
- [0193] 본원에 사용된 "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정 시, 특정한 값에 대해 허용 오차 범위 내를 의미하고, 이는 부분적으로 값이 어떻게 측정 또는 결정되는지에 따라, 즉 측정 시스템의 한계에 의존할 것이다. 예를 들어, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 관련 기술분야에서 실시할 때마다 1 또는 1 초과의 표준 편차 내에 있다는 것을 의미할 수 있다. 대안적으로, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 20% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 게다가, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여, 상기 용어는 값의 한 자릿수 이하 또는 5-배 이하를 의미할 수 있다. 특정한 값이 본 출원 및 청구범위에 제공되는 경우에, 달리 언급되지 않는 한, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"의 의미는 상기 특정한 값에 대한 허용가능한 오차 범위 내에 있는 것으로 가정되어야 한다.
- [0194] 본원에 기재된 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비 범위 또는 정수 범위는 달리 나타내지 않는 한, 언급된 범위 내의 임의의 정수 값, 및 적절한 경우에, 그의 분율 (예컨대 정수의 1/10 및 1/100)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0195] 경쟁 검정
- [0196] 본 개시내용은 또한 참조 항-PD-L1 항체 (MDX-1105)의 결합과 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 및 적어도 약 100%만큼 경쟁할 수 있는 마크로시클릭 화합물에 관한 것이다. 이러한 마크로시클릭 화합물은, PD-L1에 특이적으로 결합하는 것을 단서로 돌연변이체, 보존적 치환, 기능적 치환, 및 결실 형태를 포함한, 본원에 개시된 1종 이상의 마크로시클릭 화합물과 구조적 상동성을 공유할 수 있다. 예를 들어, 마크로시클릭 화합물이 참조 항-PD-L1 항체와 동일한 영역의 PD-L1에 실질적으로 결합하는 경우에, 마크로시클릭 화합물은 항-PD-L1 모노클로날 항체가 결합하는 PD-L1 에피토프와 적어도 중첩되는 PD-L1의 에피토프에 결합할 것이다. 중첩 영역은 1개의 아미노산 잔기에서 수백개의 아미노산 잔기의 범위일 수 있다. 마크로시클릭 화합물은 이어서 PD-L1에 대한 항-PD-L1 모노클로날 항체의 결합과 경쟁하고/거나 그러한 결합을 차단하며, 그에 의해 PD-L1에 대한 항-PD-L1 모노클로날 항체의 결합을 경쟁 검정에서 바람직하게는 적어도 약 50%만큼 감소시킬 것이다.
- [0197] 경쟁 검정 목적을 위한 참조 항체로서 사용될 수 있는 항-PD-L1 항체는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 하기 대표 항-PD-L1 항체가 사용될 수 있다: MDX-1105 (BMS); L01X-C (세로노), L1X3 (세로노), MSB-0010718C (세로노) 및 PD-L1 프로바디 (시툼엑스) 및 공동-소유한 WO 2007/005874에 개시된 PD-L1 항체.
- [0198] 경쟁 검정 목적을 위한 참조 항체로서 사용될 수 있는 항-PD-1 항체는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 하기 대표 항-PD-1 항체가 사용될 수 있다: 니블루맵 (BMS); 각각 공동-소유한 미국 특허 번호 8,008,449 (BMS)에 개시된 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 및 5F4, MK-3475 (머크, 미국 특허 번호 8,168,757에 개시됨) 및 미국 특허 번호 7,488,802에 개시된 항체.

- [0199] 제약 조성물
- [0200] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된, 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물 중 하나 또는 그의 조합을 함유하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 본 개시내용의 (예를 들어, 2종 이상의 상이한) 마크로시클릭 화합물, 또는 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 하나 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 제약 조성물은 표적 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하거나 또는 보체 활성을 갖는 마크로시클릭 화합물 (또는 면역접합체 또는 이중특이체)의 조합을 포함할 수 있다.
- [0201] 본 개시내용의 제약 조성물은 또한 조합 요법으로, 즉 다른 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 적어도 1종의 다른 항염증제 또는 면역억제제와 조합된 마크로시클릭 화합물을 포함할 수 있다. 조합 요법에 사용될 수 있는 치료제의 예는 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물의 사용에 대한 섹션에서 보다 상세하게 기재된다.
- [0202] 본원에 사용된 "제약상 허용되는 담체"는 생리학상 상용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의함)에 적합하다. 투여 경로에 의존하여, 활성 화합물, 즉 마크로시클릭 화합물, 면역접합체, 또는 이중특이적 분자는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 다른 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅될 수 있다.
- [0203] 본 개시내용의 제약 화합물은 1종 이상의 제약상 허용되는 염을 포함할 수 있다. "제약상 허용되는 염" 또는 "치료상 허용되는 염"은 모 화합물의 목적하는 생물학적 활성을 보유하고 임의의 목적하지 않는 독성학적 효과를 제공하지 않는 염을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci., 66:1-19 (1977)] 참조). 이러한 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 비독성 무기 산, 예컨대 염산, 질산, 인산, 황산, 브로민화수소산, 아이오딘화수소산, 아인산 등으로부터 유래된 것, 뿐만 아니라 비독성 유기 산, 예컨대 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유래된 것을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리 토금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등으로부터 유래된 것 뿐만 아니라 비독성 유기 아민, 예컨대 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유래된 것을 포함한다.
- [0204] 본 개시내용의 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 항산화제의 예는 하기를 포함한다: (1) 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 유용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시 아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이트화제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.
- [0205] 본 개시내용의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0206] 이들 조성물은 또한 아주반트 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물 존재의 방지는 상기의 멸균 절차, 및 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시키는 것 둘 다에 의해 보장될 수 있다. 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물 내에 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 제약 형태의 지속 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시키는 것에 의해 이루어질 수 있다.
- [0207] 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 비상용성이 아닌 한, 본 개시내용의 제약 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물 내에 혼합될 수 있다.
- [0208] 치료 조성물은 전형적으로 멸균되고 제조 및 저장 조건 하에 안정하여야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조로서 제제화될 수 있다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의

적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물 내에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 지속 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시키는 것에 의해 이루어질 수 있다.

[0209] 멸균 주사가 가능한 용액은 필요량의 활성 화합물을 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합과 함께 적절한 용매 중에 혼입시키고, 이어서 필요에 따라 멸균 마이크로여과하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 혼입시켜 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 활성 성분 플러스 이전에 멸균-여과된 그의 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 산출하는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이다.

[0210] 담체 물질과 조합되어 단일 투여 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 치료될 대상체, 및 특정한 투여 방식에 의존하여 달라질 것이다. 담체 물질과 조합되어 단일 투여 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 100 퍼센트 중 이와 같은 양은 제약상 허용되는 담체와의 조합에서 약 0.01 퍼센트 내지 약 99 퍼센트의 활성 성분, 바람직하게는 약 0.1 퍼센트 내지 약 70 퍼센트, 가장 바람직하게는 약 1 퍼센트 내지 약 30 퍼센트의 활성 성분의 범위일 것이다.

[0211] 투여 요법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 여러 분할 용량이 시간의 경과에 따라 투여될 수 있거나, 또는 치료 상황의 위급성에 의해 지시되는 바와 같이 용량이 비례적으로 감소되거나 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단위 투여량으로서 적합화된 물리적 이산 단위를 지칭하고; 각각의 단위는 필요한 제약 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 개시내용의 투여 단위 형태에 대한 세부사항은 (a) 활성 화합물의 고유 특징 및 달성하고자 하는 특정한 치료 효과, 및 (b) 개체에서의 감수성 처리를 위한 이러한 활성 화합물을 배합하는 관련 기술분야에서의 내재적 제한에 의해 좌우되며 그에 직접적으로 의존한다.

[0212] 마크로시클릭 화합물의 투여의 경우에, 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 및 보다 통상적으로 0.01 내지 5 mg/kg 숙주 체중의 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중일 수 있거나, 또는 1-10 mg/kg 범위 내일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 1일에 1회, 1일에 2회, 1주에 2회, 1주에 3회, 매주, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월에 1회, 3개월마다 1회, 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여를 수반한다. 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물에 대한 바람직한 투여 요법은 정맥내 투여를 통한 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중을 포함하며, 마크로사이클은 하기 투여 스케줄 중 하나를 사용하여 주어진다: (i) 6회의 투여량 동안 4주마다, 이어서 3개월마다; (ii) 3주마다; (iii) 3 mg/kg 체중으로 1회에 이어서 1 mg/kg 체중으로 3주마다.

[0213] 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 2종 이상의 마크로시클릭 화합물이 동시에 투여되고, 이러한 경우에 투여되는 각각의 화합물의 투여량은 지시된 범위 내에 속한다. 화합물은 통상적으로 다수회 투여된다. 단일 투여량 사이의 간격은, 예를 들어 매주, 매월, 3개월마다 또는 매년일 수 있다. 또한, 환자에서 표적 항원에 대한 마크로시클릭 화합물의 혈액 수준을 측정함으로써 지시되는 바와 같이 간격이 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서 투여량은 약 1-1000 .mu.g/ml, 일부 방법에서는 약 25-300 .mu.g/ml의 혈장 농도가 달성되도록 조정된다.

[0214] 대안적으로, 덜 빈번한 투여가 요구되는 경우에 마크로시클릭 화합물은 지속 방출 제제로서 투여될 수 있다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지의 여부에 의존하여 달라질 수 있다. 예방 용도에서, 비교적 낮은 투여량이 비교적 덜 빈번한 간격으로 장기간에 걸쳐 투여된다. 일부 환자는 그의 여생 동안 계속 치료를 받는다. 치료 용도에서, 질환의 진행이 감소되거나 종결될 때까지, 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 호전을 나타낼 때까지 비교적 짧은 간격의 비교적 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 환자에게 예방 요법을 투여할 수 있다.

[0215] 본 개시내용의 제약 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이지 않으면서, 특정한 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 목적하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 달라질 수 있다. 선택되는 투여량 수준은 사용되는 본 개시내용의 특정한 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의



활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정한 화합물의 배출 속도, 치료의 지속기간, 사용되는 특정한 조성물과 조합되어 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적 건강 및 과거 병력, 및 의학 기술분야에 널리 공지된 기타 인자를 포함한 다양한 약동학적 인자에 의존할 것이다.

[0216] 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물의 "치료 유효 투여량"은 바람직하게는 질환 증상 중증도의 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속기간의 증가, 또는 질환 고통으로 인한 장애 또는 불능의 예방을 생성한다. 예를 들어, 종양의 치료를 위해, "치료 유효 투여량"은 비치료된 대상체에 비해 바람직하게는 적어도 약 20%만큼, 보다 바람직하게는 적어도 약 40%만큼, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 60%만큼, 보다 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 80%만큼 세포 성장 또는 종양 성장을 억제한다. 종양 성장 및/또는 HIV를 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효능 또는 바이러스 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 조성물의 이러한 특성은 숙련된 진료의에게 공지된 검정에 의해 시험관내에서 이러한 억제를 억제하는 화합물의 능력을 검사함으로써 평가될 수 있다. 치료 화합물의 치료 유효량은 대상체에서 종양 크기를 감소시키거나, 바이러스 로드를 감소시키거나, 또는 달리 증상을 호전시킬 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 대상체의 크기, 대상체의 증상의 중증도, 및 선택된 특정한 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자에 기초하여 이러한 양을 결정할 수 있을 것이다.

[0217] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 마크로시클릭 화합물 및 또 다른 면역조정제를 포함하는 부분들의 제약 키트를 제공한다. 키트는 또한 추가로 과다증식성 질환 (예컨대 본원에 기재된 바와 같은 암) 및/또는 항바이러스 질환의 치료에 사용하기 위한 지침서를 포함할 수 있다.

[0218] 본 개시내용의 조성물은 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법 중 1종 이상을 사용하여 1종 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 통상의 기술자에 의해 인지될 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 의존하여 달라질 것이다. 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물에 대한 바람직한 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입에 의하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 어구 "비경구 투여"는 통상적으로 주사에 의한, 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 각피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0219] 대안적으로, 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 비-비경구 경로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로를 통해, 예를 들어 비강내로, 경구로, 질로, 직장으로, 설하로 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0220] 활성 화합물은 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함한, 급속 방출에 대해 화합물을 보호할 담체, 예컨대 제어 방출 제제와 함께 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제의 제조를 위한 많은 방법이 특허받았거나 또는 일반적으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Robinson, J.R., ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York (1978)]을 참조한다.

[0221] 치료 조성물은 관련 기술분야에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 치료 조성물은 무바늘 피하 주사 장치, 예컨대 미국 특허 번호 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, 또는 4,596,556에 개시된 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 본 개시내용에 유용한 널리 공지된 이식물 및 모듈의 예는 하기를 포함한다: 제어된 속도로 의약을 분배하는 이식가능한 마이크로-주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 번호 4,487,603; 피부를 통해 의약을 투여하는 치료 장치를 개시하고 있는 미국 특허 번호 4,486,194; 정확한 주입 속도로 의약을 전달하기 위한 의약 주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 번호 4,447,233; 연속적 약물 전달을 위한 가변 유동식 이식가능한 주입 장치를 개시하고 있는 미국 특허 번호 4,447,224; 다중-챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 번호 4,439,196; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 번호 4,475,196. 이들 특허는 본원에 참고로 포함된다. 많은 다른 이러한 이식물, 전달 시스템 및 모듈이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0222] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 생체내 적절한 분포를 보장하도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽 (BBB)은 많은 고도로 친수성인 화합물을 배제시킨다. 본 개시내용의 치료 화합물이 (원하는 경우에) BBB를 횡단하도록 보장하기 위해, 이들은 예를 들어 리포솜 내에 제제화될 수 있다. 리포솜의 제조 방법에 대해, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,522,811, 5,374,548 및 5,399,331을 참조한다. 리포솜은 구체적 세포 또는 기관 내로 선택적으로 수송되어, 따라서 표적화 약물 전달을 증진시키는 1개 이상의 모이어티를

포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ranade, V.V., J. Clin. Pharmacol., 29:685 (1989)] 참조). 예시적인 표적화 모이어터는 폴레이트 또는 비오틴 (예를 들어, 로우 등의 미국 특허 번호 5,416,016 참조); 만노시드 (Umezawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 153:1038 (1988)); 마크로사이클 (Bloeman, P.G. et al., FEBS Lett., 357:140 (1995); Owais, M. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 39:180 (1995)); 게면활성제 단백질 A 수용체 (Briscoe et al., Am. J. Physiol., 1233:134 (1995)); p120 (Schreier et al., J. Biol. Chem., 269:9090 (1994))을 포함하고; 또한 문헌 [Keinanen, K. et al., FEBS Lett., 346:123 (1994); Killion, J.J. et al., Immunomethods 4:273 (1994)]을 참조한다.

[0223] 본 개시내용의 용도 및 방법

[0224] 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물, 조성물 및 방법은, 예를 들어 PD-L1의 검출, 또는 PD-L1의 차단에 의한 면역 반응의 증진을 수반하는 수많은 시험관내 및 생체내 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이들 분자는 배양물 중, 시험관내 또는 생체의 세포에, 또는 인간 대상체, 예를 들어 생체내 투여되어 다양한 상황에서 면역을 증진시킬 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 투여하여 상기 대상체에서 면역 반응이 조정되도록 하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 면역 반응을 조정하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 반응은 증진되거나, 자극되거나, 또는 상향-조절된다. 다른 측면에서, 마크로시클릭 화합물은 항-시노, 항-마우스, 및/또는 항-우드척 결합 및 치료 활성을 가질 수 있다.

[0225] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 비-인간 동물은 모든 척추 동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 우드척, 양서류 및 파충류를 포함하지만, 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소 및 말이 바람직하다. 바람직한 대상체는 면역 반응의 증진을 필요로 하는 인간 환자를 포함한다. 상기 방법은 T-세포 매개 면역 반응을 증대시킴으로써 치료될 수 있는 장애를 갖는 인간 환자를 치료하는데 특히 적합하다. 특정한 실시양태에서, 상기 방법은 생체내 암 세포의 치료에 특히 적합하다. 면역의 항원-특이적 증진을 달성하기 위해, 마크로시클릭 화합물은 관심 항원과 함께 투여될 수 있다. PD-L1에 대한 마크로시클릭 화합물을 또 다른 작용제와 함께 투여하는 경우에, 이 둘은 임의의 순서로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0226] 본 개시내용은 추가로, 샘플 및 대조군 샘플을 인간, 우드척, 시노 및/또는 마우스 PD-L1에 특이적으로 결합하는 참조 마크로시클릭 화합물과, 마크로사이클 및 인간, 우드척, 시노, 및/또는 마우스 PD-L1 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에 접촉시키는 것을 포함하는, 샘플에서 인간, 우드척, 시노 및/또는 마우스 PD-L1 항원의 존재를 검출하거나 또는 인간, 우드척, 시노 및/또는 마우스 PD-L1 항원의 양을 측정하는 방법을 제공한다. 이어서, 복합체의 형성이 검출되고, 여기서 대조군 샘플과 비교하여 샘플 사이에 복합체 형성의 차이는 샘플 내 인간, 우드척, 시노 및/또는 마우스 PD-L1 항원의 존재를 나타낸다.

[0227] CD28, ICOS 및 CTLA-4와 비교하여 PD-L1에 대한 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물의 특이적 결합을 고려하면, 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 세포의 표면 상의 PD-L1 발현을 특이적으로 검출하는데 사용될 수 있고, 더욱이, 면역진화성 정제를 통해 PD-L1을 정제하는데 사용될 수 있다.

[0228] 암

[0229] 마크로시클릭 화합물에 의한 PD-1의 차단은 환자에서 암성 세포에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. PD-1에 대한 리간드인 PD-L1은 정상 인간 세포에서는 발현되지 않지만, 다양한 인간 암에서 풍부하다 (Dong et al., Nat. Med., 8:787-789 (2002)). PD-1 및 PD-L1 사이의 상호작용은 종양 침윤 림프구에서의 감소, T-세포 수용체 매개 증식에서의 감소, 및 암성 세포에 의한 면역 회피를 초래한다 (Dong et al., J. Mol. Med., 81:281-287 (2003); Blank et al., Cancer Immunol. Immunother., 54:307-314 (2005); Konishi et al., Clin. Cancer Res., 10:5094-5100 (2004)). 면역 억제제는 PD-L1에 대한 PD-1의 국부 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있고, 그 효과는 PD-L2에 대한 PD-1의 상호작용이 또한 차단되는 경우에 부가된다 (Iwai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99:12293-12297 (2002); Brown et al., J. Immunol., 170:1257-1266 (2003)). 이전 연구는 T-세포 증식이 PD-L1에 대한 PD-1의 상호작용을 억제함으로써 회복될 수 있음을 밝혀내었지만, PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하는 것에 의한 생체내 암 종양 성장에 대한 직접적인 효과에 대한 어떠한 보고도 없었다. 한 측면에서, 본 개시내용은 암성 종양의 성장이 억제되도록, 마크로시클릭 화합물을 사용한 대상체의 생체내 치료에 관한 것이다. 마크로시클릭 화합물은 암성 종양의 성장을 억제하기 위해 단독으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 마크로시클릭 화합물은 하기 기재된 바와 같이 다른 면역원성 작용제, 표준 암 치료, 또는 다른 마크로시클릭 화합물과 함께 사용될 수 있다.

- [0230] 따라서, 한 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 마크로시클릭 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0231] 그의 성장이 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 사용하여 억제될 수 있는 바람직한 암은 전형적으로 면역요법에 반응성인 암을 포함한다. 치료를 위해 바람직한 암의 비제한적 예는 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 신세포 암종 (예를 들어, 투명 세포 암종), 전립선암 (예를 들어, 호르몬 불응성 전립선 선암종 및 거세-저항성 전립선암), 유방암, 결장직장암 및 폐암 (예를 들어, 편평 및 비-편평 비소세포 폐암)을 포함한다. 추가적으로, 본 개시내용은 그의 성장이 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 사용하여 억제될 수 있는 불응성 또는 재발성 악성종양을 포함한다.
- [0232] 본 개시내용의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 다른 암의 예는 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안 내 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 결장암, 직장암, 항문부암, 위암, 고환암, 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 요도암, 음경암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병을 포함한 만성 또는 급성 백혈병, 소아기 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신 생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양암, 편평세포암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유발된 것을 포함한 환경적으로 유발된 암, 및 상기 암의 조합을 포함한다. 본 개시내용은 또한 전이성 암, 특히 PD-L1을 발현하는 전이성 암의 치료에 유용하다 (Iwai et al., Int. Immunol., 17:133-144 (2005)).
- [0233] 임의로, PD-L1에 대한 마크로시클릭 화합물은 면역원성 작용제, 예컨대 암성 세포, 정제된 종양 항원 (제조합 단백질, 화합물 및 탄수화물 분자 포함), 세포, 및 면역 자극 시토카인 코딩 유전자로 형질감염된 세포와 조합될 수 있다 (He et al., J. Immunol., 173:4919-4928 (2004)). 사용될 수 있는 종양 백신의 비제한적 예는 흑색종 항원의 펩티드, 예컨대 gp100, MAGE 항원, Trp-2, MART1 및/또는 티로시나제의 펩티드, 또는 시토카인 GM-CSF를 발현하도록 형질감염된 종양 세포를 포함한다 (하기에 추가로 논의됨).
- [0234] 인간에서, 일부 종양 예컨대 흑색종은 면역원성인 것으로 밝혀졌다. PD-L1 차단에 의해 T 세포 활성화의 역치를 상승시키는 것에 의해, 본 발명자들은 숙주에서 종양 반응을 활성화시킬 것을 예상할 수 있는 것으로 기대된다.
- [0235] PD-L1 차단은 백신접종 프로토콜과 조합될 때 가장 효과적인 가능성이 있다. 종양에 대한 백신접종을 위한 많은 실험적 전략이 고안되었다 (문헌 [Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring: 414-428 (2000); Foon, K., ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000)] 참조; 또한 문헌 [Restifo, N. et al., Cancer Vaccines, Chapter 61, pp. 3023-3043, in DeVita, V. et al., eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition (1997)] 참조). 이들 전략 중 하나에서, 백신은 자가 또는 동종 종양 세포를 사용하여 제조된다. 이들 세포성 백신은 GM-CSF를 발현하도록 종양 세포가 형질도입될 때 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다. GM-CSF는 종양 백신접종을 위한 항원 제시의 강력한 활성화제로 밝혀졌다 (Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543 (1993)).
- [0236] 다양한 종양에서 유전자 발현 및 대규모 유전자 발현 패턴의 연구는 소위 종양 특이적 항원에 대한 정의로 이어졌다 (Rosenberg, S.A., Immunity, 10:281-287 (1999)). 많은 경우에, 이들 종양 특이적 항원은 종양 및 종양이 발생한 세포에서 발현되는 분화 항원, 예를 들어 멜라닌세포 항원 gp100, MAGE 항원, 및 Trp-2이다. 보다 중요하게는, 이들 항원 중 많은 것은 숙주에서 발견되는 종양 특이적 T 세포의 표적인 것으로 제시될 수 있다. PD-L1 차단을 종양에서 발현되는 제조합 단백질 및/또는 펩티드의 수집과 함께 사용하여 이들 단백질에 대한 면역 반응을 생성할 수 있다. 이들 단백질은 자기 항원으로서 면역계에 의해 정상적으로 인식되고, 따라서 이들에 대해 관용성이다. 종양 항원은 또한, 염색체의 텔로미어의 합성에 필요하고 85% 초과인 인간 암에서 및 단지 제한된 수의 체세포 조직에서 발현되는 단백질 텔로머라제를 포함할 수 있다 (Kim, N et al., Science, 266:2011-2013 (1994)). (이들 체세포 조직은 다양한 수단에 의해 면역 공격으로부터 보호될 수 있음). 또한, 종양 항원은 단백질 서열을 변경하거나 또는 2개의 관련되지 않은 서열 사이의 융합 단백질 (즉, 필라텔피아 염색체 내의 bcr-abl), 또는 B 세포 종양으로부터의 이디오타입을 생성하는 체세포 돌연변이 때문에 암 세포에서 발현되는 "신생-항원"일 수 있다.
- [0237] 다른 종양 백신은 인간 암에 연루된 바이러스 예컨대 인간 유두종 바이러스 (HPV), 간염 바이러스 (HBV 및 HCV) 및 카포시 포진 육종 바이러스 (KHSV)로부터의 단백질을 포함할 수 있다. PD-L1 차단과 함께 사용될 수 있는



또 다른 형태의 종양 특이적 항원은 종양 조직 자체로부터 단리된 정제된 열 쇼크 단백질 (HSP)이다. 이러한 열 쇼크 단백질은 종양 세포로부터의 단백질의 단편을 함유하고, 이들 HSP는 종양 면역을 도출하기 위한 항원 제시 세포로의 전달에 고도로 효율적이다 (Suot, R. et al., Science, 269:1585-1588 (1995); Tamura, Y. et al., Science, 278:117-120 (1997)).

[0238] 수지상 세포 (DC)는 항원-특이적 반응을 촉발하는데 사용될 수 있는 강력한 항원 제시 세포이다. DC는 생체의 생산되고, 다양한 단백질 및 펩티드 항원 뿐만 아니라 종양 세포 추출물로 로딩될 수 있다 (Nestle, F. et al., Nat. Med., 4:328-332 (1998)). DC는 또한, 이들 종양 항원을 또한 발현시키기 위해 유전적 수단에 의해 형질도입될 수 있다. 또한, DC는 면역화를 위해 종양 세포에 직접 융합되었다 (Kugler, A. et al., Nat. Med., 6:332-336 (2000)). 백신접종 방법으로서, DC 면역화는 보다 강력한 항종양 반응을 활성화시키기 위해 PD-L1 차단과 효과적으로 조합될 수 있다.

[0239] PD-L1 차단은 또한 표준 암 치료와 조합될 수 있다. PD-L1 차단은 화학요법과 효과적으로 조합될 수 있다. 이들 경우에, 투여되는 화학요법 시약의 용량을 감소시키는 것이 가능할 수 있다 (Mokyr, M. et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998)). 이러한 조합의 예는 흑색종의 치료를 위한 데카르바진과 조합된 마크로시클릭 화합물이다. 이러한 조합의 또 다른 예는 흑색종의 치료를 위한 인터루킨-2 (IL-2)와 조합된 마크로시클릭 화합물이다. PD-L1 차단 및 화학요법의 조합 사용을 뒷받침하는 과학적 근거는 대부분의 화학요법 화합물의 세포독성 작용의 결과인 세포 사멸이 항원 제시 경로에서 종양 항원의 수준을 증가시켜야 한다는 것이다. 세포 사멸을 통한 PD-L1 차단과 상승작용을 유발할 수 있는 다른 조합 요법은 방사선요법, 수술 및 호르몬 박탈이다. 각각의 이들 프로토콜은 숙주에서 종양 항원의 공급원을 생성한다. 또한, 혈관신생 억제제가 PD-L1 차단과 조합될 수 있다. 혈관신생의 억제는 숙주 항원 제시 경로 내로 종양 항원을 공급할 수 있는 종양 세포 사멸로 이어진다.

[0240] PD-L1 차단 마크로시클릭 화합물은 또한 Fc 알파 또는 Fc 감마 수용체-발현 이펙터 세포를 종양 세포로 표적화하는 이중특이적 마크로사이클과 조합되어 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,922,845 및 5,837,243 참조). 이중특이적 마크로사이클은 2개의 개별 항원을 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-Fc 수용체/항 종양 항원 (예를 들어, Her-2/neu) 이중특이적 마크로사이클이 대식세포를 종양 부위에 대해 표적화하기 위해 사용되었다. 이 표적화는 종양 특이적 반응을 보다 효과적으로 활성화시킬 수 있다. 이들 반응의 T 세포 아군은 PD-L1 차단의 사용에 의해 증대될 것이다. 대안적으로, 항원은 종양 항원 및 수지상 세포 특이적 세포 표면 마커에 결합하는 이중특이적 마크로사이클의 사용에 의해 DC에 직접 전달될 수 있다.

[0241] 종양은 매우 다양한 메카니즘에 의해 숙주 면역 감시를 피한다. 이들 메카니즘 중 많은 것은, 종양에 의해 발현되고 면역억제성인 단백질의 불활성화에 의해 극복될 수 있다. 이들은 특히, TGF-베타 (Kehrl, J. et al., J. Exp. Med., 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. et al., Immunology Today, 13:198-200 (1992)), 및 Fas 리간드 (Hahne, M. et al., Science, 274:1363-1365 (1996))를 포함한다. 각각의 이들 개체에 대한 마크로시클릭 화합물은 면역억제제의 효과를 상쇄시키고 숙주에 의한 종양 면역 반응을 유리하게 하기 위해 항-PD-L1과 조합되어 사용될 수 있다.

[0242] 숙주 면역 반응성을 활성화시키기 위해 사용될 수 있는 다른 마크로시클릭 화합물은 항-PD-L1과 조합되어 사용될 수 있다. 이들은 DC 기능 및 항원 제시를 활성화시키는 수지상 세포의 표면 상의 분자를 포함한다. 항-CD40 마크로시클릭 화합물은 T 세포 헬퍼 활성을 효과적으로 대체할 수 있고 (Ridge, J. et al., Nature, 393:474-478 (1998)), PD-1 항체와 함께 사용될 수 있다 (Ito, N. et al., Immunobiology, 201(5):527-540 (2000)). 마크로시클릭 화합물을 T 세포 공동자극 분자 예컨대 CTLA-4 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,811,097), OX-40 (Weinberg, A. et al., Immunol., 164:2160-2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. et al., Nat. Med., 3:682-685 (1997)), 및 ICOS (Hutloff, A. et al., Nature, 397:262-266 (1999))에 대해 활성화시키는 것은 또한 증가된 수준의 T 세포 활성화를 제공할 수 있다.

[0243] 골수 이식은 조혈계 기원의 다양한 종양의 치료를 위해 현재 사용된다. 이식편 대 숙주 질환은 이러한 치료의 결과이지만, 이식편 대 종양 반응으로부터 치료 이익을 획득할 수 있다. 공여자 생착 종양 특이적 T 세포의 유효성을 증가시키기 위해 PD-L1 차단이 사용될 수 있다.

[0244] 또한, 항원 특이적 T 세포의 생체의 활성화 및 확장 및 종양에 대한 항원-특이적 T 세포를 자극하기 위한 이들 세포의 수용자 내로의 입양 전달을 수반하는 여러 실험적 치료 프로토콜이 존재한다 (Greenberg, R. et al., Science, 285:546-551 (1999)). 또한, 이들 방법은 감염원 예컨대 CMV에 대한 T 세포 반응을 활성화시키는데 사용될 수 있다. 마크로시클릭 화합물의 존재 하에서의 생체의 활성화는 입양 전달된 T 세포의 빈도 및 활성을



증가시키는 것으로 예상될 수 있다.

[0245] 감염성 질환

[0246] 본 개시내용의 다른 방법은 특정한 독소 또는 병원체에 노출되었던 환자를 치료하는데 사용된다. 따라서, 본 개시내용의 또 다른 측면은 대상체에게 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 투여하여 상기 대상체가 감염성 질환에 대해 치료되도록 하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0247] 상기 논의된 바와 같은 종양에 대한 적용과 유사하게, PD-L1 차단은 병원체, 독소 또는 자기-항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 단독으로 또는 아주반트로서 백신과 조합되어 사용될 수 있다. 이 치료 접근법이 특히 유용할 수 있는 병원체의 예는 현재 효과적인 백신이 없는 병원체, 또는 통상적인 백신이 완전하게 효과적이지는 않은 병원체를 포함한다. 이들은, HIV, 간염 (A, B, 및 C), 인플루엔자, 포진, 지아르디아, 말라리아 (Butler, N.S. et al., Nature Immunology 13, 188-195 (2012); Hafalla, J.C.R., et al. PLOS Pathogens; February 2, 2012)), 리슈마니아(Leishmania), 스태필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas Aeruginosa)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. PD-L1 차단은 감염 과정에 걸쳐 변경된 항원을 제시하는 HIV와 같은 작용제에 의해 확립된 감염에 대해 특히 유용하다. 이들 신규 에피토프는 항-인간 PD-L1 투여 시에 외래물질로서 인식되고, 따라서 PD-L1을 통한 음성 신호에 의해 약화되지 않는 강한 T 세포 반응을 유발한다.

[0248] 본 개시내용의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 바이러스의 일부 예는 HIV, 간염 (A, B 또는 C), 포진 바이러스 (예를 들어, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, 및 CMV, 엡스타인 바르(Epstein Barr) 바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코로나 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 볼거리 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파르보 바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기 바이러스, 유두종바이러스, 연속종 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스 뇌염 바이러스를 포함한다.

[0249] 본 개시내용의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 박테리아의 일부 예는 클라미디아(chlamydia), 리케치아 박테리아(rickettsial bacteria), 미코박테리아(mycobacteria), 스태필로코쿠스(staphylococci), 스트렙토코쿠스(streptococci), 뉴모노코쿠스(pneumococci), 메닝고코쿠스(meningococci) 및 코노코쿠스(conococci), 클레브시엘라(klebsiella), 프로테우스(proteus), 세라티아(serratia), 슈도모나스(pseudomonas), 레지오넬라(legionella), 디프테리아(diphtheria), 살모넬라(salmonella), 바실루스(bacilli), 콜레라(cholera), 파상풍, 보툴리눔독소증, 탄저병, 흑사병, 렙토스피라증 및 라임병 박테리아를 포함한다.

[0250] 본 개시내용의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 진균의 일부 예는 칸디다(Candida) (알비칸스(albicans), 크루세이(krusei), 글라브라타(glabrata), 트로피칼리스(tropicalis) 등), 크립토코쿠스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 아스페르길루스(Aspergillus) (푸미가투스(fumigatus), 니거(niger) 등), 뮤코랄레스(Mucorales) 속 (뮤코르(mucor), 압시디아(absidia), 리조푸스(rhizophus)), 스포로트릭스 쉐נק키이(Sporothrix schenckii), 블라스토미세스 더마티티디스(Blastomyces dermatitidis), 파라코시디오이데스 브라실리엔시스(Paracoccidioides brasiliensis), 콕시디오이데스 임미티스(Coccidioides immitis) 및 히스토플라스마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum)을 포함한다.

[0251] 본 개시내용의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 기생충의 일부 예는 엔트아메바 히스톨리티카(Entamoeba histolytica), 발란티디움 콜라이(Balantidium coli), 네글레리아포울레리(Naegleriafowleri), 아칸트아메바(Acanthamoeba) 중, 지아르디아 람비아(Giardia lamblia), 크립토스포리디움(Cryptosporidium) 중, 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii), 플라스모디움 비박스(Plasmodium vivax), 바베시아 미크로티(Babesia microti), 트리파노소마 브루세이(Trypanosoma brucei), 트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi), 리슈마니아 도노바니(Leishmania donovani), 톡소플라스마 곤디(Toxoplasma gondi) 및 니포스트롱길루스 브라실리엔시스(Nippostrongylus brasiliensis)를 포함한다.

[0252] 상기 모든 방법에서, PD-L1 차단은 다른 형태의 면역요법 예컨대 시토카인 치료 (예를 들어, 인터페론, VEGF 활성 또는 VEGF-수용체를 표적화하는 작용제, GM-CSF, G-CSF, IL-2), 또는 종양 항원의 증진된 제시를 제공하는 이중특이적 항체 요법 (예를 들어, 문헌 [Holliger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993); Poljak, Structure, 2:1121-1123 (1994)] 참조)과 조합될 수 있다.

[0253] 자가면역 반응

[0254] 마크로시클릭 화합물은 자가면역 반응을 유발하고 증폭시킬 수 있다. 실제로, 종양 세포 및 펩티드 백신을 사

용한 항-종양 반응의 유도는 많은 항-종양 반응이 항-자기 반응성 (항-CTLA-4+GM-CSF-변형된 B 16 흑색종에서 관찰된 탈색소, (van Elsas et al. supra); Trp-2 백신접종된 마우스에서의 탈색소 (Overwijk, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2982-2987 (1999)); TRAMP 종양 세포 백신 (Hurwitz, A., supra (2000)), 흑색종 펩티드 항원 백신접종에 의해 유발된 자가면역 전립선염 및 인간 임상 시험에서 관찰된 백반증 (Rosenberg, S.A. et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol., 19(1):81-84 (1996))을 수반하는 것으로 밝혀진다.

[0255] 따라서, 질환 치료를 위해 이들 자기 단백질에 대한 면역 반응을 효과적으로 생성하도록 백신접종 프로토콜을 고안하기 위해 항-PD-L1 차단을 다양한 자기 단백질과 함께 사용하는 것을 고려하는 것이 가능하다. 예를 들어, 알츠하이머병은 뇌에서 아밀로이드 침착물 내에 A.베타. 펩티드의 부적절한 축적을 수반하고; 아밀로이드에 대한 항체 반응은 이들 아밀로이드 침착물을 제거할 수 있다 (Schenk et al., Nature, 400:173-177 (1999)).

[0256] 알레르기 및 천식의 치료를 위한 IgE, 및 류마티스 관절염을 위한 TNF.알파와 같은 다른 자기 단백질이 또한 표적으로서 사용될 수 있다. 최종적으로, 다양한 호르몬에 대한 항체 반응이 본원에 개시된 마크로사이클의 사용에 의해 유도될 수 있다. 생식 호르몬에 대한 중화 항체 반응은 피임을 위해 사용될 수 있다. 특정한 종양의 성장을 위해 요구되는 호르몬 및 다른 가용성 인자에 대한 중화 항체 반응이 또한 가능한 백신접종 표적으로서 고려될 수 있다.

[0257] 항-PD-L1 마크로사이클의 사용에 대해 상기 기재된 바와 유사한 방법은 다른 자기-항원, 예컨대 알츠하이머병에서의 A.베타.를 포함한 아밀로이드 침착물, 시토카인 예컨대 TNF.알파., 및 IgE의 부적절한 축적을 갖는 환자를 치료하기 위해 치료적 자가면역 반응의 유도를 위해 사용될 수 있다.

[0258] 백신

[0259] 마크로사이클릭 화합물은 관심 항원 (예를 들어, 백신)과 항-PD-1 마크로사이클의 공투여에 의해 항원-특이적 면역 반응을 자극하는데 사용될 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서 본 개시내용은 대상체에게 (i) 항원; 및 (ii) 항-PD-1 마크로사이클을 투여하여 상기 대상체에서 항원에 대한 면역 반응이 증진되도록 하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 항원은, 예를 들어 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원 또는 병원체로부터의 항원일 수 있다. 이러한 항원의 비제한적 예는 상기 섹션에서 논의된 것, 예컨대 상기 논의된 종양 항원 (또는 종양 백신), 또는 바이러스, 박테리아 또는 상기 기재된 다른 병원체로부터의 항원을 포함한다.

[0260] 본 개시내용의 조성물 (예를 들어, 마크로사이클릭 화합물, 다중특이적 및 이중특이적 분자, 및 면역접합체)을 생체내 및 시험관내 투여하는 적합한 경로는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 통상의 기술자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 주사에 의해 (예를 들어, 정맥내 또는 피하) 투여될 수 있다. 사용된 분자의 적합한 투여량은 대상체의 연령 및 체중 및 조성물의 농도 및/또는 제제에 의존할 것이다.

[0261] 이전에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 마크로사이클릭 화합물은 1종 이상의 다른 치료제, 예를 들어 세포독성제, 방사성독성제 또는 면역억제제와 공-투여될 수 있다. 화합물은 작용제에 연결될 수 있거나 (면역복합체로서), 작용제와 개별 투여될 수 있다. 후자의 경우에 (개별 투여), 화합물은 작용제의 전에, 후에 또는 그와 공동으로 투여될 수 있거나, 또는 다른 공지된 요법, 예를 들어 항암 요법, 예를 들어 방사선과 공-투여될 수 있다. 이러한 치료제는 특히 그 자체로는 환자에게 독성 또는 준독성인 수준에서만 효과적인 항신생물제, 예컨대 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로람부실, 데카르바진 및 시클로포스파미드 히드록시우레아를 포함한다. 시스플라틴은 100 mg/용량으로서 4주마다 1회 정맥내로 투여되고, 아드리아마이신은 60-75 mg/ml 용량으로서 21일마다 1회 정맥내로 투여된다. 본 개시내용의 마크로사이클릭 화합물과 화학요법제의 공-투여는 인간 종양 세포에 세포독성 효과를 산출하는 상이한 메커니즘을 통해 작동하는 2종의 항암제를 제공한다. 이러한 공-투여는 화합물에 비반응성이 되게 할 약물에 대한 저항성의 발생 또는 종양 세포의 항원성에서의 변화로 인한 문제점을 해결할 수 있다.

[0262] 본 개시내용의 조성물 (예를 들어, 마크로사이클릭 화합물, 이중특이적 또는 다중특이적 분자, 또는 면역접합체) 및 사용에 대한 지침서를 포함하는 키트가 또한 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 키트는 적어도 1종의 추가의 시약, 또는 1종 이상의 추가의 본 개시내용의 마크로사이클릭 화합물 (예를 들어, 마크로사이클과 구분되는 PD-L1 항원 내의 에피토프에 결합하는 보체 활성을 갖는 인간 항체)을 추가로 함유할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물의 의도되는 용도를 지시하는 라벨을 포함한다. 용어 라벨은 키트 상에 또는 키트와 함께

공급되거나, 또는 달리 키트에 동반되는 임의의 문서 또는 기록물을 포함한다.

[0263] 조합 요법

[0264] 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물과 또 다른 PD-L1 길항제 및/또는 다른 면역조절제의 조합은 과다증식성 질환에 대한 면역 반응의 증진을 위해 유용하다. 예를 들어, 이들 분자는 배양물 중, 시험관내 또는 생체의 세포에, 또는 인간 대상체에, 예를 들어 생체내 투여되어 다양한 상황에서 면역을 증진시킬 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 투여하여 상기 대상체에서 면역 반응이 조정되도록 하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 면역 반응을 조정하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 반응은 증진되거나, 자극되거나, 또는 상황-조절된다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물 및 치료 용량 미만의 또 다른 면역조절제를 투여하는 것을 포함하는, 면역자극 치료제에 의한 과다증식성 질환의 치료와 연관된 유해 사건을 변경하는 방법을 제공한다.

[0265] 마크로시클릭 화합물에 의한 PD-L1의 차단은 환자에서 암성 세포에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 사용하여 성장을 억제시킬 수 있는 암은, 면역요법에 전형적으로 반응성인 암을 포함한다. 본 개시내용의 조합 요법에 의한 치료를 위한 암의 대표적인 예는 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 신암, 전립선암, 유방암, 결장암 및 폐암을 포함한다. 본 개시내용의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 다른 암의 예는 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부암, 위암, 고환암, 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 요도암, 음경암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병을 포함한 만성 또는 급성 백혈병, 소아기 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피양암, 편평세포암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유발된 것을 포함한 환경적으로 유발된 암, 및 상기 암의 조합을 포함한다. 본 개시내용은 또한 전이성 암의 치료에 유용하다.

[0266] 특정 실시양태에서, 본원에 논의된 적어도 1종의 마크로시클릭 화합물을 함유하는 치료제의 조합물은 제약상 허용되는 담체 중의 단일 조성물로서 공동으로 투여될 수 있거나, 또는 개별 조성물로서 공동으로 투여될 수 있고, 여기서 각각의 작용제는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 제2 면역조절제 및 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 제2 면역조절제가 첫 번째로 투여되고 마크로시클릭 화합물이 두 번째로 투여되거나, 또는 마크로시클릭 화합물이 첫 번째로 투여되고 제2 면역조절제가 두 번째로 투여되는 것과 같이, 순차적으로 투여될 수 있다. 게다가, 하나 초과 용량의 조합 요법이 순차적으로 투여되는 경우에, 순차적 투여의 순서는 각각의 투여 시점에서 역전되거나 동일한 순서로 유지될 수 있거나, 순차적 투여가 공동 투여, 또는 그의 임의의 조합과 조합될 수 있다. 예를 들어, 제2 면역조절제 및 마크로시클릭 화합물의 제1 투여는 공동일 수 있고, 제2 투여는 제2 면역조절제 첫 번째 및 마크로시클릭 화합물 두 번째로 순차적일 수 있고, 제3 투여는 마크로시클릭 화합물 첫 번째 및 제2 면역조절제 두 번째 등으로 순차적일 수 있다. 또 다른 대표적인 투여 계획은 마크로시클릭 화합물을 첫 번째 및 제2 면역조절제를 두 번째로 순차적인 제1 투여를 수반할 수 있고, 후속 투여는 공동일 수 있다.

[0267] 임의로, 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제의 조합은 면역원성 작용제, 예컨대 암성 세포, 정제된 종양 항원 (제조합 단백질, 펩티드 및 탄수화물 분자 포함), 세포, 및 면역 자극 시토카인 코딩 유전자로 형질감염된 세포와 추가로 조합될 수 있다 (He et al., J. Immunol., 173:4919-4928 (2004)). 사용될 수 있는 종양 백신의 비제한적 예는 흑색종 항원의 펩티드, 예컨대 gp100, MAGE 항원, Trp-2, MART1 및/또는 티로시나제의 펩티드, 또는 시토카인 GM-CSF를 발현하도록 형질감염된 종양 세포를 포함한다 (하기에 추가로 논의됨).

[0268] 조합 PD-L1 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제는 백신접종 프로토콜과 추가로 조합될 수 있다. 종양에 대한 백신접종을 위한 많은 실험적 전략이 고안되었다 (문헌 [Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C., ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring: 414-428 (2000); Foon, K., ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000)] 참조; 또한 문헌 [Restifo et al., Cancer Vaccines, Chapter 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al., eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition (1997)] 참조). 이들 전략 중 하나에서, 백신은 자가 또는 동종 종양 세포를 사용하여 제조된다. 이들 세포성 백신은 GM-CSF를 발현하도록 종양 세포가 형질도입될 때 가장 효과적인 것으로 밝혀졌다. GM-CSF는 종양 백신접종을 위한 항원 제시의 강력한 활성화제로 밝혀졌다 (Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:3539-3543

(1993)).

- [0269] 다양한 종양에서 유전자 발현 및 대규모 유전자 발현 패턴의 연구는 소위 종양 특이적 항원에 대한 정의로 이어졌다 (Rosenberg, Immunity, 10:281-287 (1999)). 많은 경우에, 이들 종양 특이적 항원은 종양 및 종양이 발생한 세포에서 발현되는 분화 항원, 예를 들어 멜라닌세포 항원 gp100, MAGE 항원, 및 Trp-2이다. 보다 중요하게는, 이들 항원 중 많은 것은 숙주에서 발견되는 종양 특이적 T 세포의 표적인 것으로 제시될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조합 PD-L1 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제를 종양에서 발현되는 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 수집과 함께 사용하여 이들 단백질에 대한 면역 반응을 생성할 수 있다. 이들 단백질은 자기-항원으로서 면역계에 의해 정상적으로 인식되고, 따라서 이들에 대해 관용성이다. 종양 항원은 또한, 염색체의 텔로미어의 합성에 필요하고 85% 초과인 인간 암에서 및 단지 제한된 수의 체세포 조직에서 발현되는 단백질 텔로머라제를 포함할 수 있다 (Kim et al., Science, 266:2011-2013 (1994)). (이들 체세포 조직은 다양한 수단에 의해 면역 공격으로부터 보호될 수 있음). 또한, 종양 항원은 단백질 서열을 변경하거나 또는 2개의 관련되지 않은 서열 사이의 융합 단백질 (즉, 필라델피아 염색체 내의 bcr-abl), 또는 B 세포 종양으로부터의 이디오타입을 생성하는 체세포 돌연변이 때문에 암 세포에서 발현되는 "신생-항원"일 수 있다.
- [0270] 다른 종양 백신은 인간 암에 연루된 바이러스, 예컨대 인간 유두종 바이러스 (HPV), 간염 바이러스 (HBV 및 HCV) 및 카포시 포진 육종 바이러스 (KHSV)로부터의 단백질을 포함할 수 있다. PD-L1 마크로시클릭 화합물 차단과 함께 사용될 수 있는 또 다른 형태의 종양 특이적 항원은 종양 조직 자체로부터 단리된 정제된 열 쇼크 단백질 (HSP)이다. 이들 열 쇼크 단백질은 종양 세포로부터의 단백질의 단편을 함유하고, 이들 HSP는 종양 면역을 도출하기 위한 항원 제시 세포로의 전달에 고도로 효율적이다 (Suot et al., Science, 269:1585-1588 (1995); Tamura et al., Science, 278:117-120 (1997)).
- [0271] 수지상 세포 (DC)는 항원-특이적 반응을 촉발하는데 사용될 수 있는 강력한 항원 제시 세포이다. DC는 생체외 생산되고, 다양한 단백질 및 펩티드 항원 뿐만 아니라 종양 세포 추출물로 로딩될 수 있다 (Nestle et al., Nat. Med., 4:328-332 (1998)). DC는 또한, 이들 종양 항원을 또한 발현시키기 위해 유전적 수단에 의해 형질도입될 수 있다. 또한, DC는 면역화를 위해 종양 세포에 직접 융합되었다 (Kugler et al., Nat. Med., 6:332-336 (2000)). 백신접종 방법으로서, DC 면역화는 보다 강력한 항종양 반응을 활성화시키기 위해 조합 항-PD-L1 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제와 효과적으로 추가로 조합될 수 있다.
- [0272] 조합 항-PD-L1 마크로시클릭 화합물 및 추가의 면역조절제는 또한 표준 암 치료와 추가로 조합될 수 있다. 예를 들어, 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제의 조합은 화학요법과 효과적으로 조합될 수 있다. 이들 경우에, 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제의 조합에 의해 관찰되는 바와 같이, 본 개시내용의 조합물과 함께 투여되는 다른 화학요법 시약의 용량을 감소시키는 것이 가능할 수 있다 (Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998)). 이러한 조합의 예는 흑색종의 치료를 위한 데카르바진과 추가로 조합된 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제의 조합이다. 또 다른 예는 흑색종의 치료를 위한 인터류킨-2 (IL-2)와 추가로 조합된 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제의 조합이다. PD-L1 마크로시클릭 화합물 및 또 다른 면역조절제와 화학요법의 조합 사용을 뒷받침하는 과학적 근거는 대부분의 화학요법 화합물의 세포독성 작용의 결과인 세포 사멸이 항원 제시 경로에서 종양 항원의 수준을 증가시켜야 한다는 것이다. 세포 사멸을 통한 조합 항-PD-L1 마크로시클릭 화합물 및 추가의 면역조절제와 상승작용을 유발할 수 있는 다른 조합 요법은 방사선요법, 수술 또는 호르몬 박탈을 포함한다. 각각의 이들 프로토콜은 숙주에서 종양 항원의 공급원을 생성한다. 또한, 혈관신생 억제제가 조합 PD-L1 및 제2 면역조절제와 조합될 수 있다. 혈관신생의 억제는, 또한 숙주 항원 제시 경로 내로 공급되는 종양 항원의 공급원일 수 있는, 종양 세포 사멸로 이어진다.
- [0273] PD-L1 및 또 다른 면역조절제의 조합은 또한 Fc.알파. 또는 Fc.감마. 수용체-발현 이펙터 세포를 종양 세포로 표적화하는 이중특이적 마크로사이클과 조합되어 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,922,845 및 5,837,243 참조). 이중특이적 마크로사이클은 2개의 개별 항원을 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-Fc 수용체/항 종양 항원 (예를 들어, Her-2/neu) 이중특이적 마크로사이클이 대식세포를 종양 부위에 대해 표적화하기 위해 사용되었다. 이 표적화는 종양 특이적 반응을 보다 효과적으로 활성화시킬 수 있다. 이들 반응의 T 세포 아암은 조합 PD-L1 및 제2 면역조절제의 사용에 의해 증대될 것이다. 대안적으로, 항원은 종양 항원 및 수지상 세포 특이적 세포 표면 마커에 결합하는 이중특이적 마크로사이클의 사용에 의해 DC에 직접 전달될 수 있다.
- [0274] 또 다른 예에서, 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제의 조합은 항-신생물성 마크로시클릭 작용제, 예컨대 리툭산(RITUXAN)® (리툭시맙), 헤르셉틴(HERCEPTIN)® (트라스투주맙), 벡사르(BEXXAR)® (토시투모맙), 제발



린(ZEVALIN)® (이브리투모맵), 캄파트(CAMPATH)® (알렘투주맵), 림포사이드(Lymphocide) (에프라투주맵), 아바스틴(AVASTIN)® (베바시주맵) 및 타르세바(TARCEVA)® (에를로티닙) 등과 함께 사용될 수 있다. 예로서 이론에 얽매이는 것을 원하지 않으면서, 항암 항체 또는 독소에 접합된 항암 항체에 의한 치료는 암 세포 사멸 (예를 들어, 종양 세포)로 이어질 수 있고, 이는 제2 면역조절제 표적 또는 PD-L1에 의해 매개되는 면역 반응을 강화시킬 것이다. 예시적 실시양태에서, 과다증식성 질환 (예를 들어, 암 종양)의 치료는 마크로시클릭 화합물 및 제2 면역조절제와 공동으로 또는 순차적으로 또는 그의 임의의 조합으로 조합된 항암 항체를 포함할 수 있고, 이는 숙주에 의한 항종양 면역 반응을 강화시킬 수 있다.

[0275] 종양은 매우 다양한 메커니즘에 의해 숙주 면역 감시를 피한다. 이들 메커니즘 중 많은 것은 종양에 의해 발현 되고 면역억제성인 단백질의 불활성화에 의해 극복될 수 있다. 이들은, 특히, TGF- $\beta$ . (Kehrl, J. et al., J. Exp. Med., 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. et al., Immunology Today, 13:198-200 (1992)), 및 Fas 리간드 (Hahne, M. et al., Science, 274:1363-1365 (1996))를 포함한다. 또 다른 예에서, 각각의 이들 개체에 대한 항체는 면역억제제의 효과를 상쇄시키고 숙주에 의한 항종양 면역 반응을 유리하게 하기 위해 마크로시클릭 화합물 및 또 다른 면역조절제와 추가로 조합될 수 있다.

[0276] 숙주 면역 반응성을 활성화시키기 위해 사용될 수 있는 다른 작용제는 추가로 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물과 조합되어 사용될 수 있다. 이들은 DC 기능 및 항원 제시를 활성화시키는 수지상 세포의 표면 상의 분자를 포함한다. 항-CD40 마크로시클릭 펩티드는 T 세포 헬퍼 활성을 효과적으로 대체할 수 있고 (Ridge, J. et al., Nature, 393:474-478 (1998)), 단독의 또는 항-CTLA-4 조합과 조합된 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물과 함께 사용될 수 있다 (Ito, N. et al., Immunobiology, 201(5):527-540 (2000)). 마크로시클릭 화합물을 T 세포 공동자극 분자, 예컨대 OX-40 (Weinberg, A. et al., Immunol., 164:2160-2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. et al., Nat. Med., 3:682-685 (1997)), 및 ICOS (Hutloff, A. et al., Nature, 397:262-266 (1999))에 대해 활성화시키는 것은 또한 증가된 수준의 T 세포 활성화를 제공할 수 있다.

[0277] 골수 이식은 조혈계 기원의 다양한 종양의 치료를 위해 현재 사용된다. 이식편 대 숙주 질환은 이러한 치료의 결과이지만, 이식편 대 종양 반응으로부터 치료 이익을 획득할 수 있다. 공여자 생착 종양 특이적 T 세포의 유효성을 증가시키기 위해 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물이 단독으로 또는 또 다른 면역조절제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0278] 또한, 항원 특이적 T 세포의 생체의 활성화 및 확장 및 종양에 대한 항원-특이적 T 세포를 자극하기 위한 이들 세포의 수용자 내로의 입양 전달을 수반하는 여러 실험적 치료 프로토콜이 존재한다 (Greenberg, R. et al., Science, 285:546-551 (1999)). 또한, 이들 방법은 감염원, 예컨대 CMV에 대한 T 세포 반응을 활성화시키는데 사용될 수 있다. 단독으로 또는 또 다른 면역조절제와 조합된 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물의 존재 하에 서의 생체의 활성화는 입양 전달된 T 세포의 빈도 및 활성을 증가시키는 것으로 예상될 수 있다.

[0279] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물을 치료 용량 미만의 또 다른 면역조절제와 조합하여 투여하는 것을 포함하는, 면역자극제에 의한 과다증식성 질환의 치료와 연관된 유해 사건을 변경하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용의 방법은 환자에게 비흡수성 스테로이드를 투여함으로써 면역자극 치료 항체-유발된 결장염 또는 설사의 발생률을 감소시키는 방법을 제공한다. 면역자극 치료 항체를 제공받을 임의의 환자가 이러한 치료에 의해 유발되는 결장염 또는 설사 발생 위험이 있기 때문에, 이러한 전체 환자 집단은 본 개시내용의 방법에 따른 요법에 적합하다. 스테로이드가 염증성 장 질환 (IBD)을 치료하고 IBD의 악화를 예방하기 위해 투여되었을지라도, 이는 IBD로 진단되지 않은 환자에서 IBD를 예방하기 (그의 발생률을 감소시키기) 위해 사용되지 않았다. 스테로이드, 심지어 비흡수성 스테로이드는 그와 연관된 유의한 부작용으로 인해 예방적 용도를 좌절시켰다.

[0280] 추가 실시양태에서, 단독으로 또는 또 다른 면역조절제와 조합된 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 임의의 비흡수성 스테로이드의 사용과 추가로 조합될 수 있다. 본원에 사용된 "비-흡수성 스테로이드"는 광범위한 일차 통과 대사를 나타내어, 간에서 대사 후에 스테로이드의 생체이용률이 낮은, 즉 약 20% 미만인 글루코코르티코이드이다. 본 개시내용의 한 실시양태에서, 비흡수성 스테로이드는 부테소니드이다. 부테소니드는 국부-작용 글루코코르티코스테로이드이고, 이것은 경구 투여 후에 주로 간에 의해 광범위하게 대사된다. 엔토코르트(ENTOCORT)® EC (아스트라-제네카)는 회장으로 및 결장 전체로의 약물 전달을 최적화하기 위해 개발된 부테소니드의 pH- 및 시간-의존적 경구 제제이다. 엔토코르트® EC는 회장 및/또는 상행 결장을 수반한 경증 내지 중등도 크론병의 치료를 위해 미국에서 승인받았다. 크론병의 치료를 위한 엔토코르트® EC의 통상의 경구 투여량은 6 내지 9 mg/일이다. 엔토코르트® EC는 장에서 방출된 후, 소화관 점막에서 흡수되고 유지된다. 장 점

막 표적 조직의 통과 시, 엔토코르트® EC는 간에서 시토크롬 P450 시스템에 의해 무시가능한 글루코코르티코이드 활성을 갖는 대사물로 광범위하게 대사된다. 따라서, 생체이용률은 낮다 (약 10%). 부테소니드의 낮은 생체이용률은 덜 광범위한 일차 통과 대사를 갖는 다른 글루코코르티코이드에 비해 개선된 치료 비를 생성한다. 부테소니드는 전신-작용 코르티코스테로이드보다 덜한 시상하부-뇌하수체 억제제를 포함한 보다 적은 부작용을 야기한다. 그러나, 엔토코르트® EC의 만성 투여는 전신 글루코코르티코이드 효과 예컨대 부신피질기능항진증 및 부신 억제제를 유발할 수 있다. 문헌 [Physicians' Desk Reference Supplement, 58th Edition, 608-610 (2004)]을 참조한다.

[0281] 추가 실시양태에서, 비흡수성 스테로이드와 함께 PD-L1 및 또 다른 면역조절제의 조합은 살리실레이트와 추가로 조합될 수 있다. 살리실레이트는 5-ASA 작용제, 예컨대 예를 들어: 술파살라진 (아줄피딘(AZULFIDINE)®, 파마시아 & 업존(Pharmacia & Upjohn)); 올살라진 (디펜툼(DIPENTUM)®, 파마시아 & 업존); 발살라지드 (콜라잘(COLAZAL)®, 살릭스 파마슈티칼스, 인크.(Salix Pharmaceuticals, Inc.); 및 메살라민 (아사콜(ASACOL)®, 프록터 & 갬블 파마슈티칼스(Procter & Gamble Pharmaceuticals); 펜타사(PENTASA)®, 샤이어 유에스(Shire US); 카나사(CANASA)®, 액스칸 스칸디팜, 인크.(Axcan Scandipharm, Inc.); 로와사(ROWASA)®, 솔베이(Solvay))을 포함한다.

[0282] 투여량 및 제제화

[0283] 화학식 I의 적합한 화합물, 또는 보다 구체적으로 본원에 기재된 마크로시클릭 화합물은 화합물 단독으로서 또는 제약 제제의 형태로 허용되는 담체와 혼합되어 당뇨병 및 다른 관련 질환을 치료하기 위해 환자에게 투여될 수 있다. 당뇨병을 치료하는 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이러한 치료를 필요로 하는 인간을 포함한 포유 동물에 대한 화합물의 투여량 및 투여 경로를 용이하게 결정할 수 있다. 투여 경로는 경구, 경구내, 직장, 경피, 협측, 비강내, 폐, 피하, 근육내, 피내, 설하, 결장내, 안구내, 정맥내, 또는 장 투여를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 화합물은 허용되는 제약 실시를 기반으로 한 투여 경로에 따라 제제화된다 (Fingl et al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, Chapter 1, p. 1 (1975); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

[0284] 본원에 기재된 제약상 허용되는 화합물 조성물은 다중 투여 형태, 예컨대 정제, 캡슐 (각각 지속 방출 또는 시한성 방출 제제를 포함함), 환제, 분말, 과립, 엘릭시르, 계내 겔, 마이크로구체, 결정질 복합체, 리포솜, 마이크로-에멀전, 덩크제, 현탁액, 시럽, 에어로졸 스프레이 및 에멀전으로 투여될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 또한, 모두 제약 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 투여 형태를 사용하여, 경구, 정맥내 (볼루스 또는 주입), 복강내, 피하, 경피로 또는 근육내 형태로 투여될 수 있다. 조성물은 단독으로 투여될 수 있지만, 일반적으로 선택된 투여 경로 및 표준 제약 실시를 기준으로 선택된 제약 담체와 함께 투여될 것이다.

[0285] 본원에 기재된 조성물에 대한 투여 요법은, 물론, 공지된 인자, 예컨대 특정한 작용제의 약역학적 특징, 및 그의 투여 방식 및 경로; 수용자의 종, 연령, 성별, 건강, 의학적 상태 및 체중; 증상의 속성 및 정도; 공동 치료의 종류; 치료 빈도; 투여 경로, 환자의 신장 및 간 기능, 및 목적하는 효과에 의존하여 달라질 것이다. 의사 또는 수의사는 질환 상태의 진행을 예방, 상쇄 또는 정지시키는데 필요한 약물의 유효량을 결정하고 처방할 수 있다.

[0286] 일반적 지침에 따라, 활성 성분의 1일 경구 투여량은 표시된 효과를 위해 사용되는 경우에, 약 0.001 내지 1000 mg/kg 체중, 바람직하게는 1일에 약 0.01 내지 100 mg/kg 체중, 및 가장 바람직하게는 약 0.6 내지 20 mg/kg/일의 범위일 것이다. 정맥내로의 활성 성분의 1일 투여량은 표시된 효과를 위해 사용되는 경우에 일정한 속도의 주입 동안 분당/Kg 체중당 0.001 ng 내지 100.0 ng의 범위일 것이다. 이러한 일정한 정맥내 주입은 바람직하게는 분당/Kg 체중당 0.01 ng 내지 50 ng의 속도에서, 가장 바람직하게는 분당/Kg 체중당 0.01 ng 내지 10.0 mg의 속도에서 투여될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 단일 1일 용량으로 투여될 수 있거나, 또는 총 1일 투여량이 1일에 2, 3, 또는 4회의 분할 용량으로 투여될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 또한 목적하는 바에 따라 일/주/개월의 기간에 걸쳐 약물의 지속 방출을 가능하게 할 데포 제제에 의해 투여될 수 있다.

[0287] 본원에 기재된 조성물은 비강내 형태로 적합한 비강내 비히클의 국소 사용을 통해, 또는 경피 피부 패치를 사용한 경피 경로를 통해 투여될 수 있다. 경피 전달 시스템의 형태로 투여되는 경우에, 투여량 투여는, 물론, 투여 요법 전반에 걸쳐 간헐적이기보다는 연속적일 것이다.

[0288] 조성물은 전형적으로, 의도된 투여 형태, 즉 경구 정제, 캡슐, 엘릭시르, 추진제의 존재 또는 부재 하에 생성된 에어로졸 스프레이 및 시럽에 대해 적합하게 선택되고 통상적인 제약 실시와 부합하는, 적합한 제약 희석제, 부

형제 또는 담체 (본원에서 제약 담체로서 집합적으로 지칭됨)와의 혼합물로 투여된다.

- [0289] 예를 들어, 정제 또는 캡슐 형태로의 경구 투여를 위해, 활성 약물 성분은 경구, 비-독성, 제약상 허용되는 불활성 담체, 예컨대 비제한적으로, 락토스, 전분, 수크로스, 글루코스, 메틸 셀룰로스, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 만니톨 및 소르비톨과 조합될 수 있고; 액체 형태로의 경구 투여를 위해, 경구 약물 성분은 임의의 경구, 비-독성, 제약상 허용되는 불활성 담체, 예컨대, 비제한적으로, 에탄올, 글리세롤, 및 물과 조합될 수 있다. 더욱이, 원하거나 필요한 경우에, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 착색제가 또한 혼합물에 혼입될 수 있다. 적합한 결합제는 전분, 젤라틴, 천연 당, 예컨대, 비제한적으로, 글루코스 또는 베타-락토스, 옥수수 감미제, 천연 및 합성 검, 예컨대 아카시아, 트라카칸트 또는 알긴산나트륨, 카르복시메틸셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜 및 왁스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 투여 형태에 사용되는 윤활제는 올레산나트륨, 스테아르산나트륨, 스테아르산마그네슘, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨 및 염화나트륨을 포함한다. 붕해제는 전분, 메틸 셀룰로스, 한천, 벤토나이트 및 크산탄 겜을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0290] 본원에 기재된 조성물은 또한 혼합 미셀 또는 리포솜 전달 시스템, 예컨대 소형 단층 소포, 대형 단층 소포 및 다층 소포 형태로 투여될 수 있다. 리포솜은 다양한 인지질, 예컨대 콜레스테롤, 스테아릴아민 또는 포스파티딜콜린으로부터 형성될 수 있다. 투과 증진제가 약물 흡수를 증진시키기 위해 첨가될 수 있다.
- [0291] 전구약물이 제약의 수많은 바람직한 특성 (즉, 용해도, 생체이용률, 제조성 등)을 증진시키는 것으로 공지되어 있기 때문에, 본원에 기재된 화합물은 전구약물 형태로 전달될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 대상은 본원에 청구된 화합물의 전구약물, 그의 전달 방법, 및 그를 함유하는 조성물을 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0292] 본원에 기재된 조성물은 또한 표적화가능한 약물 담체로서 가용성 중합체와 커플링될 수 있다. 이러한 중합체는 폴리비닐-피롤리돈, 피란 공중합체, 폴리히드록시프로필-메타크릴아미드-페놀, 폴리히드록시에틸아스파르트아미드페놀, 또는 팔미토일 잔기로 치환된 폴리에틸렌옥사이드-폴리리신을 포함할 수 있다. 게다가, 본원에 기재된 조성물은 약물의 제어 방출을 달성하는데 유용한 생분해성 중합체 부류, 예를 들어 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산 및 폴리글리콜산의 공중합체, 폴리엠피론 카프로락톤, 폴리히드록시 부티르산, 폴리오르토에스테르, 폴리아세탈, 폴리디히드로피란, 폴리스시아노아실레이트, 및 히드로겔의 가교 또는 양친매성 블록 공중합체와 조합될 수 있다.
- [0293] 투여에 적합한 투여 형태 (제약 조성물)는 투여 단위당 약 0.01 밀리그램 내지 약 500 밀리그램의 활성 성분을 함유할 수 있다. 이들 제약 조성물에서, 활성 성분은 통상적으로 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.5-95 중량 %의 양으로 존재할 것이다.
- [0294] 젤라틴 캡슐은 활성 성분 및 분말화 담체, 예컨대 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 스테아르산마그네슘, 및 스테아르산을 함유할 수 있다. 유사한 희석제를 사용하여 압축 정제를 제조할 수 있다. 정제 및 캡슐 둘 다를 지속 방출 제품으로서 제조하여, 기간에 걸쳐 의학의 연속 방출을 제공할 수 있다. 압축 정제는, 임의의 불쾌한 맛을 차폐하고 대기로부터 정제를 보호하기 위해 당 코팅 또는 필름 코팅될 수 있거나, 또는 위장관에서의 선택적 붕해를 위해 장용 코팅될 수 있다.
- [0295] 경구 투여용 액체 투여 형태는 환자 수용을 증가시키기 위해 착색제 및 향미제를 함유할 수 있다.
- [0296] 일반적으로, 물, 적합한 오일, 염수, 수성 텍스트로스 (글루코스) 및 관련 당 용액, 및 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 비경구 용액에 적합한 담체이다. 비경구 투여용 용액은 바람직하게는 활성 성분의 수용성 염, 적합한 안정화제, 및 필요한 경우에, 완충제 물질을 함유한다. 단독의 또는 조합된 항산화제, 예컨대 중아황산나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산은 적합한 안정화제이다. 시트르산 및 그의 염 및 나트륨 EDTA가 또한 사용된다. 또한, 비경구 용액은 보존제 예컨대 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올을 함유할 수 있다.
- [0297] 적합한 제약 담체는 이 분야에서 표준 참조 교재 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company (1995)]에 기재되어 있다.
- [0298] 본원에 기재된 화합물의 투여를 위한 대표적인 유용한 제약 투여 형태는 하기와 같이 예시될 수 있다:
- [0299] 캡슐
- [0300] 다수의 단위 캡슐은 표준 2-피스 경질 젤라틴 캡슐을 분말화 활성 성분 100 밀리그램, 락토스 150 밀리그램, 셀룰로스 50 밀리그램 및 스테아르산마그네슘 6 밀리그램으로 충전시킴으로써 제조될 수 있다.

- [0301] 연질 젤라틴 캡슐
- [0302] 소화가능한 오일, 예컨대 대두 오일, 목화씨 오일 또는 올리브 오일 중 활성 성분의 혼합물을 제조하고, 정변위 펌프의 수단에 의해 젤라틴 내에 주입하여 활성 성분 100 밀리그램을 함유하는 연질 젤라틴 캡슐을 형성할 수 있다. 캡슐은 세척 및 건조되어야 한다.
- [0303] 정제
- [0304] 정제는 통상적인 절차에 의해, 투여 단위가 예를 들어 활성 성분 100 밀리그램, 콜로이드성 이산화규소 0.2 밀리그램, 스테아르산마그네슘 5 밀리그램, 미세결정질 셀룰로스 275 밀리그램, 전분 11 밀리그램 및 락토스 98.8 밀리그램이도록 제조될 수 있다. 적절한 코팅을 적용하여 식미성을 증가시키거나 흡수를 지연시킬 수 있다.
- [0305] 주사제
- [0306] 본원에 기재된 화합물 조성물의 주사가 가능한 제제는 규제 기관에 의해 승인된 것들과 같은 부형제의 사용을 필요로 할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 이들 부형제는, 용매 및 공-용매, 가용화제, 유화제 또는 증점제, 킬레이트화제, 항산화제 및 환원제, 향미생물 보존제, 완충제 및 pH 조정제, 벌크제, 보호제, 및 장성 조정제 및 특수 첨가제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 주사가 가능한 제제는 멸균, 발열원 무함유이어야 하고, 용액의 경우에, 미립자 물질 무함유이어야 한다.
- [0307] 주사에 의한 투여에 적합한 비경구 조성물은 예를 들어, 1.5 중량%의 활성 성분을, 공-용매 또는 다른 부형제를 함유할 수 있거나 그렇지 않을 수 있는 제약상 허용되는 완충제 중에서 교반함으로써 제조될 수 있다. 용액은 염화나트륨에 의해 등장성이 되어야 하고 멸균되어야 한다.
- [0308] 현탁액
- [0309] 수성 현탁액은 경구 및/또는 비경구 투여를 위해, 예를 들어 각각 5 mL가 미분된 활성 성분 100 mg, 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 20 mg, 벤조산나트륨 5 mg, 소르비톨 용액, U.S.P. 1.0 g, 및 바닐린 또는 다른 식미성 향미제 0.025 mL를 함유하도록 제조될 수 있다.
- [0310] 생분해성 마이크로입자
- [0311] 주사에 의한 투여에 적합한 지속-방출 비경구 조성물은, 예를 들어 적합한 생분해성 중합체를 용매에 용해시키고, 중합체 용액에 활성제를 첨가하여 혼입시키고, 매트릭스로부터 용매를 제거하며, 그에 의해 활성제가 매트릭스 전반에 분포된 중합체 매트릭스를 형성함으로써 제조될 수 있다.
- [0312] 화합물 합성
- [0313] 본원에서 본 개시내용의 기재는 화학 결합의 법칙 및 원칙과 일치하도록 해석되어야 한다. 본 개시내용에 의해 포괄된 화합물은 제약 작용제로서 사용하기에 적합하게 안정한 것들인 것으로 이해되어야 한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 화학 결합의 일반적 원칙 및 안정성을 기준으로 하여 어떤 화합물이 안정하고 안정하지 않을 것인지를 인지할 것이다.
- [0314] 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물의 화학적 합성은 단계적 고체 상 합성, 펩티드 단편의 입체형태적-보조 라이게이션을 통한 반합성, 클로닝 또는 합성 펩티드 절편의 효소적 라이게이션, 및 화학적 라이게이션을 포함한 다양한 기술분야 인지 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 본원에 기재된 마크로시클릭 화합물 및 그의 유사체를 합성하기 위한 바람직한 방법은 다양한 고체-상 기술 예컨대 문헌 [Chan, W.C. et al., eds., Fmoc Solid Phase Synthesis, Oxford University Press, Oxford (2000); Barany, G. et al., The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", pp. 3-284, Gross, E. et al., eds., Academic Press, New York (1980); 및 Stewart, J.M. et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)]에 기재된 것들을 사용하는 화학적 합성이다. 바람직한 전략은 아미노산 측쇄의 일시적 보호를 위한 tert-부틸 기와 조합된 α-아미노 기의 일시적 보호를 위한 Fmoc (9-플루오레닐메톡ycarbonyl 메틸-옥시카르보닐) 기를 기초로 한다 (예를 들어 문헌 [Atherton, E. et al., "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 9: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pp. 1-38, Undenfriend, S. et al., eds., Academic Press, San Diego (1987)]을 참조함).
- [0315] 화합물은 불용성 중합체 지지체 (또한 "수지"로서 지칭됨) 상에서 화합물의 C-말단으로부터 시작하여 단계적 방식으로 합성될 수 있다. 합성은 아마이드 또는 에스테르 연결의 형성을 통해 화합물의 C-말단 아미노산을 수지에



부가하는 것에 의해 개시된다. 이는 각각 C-말단 아미드 또는 카르복실산으로서 생성되는 화합물의 결과적인 방출을 가능하게 한다.

[0316] 합성에 사용되는 C-말단 아미노산 및 모든 다른 아미노산은 그의 α-아미노 기, 및 α-아미노 보호기가 합성 동안 선택적으로 제거될 수 있도록 차별적으로 보호된 측쇄 관능기 (존재하는 경우에)를 가질 것이 요구된다. 아미노산의 커플링은 활성 에스테르로서의 그의 카르복실 기의 활성화, 및 수지에 부가된 N-말단 아미노산의 차단되지 않은 α-아미노 기와의 그의 반응에 의해 수행된다. 전체 화합물 서열이 어셈블리될 때까지, α-아미노 기 탈보호 및 커플링 순서는 반복된다. 이어서, 화합물은 통상적으로 부반응을 제한하는 적절한 스캐빈저의 존재 하에 측쇄 관능기의 병행 탈보호와 함께 수지로부터 방출된다. 생성된 화합물은 최종적으로 역상 HPLC에 의해 정제된다.

[0317] 최종 화합물에 대한 전구체로서 요구되는 펩티드-수지의 합성은 상업적으로 입수가 가능한 가교 폴리스티렌 중합체 수지 (노바바이오켄(Novabiochem), 캘리포니아주 샌디에고; 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터 시티)를 이용한다. 바람직한 고체 지지체는, C-말단 카르복시아미드의 경우에 4-(2',4'-디메톡시페닐-Fmoc-아미노메틸)-페녹시아세틸-p-메틸 벤즈히드릴아민 수지 (링크 아미드 MBHA 수지); 9-Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시-메리필드 수지 (시버 아미드 수지); 4-(9-Fmoc)아미노메틸-3,5-디메톡시페녹시)발레틸-아미노메틸-메리필드 수지 (PAL 수지)이다. 제1 및 후속 아미노산의 커플링은 각각 DIC/HOBt, HBTU/HOBt, BOP, PyBOP, 또는 DIC/6-Cl-HOBt, HCTU, DIC/HOAt 또는 HATU로부터 생성된 HOBt, 6-Cl-HOBt 또는 HOAt 활성 에스테르를 사용하여 달성될 수 있다. 바람직한 고체 지지체는 보호된 화합물 단편의 경우에 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 및 9-Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시-메리필드 수지 (시버 아미드 수지)이다. 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 상의 제1 아미노산의 로딩은 Fmoc-보호된 아미노산을 수지와 디클로로메탄 및 DIEA 중에서 반응시킴으로써 최적으로 달성된다. 필요한 경우에, 소량의 DMF를 첨가하여 아미노산의 용해를 용이하게 할 수 있다.

[0318] 본원에 기재된 화합물 유사체의 합성은 단일 또는 다중-채널 펩티드 합성기, 예컨대 CEM 리버티(Liberty) 마이크로웨이브 합성기, 또는 단백질 테크놀로지스, 인크.(Protein Technologies, Inc.) 프렐류드 (6 채널), 심포니 (12 채널) 또는 심포니-X (12 또는 24 채널) 합성기를 사용함으로써 수행될 수 있다.

[0319] 펩티드-수지 전구체는 임의의 표준 절차를 사용하여 절단 및 보호될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [King, D.S. et al., Int. J. Peptide Protein Res., 36:255-266 (1990)] 참조). 바람직한 방법은 물, 및 스캐빈저로서 TIS의 존재 하에 TFA를 사용하는 것이다. 전형적으로, 펩티드-수지를 TFA/물/TIS (94:3:3, v:v:v; 1 mL/100 mg 펩티드 수지) 중에서 2-6시간 동안 실온에서 교반한다. 이어서 소비된 수지를 여과하고, TFA 용액을 감압 하에 농축 또는 건조시킨다. 생성된 조 화합물을 침전시키고 Et<sub>2</sub>O로 세척하거나, 또는 정제용 HPLC에 의한 정제를 위해 DMSO 또는 50% 수성 아세트산에 직접 재용해시킨다.

[0320] 목적하는 순도를 갖는 화합물은, 예를 들어, 워터스 모델 4000 또는 시마즈 모델 LC-8A 액체 크로마토그래프 상에서 정제용 HPLC를 사용하는 정제에 의해 수득될 수 있다. 조 화합물의 용액을 YMC S5 ODS (20X 100 mm) 칼럼에 주입하고, 둘 다 0.1% TFA로 완충된 물 중 MeCN의 선형 구배로 14-20 mL/분의 유량을 사용하여 220 nm에서 UV 흡광도에 의해 용출액을 모니터링하면서 용리시킨다. 정제된 화합물의 구조는 전자-스프레이 MS 분석에 의해 확인될 수 있다.

[0321] 실시예

[0322] 특히 이어지는 예시적 반응식 및 실시예를 포함한 본 출원에 사용된 약어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 사용된 약어 중 일부는 하기와 같다: min은 분; h 또는 hr은 시간; RT 또는 rt는 실온 또는 체류 시간 (문맥이 지시할 것임); sat.는 포화; TFA는 트리플루오로아세트산; DMF는 N,N-디메틸포름아미드; DCM은 디클로로메탄; Fmoc는 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐; HATU는 (1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘-3-옥시드 헥사플루오로포스페이트); DIEA 또는 DIPEA는 디이소프로필에틸아민; NMP는 N-메틸피롤리돈; EDC는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드; DMSO는 디메틸설폭사이드; MeOH는 메탄올; EtOAc는 에틸 아세테이트; Et<sub>3</sub>N은 트리에틸아민; MeCN 또는 ACN은 아세토니트릴; DIAD는 디에틸 아조디카르복실레이트; 및 TMSI는 트리메틸실릴 아이오다이드이다.

[0323] 분석 데이터:

[0324] 질량 분광측정법: "ESI-MS(+)"는 양이온 모드로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-

MS(-)"는 음이온 모드로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(+)"는 양이온 모드로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(-)"는 음이온 모드로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미한다. 검출된 질량은 "m/z" 단위 지정에 따라 보고된다. 1000 초과의 정확한 질량을 갖는 화합물은 종종 이중-하전 또는 삼중-하전 이온으로 검출되었다.

[0325] 하기 분석 프로토콜 및 합성 방법은 실시예 1400-1508에 적용된다.

[0326] 분석 데이터:

[0327] 질량 분광측정법: "ESI-MS(+)"는 양이온 모드로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-MS(-)"는 음이온 모드로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(+)"는 양이온 모드로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(-)"는 음이온 모드로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미한다. 검출된 질량은 "m/z" 단위 지정에 따라 보고된다. 1000 초과의 정확한 질량을 갖는 화합물은 종종 이중-하전 또는 삼중-하전 이온으로 검출되었다.

[0328] 분석 LCMS 조건 A:

[0329] 칼럼: BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함; 이동상 B: 아세트ونی트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 50°C; 구배: 2% B - 98% B, 2분에 걸침, 이어서 98% B에서 0.5분 유지; 유량: 0.8 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0330] 분석 LCMS 조건 B:

[0331] 칼럼: BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트ونی트릴:물, 0.05% TFA 포함; 이동상 B: 95:5 아세트ونی트릴:물, 0.05% TFA 포함; 온도: 50°C; 구배: 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.75분 유지; 유량: 1.11 mL/분.

[0332] 분석 LCMS 조건 C:

[0333] 칼럼: BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 물, 0.2% 포름산 및 0.01% TFA 포함; 이동상 B: 아세트ونی트릴, 0.2% 포름산 및 0.01% TFA 포함; 온도: 50°C; 구배: 2% B - 80% B, 2분에 걸침, 80% B - 98% B, 0.1분에 걸침, 이어서 98% B에서 0.5분 유지; 유량: 0.8 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0334] 분석 LCMS 조건 D:

[0335] 칼럼: 워터스 액유티(Waters Acquity) UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트ونی트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트ونی트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50°C; 구배: 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.75-분 유지; 유량: 1.11 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0336] 분석 LCMS 조건 E:

[0337] 칼럼: 워터스 액유티 UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트ونی트릴:물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트ونی트릴:물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 온도: 50°C; 구배: 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.75-분 유지; 유량: 1.11 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0338] 분석 LCMS 조건 F:

[0339] 칼럼: 워터스 엑스브리지(Xbridge) C18, 2.1 x 50 mm; 이동상 A: 5:95 아세트ونی트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트ونی트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 35°C; 구배: 0-100% B, 4분에 걸침, 이어서 100% B에서 1-분 유지; 유량: 4 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0340] 분석 LCMS 조건 G:

[0341] 피니간(Finnigan) LTQ 질량 분광계; 칼럼: 페노메넥스 주피터(Phenomenex Jupiter) C4, 1 x 50 mm; 이동상 A: 물 중 1% 포름산; 이동상 B: 아세트ونی트릴 중 0.1% 포름산; 온도: 30°C; 구배: 1% B, 1분 유지; 1-95% B, 3분에 걸침, 이어서 95% B에서 3-분 유지; 유량: 0.15 mL/분

[0342] 분석 LCMS 조건 H:

[0343] 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트ونی트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트ونی트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50°C; 구배: 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 1.0 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

- [0344] 분석 LCMS 조건 I:
- [0345] 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50℃; 구배: 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 0.5 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.
- [0346] 분석 HPLC 조건 A:
- [0347] 칼럼: YMC 팩(Pack) ODS-AQ 3 $\mu$ m 150x4.6mm 이동상 A: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% TFA 포함; 온도: 60℃; 구배: 35% B - 80% B, 25분에 걸침; 유량: 1 mL/분; 검출: 217 nm에서 UV.
- [0348] 분석 HPLC 조건 B:
- [0349] 칼럼: YMC 팩 ODS-AQ 3 $\mu$ m 150x4.6mm 이동상 A: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% TFA 포함; 온도: 60℃; 구배: 25% B - 75% B, 25분에 걸침; 유량: 1 mL/분; 검출: 217 nm에서 UV.
- [0350] 분석 HPLC 조건 C:
- [0351] 칼럼: YMC 팩 ODS-AQ 3 $\mu$ m 150x4.6mm 이동상 A: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% TFA 포함; 온도: 60℃; 구배: 20% B - 70% B, 25분에 걸침; 유량: 1 mL/분; 검출: 217 nm에서 UV.
- [0352] 분석 HPLC 조건 D:
- [0353] 칼럼: YMC 팩 ODS-AQ 3 $\mu$ m 150x4.6mm 이동상 A: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% TFA 포함; 온도: 60℃; 구배: 15% B - 65% B, 25분에 걸침; 유량: 1 mL/분; 검출: 217 nm에서 UV.
- [0354] 분석 HPLC 조건 E:
- [0355] 칼럼: YMC 팩 ODS-AQ 3 $\mu$ m 150x4.6mm 이동상 A: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% TFA 포함; 온도: 60℃; 구배: 25% B - 60% B, 20분에 걸침; 유량: 1.25 mL/분; 검출: 217 nm에서 UV.
- [0356] 분석 HPLC 조건 F:
- [0357] 칼럼: YMC 팩 ODS-AQ 3 $\mu$ m 150x4.6mm 이동상 A: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% TFA 포함; 온도: 60℃; 구배: 25% B - 65% B, 20분에 걸침; 유량: 1.25 mL/분; 검출: 217 nm에서 UV.
- [0358] 분석 HPLC 조건 G:
- [0359] 칼럼: 선파이어(Sunfire) C18 3.5 $\mu$ m, 3.0x150mm; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 0.05% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 0.05% 트리플루오로아세트산 포함; 온도: 50℃; 구배: 10-100% B, 12분에 걸침, 이어서 100% B에서 3-분 유지; 유량: 1 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.
- [0360] 분석 HPLC 조건 H:
- [0361] 칼럼: 엑스브리지 페닐 3.5x150 $\mu$ m, 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 0.05% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 0.05% 트리플루오로아세트산 포함; 온도: 50℃; 구배: 10-100% B, 12분에 걸침, 이어서 100% B에서 3-분 유지; 유량: 1 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.
- [0362] 분석 HPLC 조건 I:
- [0363] 칼럼: 페노메넥스 루나(Phenomenex Luna) 5 $\mu$  C18(2) 150 x 4.6 mm; 이동상 A: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함, 구배 5-100% B, 20분에 걸침, 이어서 100% B에서 5분 유지; 유량 1 mL/분, 검출: 220 nm에서 UV
- [0364] 분석 HPLC 조건 J:
- [0365] 칼럼: 페노메넥스 루나 5 $\mu$  C18(2) 150 x 4.6 mm; 이동상 A: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함, 이동상 B: 아세토니트릴, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함, 구배 10-100% B, 20분에 걸침, 이어서 100% B에서 5분 유지; 유량 1 mL/분, 검출: 220 nm에서 UV
- [0366] 일반적 절차:
- [0367] 프렐류드 방법 A:
- [0368] 모든 조작을 프렐류드 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를

언급되지 않는 한 하단 프릿이 장착된 10 또는 45 mL 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였다. 튜브를 튜브의 하단 및 상단 둘 다를 통해 프렐류드 펌프드 합성기에 연결하였다. DMF 및 DCM을 튜브의 상단을 통해 첨가할 수 있었으며, 이를 튜브의 측면으로 동등하게 세척해 내었다. 나머지 시약을 튜브의 하단을 통해 첨가하고, 프릿을 통해 통과시켜 수지를 접촉시켰다. 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프릿을 통한  $N_2$  기체의 짧은 펄스를 기재하며; 펄스는 대략 5초 동안 지속되고, 30초마다 발생한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았고, 시버 = Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시이며, 여기서 "3-일옥시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다. 사용되는 수지는 시버 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.71 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

[0369] "프렐류드 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모로 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 시버-메리필드 수지의 대략 140 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "수지-팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "단일-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 Fmoc-N-메틸 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "2급 아민-커플링 절차"를 사용하였다. 화합물의 N-말단에 대한 클로로아세틸 기의 커플링은 하기 상세화된 "클로로아세트산틸 클로라이드 커플링 절차" 또는 "클로로아세트산 커플링 절차"에 의해 기재되어 있다.

[0370] 수지-팽윤 절차:

[0371] 40 mL 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 메리필드:시버 수지 (140 mg, 0.100 mmol)를 첨가하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (5.0 mL) 및 DCM (5.0 mL)을 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의  $N_2$  버블링과 함께 10분 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 배출하였다.

[0372] 단일-커플링 절차:

[0373] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 및 HOAt (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량)의 용액에 이어서 DIC (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 60분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0374] 2급 아민-커플링 절차:

[0375] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 및 HOAt의 용액 (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 5 당량)에 이어서 DIC (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 5 당량)를 첨가하였다. 혼합물을



300분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0376] 클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차:

[0377] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 반응 용기에 DMF 중 DIPEA (4.0 mmol, 0.699 mL, 40 당량), 및 클로로아세틸 클로라이드 (2.0 mmol, 0.160 mL, 20 당량)의 용액 3.0 mL를 첨가하였다. 혼합물을 12 내지 18시간 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DCM (4.0 mL)을 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 배출하였다.

[0378] 프렐류드 방법 B:

[0379] 모든 조작을 프렐류드 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를 하단 프리트가 장착된 10 또는 45 mL 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였다. DMF 및 DCM을 튜브의 상단을 통해 첨가할 수 있었으며, 이를 튜브의 측면으로 동등하게 세척해 내었다. 나머지 시약을 튜브의 하단을 통해 첨가하고, 프리트를 통해 통과시켜 수지를 접촉시켰다. 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프리트를 통한 N<sub>2</sub> 기체의 짧은 펄스를 기재하며; 펄스는 대략 5초 동안 지속되고, 30초마다 발생한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았다. 시버 = Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시이며, 여기서 "3-일옥시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다. 사용되는 수지는 시버 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.71 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

[0380] "프렐류드 방법 B"의 절차는 0.100 mmol 규모로 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 시버-메리필드 수지의 대략 140 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "수지-팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "단일-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "2급 아민-커플링 절차"를 사용하였다. 화합물의 N-말단에 대한 클로로아세틸 기의 커플링은 하기 상세화된 "클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차" 또는 "클로로아세틸산 커플링 절차"에 의해 기재되어 있다.

[0381] 수지-팽윤 절차:

[0382] 40 mL 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 메리필드:시버 수지 (140 mg, 0.100 mmol)를 첨가하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다 (팽윤시켰다): 반응 용기에 DMF (5.0 mL) 및 DCM (5.0 mL)을 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 10분 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프리트를 통해 배출하였다.

[0383] 단일-커플링 절차:

[0384] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3 분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량)에 이어서 HCTU (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 2.5 mL, 20 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0385] 이중-커플링 절차:

[0386] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3 분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량)에 이어서 HCTU (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 2.5 mL, 20 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 용기의 상단을 통해 DMF (4.0 mL)로 연속적으로 3회 세척하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량)에 이어서 HCTU (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 2.5 mL, 20 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0387] 2급 아민-커플링 절차:

[0388] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3 분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 10 당량)에 이어서 HCTU (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 10 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.5 mL, 12 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 12시간 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0389] 클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차 A:

[0390] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3 분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 필터를 통해 배출하였다. 반응 용기에 DMF 중 DIPEA (4.0 mmol, 0.699 mL, 40 당량), 및 클로로아세틸 클로라이드 (2.0 mmol, 0.160 mL, 20 당량)의 용액 3.0 mL를 첨가하였다. 혼합물을 12 내지 18시간 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 필터를 통해 배출하였다. 수지를 하

기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다.

[0391] 클로로아세트산 커플링 절차 B:

[0392] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 DMF (2.0 mL), 클로로아세트산 (1.2 mmol, 113 mg, 12 당량), 및 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 (1.2 mmol, 0.187 mL, 12 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 12 내지 18시간 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다.

[0393] 프렐류드 방법 C:

[0394] 모든 조작을 프렐류드 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를 언급되지 않는 한 하단 프릿이 장착된 10 또는 45 mL 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였다. 튜브를 튜브의 하단 및 상단 둘 다를 통해 프렐류드 펩티드 합성기에 연결하였다. DMF 및 DCM을 튜브의 상단을 통해 첨가할 수 있었으며, 이를 튜브의 측면으로 동등하게 세척해 내었다. 나머지 시약을 튜브의 하단을 통해 첨가하고, 프릿을 통해 통과시켜 수지를 접촉시켰다. 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프릿을 통한 N<sub>2</sub> 기체의 짧은 펄스를 기재하며; 펄스는 대략 5초 동안 지속되고, 30초마다 발생한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았다. HATU 용액은 제조의 5일 이내에 사용하였다. 시버 = Fmoc-아미노-3-일옥시이며, 여기서 "3-일옥시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다. 사용되는 수지는 시버 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.71 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

[0395] "프렐류드 방법 C"의 절차는 0.100 mmol 규모로 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 시버-메리필드 수지의 대략 140 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "수지-팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "단일-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "2급 아민-커플링 절차"를 사용하였다. 수지의 최종 세척은 하기 기재된 "최종 세척 절차"를 사용하였다.

[0396] 수지-팽윤 절차:

[0397] 40 mL 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 메리필드:시버 수지 (140 mg, 0.100 mmol)를 첨가하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다 (팽윤시켰다): 반응 용기에 DMF (5.0 mL) 및 DCM (5.0 mL)을 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 10분 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다.

[0398] 단일-커플링 절차:

[0399] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3

분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 5.0 mL, 10 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 2.5 mL, 20 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 60분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0400] 2급 아민-커플링 절차:

[0401] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 1.5 mL, 12 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 300분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 1.5 mL, 12 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 300분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0402] 통상의 아미노산-커플링 절차:

[0403] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 0.5 내지 2.5 mL, 1 내지 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 0.5 내지 2.5 mL, 1 내지 5 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 0.5 내지 1.5 mL, 4 내지 12 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 60분 내지 600분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0404] 최종 세척 절차:

[0405] 수지를 하기와 같이 연속적으로 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와



같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DCM (4.0 mL)을 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0406] 클로로아세트산 커플링 절차:

[0407] 수동 단계 주목. 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 5분 동안 진탕시킨 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 DMF (2.0 mL), 클로로아세트산 (1.2 mmol, 113 mg, 12 당량), 및 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 (1.2 mmol, 0.187 mL, 12 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12 내지 18시간 동안 진탕시킨 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다.

[0408] 프렐류드 방법 D:

[0409] 모든 조작을 프렐류드 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를 언급되지 않는 한 하단 프릿이 장착된 10 또는 45 mL 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였다. 튜브를 튜브의 하단 및 상단 둘 다를 통해 프렐류드 펩티드 합성기에 연결하였다. DMF 및 DCM을 튜브의 상단을 통해 첨가할 수 있었으며, 이를 튜브의 측면으로 동등하게 세척해 내었다. 나머지 시약을 튜브의 하단을 통해 첨가하고, 프릿을 통해 통과시켜 수지를 접촉시켰다. 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프릿을 통한 N<sub>2</sub> 기체의 짧은 펄스를 기재하며; 펄스는 대략 5초 동안 지속되고, 30초마다 발생한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았다. HATU 용액은 제조의 5일 이내에 사용하였다. 시버 = Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시이며, 여기서 "3-일옥시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다. 사용되는 수지는 시버 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.71 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

[0410] "프렐류드 방법 D"의 절차는 0.100 mmol 규모로 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 시버-메리필드 수지의 대략 140 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "수지-팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "단일-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "2급 아민-커플링 절차"를 사용하였다. 수지의 최종 세척은 하기 기재된 "최종 세척 절차"를 사용하였다.

[0411] 수지-팽윤 절차:

[0412] 40 mL 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 메리필드:시버 수지 (140 mg, 0.100 mmol)를 첨가하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다 (팽윤시켰다): 반응 용기에 DMF (5.0 mL) 및 DCM (5.0 mL)을 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 10분 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다.

[0413] 단일-커플링 절차:

[0414] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기

와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 2.5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 2.5 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 0.75 mL, 5 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0415] 2급 아민-커플링 절차:

[0416] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 2.5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 2.5 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 0.75 mL, 5 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 2.5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 2.5 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 0.75 mL, 5 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0417] 최종 세척 절차:

[0418] 수지를 하기와 같이 연속적으로 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DCM (4.0 mL)을 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0419] 클로로아세트산 커플링 절차:

[0420] 수동 단계 주목. 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 5분 동안 진탕시킨 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 DMF (2.0 mL), 클로로아세트산 (1.2 mmol, 113 mg, 12 당량), 및 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 (1.2 mmol, 0.187 mL, 12 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12 내지 18시간 동안 진탕시킨 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다.

- [0421] CEM 방법 A:
- [0422] 모든 조작을 CEM 리버티 마이크로웨이브 펌프드 합성기 (CEM 코퍼레이션(CEM Corporation)) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를 언급되지 않는 한 CEM 디스커버리(Discovery) 마이크로웨이브 유닛에 하단 프릿이 장착된 30 또는 125 mL 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였다. 튜브를 튜브의 하단 및 상단 둘 다를 통해 CEM 리버티 합성기에 연결하였다. DMF 및 DCM을 튜브의 상단 및 하단에 첨가할 수 있었으며, 이를 튜브의 측면으로 동등하게 세척해 내었다. 수지를 상단으로부터 옮기는 동안에 제외하고 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 버블링"은 하단 프릿을 통한  $N_2$  기체의 짧은 버블링을 기재한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았다. HATU 용액은 제조의 5일 이내에 사용하였다. DMF = 디메틸포름아미드; HCTU = 2-(6-클로로-1-H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄; HATU = 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트; DIPEA = 디이소프로필에틸아민; 시버 = Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시, 여기서 "3-일옥시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다.
- [0423] 사용되는 수지는 시버 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.71 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 다른 통상의 수지 예컨대 링크, 클로로트리틸, 또는 다른 산 감수성 링커를 합성에 사용할 수 있으며, 시버 아미드 수지가 달리 언급되지 않는 한 구체적인 실시예에서 사용된다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Orn(Boc)-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.
- [0424] "CEM 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모로 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 시버-메리필드 수지의 대략 140 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "수지-팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "단일-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "2급 아민-커플링 절차"를 사용하였다. 화합물의 N-말단에 대한 클로로아세틸 기의 커플링은 상기 상세화된 "클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차" 또는 "클로로아세트산 커플링 절차"에 의해 기재되어 있다.
- [0425] 수지-팽윤 절차:
- [0426] 50 mL 폴리프로필렌 원추형 튜브에 메리필드:시버 수지 (140 mg, 0.100 mmol)를 첨가하였다. 이어서, DMF (7 mL)에 이어서 DCM (7 mL)을 튜브에 첨가하였다. 이어서, 수지를 용기의 상단으로부터 반응 용기로 옮겼다. 절차를 추가적으로 2회 반복하였다. DMF (7 mL)에 이어서 DCM (7 mL)을 첨가하였다. 수지를 반응 용기의 하단으로부터의  $N_2$  버블링과 함께 15분 동안 팽윤되도록 한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다.
- [0427] 표준 커플링 절차:
- [0428] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량), HATU (DMF 중 0.5M, 1.0 mL, 5 당량), 및 DIPEA (NMP 중 2M, 0.5 mL, 10 당량)를 첨가하였다. 혼합물을, Fmoc-Cys(Trt)-OH 및 Fmoc-His(Trt)-OH를 50°C에서 커플링시키는 것을 제외하고는, 모든 아미노산에 대해 75°C에서 5분 동안  $N_2$  버블링함으로써 혼합하고, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 65°C에서 2분 동안 주기적으로 버블링한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터

의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0429] 이중-커플 커플링 절차:

[0430] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량), HATU (DMF 중 0.5M, 1.0 mL, 5 당량), 및 DIPEA (NMP 중 2M, 0.5 mL, 10 당량)를 첨가하였다. 혼합물을, Fmoc-Cys(Trt)-OH 및 Fmoc-His(Trt)-OH를 50℃에서 커플링시키는 것을 제외하고는, 모든 아미노산에 대해 75℃에서 5분 동안 N<sub>2</sub> 버블링함으로써 혼합하고, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량), HATU (DMF 중 0.5M, 1.0 mL, 5 당량), 및 DIPEA (NMP 중 2M, 0.5 mL, 10 당량)를 첨가하였다. 혼합물을, Fmoc-Cys(Trt)-OH 및 Fmoc-His(Trt)-OH를 50℃에서 커플링시키는 것을 제외하고는, 모든 아미노산에 대해 75℃에서 5분 동안 N<sub>2</sub> 버블링함으로써 혼합하고, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 65℃에서 2분 동안 주기적으로 버블링한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0431] 2급 아민 커플링 절차:

[0432] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 DMF (7 mL) 중 5% 피페라진 및 0.1 M HOBt의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 75℃에서 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 배출하였다. 이 절차를 1회 더 반복하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량), HCTU (DMF 중 0.5M, 1.0 mL, 5 당량), 및 DIPEA (NMP 중 2M, 0.5 mL, 10 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 모든 아미노산에 대해 75℃에서 5분 동안 (Fmoc-Cys(Trt)-OH 및 Fmoc-His(Trt)-OH에 대해 50℃)에 이어서 가열 없이 6시간 동안 N<sub>2</sub> 버블링에 의해 혼합하였다. 배출 후, 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 65℃에서 2분 동안 주기적으로 버블링한 다음, 용액을 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0433] 통상의 아미노산-커플링 절차:

[0434] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 HATU (2.5 당량 내지 10 당량)를 함유하는 아미노산 용액 (1.25 mL 내지 5 mL, 2.5 당량 내지 10 당량), 및 최종적으로 DIPEA (NMP 중 2M, 0.5 mL 내지 1 mL, 20 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 25℃ 내지 75℃에서 5분 내지 2시간 동안 N<sub>2</sub> 버블링에 의해 혼합한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 반응 용기에 아세트산 무수물:DIEA:DMF (10:1:89 v/v/v, 5.0 mL)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 65℃에서 2분 동안 주기적으로 버블링한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척, 이어서 하단으로부터의 DMF (7 mL) 세척 및 최종적으로



상단으로부터의 DMF (7 mL) 세척. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0435] 심포니 방법 A:

[0436] 모든 조작을 심포니 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를 언급되지 않는 한 하단 프릿이 장착된 심포니 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였다. 튜브를 튜브의 하단 및 상단 둘 다를 통해 심포니 펩티드 합성기에 연결하였다. 모든 용매, DMF, DCM, 아미노산 및 시약을 튜브의 하단을 통해 첨가하고, 프릿을 통해 통과시켜 수지를 접촉시켰다. 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프릿을 통한 N<sub>2</sub> 기체의 짧은 펄스를 기재하며; 펄스는 대략 5초 동안 지속되고, 15초마다 발생한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았다. HATU 용액은 제조의 5일 이내에 사용하였다. DMF = 디메틸포름아미드; HCTU = 2-(6-클로로-1-H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄; HATU = 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘-3-옥시드 헥사플루오로포스페이트; NMM = n-메틸 모르폴린; DIPEA = 디이소프로필에틸아민; 시버 = Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시, 여기서 "3-일옥시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다. 사용되는 수지는 시버 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.71 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 다른 통상의 산 감수성 수지 예컨대 링크 또는 관능화 클로로 트리틸 수지가 또한 합성에 사용될 수 있다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

[0437] "심포니 방법 A"의 절차는 0.050 mmol 규모 상에서 수행되는 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 시버-메리필드 수지의 대략 70 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.050 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "표준-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 "이중-커플링"을 사용하고, 통상의 아미노산을 하기 기재된 아미노산 "블랭크 커플링"의 수동 블랭크 부가를 통해 커플링하였다.

[0438] 팽윤 절차:

[0439] 심포니 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 메리필드:시버 수지 (70 mg, 0.050 mmol)를 첨가하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다 (팽윤시켰다): 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 10분 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 용기의 하단을 통해 첨가된 DMF (6.25 mL)로 세척하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0440] 표준-커플링 절차:

[0441] 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을

통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 용기의 하단을 통해 첨가된 DMF (6.25 mL)로 세척하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0442] 2급 아민-커플링 절차:

[0443] 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 300분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 용기의 하단을 통해 첨가된 DMF (6.25 mL)로 세척하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 300분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0444] 통상의 아미노산-커플링 절차:

[0445] 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 합성을 심포니 소프트웨어에 의해 중단하여 반응 용기에 통상의 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)을 수동으로 첨가한 다음, 자동화를 재시작하고: HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 300분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5 mL)를 첨가하고, 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0446] 심포니 방법 B:

[0447] 모든 조작을 심포니 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차를 언급되지 않는 한 하단 프릿이 장착된 심포니 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였다. 튜브를 튜브의 하단 및 상단 둘 다를 통해 심포니 펩티드 합성기에 연결하였다. 모든 용매, DMF, DCM, 아미노산 및 시약을 튜브의 하단을 통해 첨가하고, 프릿을 통해 통과시켜 수지를 접촉시켰다. 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프릿을 통한 N<sub>2</sub> 기체의 짧은 펄스를 기재하며; 펄스는 대략 5초 동안 지속되고, 15초마다 발

생한다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았다. HATU 용액은 제조의 5일 이내에 사용하였다. DMF = 디메틸포름아미드; HCTU = 2-(6-클로로-1-H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄; HATU = 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 핵사플루오로포스페이트; NMM= n-메틸 모르폴린; DIPEA = 디이소프로필에틸아민; 시버 = Fmoc-아미노-크산텐-3-일옥시, 여기서 "3-일옥시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다. 사용되는 수지는 시버 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.71 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 다른 통상의 산 감수성 수지 예컨대 링크 또는 관능화 클로로 트리틸 수지가 또한 합성에 사용될 수 있다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다.

[0448] Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH. "심포니 방법 B"의 절차는 0.050 mmol 규모 상에서 수행되는 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 시버-메리필드 수지의 대략 70 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.050 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "표준-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 "2급 아민-커플링 절차 B"를 사용하고, 통상의 아미노산을 하기 기재된 아미노산 "통상의 아미노산-커플링 절차"의 수동 블랭크 첨가를 통해 커플링하고, 클로로아세틸 무수물을 하기 기재된 "최종 캡핑 절차"를 사용하여 서열의 최종 위치에 첨가하였다.

[0449] 팽윤 절차:

[0450] 심포니 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 메리필드:시버 수지 (70 mg, 0.050 mmol)를 첨가하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다 (팽윤시켰다): 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 10분 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 용기의 하단을 통해 첨가된 DMF (6.25 mL)로 세척하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0451] 표준-커플링 절차:

[0452] 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5 mL)를 첨가하고, 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용



기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0453] 2급 아민-커플링 절차:

[0454] 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 용기의 하단을 통해 첨가된 DMF (6.25 mL)로 세척하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)에 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5 mL)를 첨가하고, 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0455] 통상의 아미노산-커플링 절차:

[0456] 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 시스템을 통상의 아미노산의 반응 용기에의 수동 첨가 (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량)를 위해 시스템에 의해 중단시킨 다음, 자동화를 재시작하여 반응 용기에 HATU (DMF 중 0.2M, 1.25 mL, 5 당량), 및 최종적으로 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5 mL)를 첨가하고, 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0457] 최종 캐핑 절차:

[0458] 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다: 반응 용기에 DMF (2.5 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 반응 용기의 하단으로부터의 N<sub>2</sub> 버블링과 함께 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.5 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가한 다음, 클로로아세트산 무수물 (DMF 중 0.4M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 용기의 하단을 통해 첨가된 DMF (6.25 mL)로 세척하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 NMM (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가한 다음, 클로로아세트산 무수물 (DMF 중 0.4M, 1.25 mL, 10 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 6회 세척하였다: DMF (2.5 mL)를 용기의 하단

을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{DMF}$  (v/v/v 1:1:3 2.5 mL)를 첨가하고, 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.5 mL)를 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DCM (2.5 mL)을 용기의 하단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 이어서, 생성된 수지를 10분 동안 질소의 스트림으로 건조시켰다.

[0459] 전반적 탈보호 방법 A:

[0460] 모든 조작을 달리 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "전반적 탈보호 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. "탈보호 용액"을 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:디티오프레이톨 (92.5:2.5:2.5:2.5 v:v:v:w)을 사용하여 제조하였다. 수지를 반응 용기로부터 분리하고, 프릿이 장착된 25 mL 시린지로 옮겼다. 시린지에 "탈보호 용액" (5.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 85분 동안 진탕기에서 혼합하였다. 용액을 여과하고, 농축시키고, 디에틸 에테르 (30 mL)로 희석하였다. 침전된 고체를 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 용액을 경사분리하고, 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 재현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 화합물을 백색 내지 회백색 고체로서 수득하였다.

[0461] 전반적 탈보호 방법 B:

[0462] 모든 조작을 달리 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "전반적 탈보호 방법 B"의 절차는 0.04 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.04 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. "탈보호 용액"을 트리플루오로아세트산:트리이소프로필실란 (96:4; v:v)을 사용하여 제조하였다. 수지를 반응 용기로부터 분리하고, 프릿이 장착된 10 mL 시린지로 옮겼다. 시린지에 "탈보호 용액" (2.0-3.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 1시간 또는 1.5시간 동안 진탕기에서 혼합하였다. 용액을 여과하고, 탈보호 용액 (0.5 mL)으로 세척하고, 농축시키고, 디에틸 에테르 (30 mL)로 희석하였다. 침전된 고체를 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 용액을 경사분리하고, 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 재현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 화합물을 백색 내지 회백색 고체로서 수득하였다.

[0463] 전반적 탈보호 방법 C:

[0464] 모든 조작을 달리 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "전반적 탈보호 방법 C"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. "탈보호 용액"을 트리플루오로아세트산:트리이소프로필실란:디티오프레이톨 (95:2.5:2.5 v:v:w)을 사용하여 제조하였다. 수지를 반응 용기로부터 분리하고, 바이오-라드(Bio-Rad) 튜브로 옮겼다. 바이오-라드 튜브에 "탈보호 용액" (4.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 60분 동안 진탕기에서 혼합하였다. 용액을 여과하고, 디에틸 에테르 (30 mL) 중에 희석하였다. 침전된 고체를 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 용액을 경사분리하고, 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 재현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 화합물을 백색 내지 회백색 고체로서 수득하였다.

[0465] 전반적 탈보호 방법 D:

[0466] 모든 조작을 달리 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "전반적 탈보호 방법 B"의 절차는 0.100 mmol 규모로 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. "탈보호 용액"을 트리플루오로아세트산:트리이소프로필실란:디티오프레이톨 (94:3:3 v:v:w)을 사용하여 제조하였다. 수지를 반응 용기로부터 분리하고, 프릿이 장착된 25 mL 시린지로 옮겼다. 시린지에 "탈보호 용액" (5.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 진탕기에서 5분 동안 혼합하였다. 용액을 여과하고, 디에틸 에테르 (30 mL) 중에 희석하였다. 침전된 고체를

3분 동안 원심분리하였다. 상청액 용액을 경사분리하고, 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 재현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 화합물을 백색 내지 회백색 고체로서 수득하였다.

[0467] 전반적 탈보호 방법 E:

[0468] 모든 조작을 달리 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "전반적 탈보호 방법 E"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 Fmoc Gly-CITrt 링커의 양에 의해 결정된다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. "탈보호 용액"을 트리플루오로아세트산:트리이소프로필실란:디티오프레이톨 (95:2.5:2.5 v:v:w)을 사용하여 제조하였다. 수지를 반응 용기로부터 분리하고, 바이오-라드 튜브로 옮겼다. 바이오-라드 튜브에 "탈보호 용액" (2.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 진탕기에서 혼합하였다. 용액을 여과하고, 원심분리 튜브에 수집하였다. 바이오-라드 튜브에 "탈보호 용액" (2.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 진탕기에서 혼합하였다. 용액을 여과하고, 원심분리 튜브에 수집하였다. 바이오-라드 튜브에 "탈보호 용액" (2.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 진탕기에서 혼합하였다. 용액을 여과하고, 원심분리 튜브에 수집하였다. 원심분리 튜브 중 용액을 60분 동안 정치되도록 하였다. 이어서, 수집된 용액을 디에틸 에테르 (30 mL)로 희석하고, 침전물이 형성되었다. 침전된 고체를 3분 동안 원심분리하였다. 상청액 용액을 경사분리하고, 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 재현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 화합물을 백색 내지 회백색 고체로서 수득하였다.

[0469] 전반적 탈보호 방법 F:

[0470] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "전반적 탈보호 방법 F"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 링크 링커의 양에 의해 결정된다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. "탈보호 용액"을 트리플루오로아세트산:트리이소프로필실란:디티오프레이톨 (95:2.5:2.5 v:v:w)을 사용하여 제조하였다. 수지를 반응 용기로부터 분리하고, 6 mL 바이오-라드 튜브로 옮겼다. 바이오-라드에 "탈보호 용액" (4.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 90분 동안 진탕기에서 혼합하였다. 용액을 여과하고, 디에틸 에테르 (30 mL) 중에 희석하였다. 침전된 고체를 3분 동안 원심분리하였다. 상청액 용액을 경사분리하고, 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 재현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 디에틸 에테르 (25 mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 3분 동안 원심분리하였다. 상청액을 경사분리하고, 나머지 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 화합물을 백색 내지 회백색 고체로서 수득하였다.

[0471] 고리화 방법 A:

[0472] 모든 조작을 달리 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "고리화 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 화합물을 생성하기 위해 사용된 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 절차에 사용된 화합물의 양의 직접 결정에 기초하지 않는다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 조 화합물 고체를 아세트ونی트릴:수성 8M 구아니딘/50mM 트리스 (1:3) (pH 8.6) (7 mL:18 mL 또는 유사한 비율)의 용액 중에 용해시키고, 이어서 용액을, 필요한 경우에, 수성 NaOH (1.0M)를 사용하여 pH = 8.5-9.0으로 조정하였다. 이어서, 용액을 진탕기를 12 내지 18시간 동안 사용하여 혼합하였다. 반응 용액을 농축시킨 다음, 잔류물을 아세트ونی트릴:물 중에 용해시켰다. 이 용액을 역상 HPLC 정제에 적용하여 목적 시클릭 화합물을 수득하였다.

[0473] 고리화 방법 C:

[0474] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "고리화 방법 C"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 화합물을 생성하기 위해 사용된 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 절차에 사용된 화합물의 양의 직접 결정에 기초하지 않는다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 조 화합물 고체를 아세트ونی트릴:수성 0.1M 중탄산암모늄 완충제 (11 mL:24 mL 또는 유사한 비율)의 용액 중에 용해시키고, 이어서 용액을 수성 NaOH (1.0M)를 사용하여 pH = 8.5-9.0으로 조심스럽게 조정하였다. 이어서, 용액을 진탕기를 12 내지 18시간 동안 사용하여 혼합하였다. 반응 용액을 농축시킨 다음, 잔류물을 아세트ونی트릴:물 중에 용해시켰다. 이 용액을 역상

HPLC 정제에 적용하여 목적 시클릭 화합물을 수득하였다.

[0475] 고리화 방법 D:

[0476] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "고리화 방법 D"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 화합물을 생성하기 위해 사용된 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 절차에 사용된 화합물의 양의 직접 결정에 기초하지 않는다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 조 화합물 고체를 아세트니트릴:수성 0.1M 중탄산암모늄 완충제 (11 mL:24 mL)의 용액 중에 용해시키고, 이어서 용액을 수성 NaOH (1.0M)를 사용하여 pH = 8.5-9.0으로 조심스럽게 조정하였다. 이어서, 용액을 교반 하에 12 내지 18시간 동안 혼합하였다. 반응 용액을 농축시킨 다음, 잔류물을 아세트니트릴:물 중에 용해시켰다. 이 용액을 역상 HPLC 정제에 적용하여 목적 시클릭 화합물을 수득하였다.

[0477] 고리화 방법 E:

[0478] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "고리화 방법 E"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 화합물을 생성하기 위해 사용된 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 절차에 사용된 화합물의 양의 직접 결정에 기초하지 않는다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 조 화합물 고체를 수성 6M 구아니딘 HCl 완충제의 용액 (15 mL) 중에 용해시키고, 이어서 용액을 교반 하에 12 내지 18시간 동안 혼합하였다. 반응 용액을 농축시키고, DMSO 15 mL를 잔류물에 첨가하여 슬러리를 수득하였으며, 이를 여과하였다. 이 여과된 용액을 역상 HPLC 정제로 처리하여 목적 시클릭 화합물을 수득하였다.

[0479] 수동 커플링 절차 A:

[0480] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 바이오-라드 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 주기적으로 진탕시킨 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 5회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 진탕시킨 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 전형적 아미노산 (1.2-10 당량) (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량)에 이어서 전형적 HATU (1.210 당량) (DMF 중 0.2M, 2.5 mL, 5 당량), 및 최종적으로 전형적 DIPEA (2.4- 20 당량) (DMF 중 0.8M, 1.25 mL, 10 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 60분 내지 18시간 동안 진탕시킨 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (4.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 60초 동안 진탕시킨 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다.

[0481] 수지 상 N-메틸화 방법 A. (Turner, R. A.; Hauksson, N. E.; Gipe, J. H.; Lokey, R. S. Org. Lett. 2013, 15(19), 5012-5015):

[0482] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "수지 상 N-메틸화 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 화합물을 생성하기 위해 사용된 수지에 결합된 시버 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 절차에 사용된 화합물의 양의 직접 결정에 기초하지 않는다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다.

[0483] 수지를 25 mL 프릿화 시린지로 옮겼다. 수지에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 5.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 진탕시킨 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 DMF (4.0 mL)로 3회 세척하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 4.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 진탕시킨 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 연속적으로 DMF (4.0 mL)로 3회 및 DCM (4.0 mL)으로 3회 세척하였다. 수지를 DMF (2.0 mL) 및 에틸 트리플루오로아세테이트 (0.119 mL, 1.00 mmol), 1,8-디아자비스클로[5.4.0]운데스-7-엔 (0.181 mL, 1.20 mmol) 중에 현탁시켰다. 혼합물을 진탕기에 60분 동안 두었다. 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 연속적으로 DMF (4.0 mL)로 3회 및 DCM (4.0 mL)으로 3회 세척하였다.

[0484] 수지를 건조 THF (2.0 mL)로 3회 세척하여 임의의 잔류수를 제거하였다. 오븐 건조된 4.0 mL 바이알에 THF (1.0 mL) 및 건조 4 Å 분자체 (20 mg) 상의 트리페닐포스핀 (131 mg, 0.500 mmol)을 첨가하였다. 용액을 수지로 옮기고, 디이소프로필 아조디카르복실레이트 (0.097 mL, 0.5 mmol)를 천천히 첨가하였다. 수지를 15분 동안 교반하였다. 용액을 프릿을 통해 배출하고, 수지를 건조 THF (2.0 mL)로 3회 세척하여 임의의 잔류수를 제거하였다. 오븐 건조된 4.0 mL 바이알에 THF (1.0 mL), 건조 4 Å 분자체 (20 mg) 상의 트리페닐포스핀 (131 mg, 0.500 mmol)을 첨가하였다. 용액을 수지로 옮기고, 디이소프로필 아조디카르복실레이트 (0.097 mL, 0.5



mmol)를 천천히 첨가하였다. 수지를 15분 동안 교반하였다. 용액을 프리트를 통해 배출하였다. 수지를 연속적으로 DMF (4.0 mL)로 3회 및 DCM (4.0 mL)으로 3회 세척하였다. 수지를 에탄올 (1.0 mL) 및 THF (1.0 mL) 중에 현탁시키고, 수소화붕소나트륨 (37.8 mg, 1.000 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 교반하고, 배출하였다. 수지를 연속적으로 DMF (4.0 mL)로 3회 및 DCM (4.0 mL)으로 3회 세척하였다.

[0485] 락탐 형성 A:

[0486] "고리화 방법 D"로부터 수득된 조 화합물에 무수 디메틸포름아미드 (7.5 mL)에 이어서 HATU 1.5 당량, N-메틸모르폴린 3 당량을 첨가하였다. 반응을 3시간 내지 밤새 실온에서 교반하였다. 빙초산 (3 방울)을 첨가하고, 용매를 진백(Genevac) EZ2에서 증발 하에 제거하였다. 화합물을 DMF (2 mL) 중에 용해시키고, 0.2  $\mu$ m 시린지 필터를 통해 여과하고, 역상 정제에 적용시켰다.

[0487] 락탐 형성 B:

[0488] 정제로부터 수득된 화합물에 무수 디메틸포름아미드 (1 mL)에 이어서 DMF (0.1M) 중의 새로이 제조된 스톱으로 HATU 1.5 당량 및 DMF 중의 새로이 제조된 스톱 0.3M으로서 N-메틸모르폴린 3 당량을 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반하고, 0.2  $\mu$ m 필터를 통해 여과하고, 역상 정제에 적용시켰다.

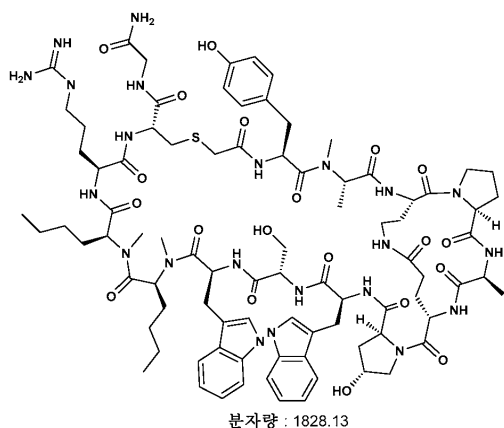
[0489] 마이크로절단 A:

[0490] 수지의 작은 < 10 mg 샘플에 TIS 2 방울 및 트리플루오로아세트산 1 mL를 첨가하고, 실온에서 진탕시켰다. 1시간 후, 소량의 분취물을 분리하고, 0.5 mL 아세토니트릴로 희석하고, 여과하고, LC-MS에 의한 분석을 얻었다.

[0491] 일반적 합성 순서:

[0492] "일반적 합성 순서"는 본원에 기재된 시클릭 화합물을 수득하는데 사용된 절차의 일반적 순서를 기재한다. 순서는 상기 기재된 일반적 방법으로 구성된다. 순서는 수지-팽윤 절차로 시작했다. 이어서, 일련의 아미노산 커플링을 수지-결합된 화합물의 N-말단이 1급 아민인 경우에 단일-커플링 절차 또는 수지-결합된 화합물의 N-말단이 2급 아민인 경우에 이중-커플링 절차를 사용하여 순차적으로 수행하였다. 순서의 모든 아미노산의 커플링 후에, 추가의 절차를 주어진 순서로 수행하였다: 최종 세척, 클로로아세트산 커플링, 전반적 탈보호, 고리화 및 최종적으로 락탐 형성.

[0493] 실시예 1400의 제조



[0494]

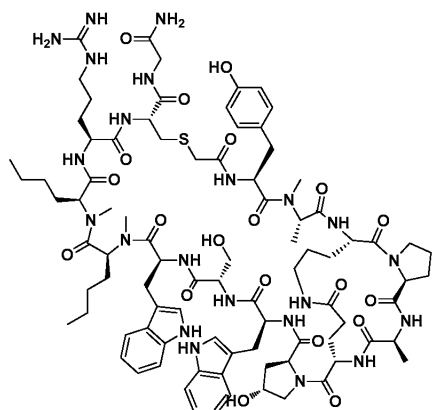
[0495] 실시예 1400을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 C", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다.

[0496] 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 0.5 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 99%였다.





[0507] 실시예 1402의 제조



분자량: 1842.13

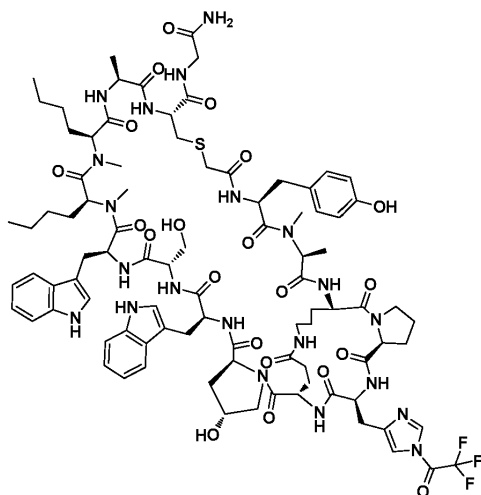
[0508]

[0509] 실시예 1402를 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 C", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 4.6 mg 이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 99%였다.

[0510] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.44분; ESI-MS(+) m/z 921.7 (M+2H).

[0511] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.46분; ESI-MS(+) m/z 921.7 (M+2H).

[0512] 실시예 1403의 제조



분자량: 1919.09

[0513]

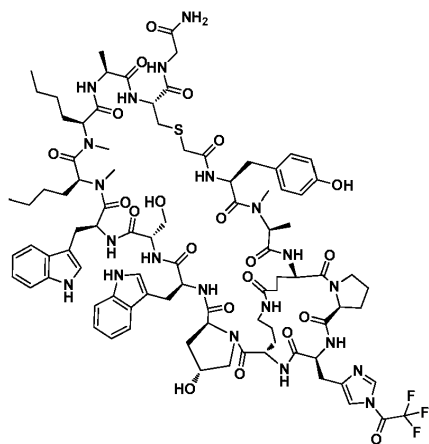
[0514] 실시예 1403을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 C", "고리화 방법 D"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 10-61% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 19.2 mg 이었다.

[0515] "락탐 형성 B"에 따랐다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 3.5 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 91%였다.

[0516] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.39분; ESI-MS(+) m/z 961.3 (M+2H).

[0517] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.41분; ESI-MS(+) m/z 961.2 (M+2H).

[0518] 실시예 1404의 제조



분자량: 1919.09

[0519]

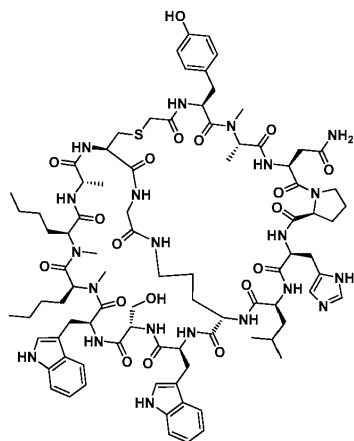
[0520] 실시예 1404를 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 C", "고리화 방법 D"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-60% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 12.8 mg이었다.

[0521] "락탐 형성 B"에 따랐다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 1.1 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 92%였다.

[0522] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.49분; ESI-MS(+) m/z 961.2 (M+2H).

[0523] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.51분; ESI-MS(+) m/z 961.3 (M+2H).

[0524] 실시예 1405의 제조



분자량 : 1809.10

[0525]

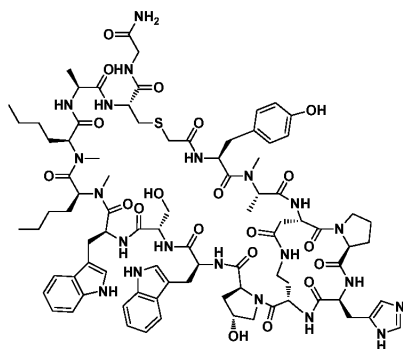
[0526] 실시예 1405를 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 C", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다.

[0527] 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 15-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 2.4 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 94%였다.

[0528] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.55분; ESI-MS(+) m/z 905.4 (M+2H).

[0529] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.55분; ESI-MS(+) m/z 905.6 (M+2H).

[0530] 실시예 1500의 제조



분자량 : 1795.03

[0531]

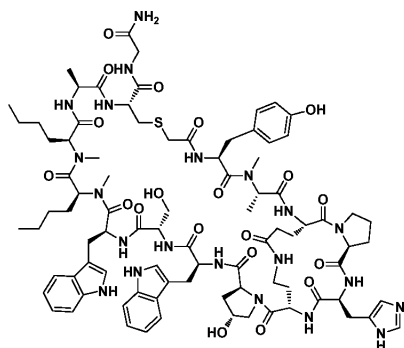
[0532] 실시예 1500을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 C", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 20-60% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 1.3 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그

의 추정 순도는 99%였다.

[0533] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.50분; ESI-MS(+) m/z 898.5 (M+2H).

[0534] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.44분; ESI-MS(+) m/z 898.2 (M+2H).

[0535] 실시예 1501의 제조



분자량 : 1809.05

[0536]

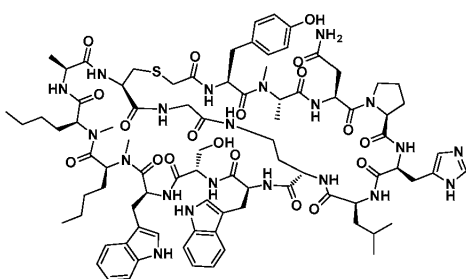
[0537] 실시예 1501을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 C", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트오니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트오니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트오니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트오니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 15-60% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 4.8 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그 의 추정 순도는 99%였다.

[0538] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.45분; ESI-MS(+) m/z 905.3 (M+2H).

[0539] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.41분; ESI-MS(+) m/z 905.4 (M+2H).

[0540] ESI-HRMS(+) m/z: 계산치: 904.9325 (M+2H); 실측치: 904.9305 (M+2H)

[0541] 실시예 1502의 제조



분자량 : 1795.07

[0542]

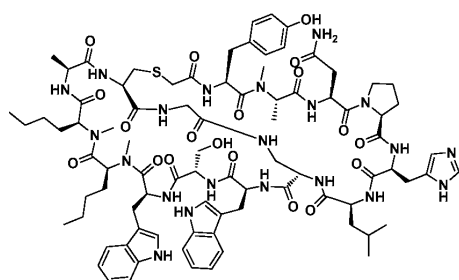
[0543] 실시예 1502를 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 E", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트오니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트오니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추

가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 20-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 20-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 9.8 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 97%였다.

[0544] 분석 LCMS 조건 D: 채류 시간 = 1.60분; ESI-MS(+) m/z 898.5 (M+2H).

[0545] 분석 LCMS 조건 E: 채류 시간 = 1.56분; ESI-MS(+) m/z 898.4 (M+2H).

[0546] 실시예 1503의 제조



분자량: 1781.04

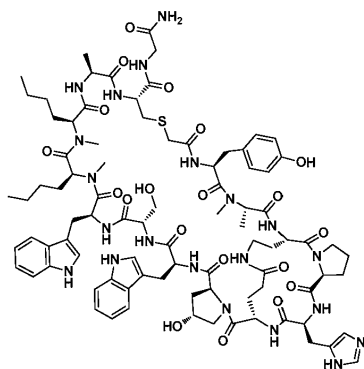
[0547]

[0548] 실시예 1503을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 E", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 15-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 25-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 3.7 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 96%였다.

[0549] 분석 LCMS 조건 D: 채류 시간 = 1.63분; ESI-MS(+) m/z 891.7 (M+2H).

[0550] 분석 LCMS 조건 E: 채류 시간 = 1.60분; ESI-MS(+) m/z 891.2 (M+2H).

[0551] 실시예 1504의 제조



분자량: 1809.05

[0552]

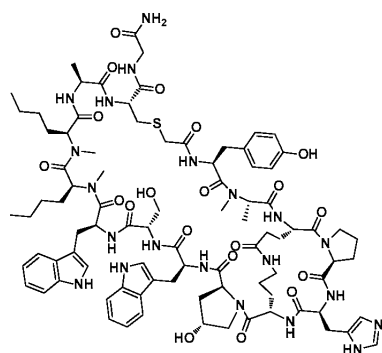
[0553] 실시예 1504를 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차",

"프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 F", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 10-60% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 2.4 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0554] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.43분; ESI-MS(+) m/z 905.4 (M+2H).

[0555] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.40분; ESI-MS(+) m/z 905.3 (M+2H).

[0556] 실시예 1505의 제조



[0557] 분자량 : 1823.08

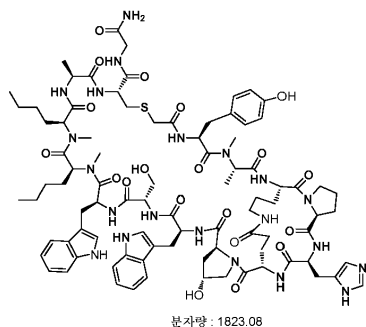
[0558] 실시예 1505를 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-폐윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 F", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 워터스 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-65% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 250 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 15-60% B, 25분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 3.7 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0559] 분석 LCMS 조건 D: 체류 시간 = 1.50분; ESI-MS(+) m/z 912.2 (M+2H).

[0560] 분석 LCMS 조건 E: 체류 시간 = 1.42분; ESI-MS(+) m/z 912.4 (M+2H).



[0561] 실시예 1506의 제조



[0562]

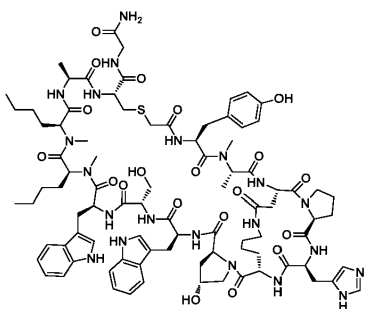
[0563] 실시예 1506을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 E", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 40-80% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 1.2 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 96%였다.

[0564] 분석 LCMS 조건 H: 체류 시간 = 1.49분; ESI-MS(+) m/z 912.6 (M+2H).

[0565] 분석 LCMS 조건 I: 체류 시간 = 2.60분; ESI-MS(+) m/z 912.7 (M+2H).

[0566] ESI-HRMS(+) m/z: 계산치: 911.9403(M+2H); 실측치: 911.9391 (M+2H).

[0567] 실시예 1507의 제조



[0568]

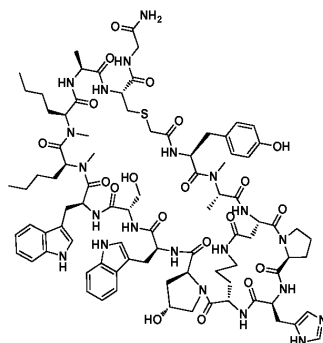
[0569] 실시예 1507을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 E", "고리화 방법 D", 및 "락탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 40-80% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 4.5 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 98%였다.

[0570] 분석 LCMS 조건 H: 체류 시간 = 1.54분; ESI-MS(+) m/z 913.2 (M+2H).

[0571] 분석 LCMS 조건 I: 체류 시간 = 2.67분; ESI-MS(+) m/z 912.9 (M+2H).

[0572] ESI-HRMS(+) m/z: 계산치: 911.9385 (M+2H); 실측치: 911.9403 (M+2H).

[0573] 실시예 1508의 제조



분자량: 1809.05

[0574]

[0575] 실시예 1508을 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 C: 수지-펄윤 절차", "프렐류드 방법 C: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 2급 아민-커플링 절차", "프렐류드 방법 C: 최종 세척 절차", 클로로아세트산 커플링 절차 B "전반적 탈보호 방법 E", "고리화 방법 D", 및 "라탐 형성 A"로 구성된, 상기 기재된 "일반적 합성 순서"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% 트리플루오로아세트산 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 40-80% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 6.7 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0576] 분석 LCMS 조건 H: 체류 시간 = 1.55분; ESI-MS(-) m/z 904.7 (M+2H).

[0577] 분석 LCMS 조건 I: 체류 시간 = 3.11분; ESI-MS(+) m/z 905.1 (M+2H).

[0578] ESI-HRMS(+) m/z: 계산치: 904.9302 (M+2H); 실측치: 904.9325 (M+2H)

[0579] 하기 절차를 실시예 5001-5008에 사용하였다:

[0580] 분석 데이터:

[0581] 질량 분광측정법: "ESI-MS(+)"는 양이온 모드로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-MS(-)"는 음이온 모드로 수행된 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(+)"는 양이온 모드로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미하고; "ESI-HRMS(-)"는 음이온 모드로 수행된 고해상도 전기분무 이온화 질량 분광측정법을 의미한다. 검출된 질량은 "m/z" 단위 지정에 따라 보고된다. 1000 초과의 정확한 질량을 갖는 화합물은 종종 이중-하전 또는 삼중-하전 이온으로 검출되었다.

[0582] 분석 조건 A:

[0583] 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 1 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0584] 분석 조건 B:

[0585] 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 0.5 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0586] 분석 조건 C:

[0587] 칼럼: 페노메넥스 루나 C18 2.0 X 30 mm 3.0  $\mu$ m 입자; 이동상 A: 아세트니트릴:물 (10:90), 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 아세트니트릴:물 (90:10), 0.1% TFA 포함; 온도: 40°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 2분에 걸침, 이어서

100% B에서 1.0-분 유지; 유량: 0.8 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0588] 분석 조건 D:

[0589] 칼럼: 워터스 액티비 BEH C18 2.1 X 50 mm 1.7  $\mu$ m 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함; 이동상 B: 아세트니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 40°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 1.5분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 0.8 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0590] 분석 조건 E:

[0591] 칼럼: 워터스 액티비 BEH C18 2.1 X 50 mm 1.7  $\mu$ m 입자; 이동상 A: 물, 0.05% TFA 포함; 이동상 B: 아세트니트릴, 0.05% TFA 포함; 온도: 40°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 0.8 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0592] 일반적 절차:

[0593] 프렐류드 방법 A:

[0594] 모든 조작을 프렐류드 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스) 상에서 자동화 하에 수행하였다. 모든 절차는 언급되지 않는 한 하단 프릿이 장착된 10 mL 폴리프로필렌 튜브에서 수행하였으며; 여기서 반응의 규모는 0.100 mmol을 초과하였고, 하단 프릿이 장착된 40 mL 폴리프로필렌 튜브를 사용하였다. 튜브를 튜브의 하단 및 상단 둘 다를 통해 프렐류드 펩티드 합성기에 연결하였다. DMF 및 DCM을 튜브의 상단을 통해 첨가할 수 있었으며, 이를 튜브의 측면으로 동등하게 세척해 내었다. 나머지 시약을 튜브의 하단을 통해 첨가하고, 프릿을 통해 통과시켜 수지를 접촉시켰다. 모든 용액을 튜브의 하단을 통해 제거하였다. "주기적 교반"은 하단 프릿을 통한 N<sub>2</sub> 기체의 짧은 펄스를 기재하며; 펄스는 대략 5초 동안 지속되고, 30초마다 발생한다. DMF 중 클로로아세틸 클로라이드 용액을 제조의 24시간 내에 사용하였다. 아미노산 용액은 일반적으로 제조로부터 3주 이후에는 사용하지 않았다. HATU 용액은 제조의 5일 이내에 사용하였다. DMF = 디메틸포름아미드; HATU = 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트; DIPEA = 디이소프로필 에틸아민; 링크 = (2,4-디메톡시페닐)(4-알콕시페닐)메탄아민, 여기서 "4-알콕시"는 폴리스티렌 수지에 대한 연결의 위치 및 유형을 기재한다. 사용되는 수지는 링크 링커 (질소에서 Fmoc-보호됨); 100-200 메쉬, 1% DVB, 0.56 mmol/g 로딩을 갖는 메리필드 중합체 (폴리스티렌)이다. 사용되는 통상의 아미노산은 하기에 열거되어 있으며, 측쇄 보호기는 괄호 안에 제시되어 있다. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

[0595] "프렐류드 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모로 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 링크 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 상기 기재된 링크-메리필드 수지의 대략 178 mg에 해당한다. 모든 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 아미노산 커플링 전에, 모든 화합물 합성 순서를 "수지-팽윤 절차"로서 하기 기재된 수지-팽윤 절차로 시작하였다. 1급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "단일-커플링 절차"를 사용하였다. 2급 아민 N-말단에 대한 아미노산의 커플링은 하기 기재된 "이중-커플링 절차"를 사용하였다. 화합물의 N-말단에 대한 클로로아세틸클로라이드의 커플링은 하기 상세화된 "클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차"에 의해 기재되어 있다.

[0596] 수지-팽윤 절차:

[0597] 10 mL 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 메리필드:링크 수지 (178 mg, 0.100 mmol)를 첨가하였다. 수지를 하기와 같이 3회 세척하였다 (팽윤시켰다): 반응 용기에 DMF (2.0 mL)를 첨가하고, 이때 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 후에 용매를 프릿을 통해 배출하였다.

[0598] 단일-커플링 절차:

[0599] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼

합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.0 mL, 2 당량), 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.0 mL, 2 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 0.5 mL, 4 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물 (2.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 주기적으로 90초 동안 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0600] 이중-커플링 절차:

[0601] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.0 mL, 2 당량), 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.0 mL, 2 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 0.5 mL, 4 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아미노산 (DMF 중 0.2M, 1.0 mL, 2 당량), 이어서 HATU (DMF 중 0.2M, 1.0 mL, 2 당량), 및 최종적으로 DIPEA (DMF 중 0.8M, 0.5 mL, 4 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 15분 동안 주기적으로 교반한 다음, 반응 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 2회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 아세트산 무수물 (2.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 주기적으로 90초 동안 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를 직접 후속 단계에 사용하였다.

[0602] 클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차:

[0603] 이전 단계로부터의 수지를 함유하는 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 피페리딘:DMF (20:80 v/v, 2.0 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 3분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 6회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 30초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 반응 용기에 DIPEA (DMF 중 0.8M, 3.0 mL, 24 당량), 이어서 클로로아세틸 클로라이드 (DMF 중 0.8M, 1.65 mL, 13.2 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주기적으로 교반한 다음, 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 3회 세척하였다: 각 세척에 대해, DMF (2.0 mL)를 용기의 상단을 통해 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 수지를 하기와 같이 연속적으로 4회 세척하였다: 각 세척에 대해,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 mL)를 용기의 상단에 첨가하고, 생성된 혼합물을 90초 동안 주기적으로 교반한 후에 용액을 프릿을 통해 배출하였다. 생성된 수지를  $\text{N}_2$  스트림 하에 15분 동안 두었다.

[0604] 심포니 방법 A:

[0605] 이 컬렉션의 절차는 언급된 바를 제외하고는 "프렐류드 방법 A"의 것과 동일하다. 모든 절차에 대해 심포니 X 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스)를 프렐류드 펩티드 합성기 대신 사용하고, 모든 시약을 반응 용기의 상단을 통해 첨가하였다.

[0606] 수지-팽윤 절차:

[0607] 이 절차는 "프렐류드 방법 A: 수지-팽윤 절차"와 동일하다.

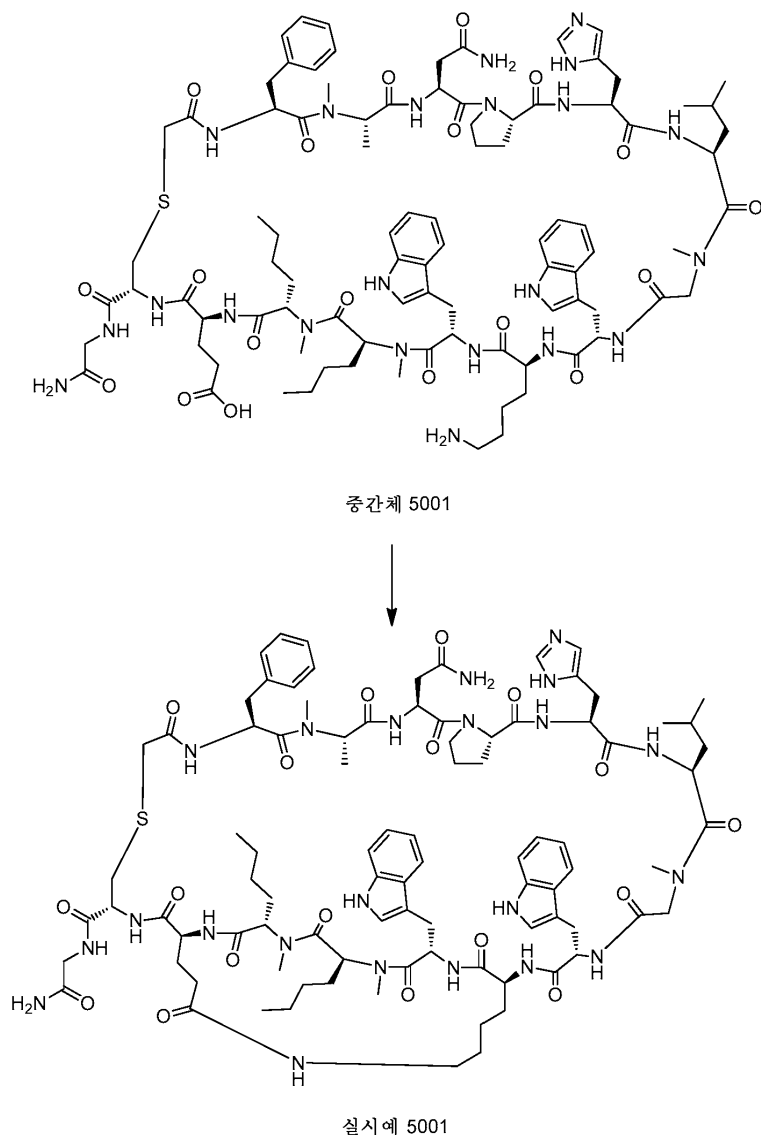
[0608] 단일-커플링 절차:

- [0609] 이 절차는 DIPEA 용액의 농도가 0.4M이고, 이러한 용액 1.0 mL를 반응에 전달하였다는 것을 제외하고는 "프렐류드 방법 A: 단일-커플링 절차"와 동일하다.
- [0610] 이중-커플링 절차:
- [0611] 이 절차는 DIPEA 용액의 농도가 0.4M이고, 이러한 용액 1.0 mL를 반응에 전달하였다는 것을 제외하고는 "프렐류드 방법 A: 이중-커플링 절차"와 동일하다.
- [0612] 클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차:
- [0613] 이 절차는 "프렐류드 방법 A: 클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차"와 동일하다.
- [0614] 전반적 탈보호 방법 A:
- [0615] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "전반적 탈보호 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 링크 링커의 양에 의해 결정된다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. "탈보호 용액"을 40 mL 유리 바이알 중에서 트리플루오로아세트산 (22 mL), 페놀 (1.325 g), 물 (1.25 mL) 및 트라이소프로필실란 (0.5 mL)을 혼합함으로써 제조할 수 있다. 수지를 반응 용기로부터 분리하고, 4 mL 유리 바이알로 옮겼다. 바이알에 "탈보호 용액" (2.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 진탕기에서 격렬히 혼합하였다 (1분 동안 1000 RPM, 이어서 1-2시간 동안 500 RPM). 혼합물을 0.2 마이크로미터 시린지 필터를 통해 여과하고, 고체를 "탈보호 용액" (1.0 mL) 또는 TFA (1.0 mL)로 추출하였다. 합한 여과물이 채워진 24 mL 시험관에 Et<sub>2</sub>O (15 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 격렬히 혼합하였으며, 이때 상당한 양의 백색 고체가 침전하였다. 혼합물을 5분 동안 원심분리한 다음, 용액을 고체로부터 경사분리하고, 폐기하였다. 고체를 Et<sub>2</sub>O (20 mL) 중에 현탁시킨 다음; 혼합물을 5분 동안 원심분리하고; 용액을 고체로부터 경사분리하고, 폐기하였다. 마지막으로, 고체를 Et<sub>2</sub>O (20 mL) 중에 현탁시키고; 혼합물을 5분 동안 원심분리하고; 용액을 고체로부터 경사분리하고, 폐기하여 조 화합물을 백색 내지 회백색 고체로서 수득하였다.
- [0616] 고리화 방법 A:
- [0617] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "고리화 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 화합물을 생성하기 위해 사용된 수지에 결합된 링크 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 절차에 사용된 화합물의 양의 직접 결정에 기초하지 않는다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 조 화합물 고체를 MeCN:수성 0.1M NH<sub>4</sub>OAc (1:1) 중에 60 mL의 총 부피로 용해시킨 다음, 용액을 수성 NaOH (1.0M)를 사용하여 pH = 8.5-9.0으로 조심스럽게 조정하였다. 이어서, 용액을 12-18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 농축시킨 다음, 잔류물을 DMSO:MeOH 중에 용해시켰다. 이 용액을 역상 HPLC 정제에 적용하여 목적 시클릭 화합물을 수득하였다.
- [0618] 고리화 방법 B:
- [0619] 모든 조작을 언급되지 않는 한 수동으로 수행하였다. "고리화 방법 A"의 절차는 0.100 mmol 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 화합물을 생성하기 위해 사용된 수지에 결합된 링크 링커의 양에 의해 결정된다. 이 규모는 절차에 사용된 화합물의 양의 직접 결정에 기초하지 않는다. 절차는 기재된 부피를 규모의 배수로 조정함으로써 0.100 mmol 넘는 규모로 규모화될 수 있다. 조 화합물 고체를 MeCN:수성 0.1M NH<sub>4</sub>OAc (1:1) 중에 18-22 mL의 총 부피로 용해시킨 다음, 용액을 수성 NaOH (1.0M)를 사용하여 pH = 8.5-9.0으로 조심스럽게 조정하였다. 이어서, 용액을 12-18시간 동안 교반하지 않고 정치되도록 하였다. 반응 용액을 농축시킨 다음, 잔류물을 DMSO:MeOH 중에 용해시켰다. 이 용액을 역상 HPLC 정제에 적용하여 목적 시클릭 화합물을 수득하였다.
- [0620] 일반적 합성 순서 A:
- [0621] "일반적 합성 순서 A"는 본원에 기재된 시클릭 화합물을 수득하는데 사용된 절차의 일반적 순서를 기재한다. 이러한 일반적 절차의 목적을 위해, "심포니 방법 A"의 절차는 "프렐류드 방법 A"의 것과 상호교환가능하다. 10 mL 폴리프로필렌 고체-상 반응 용기에 링크-메리필드 수지 (178 mg, 0.100 mmol)를 첨가하고, 반응 용기를 프렐류드 펩티드 합성기 상에 두었다. "프렐류드 방법 A: 수지-팽윤 절차"에 따랐다. 이어서 일련의 아미노산 커플링을 수지-결합된 화합물의 N-말단이 1급 아민인 경우에 "프렐류드 방법 A: 단일-커플링 절차" 또는 수지-



결합된 화합물의 N-말단이 2급 아민인 경우에 "프렐류드 방법 A: 이중-커플링 절차"에 따라 프렐류드 상에서 순차적으로 수행하였다. "프렐류드 방법 A: 클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차"에 따르고; 이어서 "전반적 탈보호 방법 A"에 따르고; 이어서 "고리화 방법 A"에 따랐다.

[0622] 실시예 5001의 제조



[0623]

[0624] 중간체 5001을 0.200 mmol 규모 상에서 "일반적 합성 순서 A"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 HPLC를 통해 하기 조건: 칼럼: 루나 C18, 30 x 100 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 구배: 0-60% B, 10분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 42 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 9.32분에 용리시켰다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 53.8 mg이었다.

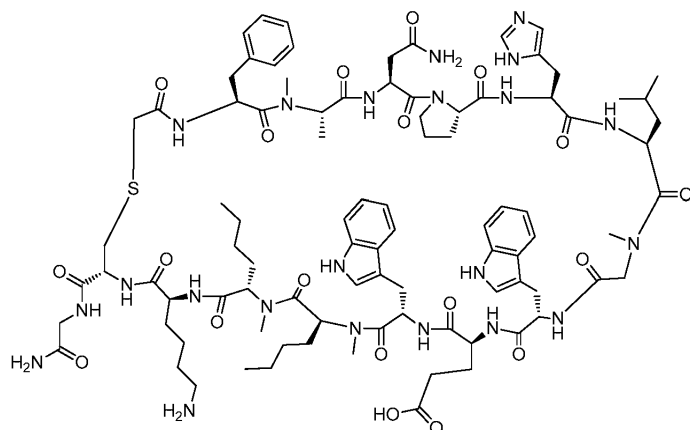
[0625] 분석 조건 D: 체류 시간 = 1.106분; ESI-MS(+) m/z 934.05 (M+2H).

[0626] 실시예 5001을 하기와 같이 제조하였다: DMF (3 mL) 중의 중간체 5001 (53.8 mg, 0.029 mmol)이 채워진 2 mL 바이알에 DIPEA (0.101 mL, 0.577 mmol) 및 HATU (43.8 mg, 0.115 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 50-90% B, 15분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 11.2 mg 이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 99%였다.

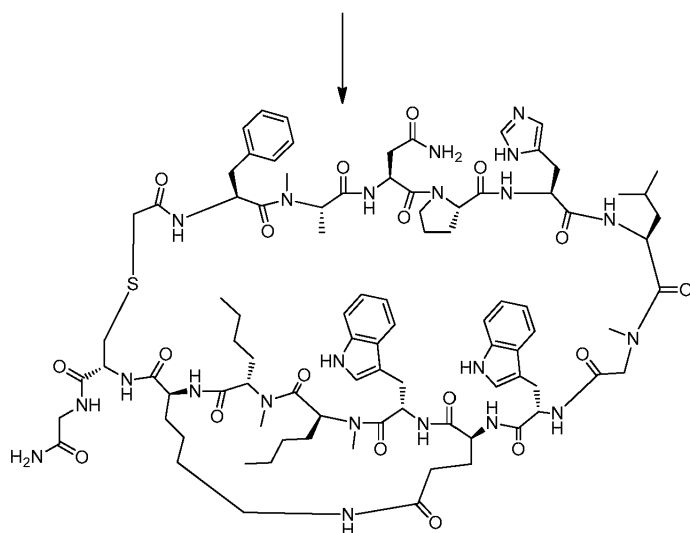
[0627] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.96분; ESI-MS(+) m/z 924.6 (M+2H)

[0628] 분석 조건 B: 체류 시간 = 3.13분; ESI-MS(+) m/z 924.7 (M+2H).

[0629] 실시예 5002의 제조



중간체 5002



실시예 5002

[0630]

[0631] 중간체 5002를 0.200 mmol 규모 상에서 "일반적 합성 순서 A"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 HPLC를 통해 하기 조건: 칼럼: 루나 C18, 30 x 100 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 구배: 10-60% B, 10분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 42 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 50.0 mg이었다.

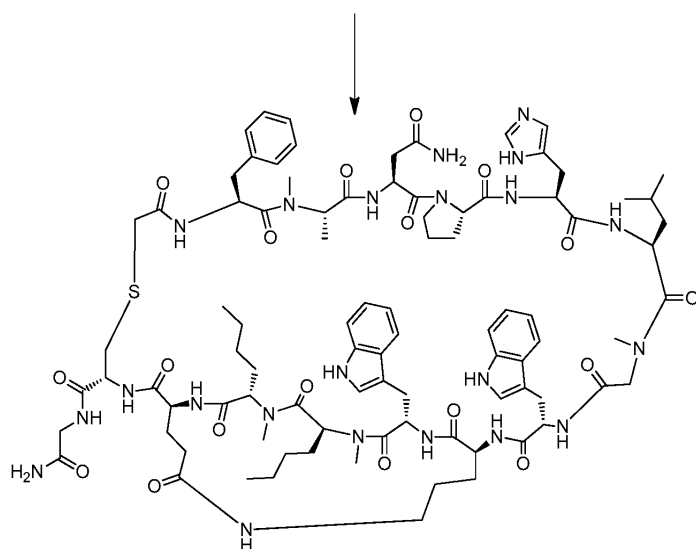
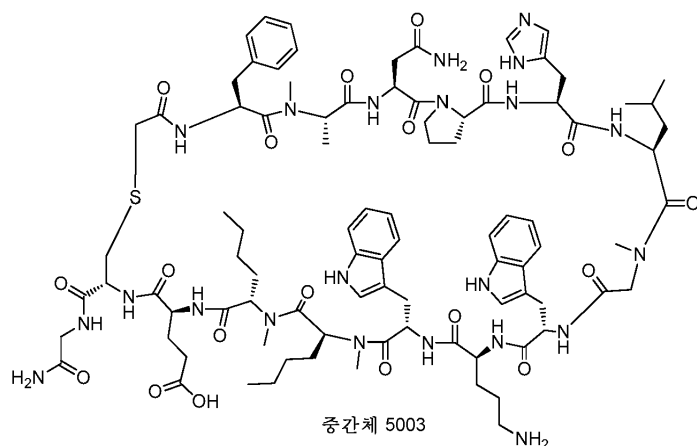
[0632] 분석 조건 C: 체류 시간 = 1.272분; ESI-MS(+) m/z 933.75 (M+2H).

[0633] 실시예 5002를 하기와 같이 제조하였다: DMF (3 mL) 중 중간체 5002 (50 mg, 0.024 mmol)가 채워진 7 mL 바이알에 DIPEA (0.083 mL, 0.478 mmol) 및 HATU (36.3 mg, 0.096 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 30-70% B, 15분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 14.6 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0634] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.82분; ESI-MS(+) m/z 924.8 (M+2H)

[0635] 분석 조건 B: 체류 시간 = 3.01분; ESI-MS(+) m/z 923.3 (M-2H).

[0636] 실시예 5003의 제조



[0637]

[0638] 중간체 5003을 0.200 mmol 규모 상에서 "일반적 합성 순서 A"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 HPLC를 통해 하기 조건: 칼럼: 루나 C18, 30 x 100 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 구배: 10-60% B, 10분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 42 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 50.0 mg이었다.

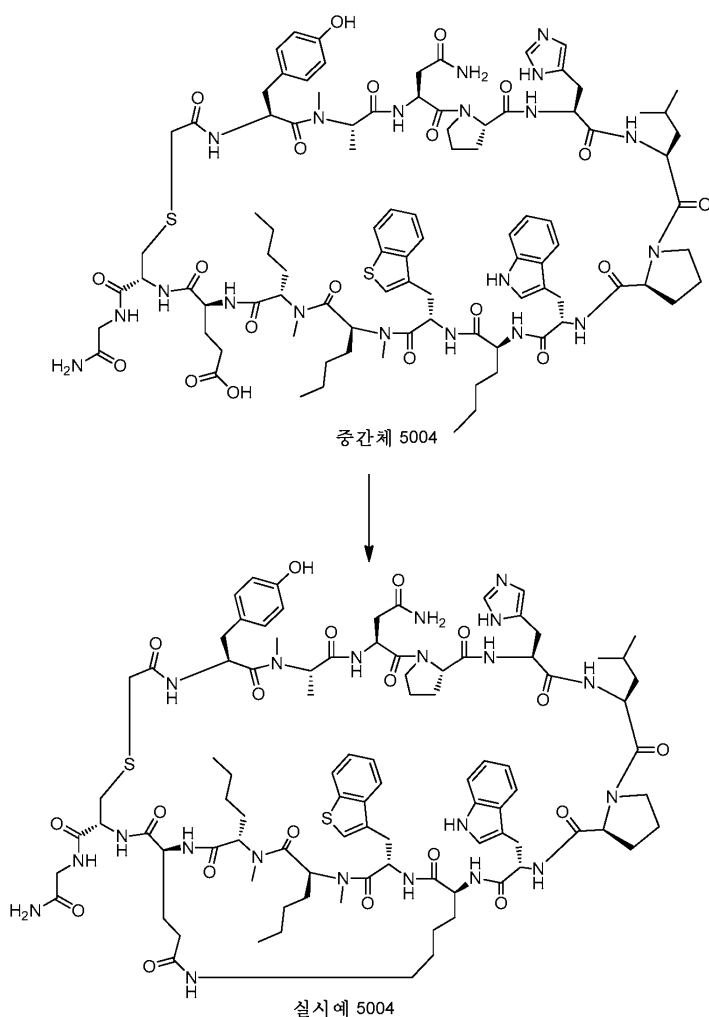
[0639] 분석 조건 C: 체류 시간 = 1.300분; ESI-MS(+) m/z 926.75 (M+2H).

[0640] 실시예 5003을 하기와 같이 제조하였다: DMF (3 mL) 중 중간체 5003 (50 mg, 0.024 mmol)이 채워진 7 mL 바이알에 DIPEA (0.084 mL, 0.481 mmol) 및 HATU (36.6 mg, 0.096 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 25-65% B, 15분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 50-90% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 12.5 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 98%였다.

[0641] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.94분; ESI-MS(+) m/z 917.5 (M+2H)

[0642] 분석 조건 B: 체류 시간 = 3.03분; ESI-MS(+) m/z 917.4 (M+2H)

[0643] 실시예 5004의 제조



[0644]

[0645] 중간체 5004를 0.200 mmol 규모 상에서 "일반적 합성 순서 A"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 HPLC를 통해 하기 조건: 칼럼: 루나 C18, 30 x 100 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 0.1% TFA 포함; 구배: 10-60% B, 10분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 42 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 35.5 mg이었다.

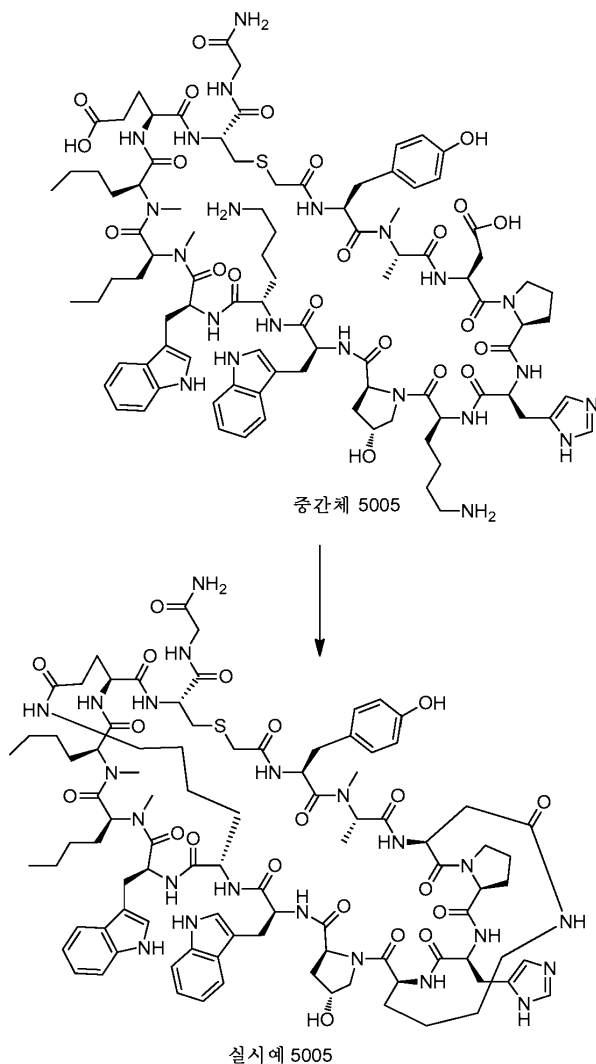
[0646] 분석 조건 D: 체류 시간 = 1.557분; ESI-MS(+) m/z 963.6 (M+2H)

[0647] 실시예 5004를 하기와 같이 제조하였다: 중간체 5004 (35.5 mg, 0.018 mmol)를 DMF (2.0 mL) 중에 용해시켰다. 용액에 DIPEA (0.075 mL, 0.43 mmol)에 이어서 HATU (28 mg, 0.074 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 45 분 동안 교반하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 35-75% B, 15분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 4.9 mg 이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 95%였다.

[0648] 분석 조건 A: 체류 시간 = 2.14분; ESI-MS(+) m/z 954.1 (M+2H)

[0649] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.93분; ESI-MS(+) m/z 952.4 (M-2H).

[0650] 실시예 5005의 제조



[0651]

[0652] 중간체 5005를 "일반적 합성 순서 A"에 따라 0.600 mmol 규모 상에서, "고리화 방법 A" 대신에 "고리화 방법 B"를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 15분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 45-85% B, 40분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성된 물질을 수성 HCl로 연화처리한 다음, 진공 하에 건조시켰다. 생성물의 수율은 112.8 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 93%였다.

[0653] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.37분; ESI-MS(+) m/z 971.2 (M+2H)

[0654] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.58분; ESI-MS(+) m/z 971.3 (M+2H)

[0655] 실시예 5005를 하기와 같이 제조하였다: 교반용 막대가 장착된 중간체 5005 (26.0 mg, 0.013 mmol)가 채워진 15 mL 바이알에 DMF (0.50 mL), 이어서 DIPEA (0.023 mL, 0.129 mmol), 이어서 HATU (12.28 mg, 0.032 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 반응물에 에탄올아민 (0.1 mL)을 첨가하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 45-85% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 7-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분

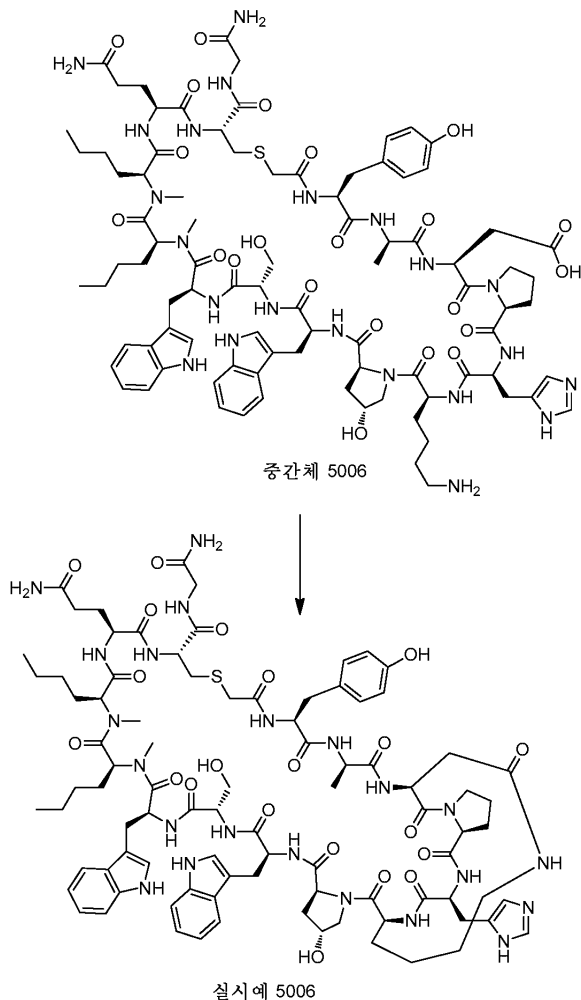


획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 8.0 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0656] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.58분; ESI-MS(+)  $m/z$  952.8 (M+2H)

[0657] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.73분; ESI-MS(+)  $m/z$  953.2 (M+2H).

[0658] 실시예 5006의 제조



[0659]

[0660] 중간체 5006을 "일반적 합성 순서 A"에 따라 0.400 mmol 규모 상에서 "고리화 방법 A" 대신에 "고리화 방법 B"를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-50% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 40-80% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 54.7 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0661] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.43분; ESI-MS(+)  $m/z$  941.3 (M-2H)

[0662] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.62분; ESI-MS(+)  $m/z$  940.8 (M-2H)

[0663] ESI-HRMS(+)  $m/z$ : 계산치: 942.4485 실측치: 942.4475.

[0664] 실시예 5006을 하기와 같이 제조하였다: 교반용 막대가 장착된 중간체 5006 (40 mg mg, 0.020 mmol)이 채워진 1 드램 바이알에 NMP (1.00 mL), 이어서 DIPEA (0.036 mL, 0.20 mmol), 이어서 HATU (19 mg, 0.051 mmol)를 첨가

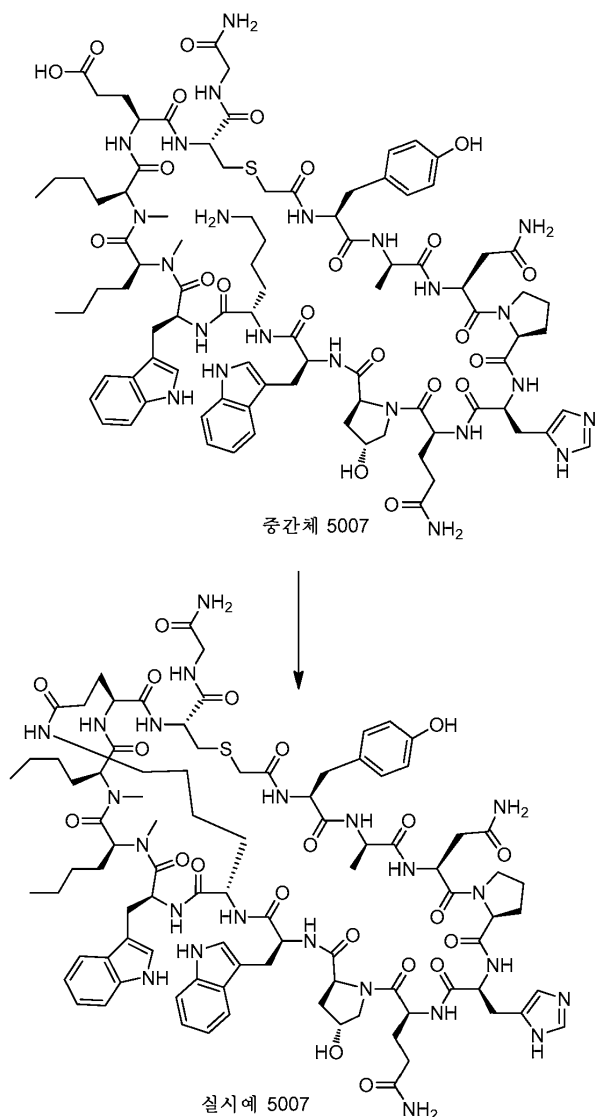
하였다. 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 용액에  $\text{MeNH}_3\text{Cl}$  (5 mg) 및 HATU (10 mg)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 용액에 AcOH (3 방울)를 첨가하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu\text{m}$  입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 45-100% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu\text{m}$  입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-50% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 5.2 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0665] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.497분; ESI-MS(+)  $m/z$  933.45 ( $M+2H$ )

[0666] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.139분; ESI-MS(+)  $m/z$  933.70 ( $M+2H$ )

[0667] ESI-HRMS(+)  $m/z$ : 계산치: 933.4432 실측치: 933.4416.

[0668] 실시예 5007의 제조



[0669]

[0670] 중간체 5007을 "일반적 합성 순서 A"에 따라 0.400 mmol 규모 상에서, "고리화 방법 A" 대신에 "고리화 방법 B"를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu\text{m}$  입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-50% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을

사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 75.1 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0671] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.408분; ESI-MS(+) m/z 961.40 (M-2H)

[0672] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.912분; ESI-MS(+) m/z 963.45 (M+2H)

[0673] ESI-HRMS(+) m/z: 계산치: 962.9618 실측치: 962.9592

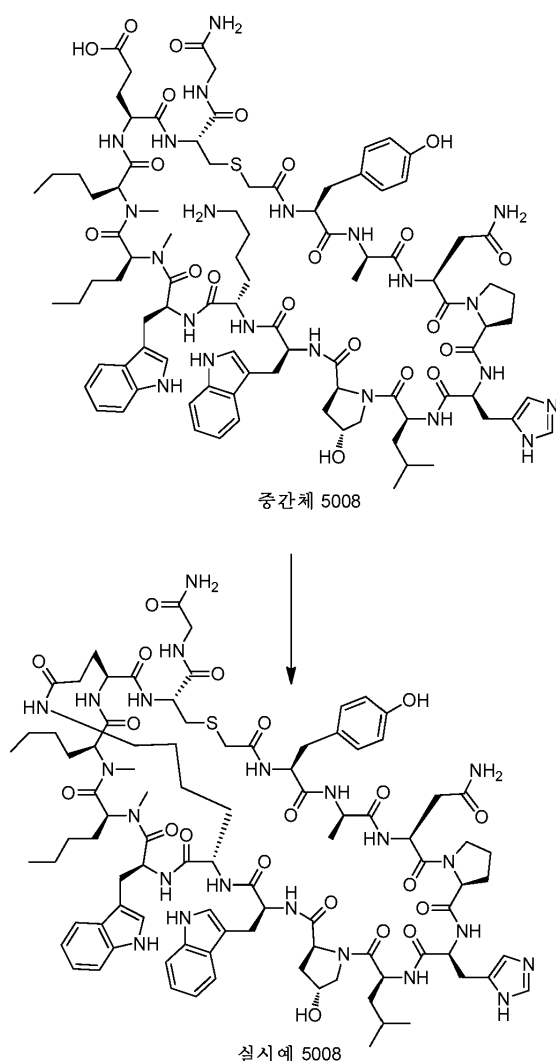
[0674] 실시예 5007을 하기와 같이 제조하였다: 교반용 막대가 장착된 중간체 5007 (49 mg, 0.025 mmol)이 채워진 1 드램 바이알에 NMP (1.00 mL), 이어서 DIPEA (0.043 mL, 0.25 mmol), 이어서 HATU (23 mg, 0.062 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 용액에 MeNH<sub>3</sub>Cl (5 mg) 및 HATU (10 mg)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용액에 AcOH (3 방울)를 첨가하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5-μm 입자; 이동상 A: 5:95 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세트니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 3.3 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 97%였다.

[0675] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.55분; ESI-MS(+) m/z 952.3 (M-2H)

[0676] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.68분; ESI-MS(+) m/z 954.3 (M+2H)

[0677] ESI-HRMS(+) m/z: 계산치: 953.9565 실측치: 953.9542.

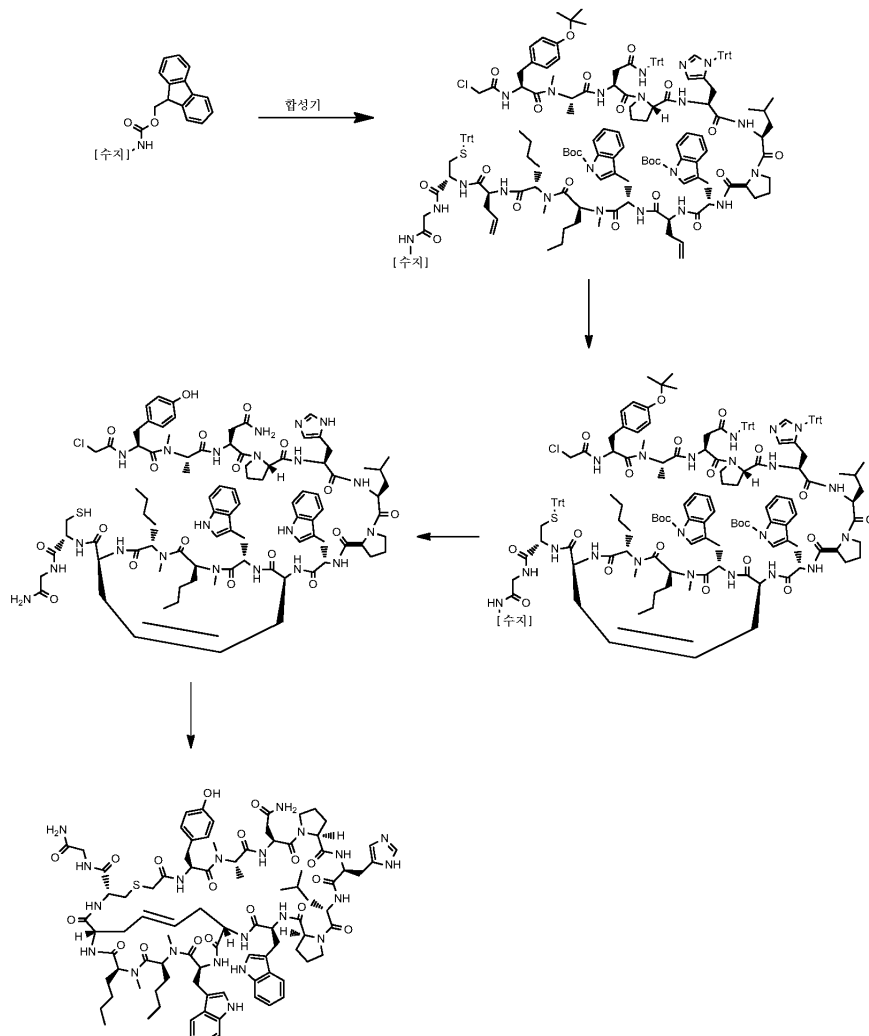
[0678] 실시예 5008의 제조



[0679]

- [0680] 중간체 5008을 "일반적 합성 순서 A"에 따라 0.400 mmol 규모 상에서, "고리화 방법 A" 대신에 "고리화 방법 B"를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 122.4 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 97%였다.
- [0681] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.55분; ESI-MS(+) m/z 957.5 (M+2H)
- [0682] 분석 조건 B: 체류 시간 = 1.82분; ESI-MS(+) m/z 954.5 (M-2H)
- [0683] ESI-HRMS(+) m/z: 계산치: 955.9577 실측치: 955.9543
- [0684] 실시예 5008을 하기와 같이 제조하였다: 교반용 막대가 장착된 중간체 5008 (46 mg, 0.023 mmol)이 채워진 1 드램 바이알에 NMP (1.00 mL), 이어서 DIPEA (0.041 mL, 0.23 mmol), 이어서 HATU (22 mg, 0.058 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 용액에 MeNH<sub>3</sub>Cl (5 mg) 및 HATU (10 mg)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음, 용액에 AcOH (3 방울)를 첨가하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 20-60% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 50-100% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 1.7 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.
- [0685] 분석 조건 E: 체류 시간 = 1.833분; ESI-MS(+) m/z 948.15 (M+2H)
- [0686] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.545분; ESI-MS(+) m/z 946.55 (M+2H).

[0687] 실시예 7155의 제조



실시예 7155

[0688]

[0689] 실시예 7155를 하기 일반적 절차: "프렐류드 방법 A: 수지-팽윤 절차", "프렐류드 방법 A: 단일-커플링 절차", "프렐류드 방법 A: 이중-커플링 절차", "프렐류드 방법 A: 클로로아세틸 클로라이드 커플링 절차"로 구성된, 실시예 5001의 제조에 대해 기재된 일반적 합성 순서에 따르는 것에 의해 100  $\mu\text{mol}$  x 4 규모 상에서 제조하였다.

[0690] 마이크로웨이브 바이알 중에서 생성된 수지 결합된 화합물 (100  $\mu\text{mol}$ )에 호베이다-그럽스(Hoveyda-Grubbs) 제2세대 촉매 1 당량 (100  $\mu\text{m}$ , 63 mg) 및 디클로로에탄 17 mL를 첨가하였다. 바이알을 밀봉하고, 혼합물을 질소로 탈기/플러싱한 다음, 120°C에서 1시간 동안 마이크로웨이브 가열에 적용하였다. 반응을 4회 반복하고, 생성된 수지를 고체 상 합성 용기에 합하고, 여과하고, DMF (4 x 20mL)에 이어서 DCM (5 x 20mL)으로 세척한 다음, 진공 하에 밤새 건조시켰다. 물질을 4개의 100  $\mu\text{mol}$  배치로 나누었다.

[0691] 이어서, "전반적 탈보호 방법 A" 및 "고리화 방법 A"를 사용하였다.

[0692] 전반적 탈보호 방법 A: "전반적 탈보호 방법 A"의 절차는 100  $\mu\text{mol}$  x 4 규모 상에서 수행된 실험을 기재하며, 여기서 규모는 수지에 결합된 링크 링커의 양에 의해 결정된다. "탈보호 용액"을 40 mL 유리 자(jar)에서 트리플루오로아세트산 (22 mL), 페놀 (1.325 g), 물 (1.25 mL) 및 트라이소프로필실란 (0.5 mL)을 혼합함으로써 제조하였다. 고체 상 합성 용기 바이알에 함유된 수지에 "탈보호 용액" (8.0 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 오비탈 진탕기 (2시간 동안 175RPM) 상에서 혼합하였다. 혼합물을 여과하고, 고체를 추가의 "탈보호 용액" (4.0 mL)으로 세척하고, 40 mL 스크류 마개 바이알에 수집하였다. 합한 여과물에 Et<sub>2</sub>O (15 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 격렬히 혼합하였으며, 이때 상당한 양의 백색 고체가 침전하였다. 혼합물을 3분 동안 2000 RPM에서 원심분리하고, 용액을 고체로부터 경사분리하고, 폐기하였다. 과정을 3회 반복한 다음, 고체를 벤치 상에 정치시키고 1-2 시간 동안 공기 건조되도록 한 후에 조 화합물을 회백색 고체로서 수득하였다.



[0693] 고리화 방법 A: "고리화 방법 A"의 절차는 100  $\mu\text{mol}$  x 4 규모 상에서 수행된 실험을 기재한다. 조 화합물 고체를 MeCN:수성 0.1M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (60mL:60mL) 중에 용해시키고, 이어서 용액을 수성 NaOH (1.0M)를 사용하여 pH = 9.0으로 조심스럽게 조정하였다. 바이알을 마개를 막은 다음, 용액을 175RPM으로 오비탈 진탕기 상에서 밤새 (~18시간) 혼합하였다. 반응 용액을 농축시킨 다음, 잔류물을 MeOH 중에 용해시켰다.

[0694] 조 화합물을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 5 $\mu\text{m}$ , 19 x 200 mm, 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 3.0 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 84%였다.

[0695] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.63분; ESI-MS(+)  $m/z$  = 909.5 ( $M + 2H$ )

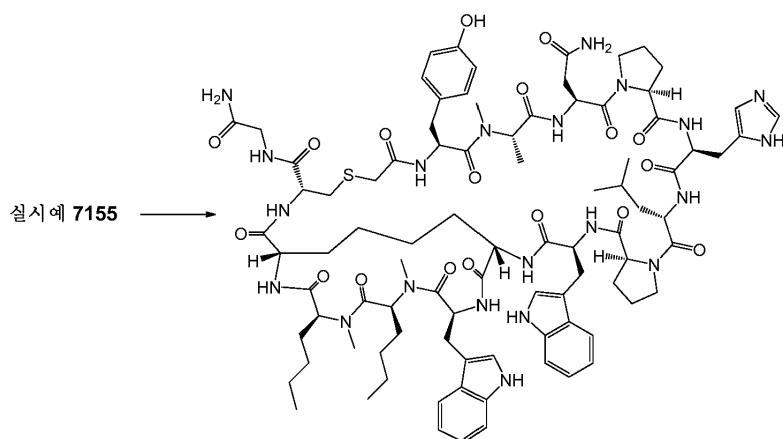
[0696] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.70분; ESI-MS(+)  $m/z$  = 909.5 ( $M + 2H$ ).

[0697] 하기 분석용 LC/MS 조건을 사용하여 최종 순도를 결정하였다.

[0698] 분석 조건 A: 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu\text{m}$  입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 1 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0699] 분석 조건 B: 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu\text{m}$  입자; 이동상 A: 5:95 메탄올:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 0.5 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0700] 실시예 7156의 제조



[0701]

[0702] 둥근 바닥 플라스크에 실시예 7155 (1.65  $\mu\text{mol}$ ) 3.0 mg 및 메탄올 2 mL를 첨가하였다. 플라스크를 밀봉하고, 용액을 질소로 탈기하고 플러싱하였다. 이어서, 이 용액에 10% Pd/C 1당량을 첨가하고, 플라스크에 수소 풍선을 장착하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 생성된 생성물을 여과하고, 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 5 $\mu\text{m}$ , 19 x 200 mm, 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 45-85% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 1.7 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0703] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.69분; ESI-MS(+)  $m/z$  = 910.5 ( $M + 2H$ )

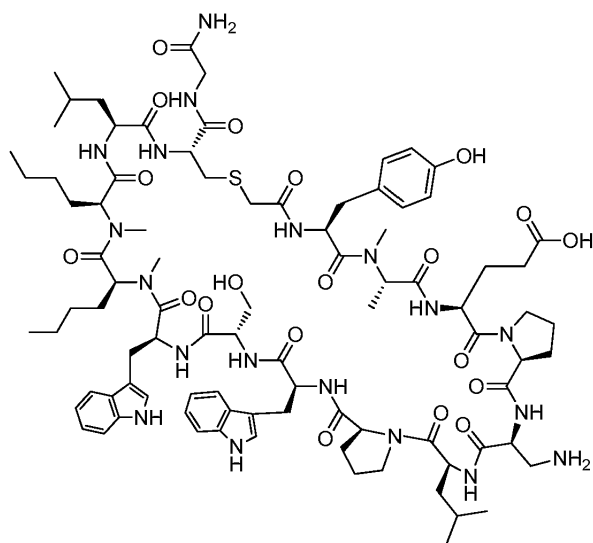
[0704] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.70분; ESI-MS(+)  $m/z$  = 910.5 ( $M + 2H$ ).

[0705] 하기 분석용 LC/MS 조건을 사용하여 최종 순도를 결정하였다.

[0706] 분석 조건 A: 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu\text{m}$  입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50°C; 구배: 0%B, 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 1 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0707] 분석 조건 B: 칼럼: 워터스 BEH C18, 2.0 x 50 mm, 1.7- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올:물, 10 mM 아세트산 암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올:물, 10 mM 아세트산암모늄 포함; 온도: 50℃; 구배: 0%B, 0-100% B, 3분에 걸침, 이어서 100% B에서 0.5-분 유지; 유량: 0.5 mL/분; 검출: 220 nm에서 UV.

[0708] 중간체 10500의 제조



중간체 10500

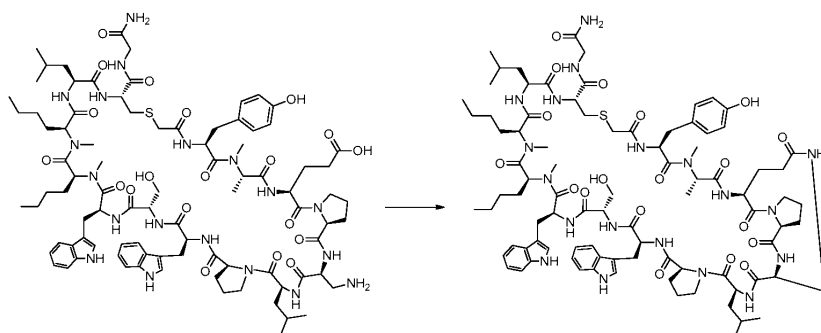
[0709]

[0710] 중간체 10500을 "일반적 합성 순서 A"에 따라, 그러나 "고리화 방법 A" 대신에 "고리화 방법 B"를 사용하여 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 메탄올: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 40-80% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 물질을 추가로 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 10-50% B, 40분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 25.8 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 99%였다.

[0711] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.66분; ESI-MS(+) m/z 908.4 (M+2H).

[0712] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.81분; ESI-MS(+) m/z 908.4 (M+2H).

[0713] 실시예 10500의 제조



중간체 10500

실시예 10500

[0714]

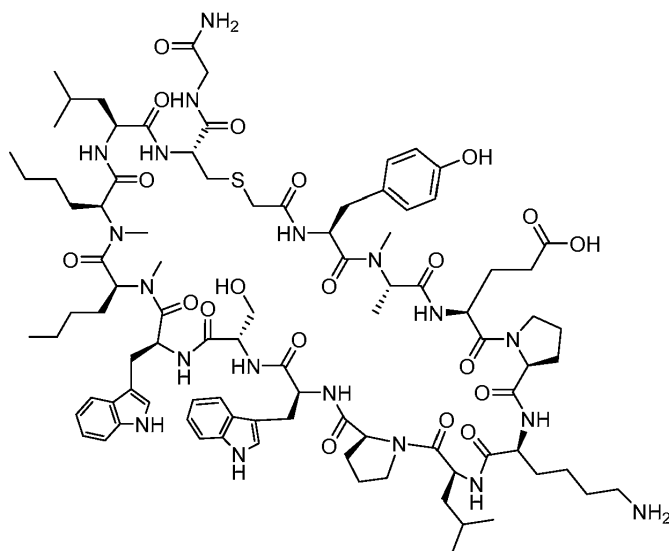
[0715] 중간체 10500 (15 mg, 8.26  $\mu$ mol)을 DMF (1 mL) 중에 용해시키고, 이어서 휘니그 염기 (7.22  $\mu$ l, 0.041 mmol), 이어서 HATU (4.71 mg, 0.012 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 1시간 동안 교반하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 30-70% B,

30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 1.2 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 99%였다.

[0716] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.85분; ESI-MS(+)  $m/z$  899.5 ( $M+2H$ ).

[0717] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.98분; ESI-MS(+)  $m/z$  899.7 ( $M+2H$ ).

[0718] 중간체 10501의 제조



중간체 10501

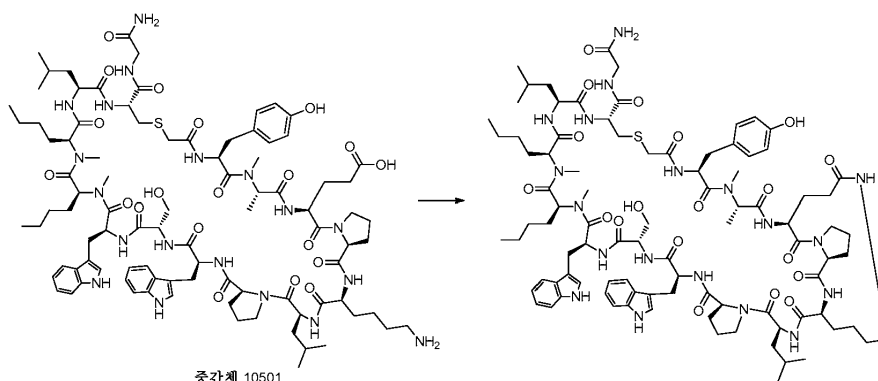
[0719]

[0720] 중간체 10501을 "일반적 합성 순서 A"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 34.0 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0721] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.64분; ESI-MS(+)  $m/z$  929.4 ( $M+2H$ ).

[0722] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.82분; ESI-MS(+)  $m/z$  929.8 ( $M+2H$ ).

[0723] 실시예 10501의 제조



중간체 10501

실시예 10501

[0724]

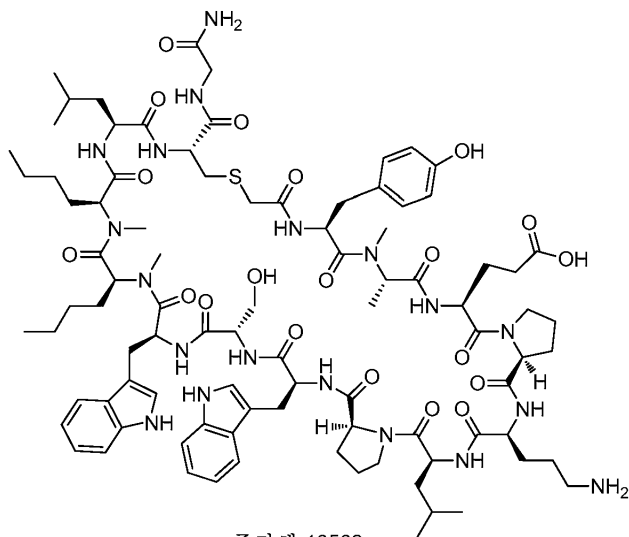
[0725] 실시예 10501을 실시예 10500을 제조하는데 사용된 방법에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 25-65% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 6.5 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는

100%였다.

[0726] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.75분; ESI-MS(+) m/z 920.6 (M+2H).

[0727] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.88분; ESI-MS(+) m/z 920.6 (M+2H).

[0728] 중간체 10502의 제조



중간체 10502

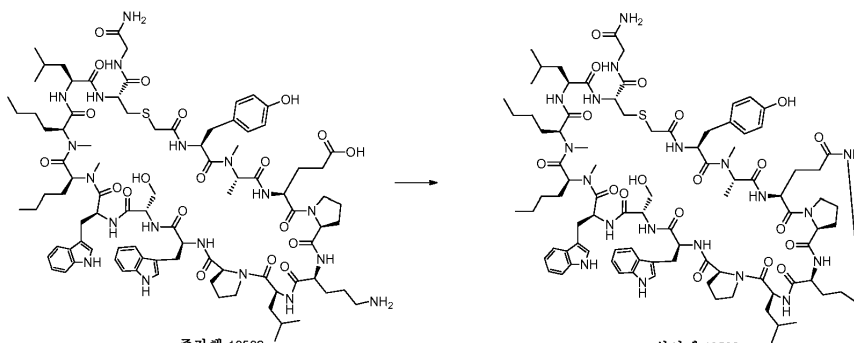
[0729]

[0730] 중간체 10502를 "일반적 합성 순서 A"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 34.0 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0731] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.68분; ESI-MS(+) m/z 922.5 (M+2H).

[0732] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.83분; ESI-MS(+) m/z 922.8 (M+2H).

[0733] 실시예 10502의 제조



중간체 10502

실시예 10502

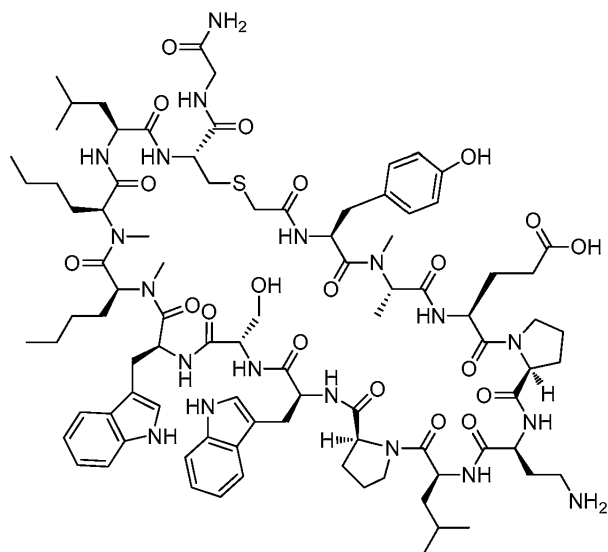
[0734]

[0735] 실시예 10502를 실시예 10500을 제조하는데 사용된 방법에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 25-65% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 3.1 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 98%였다.

[0736] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.77분; ESI-MS(+) m/z 913.4 (M+2H).

[0737] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.88분; ESI-MS(+) m/z 913.7 (M+2H).

[0738] 중간체 10503의 제조



중간체 10503

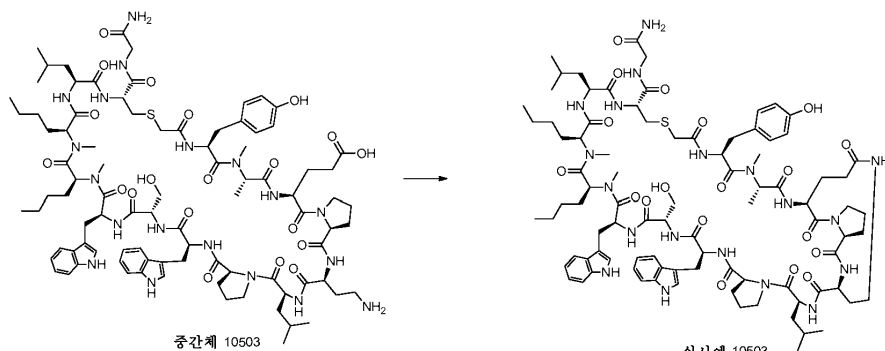
[0739]

[0740] 중간체 10503을 "일반적 합성 순서 A"에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 15-55% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 23.4 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0741] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.65분; ESI-MS(+) m/z 915.8 (M+2H)

[0742] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.84분; ESI-MS(+) m/z 915.8 (M+2H)

[0743] 실시예 10503의 제조



[0744]

[0745] 실시예 10503을 실시예 10500을 제조하는데 사용된 방법에 따라 제조하였다. 조 물질을 정제용 LC/MS를 통해 하기 조건: 칼럼: 엑스브리지 C18, 19 x 200 mm, 5- $\mu$ m 입자; 이동상 A: 5:95 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 이동상 B: 95:5 아세토니트릴: 물, 10-mM 아세트산암모늄 포함; 구배: 25-65% B, 30분에 걸침, 이어서 100% B에서 5-분 유지; 유량: 20 mL/분을 사용하여 정제하였다. 목적 생성물을 함유하는 분획을 합하고, 원심 증발을 통해 건조시켰다. 생성물의 수율은 1.8 mg이었고, LCMS 분석에 의한 그의 추정 순도는 100%였다.

[0746] 분석 조건 A: 체류 시간 = 1.78분; ESI-MS(+) m/z 906.8 (M+2H).

[0747] 분석 조건 B: 체류 시간 = 2.92분; ESI-MS(+) m/z 906.7 (M+2H).

[0748] 균질 시간-분해 형광 (HTRF) 결합 검정을 사용하여 PD-L1에 대한 PD-1의 결합에 대해 경쟁하는 마크로시클릭 화합물의 능력을 시험하는 방법

[0749] PD-1/PD-L1 균질 시간-분해 형광 (HTRF) 결합 검정을 사용하여 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물이 PD-L1에



결합하는 능력을 조사하였다.

[0750]

방법

[0751]

가용성 PD-L1에 대한 가용성 PD-1의 결합의 균질 시간-분해 형광 (HTRF) 검정. 가용성 PD-1 및 가용성 PD-L1은 막형단-관통 영역이 제거되고 이중 서열, 구체적으로 인간 이뮤노글로불린 G 서열 (Ig)의 Fc 부분 또는 헥사히스티딘 에피토프 태그 (His)에 융합된 카르복실-말단 절단을 갖는 단백질을 지칭한다. 모든 결합 연구는 0.1% (w/v) 소 혈청 알부민 및 0.05% (v/v) 트윈-20으로 보충된 dPBS로 이루어진 HTRF 검정 완충제 중에서 수행하였다. PD-1-Ig/PD-L1-His 결합 검정을 위해, 억제제를 검정 완충제 4  $\mu$ l 중 PD-L1-His (10 nM 최종)와 함께 15분 동안 사전-인큐베이션하고, 이어서 검정 완충제 1  $\mu$ l 중 PD-1-Ig (20 nM 최종)를 첨가하고, 추가로 15분 동안 인큐베이션하였다. 인간, 시노몰구스 마카크, 마우스, 또는 다른 종으로부터의 PD-L1 융합 단백질을 사용하였다. HTRF 검출은 유로폼 크립테이트-표지된 항-Ig 모노클로날 항체 (1 nM 최종) 및 알로피코시아닌 (APC) 표지된 항-His 모노클로날 항체 (20 nM 최종)를 사용하여 달성하였다. 항체를 HTRF 검출 완충제 중에 희석하고, 5  $\mu$ l를 결합 반응물의 상단에 분배하였다. 반응이 30분 동안 평형이 되도록 하고, 엔비전(EnVision) 형광계를 사용하여 신호 (665nm/620nm 비)를 획득하였다. PD-1-Ig/PD-L2-His (각각 20 및 5 nM), CD80-His/PD-L1-Ig (각각 100 및 10 nM) 및 CD80-His/CTLA4-Ig (각각 10 및 5 nM) 사이의 추가의 결합 검정을 확립하였다. 비오틴화 화합물 번호 71 및 인간 PD-L1-His 사이의 결합/경쟁 연구를 하기와 같이 수행하였다. 마크로시클릭 화합물 억제제를 검정 완충제 4  $\mu$ l 중 PD-L1-His (10 nM 최종)와 함께 60분 동안 사전-인큐베이션한 다음, 검정 완충제 1  $\mu$ l 중 비오틴화 화합물 번호 71 (0.5 nM 최종)을 첨가하였다. 결합이 30분 동안 평형이 되도록 하고, 이어서 HTRF 완충제 5  $\mu$ l 중 유로폼 크립테이트 표지된 스트렙타비딘 (2.5 pM 최종) 및 APC-표지된 항-His (20 nM 최종)를 첨가하였다. 반응이 30분 동안 평형이 되도록 하고, 엔비전 형광계를 사용하여 신호 (665nm/620nm 비)를 획득하였다.

[0752]

재조합 단백질. C-말단 인간 Ig 에피토프 태그 [hPD-1 (25-167)-3S-Ig]를 갖는 카르복실-말단절단된 인간 PD-1 (아미노산 25-167) 및 C-말단 His 에피토프 태그 [hPD-L1(19-239)-담배 엽맥 반점형성 바이러스 프로테아제 절단 부위 (TVMV)-His]를 갖는 인간 PD-L1 (아미노산 18-239)을 HEK293T 세포 내에서 발현시키고, 재조합 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 순차적으로 정제하였다. 인간 PD-L2-His (시노 바이올로지칼스(Sino Biologicals)), CD80-His (시노 바이올로지칼스), CTLA4-Ig (알앤디 시스템즈(RnD Systems))는 모두 상업적 공급원을 통해 입수하였다.

[0753]

재조합 인간 PD-1-Ig의 서열

#### hPD1(25-167)-3S-Ig

```

1      LQSPDRPQNP FTFSPALLVY TEGDNATFTC SFSNTSESFV LNWYRMSPSN
51     QTDKLAAPFE DESQPGQDCR FRVTQLFNCR DFHMSVVRAR RNDSGTYLGG
101    AISLAFPAQI KESLEAELRV TERRAEVPTA HPSFSPRPAG QPQGSPPGGG
151    GREPKSSDKT HTSPSPAPAE LLGGSSVFLF PPKPKDTLMI SETPEVTCVV
201    VDVSNEDEFE KFNWYVDGVE VHNKTKPRE EQNSTYRVV SVLTVLNQDN
251    LNKKEYKCRV SNKALPAIE KTISKANGQP REPQVYTLFP SRDELTKNQV
301    SLTCLVKGFI PSDIAVEWES NGQFENNYKT TFPVLDSDGS FFLYSKLTVD
351    KSRWQQGVNF SCSVMHEALH NHYTKLSLSL SPQK

```

[0754]

(서열식별번호: 1)

[0756]

재조합 인간 PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His)의 서열

#### hPD.L1(19-239)-TVMV-His

```

1      FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVWE MEDKNIIQFV
51     HGEEDLKVOH SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY
101    GGADYKRITV KVNAPYKIN GRILVVDPTV SEHELTQQAQ GYFKAQVINT
151    SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSTLR INTTTNEIFY CTFRELDPEE
201    NHTAELVIPE LPLAHPPNER TGSSETVRFQ GRRHHHHH

```

[0757]

(서열식별번호: 2)

[0759]

결과는 표 1에 제시된다. 제시된 바와 같이, 본 개시내용의 마크로시클릭 화합물은 PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His)에 대한 PD-1-Ig 결합 활성의 강력한 억제를 입증하였다. 범위는 하기와 같다: A = 0.10-1  $\mu$ M; B = 0.01-0.099  $\mu$ M; C = 0.003 - 0.0099  $\mu$ M.

[0760] 표 1

실시에 번호	HTRF IC50 (μM)
5001	C
5002	B
5003	B
5004	C
1400	B
1401	B
1402	B
10500	A

[0761]

실시에 번호	HTRF IC50 (μM)
10501	A
10502	A
10503	A
5005	B
7155	B
1403	0.007
1404	C
1405	B
1500	B
1501	B
1502	--
1503	0.993
1504	B
1505	B
1506	B
1507	B
1508	B
5006	B
5007	0.014
5008	C
7156	B

[0762]

[0763] 본 개시내용이 상기 예시적인 실시예에 제한되지 않고, 그의 본질적인 속성으로부터 벗어나지 않으면서 다른 구체적 형태로도 구현될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 따라서, 실시예는 모든 측면에서 제한하는 것이 아니라 예시적인 것으로 고려되며, 상기 실시예보다는 첨부된 청구범위를 참조하고, 이에 따라 청구범위의 등가의 의미 및 범위 내에 있는 모든 변화가 그 안에 포괄되도록 의도되는 것이 바람직하다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> IMMUNOMODULATORS

<130> 12670WOPCT

<150> US 62/303,673

<151> 2016-03-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala

1 5 10 15

Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe

20 25 30

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro

35 40 45

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln

50 55 60

Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg

65 70 75 80

Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr

85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro

115 120 125

Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Gly

130 135 140

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr

145 150 155 160

His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser  
165 170 175  
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
180 185 190  
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
195 200 205  
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
210 215 220

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
225 230 235 240  
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
245 250 255  
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
260 265 270  
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
275 280 285

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
290 295 300  
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
305 310 315 320  
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
325 330 335  
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
340 345 350

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
355 360 365  
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
370 375 380

<210> 2

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser

1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu

20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln

35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg

50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala

65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys

85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val

100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro

115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys

130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys

145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr

165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr

180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile

195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr Gly Ser Ser

210 215 220

Glu Thr Val Arg Phe Gln Gly His His His His His His

225 230 235