(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0052833
(43) 공개일자 2024년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
C07K 14/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7011055
(22) 출원일자(국제) 2022년09월08일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월02일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/033713
(87) 국제공개번호 WO 2023/038082
국제공개일자 2023년03월16일
(30) 우선권주장
JP-P-2021-146504 2021년09월08일 일본(JP)

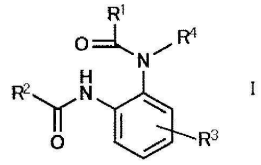
(71) 출원인
가고시마 유니버시티
일본국 가고시마군 가고시마시 코리모토 1쵸메 21반 24고
가부시키가이샤 페프치도 겐큐쇼
일본 오사카후 이바라키시 사이토 아사기 7초메 2반 9고
(72) 발명자
이토, 유지
일본 8908580 가고시마켄 가고시마시 고리모토 1쵸메 21반 24고 가고시마 유니버시티 내
요시야, 다쿠
일본 5670085 오사카후 이바라키시 사이토 아사기 7초메 2반 9고 가부시키가이샤 페프치도 겐큐쇼 내
츠다, 슈고
일본 5670085 오사카후 이바라키시 사이토 아사기 7초메 2반 9고 가부시키가이샤 페프치도 겐큐쇼 내
(74) 대리인
한상욱, 이유리, 이석재

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **화합물, 화합물의 염, 항체 수식 시약, 수식 항체의 제조 방법 및 수식 항체**

(57) 요 약

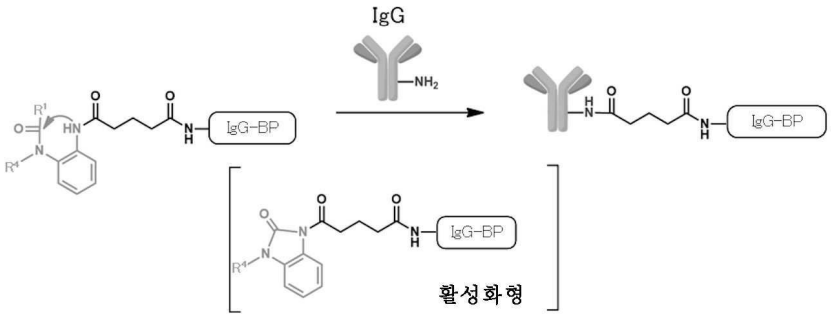
하기 식 I에 표시되는 화합물 또는 그의 염.



I

(식 I에 있어서, R^1은, R^1-H의 pKa가 4 내지 14가 되는 치환기이며, R^2 및 R^3의 한쪽이 IgG의 Fc 영역에 특이적으로 결합하는 IgG 결합 펩티드를 갖고, R^4는 H 또는 치환 혹은 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기임)

대 표 도



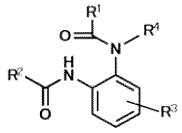
(52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 식 I로 표시되는 화합물 또는 그의 염.



식 I

(식 I에 있어서, R^1은, R^1-H의 pKa가 4 내지 14가 되는 치환기이며,

R^2 및 R^3의 한쪽이 IgG의 Fc 영역에 특이적으로 결합하는 IgG 결합 펩티드를 갖고,

R^2가 상기 IgG 결합 펩티드를 갖는 경우, R^3은 존재하지 않거나, 또는 치환 혹은 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기, 치환 혹은 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알케닐기, 치환 혹은 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알키닐기, 니트로기, 할로겐, 카르복사미드기로 이루어지는 군에서 선택되고,

R^3이 상기 IgG 결합 펩티드를 갖는 경우, R^2는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알키닐기, 아미노산 잔기수 2 내지 50의 치환 또는 비치환된 펩티드쇄, 중합도 2 내지 50의 치환 또는 비치환된 폴리머쇄 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택되고,

R^4는 H 또는 치환 혹은 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기임)

청구항 2

제1항에 있어서, R^1은 니트로페녹시기인,

화합물 또는 그의 염.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R^2는 상기 IgG 결합 펩티드를 갖고,

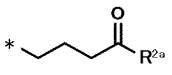
R^3은 존재하지 않는,

화합물 또는 그의 염.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, R^2는 상기 IgG 결합 펩티드를 R^{2a}로 하여, 하기 식 II로 표시되는,

화합물 또는 그의 염.



식 II

(식 II에 있어서, *은 식 I의 카르보닐기의 탄소를 나타냄)

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 IgG 결합 펩티드는,

약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 수식되어 있는,

화합물 또는 그의 염.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 IgG 결합 펩티드는,

약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 수식되어 있는,

화합물 또는 그의 염.

청구항 7

제1항에 있어서, R^3은 상기 IgG 결합 펩티드를 갖고,

R^2는 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는,

화합물 또는 그의 염.

청구항 8

제2항에 있어서, R^3은 상기 IgG 결합 펩티드를 갖고,

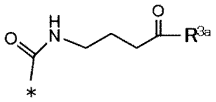
R^2는 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는,

화합물 또는 그의 염.

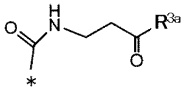
청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, R^3은 상기 IgG 결합 펩티드를 R^{3a}로 하여 하기 식 III, 식 IV 및 식 V의 어느 것으로 표시되는,

화합물 또는 그의 염.



식III



식IV



식V

(식 III, 식 IV 및 식 V에 있어서, *은 식 I의 벤젠환의 탄소를 나타냄)

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG 결합 펩티드의 아미노산 서열은,

서열 번호 1로부터 115의 어느 하나에 표시된 아미노산 서열인,

화합물 또는 그의 염.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 IgG 결합 펩티드의 아미노산 서열은,

서열 번호 116으로부터 151의 어느 하나에 표시된 아미노산 서열인,

화합물 또는 그의 염.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 기재된 화합물 또는 그의 염을 포함하는,

항체 수식 시약.

청구항 13

제12항에 기재된 항체 수식 시약과 IgG를 반응시키는 반응 스텝을 포함하는,

수식 항체의 제조 방법.

청구항 14

IgG의 Fc 영역의 Lys에 Lys-Gly-Gly를 포함하는 원자단을 통해 1가 또는 2가로 결합한 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는,

수식 항체.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 원자단에 포함되는 Lys의 측쇄의 아미노기가,

상기 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 치환되어 있는,

수식 항체.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 반응성 관능기는,

아지드기인,

수식 항체.

청구항 17

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 IgG는,

인간 IgG인,

수식 항체.

청구항 18

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 IgG는,

토실리주맙 또는 트라스투주맙인,

수식 항체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 화합물, 화합물의 염, 항체 수식 시약, 수식 항체의 제조 방법 및 수식 항체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 약물을 부가함으로써 고기능화된 항체 의약, 예를 들어 항체 약물 복합체(ADC) 등의 개발이 진행하고 있다. 항체의 수식에는, 아미노기의 랜덤 수식법 및 힌지 부위의 티올 수식법 등의 다양한 방법이 사용되어 왔다.

[0003] 특허문헌 1로부터 3에는, 항체와 약물 등의 콘쥬게이트(복합체)를 조제하기 위한 부위 특이적 수식법인

CCAP(Chemical Conjugation by Affinity Peptide)법이 개시되어 있다.

[0004] CCAP법에서는, IgG의 Fc 영역에 특이적으로 결합하는 IgG 결합 펩티드(IgG-BP)를 갖는 항체 수식 시약을 항체와 반응시킨다. IgG-BP의 소정의 아미노산 잔기가, 글루타르산N,N'-디숙신이미딜(disuccinimidyl glutarate; DSG) 또는 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(dithiobis(succinimidyl propionate); DSP)에 의해 수식되어 있고, N-히드록시숙신이미드(NHS)기를 갖는다. 항체 수식 시약과 항체의 반응에서, Fc 도메인의 특정한 영역에 NHS기를 통해 IgG-BP가 결합한다.

[0005] CCAP법에서는, 항체 수식 시약을 항체와 반응시켰을 때, 수식 항체에 IgG-BP가 잔존하기 때문에, 의약품 등에의 응용에서는, 체내 투여 후의 잔존하는 펩티드의 항원성이 우려가 되고 있었다. 이에 비해, 특허문헌 4에는, IgG-BP가 최종 생성물에 남지 않는 CCAP법이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2016/186206호

(특허문헌 0002) 국제 공개 제2017/217347호

(특허문헌 0003) 국제 공개 제2018/230257호

(특허문헌 0004) 국제 공개 제2018/199337호

발명의 내용

해결하려는 과제

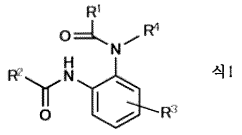
[0007] 특허문헌 1로부터 4에 개시된 CCAP법에서 사용되는 항체 수식 시약은, NHS기가 가수 분해되기 쉬워 불안정하고, 장기 보존에 견딜 수 없다. CCAP법의 산업에의 응용을 위해서, 항체 수식 시약의 안정성의 향상이 요구되고 있다.

[0008] 본 발명은, 상기 실정을 감안하여 이루어진 것이고, 화학적으로 안정되어 장기 보존할 수 있는 화합물, 화합물의 염, 항체 수식 시약 및 당해 항체 수식 시약을 사용한 수식 항체의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 신규 수식 항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 제1 관점에 관한 화합물은,

[0010] 하기 식 I로 표시된다.

[0011] 

식 I

[0012] (식 I에 있어서, R^1은, R^1-H의 pKa가 4 내지 14가 되는 치환기이며,

[0013] R^2 및 R^3의 한쪽이 IgG의 Fc 영역에 특이적으로 결합하는 IgG 결합 펩티드를 갖고,

[0014] R^2가 상기 IgG 결합 펩티드를 갖는 경우, R^3은 존재하지 않거나, 또는 치환 혹은 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기, 치환 혹은 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알케닐기, 치환 혹은 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알키닐기, 니트로기, 할로겐, 카르복사미드기로 이루어지는 군에서 선택되고,

[0015] R^3이 상기 IgG 결합 펩티드를 갖는 경우, R^2는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알키닐기, 아미노산 잔기수 2 내지 50의 치환 또는 비치환된 펩티드쇄, 중합도 2 내지 50의 치환 또는 비치환된 폴리머쇄 및 이들의 조합으로 이루어

지는 군에서 선택되고,

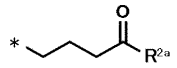
[0016] R^4는 H 또는 치환 혹은 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기임)

[0017] 본 발명의 제2 관점에 관한 화합물의 염은, 상기 본 발명의 제1 관점에 관한 화합물의 염이다.

[0018] R^1은 니트로페녹시기인 것으로 해도 된다.

[0019] R^2는 상기 IgG 결합 펩티드를 갖고, R^3은 존재하지 않는 것으로 해도 된다.

[0020] R^2는 상기 IgG 결합 펩티드를 R^{2a}로 하여, 하기 식 II로 표시되는 것으로 해도 된다.

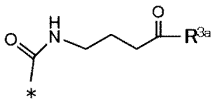
[0021]  식II

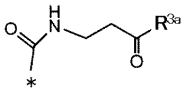
[0022] (식 II에 있어서, *은 식 I의 카르보닐기의 탄소를 나타냄)

[0023] R^2가 상기 IgG 결합 펩티드를 갖는 경우, IgG 결합 펩티드는 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 수식되어 있는 것으로 해도 된다.

[0024] R^3은 상기 IgG 결합 펩티드를 갖고, R^2는 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는 것으로 해도 된다.

[0025] R^3은 상기 IgG 결합 펩티드를 R^{3a}로 하여 하기 식 III, 식 IV 및 식 V의 어느 것으로 표시되는 것으로 해도 된다.

[0026]  식III

 식IV

 식V

[0027] (식 III, 식 IV 및 식 V에 있어서, *은 식 I의 벤젠환의 탄소를 나타냄)

[0028] 본 명세서에 기재된 IgG 결합 펩티드의 아미노산 서열은, 서열 번호 1로부터 115의 어느 하나에 표시된 아미노산 서열인 것으로 해도 된다.

[0029] 상기 IgG 결합 펩티드의 아미노산 서열은, 서열 번호 116으로부터 151의 어느 하나로 표시된 아미노산 서열인 것으로 해도 된다.

[0030] 본 발명의 제3 관점에 관한 항체 수식 시약은, 상기 본 발명의 제1 관점에 관한 화합물 또는 상기 본 발명의 제2 관점에 관한 화합물의 염을 포함한다.

[0031] 본 발명의 제4 관점에 관한 수식 항체의 제조 방법은, 상기 본 발명의 제3 관점에 관한 항체 수식 시약과 IgG를 반응시키는 반응 스텝을 포함한다.

[0032] 본 발명의 제5 관점에 관한 수식 항체는, IgG의 Fc 영역의 Lys에 Lys-Gly-Gly를 포함하는 원자단을 통해 1가 또는 2가로 결합한 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는다.

[0033] 상기 원자단에 포함되는 Lys의 측쇄의 아미노기가, 상기 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 치환되어 있는 것으로 해도 된다.

[0034] 상기 반응성 관능기는, 아지드기인 것으로 해도 된다.

[0035] 상기 IgG는, 인간 IgG인 것으로 해도 된다.

[0036] 상기 IgG는, 토실리주맙 또는 트라스투주맙인 것으로 해도 된다.

발명의 효과

[0037] 본 발명에 관한 화합물, 화합물의 염 및 항체 수식 시약은, 화학적으로 안정되어 장기 보존할 수 있다. 본 발명에 따르면, 당해 항체 수식 시약을 사용한 수식 항체의 제조 방법이 제공된다. 본 발명에 따르면, 신규 수식 항체가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은, 본 발명의 실시 형태에 관한 화합물에 의해 항체를 IgG-BP로 수식하는 반응을 모식적으로 도시하는 도면이다.

도 2는, 본 발명의 실시 형태에 관한 화합물에 의해 항체를 수식하는 반응을 모식적으로 도시하는 도면이다.

도 3은, 실시예 3에 있어서 실시예 1에 관한 화합물과 IgG의 반응 용액을 액체 크로마토그래피 질량 분석계(LC-MS)로 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액의 용출 크로마토그램을 도시하는 도면이다.

도 4는, 실시예 3에 있어서 실시예 1에 관한 화합물과 IgG의 반응 용액을 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는, 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시하는 도면이다.

도 5는, 실시예 3에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 IgG의 반응 용액을 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는, 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액의 용출 크로마토그램을 도시하는 도면이다.

도 6은, 실시예 3에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 IgG의 반응 용액을 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는, 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시하는 도면이다.

도 7은, 실시예 4에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 마우스 IgG의 반응 용액의 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B) 및 (C)는, 각각 화합물을 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액, 반응 2시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 2시간 후의 pH8.9의 용액의 용출 크로마토그램을 도시하는 도면이다.

도 8은, 실시예 4에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 마우스 IgG의 반응 용액의 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B) 및 (C)는, 각각 화합물을 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액, 반응 2시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 2시간 후의 pH8.9의 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시하는 도면이다.

도 9는, 실시예 5에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 래빗 IgG의 반응 용액의 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A) 및 (B)는, 각각 화합물을 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액의 용출 크로마토그램을 도시하는 도면이다.

도 10은, 실시예 5에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 래빗 IgG의 반응 용액의 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A) 및 (B)는, 각각 화합물을 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시하는 도면이다.

도 11은, 실시예 8에 있어서 실시예 6에 관한 화합물과 인간 IgG의 반응 용액의 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액의 용출 크로마토그램을 도시하는 도면이다.

도 12는, 실시예 8에 있어서 실시예 6에 관한 화합물과 인간 IgG와의 반응 용액의 LC-MS에서 분석한 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시하는 도면이다.

도 13은, 실시예 9에 있어서 실시예 7에 관한 화합물과 인간화 IgG의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B) 및 (C)는, 각각 화합물을 첨가하기 전의 항체 용액, 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.9의 용액의 용출 크로마토그램을 도시하는 도면이다.

도 14는, 실시예 9에 있어서 실시예 7에 관한 화합물과 인간화 IgG의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도시하는 도

면이다. (A), (B) 및 (C)는, 각각 화합물을 첨가하기 전의 항체 용액, 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.9의 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시하는 도면이다.

도 15는, 시험예 2에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 반응시킨 트라스투주맙의 펩티드 맵의 결과를 도시하는 도면이다.

도 16은, 시험예 2에 있어서 실시예 2에 관한 화합물과 반응시킨 트라스투주맙에서 용출된 피크에 대한 탠덤 질량 분석(MS/MS)의 결과를 도시하는 도면이다.

도 17은, 실시예 10에 있어서의 LC-MS의 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는, 각각 트라스투주맙(미수식 항체), 실시예 2에 관한 화합물로 수식한 아지드화 트라스투주맙(아지드화 KGG 수식 항체), 항암제와 아지드화 트라스투주맙의 반응물 및 아지드화 트라스투주맙과 형광제의 반응물의 용출 크로마토그램을 도시하는 도면이다.

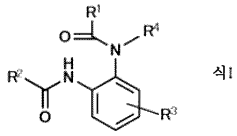
도 18은, 실시예 10에 있어서의 LC-MS의 결과를 도시하는 도면이다. (A), (B), (C) 및 (D)는, 각각 미수식 항체, 아지드화 KGG 수식 항체, 항암제와 아지드화 트라스투주맙의 반응물 및 아지드화 트라스투주맙과 형광제의 반응물에 있어서 용출된 항체의 피크를 질량 분석한 결과를 도시하는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명에 관한 실시 형태에 대하여 도면을 참조하여 설명한다. 또한, 본 발명은 하기의 실시 형태 및 도면에 의해 한정되는 것은 아니다. 또한, 하기의 실시 형태에 있어서, "가진다", "포함한다" 또는 "함유한다"라고 하는 표현은, "이루어진다" 또는 "로 구성된다"라고 하는 의미도 포함한다.

[0040] (화합물 및 그의 염)

[0041] 본 실시 형태에 관한 화합물은, 하기 식 I로 표시된다.

[0042]  식 I

[0043] 식 I에 있어서, R^1은 R^1-H의 산 해리 상수(pKa)가 4 내지 14, 4 내지 12 또는 4 내지 10, 바람직하게는 5 내지 9가 되는 치환기이다. 여기에서의 pKa는 실온(예를 들어 25℃)에 있어서의 pKa이다. 상기 화합물은, R^1의 탈리에 의해 활성화 중간체가 된다. R^1-H의 pKa는 탈리의 용이함, 즉 활성화 중간체로의 이행 용이함을 결정한다. pKa가 높으면 이행하기 어려워지고, pKa가 낮으면 이행하기 쉬워지지만, pKa가 너무 낮으면 화합물은 불안정하여 가수 분해해 버릴 우려가 있다. 바람직하게는, R^1-H는 페놀류이다. R^1-H는, 예를 들어 살리실산, 페놀, 4-플루오로페놀, 4-니트로페놀, 2,6-디클로로페놀, N-히드록시숙신산이미드, 2,3,5,6-테트라플루오로 페놀, 펜타플루오로페놀, 아미노페놀 및 디니트로페놀 등을 들 수 있다. 적합하게는, R^1-H는 4-니트로페놀로, R^1은 니트로페녹시기이다.

[0044] R^2 및 R^3의 한쪽이 IgG의 Fc 영역에 특이적으로 결합하는 IgG-BP를 갖는다. "IgG"는 포유 동물, 예를 들어 인간 및 침팬지 등의 영장류, 래트, 마우스 및 토끼 등의 실험 동물, 돼지, 소, 말, 양 및 염소 등의 가축 동물, 그리고 개 및 고양이 등의 애완동물의 IgG이면 되고, 바람직하게는 인간의 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)이다. IgG는, 바람직하게는 인간 IgG1, IgG2 혹은 IgG4, 또는 토끼 IgG이고, 특히 바람직하게는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG4이다. "IgG의 Fc 영역"이란, 전형적으로는, IgG의 단백 분해 효소 파파인 처리물로서 얻어지는 C 말단측의 단편을 의미한다.

[0045] R^2가 IgG-BP를 갖는 경우, R^3은 존재하지 않거나, 또는 치환 혹은 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기, 치환 혹은 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알케닐기, 치환 혹은 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알키닐기, 니트로기, 할로겐, 카르복사미드기로 이루어지는 군에서 선택된다. 바람직하게는, R^2가 IgG-BP를 갖는 경우, R^3은 존재하지 않는다.

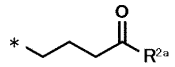
[0046] "알킬기"는, 포화 탄화수소기를 의미한다. 알킬기는, 탄소수의 조건을 만족시키는 환식(축합 2환식을 포함함) 알킬기, 직쇄 및 분지쇄 알킬기, 그리고 환식 알킬기로 치환되어 있는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기가 포함된다. 알킬기의 예로서는, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, iso-프로필기, 시클로프로필기, n-부틸기, iso-부틸기, sec-부틸기, t-부틸기, n-펜틸기, 1,1-디메틸프로필기, 1,2-디메틸프로필기, 2,2-디메틸프로필기, 1-에틸프로필기, 2-에틸프로필기, n-헥실기, 시클로헥실기, 시클로옥틸기 및 1-메틸-2-에틸프로필기를 들 수 있다.

[0047] "알케닐"은, 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 탄화수소기를 의미한다. 알케닐은, 직쇄 알케닐기와 분지쇄 알케닐기의 양쪽을 포함한다. 알케닐의 예로서는, 에테닐기, n-프로페닐기, iso-프로페닐기, n-부테닐기, iso-부테닐기, sec-부테닐기, t-부테닐기, n-펜테닐기, 1,1-디메틸프로페닐기, 1,2-디메틸프로페닐기, 2,2-디메틸프로페닐기, 1-에틸프로페닐기, 2-에틸프로페닐기, n-헥세닐기 및 1-메틸-2-에틸프로페닐기를 들 수 있다.

[0048] "알키닐"은, 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 탄화수소기를 의미한다. 알키닐은 직쇄 알키닐기와 분지쇄 알키닐기의 양쪽을 포함한다. 알키닐의 예로서는, 에티닐기, n-프로피닐기, iso-프로피닐기, n-부티닐기, iso-부티닐기, sec-부티닐기, t-부티닐기 및 n-펜티닐기 등을 들 수 있다.

[0049] R^2가 IgG-BP를 갖는 경우, R^2는 IgG-BP여도 된다. 또한, R^2는 링커(Linker)를 갖고 있어도 되고, *을 식 I의 카르보닐기의 탄소로서, R^2는 *-(Linker)-(IgG-BP)여도 된다. 링커는, 화합물이 Fc 영역에의 특이적인 결합능을 유지하는 한, 특별히 한정되지 않고, 예를 들어 -NH-, -O-, -S-, -C(=O)-NH-, -NH-C(=O)-, -O-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-, -S-, -C(=O)-, 폴리옥시알킬렌기, 아미노산 잔기, 펩티드쇄, 폴리에틸렌글리콜(PEG)쇄 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0050] 적합하게는, R^2는 IgG-BP를 R^{2a}로 하여, 식 II로 표시된다.

[0051] 

식 II

[0052] R^2에 있어서의 IgG-BP는, 식 I의 카르보닐기의 탄소 또는 링커에 주쇄 또는 임의의 아미노산 잔기의 측쇄를 통해 결합하고 있다. 바람직하게는, R^2에 있어서의 IgG-BP는, N 말단의 주쇄 또는 측쇄의 아미노기를 통해 식 I의 카르보닐기의 탄소 또는 링커에 결합하고 있다.

[0053] R^2에 있어서의 IgG-BP는, 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 수식되어 있어도 된다. 약물로서는, 예를 들어 오리스타틴 E 등의 오리스타틴, 메이탄신, 엠탄신, 독소루비신, 블레오마이신, 혹은 이들의 유도체 등의 항암제, 혈액 뇌 관문의 리셉터에 결합하여 중추 신경에의 이행을 촉진하는 약물, 또는 암세포 등에 결합하여 IgG의 세포 내에의 이행을 가능하게 하는 약물 등의 표적화제를 들 수 있다.

[0054] 반응성 관능기로서는, 이미다졸기, 히드록시기, 아미노기, 티올기, 할로겐 원자, 술폰산에스테르기, 에폭시기, 이소시아나토기, 아지드기, 비닐기, 말레이미드기, 숙프히드릴기, 에티닐기(-C≡CH), 디엔, 알킨, 비시클로[6.1.0]노닌(BCN), 디벤조시클로옥틴(DBCO)기, trans-시클로옥텐(TCO), 테트라진 등을 들 수 있다. 바람직하게는, 반응성 관능기는 아지드기로, 알킨 또는 DBCO기 등과의 클릭 반응에 의해 원하는 분자로 IgG-BP를 수식할 수 있다.

[0055] 표지 물질은 한정되지 않지만, 예를 들어 형광 색소, 화학 발광 색소, 방사성 동위 원소, 발광 단백질, 비오틴(Biotin), 녹색 형광 단백질 등의 형광 단백질 및 퍼옥시다아제 등의 효소 등이다. 바람직하게는, 표지 물질은 플루오레세인(FAM) 및 FITC 등의 플루오레세인 유도체, 로다민 및 테트라메틸로다민 등의 로다민 유도체, 그리고 텍사스 레드 등의 형광 색소이다.

[0056] R^2가 IgG-BP를 갖는, 본 실시 형태에 관한 화합물로 IgG를 수식하는 반응을 도 1에 도시한다. 당해 화합물은, 식 I에 나타내는 활성 에스테르 전구체를 갖기 때문에, 중성 조건, 바람직하게는 약알칼리성 조건에 있어서 활성화형의 화합물을 경유하여, IgG의 소정의 아미노산 잔기, 특히는 Lys 잔기에 IgG-BP를 부가할 수 있다.

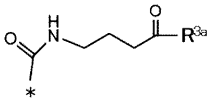
[0057] 이어서, R^3이 IgG-BP를 갖는 경우에 대하여 설명한다. R^3이 IgG-BP를 갖는 경우, R^2는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 8의 알키닐기, 아미노산 잔기수 2 내지 50의 치환 또는 비치환된 펩티드쇄, 중합도 2 내지 50의 치환 또는 비치

환된 폴리머쇄 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된다. 펩티드쇄에 있어서의 아미노산 잔기수는, 바람직하게는 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 10 또는 2 내지 5이며, 보다 바람직하게는 3이다. 구체적인 펩티드쇄로서는, Lys-Gly-Gly를 들 수 있다. 폴리머쇄는, 특별히 한정되지 않고 공지된 폴리머쇄이면 되고, 예를 들어 PEG 등을 들 수 있다. 또한, 치환된 펩티드쇄에는, 주쇄 또는 측쇄에 치환기가 결합한 것이 포함된다. 치환된 폴리머쇄에는, 주쇄 또는 측쇄에 치환기가 결합한 것이 포함된다.

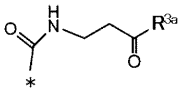
[0058] R^3이 IgG-BP를 갖는 경우, R^3은 IgG-BP여도 된다. 또한, R^3은, 상기의 R^2와 마찬가지로 링커를 갖고 있어도 된다.

[0059] R^3에 있어서의 IgG-BP는, 식 I의 벤젠환의 탄소 또는 링커에 주쇄 또는 임의의 아미노산 잔기의 측쇄를 통해 결합하고 있다. 바람직하게는, R^3에 있어서의 IgG-BP는, N 말단의 주쇄 또는 측쇄의 아미노기를 통해 식 I의 카르보닐기의 탄소 또는 링커에 결합하고 있다.

[0060] 적합하게는, R^3은 IgG-BP를 R^{3a}로 하여 식 III, 식 IV 및 식 V의 어느 것으로 표시된다. 또한, 식 III, 식 IV 및 식 V에 있어서, *은 식 I의 벤젠환의 탄소를 나타낸다.



식III



식IV



식V

[0061]

[0062] R^3이 IgG 결합 펩티드를 갖는 경우, R^2는 상술한 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖고 있어도 된다. R^2에 있어서의 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질은, 예를 들어 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 펩티드쇄 또는 폴리머쇄에 결합하고 있다. R^2가, 예를 들어 펩티드쇄로서 Lys-Gly-Gly를 갖는 경우, 펩티드쇄의 Lys의 측쇄의 아미노기를 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 치환해도 된다.

[0063] R^3이 IgG-BP를 갖는, 본 실시 형태에 관한 화합물로 IgG를 수식하는 반응을 도 2에 도시한다. 당해 화합물은, 식 I에 나타내는 활성 에스테르 전구체를 갖기 때문에, 활성화형의 화합물을 거쳐서 IgG에 결합한다. R^3이 IgG-BP를 갖는 당해 화합물은, R^2가 IgG-BP를 갖는 경우와 다르게, R^2를 포함하는 치환기가 IgG의 소정의 아미노산 잔기에 부가되고, IgG-BP를 포함하는 R^3은 IgG에 부가되지 않는다. 따라서, R^3이 IgG-BP를 갖는 경우, 바람직하게는 R^2는 상술한 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는다. 이렇게 함으로써, 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 IgG를 용이하게 수식할 수 있다.

[0064] 상술한 특허문헌 4 등에 개시된 IgG에 IgG-BP를 남기지 않는 CCAP법에서는, IgG를 수식한 후에 IgG-BP의 탈리 반응을 요한다. 한편, 본 실시 형태에 관한 화합물을 사용하면, IgG에의 수식과 동시에 IgG-BP의 탈리 반응이 완결된다.

[0065] IgG-BP는, 바람직하게는 Fc에 있어서의 Eu 넘버링을 따르는 Lys248, Lys246, Lys338, Lys288, Lys290, Lys360, Lys414 및 Lys439에서 선택되는 부위, 또는 그의 근접 영역, 바람직하게는 Lys248 또는 그의 근접 영역에 결합하거나, 혹은, 프로테인 A의 결합 영역에 결합하는 펩티드이다. 예를 들어, IgG-BP는, Fc 결합능을 갖는 프로테인 A의 부분 펩티드 또는 그의 변이체여도 된다. 이러한 펩티드의 구체적인 예가, 국제 공개 제2008/054030호, 국제 공개 제2013/027796호, 상기 특허문헌 1 내지 3 등에 기재되어 있다. IgG-BP는 공지된 펩티드의 합성법, 예를 들어 펩티드 고상 합성법 또는 각각의 문헌에 기재된 방법을 따라서 적절히 조제할 수 있다.

[0066] 보다 구체적으로는, R^2 및 R^3은 이하의 (i) 내지 (iii)에 들 수 있다.

[0067] (i) 하기 식 (PI)로 표시되는 IgG-BP를 포함하는 치환기

[0068] NH_2-(Linker)-(X^1_{1-3})-C-(X^2)-(X^3)-(X^4)-(X^5)-G-(X^6)-L-(X^7)-W-C-(X^8_{1-3})-(Linker)···식 (PI)

[0069] [식 (PI)에 있어서, 각 (Linker)는 독립적으로, 동일하거나 또는 다른 링커이거나, 또는 존재하지 않고, 여기서, 링커는 RRRGS, EEGGS, $(GSGGS)_{1-3}$ 혹은 $(PEG)_{1-10}$, 바람직하게는 $(PEG)_{1-8}$ 또는 $(PEG)_{2-10}$이고, 보다 바람직하게는 $(PEG)_4$이고,

[0070] 1 내지 3개의 X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7 및 1 내지 3개의 X^8은, 각각 서로 독립적으로, 동일하거나 또는 다른 아미노산 잔기를 나타내고,

[0071] 각 X^1, X^2, X^3 및 각 X^8은, 서로 독립적으로, 동일하거나 또는 다른, C 이외의 임의의 아미노산 잔기를 나타내고,

[0072] X^4는 H, R, S, 또는 D이고,

[0073] X^5는 K, C, D, E, R, V, F, L, 2-아미노수베르산, Dpr, Orn, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Tle, Ala(t-Bu) 및 Cha에서 선택되는 1개의 아미노산 잔기이고,

[0074] X^6은 E, N, R, 또는 D이고,

[0075] X^7은 I 또는 V이고,

[0076] 또한, Dab, Tle 및 Cha는, 각각 2,4-디아미노부탄산, tert-류신 및 β-시클로헥실-L-알라닌을 의미하고, 또한, Ac 및 t-Bu는, 각각 아세틸기를 갖는 것 및 tert-부틸기를 의미함]

[0077] 식 (PI)에 있어서, 결합을 위해, 식 (PI)의 C 말단 아미노산 잔기의 말단(-COOH)에 아미노기가 결합하여 (-C(=O)NH_2)기가 되고 있어도 된다. 또한, 식 (PI)에 있어서, N 말단의 아미노기는 아세틸화되어 있어도 된다. 이 경우, Linker 중의 N 말단 근방의 적절한 위치에 Lys 잔기가 도입되어 있어도 된다.

[0078] 식 (PI)로 표시되는 치환기에 포함되는 IgG-BP로서, 바람직하게는 이하의 펩티드를 들 수 있다.

[0079] [1] X^1_{1-3}이 (S, G, F, 또는 없음)-(D, G, A, S, P, Hcy, 또는 없음)-(S, D, T, N, E, 또는 R)로 표시되는 아미노산 서열이다.

[0080] [2] X^1_{1-3}이 D, GPD, R, GPR, SPD, GDD, GPS, SDD, RGN, G-Hcy-D, RGP, 또는 GPD이다.

[0081] [3] X^1_{1-3}이 D 또는 GPD이다.

[0082] [4] X^2가 A, S, 또는 T이다.

[0083] [5] X^2가 A 또는 T이다.

[0084] [6] X^2가 A이다.

[0085] [7] X^3이 Y 또는 W이다.

[0086] [8] X^3이 Y이다.

[0087] [9] X^4가 H이다.

[0088] [10] X^5가 A, R, K, C, D, E, L, 2-아미노수베르산, Dpr, R, F, 2-아미노수베르산, Dpr, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Ala(t-Bu) 및 Cha에서 선택되는 1개의 아미노산 잔기이다.

[0089] [11] X^5가 K, R, AcOrn이다.

[0090] [12] X^5가 V, Dab, F, R, L, Nva, Nle, Ala(t-Bu) 및 Cha에서 선택되는 1개의 아미노산 잔기이다.

[0091] [13] X^5가 F, R, L, Nva, Nle, Ala(t-Bu) 및 Cha에서 선택되는 1개의 아미노산 잔기이다.

[0092] [14] X^5가 L, Ala(t-Bu) 및 Cha에서 선택되는 1개의 아미노산 잔기이다.

[0093] [15] X^6이 E 또는 N이다.

[0094] [16] X^6이 E이다.

[0095] [17] X^7이 V이다.

[0096] [18] X^8_{1-3}이 (S, T, 또는 D)-(H, G, Y, T, N, D, F, Hcy 또는 없음)-(Y, F, H, M 또는 없음)이다.

[0097] [19] X^8_{1-3}이 T, TFH, S, SFH, THH, TFY, TYH 또는 T-Hcy-H이다.

[0098] [20] X^8_{1-3}이 T 또는 TFH이다.

[0099] 식 (PI)로 표시되는 치환기에 포함되는 IgG-BP로서는, 이상의 조건의 임의의 1개 또는 2 이상의 조합이어도 되고, 예를 들어 이하에 기재된 조건을 만족시키는 펩티드여도 된다: [8]과 [9], [8]과 [17], [9]와 [17], [8]과 [9]와 [17], 혹은 이들과 [10] 내지 [14]의 어느 하나의 조합이다.

[0100] 보다 구체적으로는, IgG-BP로서 이하의 펩티드를 들 수 있다(X^5는 상술과 동일하고, N 말단에 NH_2-(Linker)-기를 갖고 있어도 되고, C 말단에 $-NH_2$기 또는 -(Linker)-NH_2기를 갖고 있어도 된다):

[0101] 1) DCAYHX^5GELVWCT(서열 번호 1)

[0102] 2) GPDCAYHX^5GELVWCTFH(서열 번호 2)

[0103] 3) RCAYHX^5GELVWCS(서열 번호 3)

[0104] 4) GPRCAYHX^5GELVWCSFH(서열 번호 4)

[0105] 5) SPDCAYHX^5GELVWCTFH(서열 번호 5)

[0106] 6) GDDCAYHX^5GELVWCTFH(서열 번호 6)

[0107] 7) GPSCAYHX^5GELVWCTFH(서열 번호 7)

[0108] 8) GPDCAYHX^5GELVWCSFH(서열 번호 8)

[0109] 9) GPDCAYHX^5GELVWCTHH(서열 번호 9)

[0110] 10) GPDCAYHX^5GELVWCTFY(서열 번호 10)

[0111] 11) SPDCAYHX^5GELVWCTFY(서열 번호 11)

[0112] 12) SDDCAYHX^5GELVWCTFY(서열 번호 12)

[0113] 13) RGNCAYHX^5GQLVWCTYH(서열 번호 13)

[0114] 14) G-Hcy-DCAYHX^5GELVWCT-Hcy-H(서열 번호 14)

[0115] 15) RRGPDCAYHX^5GELVWCTFH(서열 번호 15)

[0116] 16) DCTYHX^{5}GNLVWCT(서열 번호 16)

[0117] 17) DCAYHX^{5}GNLVWCT(서열 번호 17)

[0118] 18) DCTYHX^{5}GELVWCT(서열 번호 18)

[0119] 19) DCAWHX^{5}GELVWCT(서열 번호 19)

[0120] 20) DCTYTX^{5}GNLVWCT(서열 번호 20)

[0121] 21) DCAYTX^{5}GNLVWCT(서열 번호 21)

[0122] 22) DCSYTX^{5}GNLVWCT(서열 번호 22)

[0123] 23) DCTWTX^{5}GNLVWCT(서열 번호 23)

[0124] 24) DCTYHX^{5}GNLVWCT(서열 번호 24)

[0125] 25) DCTYRX5GNLVWCT(서열 번호 25)

[0126] 26) DCTYSX^{5}GNLVWCT(서열 번호 26)

[0127] 27) DCTYTX^{5}GNLVWCT(서열 번호 27)

[0128] 28) DCTYTX^{5}GELVWCT(서열 번호 28)

[0129] 29) DCTYTX^{5}GRLVWCT(서열 번호 29)

[0130] 30) DCTYTX^{5}GDLVWCT(서열 번호 30)

[0131] 31) DCTYTX^{5}GNLIWCT(서열 번호 31)

[0132] 32) DCAYHRGELVWCT(서열 번호 32)

[0133] 33) GPDCAYHRGELVWCTFH(서열 번호 33)

[0134] 34) RCAYHRGELVWCS(서열 번호 34)

[0135] 35) GPRCAYHRGELVWCSFH(서열 번호 35)

[0136] 36) SPDCAYHRGELVWCTFH(서열 번호 36)

[0137] 37) GDDCAYHRGELVWCTFH(서열 번호 37)

[0138] 38) GPSCAYHRGELVWCTFH(서열 번호 38)

[0139] 39) GPDCAYHRGELVWCSFH(서열 번호 39)

[0140] 40) GPDCAYHRGELVWCTHH(서열 번호 40)

[0141] 41) GPDCAYHRGELVWCTFY(서열 번호 41)

[0142] 42) SPDCAYHRGELVWCTFY(서열 번호 42)

[0143] 43) SDDCAYHRGELVWCTFY(서열 번호 43)

[0144] 44) DCTYHRGNLVWCT(서열 번호 44)

[0145] 45) DCAYHRGNLVWCT(서열 번호 45)

[0146] 46) DCTYHRGELVWCT(서열 번호 46)

[0147] 47) DCAWHRGELVWCT(서열 번호 47)

[0148] 48) DCTYTNGNLVWCT(서열 번호 48)

[0149] 49) DCAYTNGNLVWCT(서열 번호 49)

[0150] 50) DCSYTNGNLVWCT(서열 번호 50)

[0151] 51) DCTWTNGNLVWCT(서열 번호 51)

[0152] 52) DCTYHNGNLVWCT(서열 번호 52)

[0153] 53) DCTYRNGNLVWCT(서열 번호 53)

[0154] 54) DCTYSNGNLVWCT(서열 번호 54)

[0155] 55) DCTYTRGNLVWCT(서열 번호 55)

[0156] 56) DCTYTNGELVWCT(서열 번호 56)

[0157] 57) DCTYTNGRLVWCT(서열 번호 57)

[0158] 58) DCTYTNGDLVWCT(서열 번호 58)

[0159] 59) DCTYTNGNLIWCT(서열 번호 59)

[0160] R^2 및 R^3의 예로서, 이하의 구조를 갖는 치환기를 들 수 있다.

[0161] 60) GSGGS-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH_2(서열 번호 60)

[0162] $(PEG)_4$-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH_2(서열 번호 33)

[0163] 61) GSGGS-DCAYHRGELVWCT-NH_2(서열 번호 61)

[0164] $(PEG)_4$-DCAYHRGELVWCT-NH_2(서열 번호 32)

[0165] 본 명세서에 있어서 펩티드 및 IgG-BP는, 관능기 Z가 결합한 펩티드를 포함한다. 예를 들어, 식 (PI)로 표시되는 치환기는, (Linker)의 끝에 관능기 Z가 결합하고 있어도 된다. 이러한 치환기로서는, 이하의 치환기를 들 수 있다.

[0166] 62) 아세틸-K(Z)-RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH_2(서열 번호 62)

[0167] 63) 아세틸-K(Z)-EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH_2(서열 번호 63)

[0168] 64) 아세틸-K(Z)-$(PEG)_4$-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH_2(서열 번호 64)

[0169] R^2 및 R^3은, 이하의 펩티드 N 말단 또는 PEG에 말레이미드기, DBCO기, 테트라진기, TCO기가 결합한 치환기여도 되고, C 말단에 NH_2기가 결합하고 있는 치환기여도 된다.

[0170] 65) RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH(서열 번호 65)

[0171] 66) EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH(서열 번호 66)

[0172] $(PEG)_4$-GPDCAYHKGELVWCTFH(서열 번호 64)

[0173] 또한, (Linker)의 끝에 관능기 Z가 결합한 치환기로서는, 이하의 펩티드를 들 수 있다.

[0174] 67) 아세틸-K(Z)RRRGS-DCAYHKGELVWCT-NH_2(서열 번호 67)

[0175] 68) 아세틸-K(Z)EEGGS-DCAYHKGELVWCT-NH_2(서열 번호 68)

[0176] 69) 아세틸-K(Z)-$(PEG)_4$-DCAYHKGELVWCT-NH_2(서열 번호 69)

[0177] R^2 및 R^3은, 이하의 펩티드 N 말단 또는 PEG에 말레이미드기, DBCO기, 테트라진기, TCO기가 결합한 치환기여도 되고, C 말단에 NH_2기가 결합하고 있는 치환기여도 된다.

[0178] 70) RRRGS-DCAYHKGELVWCT(서열 번호 70)

[0179] 71) EEGGS-DCAYHKGELVWCT(서열 번호 71)

[0180] $(PEG)_4$-DCAYHKGELVWCT(서열 번호 69)

[0181] (ii) 하기 식 (PII)로 표시되는 IgG-BP를 포함하는 치환기, 또는 (PII)의 아미노산 서열에 있어서, X^9 내지 X^{14} 이외의 위치에서 1 혹은 수개의 아미노산이 부가, 결실, 및/또는 치환된 아미노산 서열로 이루어지는 IgG-BP를 포함하는 치환기

[0182] $X^9_{1-2}NMQX^{10}QX^{14}RFYEALHDPNLNEEQRNAX^{11}IX^{12}SIRDDX^{13}$-(Linker2)-$CONH_2$ · · · (PII)

[0183] [식 (PII)에 있어서, (Linker2)는 $(GSGGS)_{1-3}$, $(SGSGS)_{1-3}$, 혹은 $(PEG)_{2-10}$-Lys(바람직하게는, $(PEG)_4$-Lys), SGSGSK, SRRCR, SRRK(Z)R, SRRCRRCRRC, SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z), 혹은 $(PEG)_{1-8}$-Lys(바람직하게는, $(PEG)_4$-Lys)이거나, 또는 존재하지 않고,

[0184] X^9_{1-2}는 GF, AF, VF, LF, IF, MF, PF, FF, WF, KF, Orn-F, CF, DF, EF, beta알라닌-F, 2-아미노수베르산-F, Dpr-F, NH_2-(PEG)n-CO(여기서, n=1-50)-F, F, K, Orn, C, D, E, 2-아미노수베르산, Dpr 및 아세틸-K로 이루어지는 군에서 선택되고,

[0185] X^{10}은 C 또는 Q이고,

[0186] X^{11} 및 X^{12}는 각각 독립적으로 R, H, D, E, S, T, N, Q, Y 및 C로 이루어지는 군에서 선택되고,

[0187] X^{13}은 C 또는 P이거나, 존재하지 않고

[0188] X^{14}는 R, C, K, 또는 K(Z)임].

[0189] 식 (PII)의 N 말단 아미노산의 말단($-NH_2$)은 아세틸화되어 (CH_3-C(=O)-NH-)기로 되어 있어도 된다. 또한, 링커에 포함되는 Cys 잔기(C)는 필요에 따라, 말레이미드기를 통해 다른 기능성 분자가 결합하고 있어도 된다.

[0190] 식 (PII)로 표시되는 치환기에 포함되는 IgG-BP로서, 바람직하게는 이하의 펩티드를 들 수 있다.

[0191] [21] X^9가 GF, AF, βAlaF, NH_2-$(PEG)_n$-CO(n=2-10)-F, F, K, Orn, C, Dpr 및 아세틸-K로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0192] [22] X^9가 GF, F, K 및 아세틸-K로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0193] [23] X^{10}이 Q이다.

[0194] [24] X^{11} 및 X^{12}가 각각 독립적으로 R, H 및 E로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0195] [25] X^{11}이 R이다.

[0196] [26] X^{12}가 R 또는 K(Z)이다(바람직하게는, Z가 아지드임).

[0197] 식 (PII)로 표시되는 치환기로서, 보다 구체적으로는, 이하의 치환기를 들 수 있다(단, 포함되는 Lys 잔기에는 필요에 따라서 관능기가 결합하고 있어도 됨).

[0198] 72) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열 번호 72)

[0199] 73) GFNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열 번호 73)

[0200] 74) KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열 번호 74)

[0201] 75) GFNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열 번호 75)

[0202] 76) KNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열 번호 76)

[0203] 77) FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD(서열 번호 77)

[0204] 78) GKNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열 번호 78)

[0205] 79) 아세틸-FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SGSGSK-NH_2(서열 번호 79)

[0206] 80) 아세틸-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SGSGSK-NH_2(서열 번호 80)

[0207] 81) 아세틸-FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-$(PEG)_4$-Lys-NH_2(서열 번호 81)

[0208] 72-2) 아세틸-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-$(PEG)_4$-Lys-NH_2(서열 번호 72)

[0209] 82) FNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD-NH_2(서열 번호 82)

[0210] 83) FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열 번호 83)

[0211] 84) FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRK(Z)R-NH_2(서열 번호 84)

[0212] 85) FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRCR-NH_2(서열 번호 85)

[0213] 86) FNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARICSIRDDP-SRRCRRCRRC-NH_2(서열 번호 86)

[0214] 87) FNMQQQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIK(Z)SIRDDP-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(서열 번호 87)

[0215] 88) 아세틸-KNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD-NH_2(서열 번호 88)

[0216] 89) 아세틸-KNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열 번호 89)

[0217] 90) 아세틸-KNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRK(Z)R-NH_2(서열 번호 90)

[0218] 91) 아세틸-KNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRCR-NH_2(서열 번호 91)

[0219] 92) 아세틸-KNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARICSIRDDP-SRRCRRCRRC-NH_2(서열 번호 92)

[0220] 93) 아세틸-KNMQQQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIK(Z)SIRDDP-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(서열 번호 93)

[0221] 94) GFNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD-NH_2(서열 번호 94)

[0222] 95) GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열 번호 95)

[0223] 96) GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRK(Z)R-NH_2(서열 번호 96)

[0224] 97) GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRCR-NH_2(서열 번호 97)

[0225] 98) GFNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARICSIRDDP-SRRCRRCRRC-NH_2(서열 번호 98)

[0226] 99) GFNMQQQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIK(Z)SIRDDP-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(서열 번호 99)

[0227] 100) FNMQCQZRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열 번호 100)

[0228] 101) 아세틸-KNMQCQZRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열 번호 101)

[0229] 102) GFNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)R-NH_2(서열 번호 102)

[0230] 103) FNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열 번호 103)

[0231] 104) 아세틸-KNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)R-NH_2(서열 번호 104)

[0232] 105) GFNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)- NH_2(서열 번호 105)

[0233] 106) 아세틸-KNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(서열 번호 106)

[0234] 107) GFNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(서열 번호 107)

[0235] (iii) 이하의 펩티드

[0236] 108) CAWHLGELVWC(서열 번호 108)

[0237] 109) DCAWHLGELVWCT(서열 번호 109)

[0238] 110) DCAWHLGELVFCT(서열 번호 110)

[0239] 111) DCAWHLGELVX^{15}CT(서열 번호 111)

[0240] X^{15}=1-나프토일, 2-나프토일, 벤질, 또는 벤조티오펜

[0241] 112) CDCAWHLGELVWCTC(서열 번호 112)

[0242] 113) CAYHLGELVWC(서열 번호 113)

[0243] 114) DCAYHLGELVWCTF(2-Pya)(서열 번호 114)

[0244] 115) 아세틸-(Lys[아지드])RRRGSGPDCAYHKGELVWCTFH-$CONH_2$)(서열 번호 115)

[0245] IgG-BP와 IgG의 입체 구조를 고려하여, R^3이 IgG-BP를 갖는 경우, IgG-BP의 아미노산 서열은, 서열 번호 72 내지 107에 나타내는 아미노산 서열의 N 말단의 아미노산 잔기를 결하는, 서열 번호 116으로부터 151의 어느 하나에 표시된 아미노산 서열이어도 된다.

[0246] R^2는, IgG-BP에 포함되는 Lys 잔기, 특히는 X_5의 측쇄를 통해 식 I의 카르보닐기의 탄소 또는 링커에 결합해도 되고, R^3은 IgG-BP에 포함되는 Lys 잔기, 특히 상기의 X^5의 측쇄를 통해 식 I의 벤젠환의 탄소 또는 링커에 결합해도 된다.

[0247] 또한, R^2가, 예를 들어 상기의 79), 80), 81), 72-2), 88), 89), 90), 91), 92), 93), 101), 104) 및 106)의 경우, 임의의 Lys 잔기의 측쇄가 식 I의 카르보닐기의 탄소 또는 링커와 결합해도 된다. 마찬가지로, R^3이 상기의 79), 80), 81), 72-2), 88), 89), 90), 91), 92), 93), 101), 104) 및 106)의 경우, 임의의 Lys 잔기의 측쇄가 식 I의 벤젠환의 탄소 또는 링커와 결합해도 된다.

[0248] 또한, 상술한 IgG-BP에서는, 임의의 2개의 시스테인 잔기끼리가 디술피드 결합을 통해 분자(펩티드) 내 결합을 형성하고 있어도 된다.

[0249] R^4는 H 또는 치환 혹은 비치환된 탄소수 1 내지 8의 알킬기이다. R^4는, 예를 들어 탄소수 1 내지 6, 1 내지 4 또는 1 내지 3의 알킬기이며, 바람직하게는 에틸기, 보다 바람직하게는 메틸기이다.

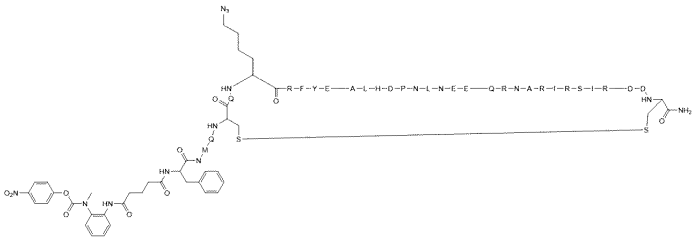
[0250] 본 실시 형태에 관한 환상 펩티드의 염으로서는, 약리학적으로 허용되는 염이라면 특별히 한정되지 않고, 산성염 및 염기성염의 어느 것이어도 된다. 염으로서는, 예를 들어 리튬염, 나트륨염 및 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 마그네슘염 및 칼슘염 등의 알칼리 토류 금속염 등, 염산염, 브롬화수소산염, 황산염, 질산염, 옥살산염 및 인산염 등의 무기산염, 그리고 아세트산염, 프로피온산염, 헥산산염, 시클로펜탄프로피온산염, 글리콜산염, 피루브산염, 락트산염, 말론산염, 숙신산염, 말산염, 푸마르산염, 타르타르산염, 시트르산염, 벤조산염, o-(4-히드록시벤조일)벤조산염, 신남산염, 만델산염, 메탄술폰산염, 에탄술폰산염, 1,2-에탄디술폰산염, 2-히드록시에탄술폰산염, 벤젠술폰산염, p-클로로벤젠술폰산염, 2-나프탈렌술폰산염, p-톨루엔술폰산염, 캄포술폰산염, 글루코헵탄산염, 3-페닐프로피온산염, 트리메틸아세트산염, 제3급 부틸아세트산염, 라우릴황산염, 글루콘산염, 글루탐산염, 히드록시나프토산염, 살리실산염, 스테아르산염, 트리플루오로아세트산(TFA)염, 말레산염 및 뮤콘산염 등의 유기산염 등을 들 수 있다.

[0251] 본 실시 형태에 관한 화합물은, 상기 식 I에 나타내는 구조에 기초하여 공지된 방법으로 합성할 수 있다. 예를

들어, R^2가 IgG-BP를 갖는 화합물의 합성에서는, 펩티드 고상 합성법으로 합성한 수지상의 펩티드의 아미노기를 글루타릴화하고, N-메틸-1,2-페닐렌디아민을 축합한 후, 4-니트로페닐 클로로포메이트 처리를 행하면 된다. 예를 들어, R^3이 IgG-BP를 갖는 화합물의 합성에서는, 수지 상에서 펩티드를 신장하는 도중에, Fmoc-MeDbz(3-[(9-플루오레닐메톡시카르보닐)아미노]-4-(메틸아미노)벤조산)을 사용하여 MeDbz 잔기를 삽입해 둠으로써, 보호 펩티드 수지에 대한 4-니트로페닐 클로로포메이트 처리에 의해 MeDbz 잔기 부위에 상기 식 I에 나타내는 골격을 구축할 수 있다.

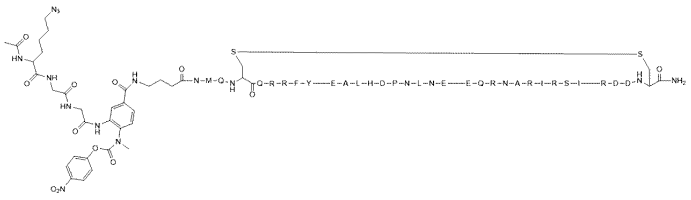
[0252] 본 실시 형태에 관한 화합물 또는 그의 염은, 가수 분해되기 쉬운 NHS기를 갖고 있지 않기 때문에, 화학적으로 안정되어 장기 보존할 수 있다. 당해 화합물 또는 그의 염은, 식 I에 나타내는 활성 에스테르 전구체를 갖기 때문에, IgG와 혼화함으로써, Fc 영역의 소정의 부위를 특이적으로 수식할 수 있다. 반응성 관능기로 IgG를 수식하면, 반응성 관능기를 통해 약물 또는 표지 물질 등을 IgG에 결합시킬 수 있다. 약물을 IgG에 담지시키면, 부위 특이적으로 약물을 결합시킨 항체 약물 복합체가 얻어진다. 이에 의해, 약물의 특성을 IgG에 부여할 수 있기 때문에, 약물 수송 시스템(DDS) 등에 응용할 수 있다. 또한, 부위 특이적인 표지 물질에서의 IgG의 수식에 의해, 표지 물질을 양적으로 제어할 수 있으므로, IgG의 추적, 분포 및 검출 등에 유용하다.

[0253] 본 실시 형태에 관한 화합물의 일례로서 화합물 A의 구조를 다음에 나타낸다. 화합물 A는, R^2가 서열 번호 152에 나타내는 아미노산 서열의 IgG-BP를 갖는다. 또한, 하기의 화합물 A의 구조에 있어서, -N-M-Q-NH-에 있어서의 N, M 및 Q, 그리고 RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD는, 1문자 표기의 아미노산을 나타낸다.



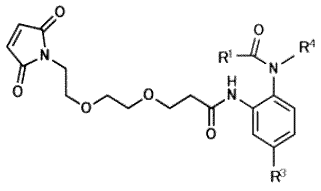
[0254]

[0255] 본 실시 형태에 관한 화합물의 일례로서 화합물 B의 구조를 다음에 나타낸다. 당해 화합물은, R^3이 서열 번호 153에 나타내는 아미노산 서열의 IgG-BP를 갖는다. 또한, 하기의 화합물 B의 구조에 있어서, -C(=O)-N-M-Q-NH-에 있어서의 N, M 및 Q, 그리고 QRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD는, 1문자 표기의 아미노산을 나타낸다.



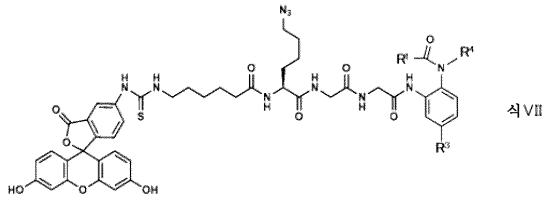
[0256]

[0257] 또한, R^3이 IgG-BP를 갖는 화합물로서, 하기의 식 VI 내지 IX가 예시된다.



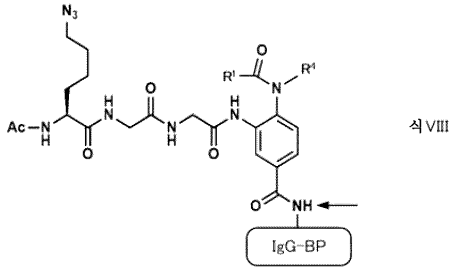
식 VI

[0258]



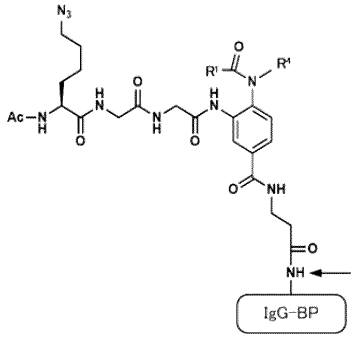
식 VII

[0259]



식 VIII

[0260]

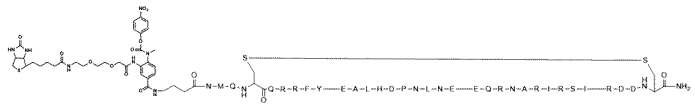


식 IX

[0261]

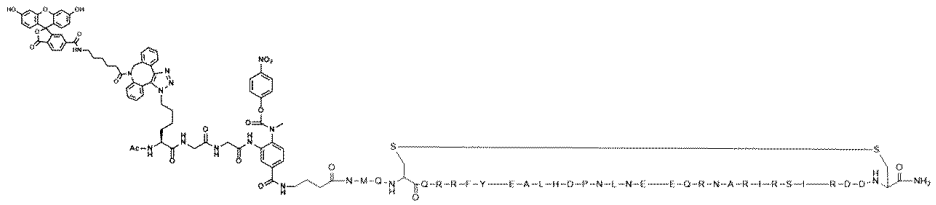
[0262] 식 VIII 및 식 IX에서는, IgG-BP의 N 말단이 아닌 아미노산 잔기, 예를 들어 Lys 잔기의 측쇄 아미노기가 링커를 통해 식 I의 벤젠환의 탄소와 결합하고 있다. 또한, 식 VIII 및 식 IX에 있어서 화살표로 나타낸 -NH-는 Lys 잔기의 측쇄 아미노기를 나타낸다.

[0263] 또한, R^3이 IgG-BP를 갖는 화합물 C 및 화합물 D로서, 각각 하기의 식 X 및 식 XI가 예시된다. 화합물 C 및 화합물 D의 IgG-BP의 아미노산 서열은, 상기 화합물 B의 IgG-BP와 동일하게 서열 번호 153에 나타내는 아미노산 서열이다.



식 X

[0264]



식 XI

[0265]

[0266] 다른 실시 형태에서는, 본 실시 형태에 관한 화합물 또는 그의 염을 포함하는, 항체 수식 시약이 제공된다. 다른 실시 형태에서는, 당해 항체 수식 시약을 사용한 수식 항체의 제조 방법이 제공된다. 수식 항체의 제조 방법은, 반응 스텝을 포함한다. 반응 스텝에서는, 당해 항체 수식 시약과 IgG를 반응시킨다.

[0267] 반응 스텝에 있어서의 반응 조건은, 항체 수식 시약이 IgG에 폭로되면 임의이지만, 예를 들어 pH7.0 내지 9.0의 완충액 중에서, IgG와 항체 수식 시약을 혼화하면 된다. 완충액 중의 IgG 및 항체 수식 시약의 농도는 적절히 조정된다. 완충액 중에 있어서의 IgG와 항체 수식 시약의 몰비는, 예를 들어 1:1 내지 10, 1:2 내지 8 또는 1:3 내지 6으로, 바람직하게는 1:5이다.

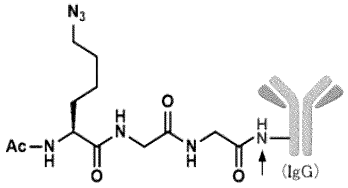
[0268] (수식 항체)

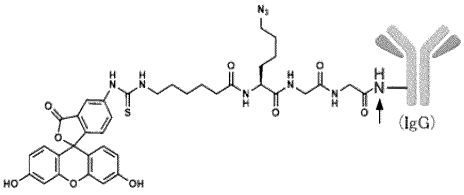
[0269] 본 실시 형태에 관한 수식 항체는, 상기 식 I의 R^2가 결합하는 카르보닐기로부터 R^2까지를 포함하는 원자단을 갖는다. 당해 수식 항체는, 바람직하게는 상술한 화합물 또는 그의 염과 IgG를 반응시킴으로써 얻어진다.

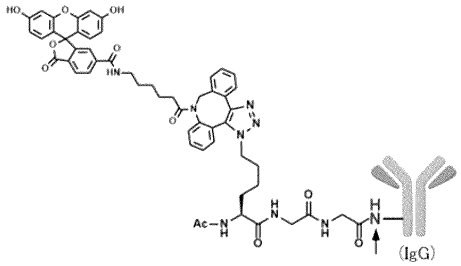
[0270] 예를 들어, 당해 수식 항체는, IgG의 Fc 영역의 Lys에 Lys-Gly-Gly를 포함하는 원자단을 통해 1가 또는 2가로 결합한 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는다. IgG는 특별히 한정되지 않지만, 특히는 인간 IgG가 바람직하고, 예를 들어 트라스투주맙 및 토실리주맙 등이다.

[0271] 상기 원자단은, 예를 들어 Lys-Gly-Gly를 포함하는 펩티드쇄여도 되고, 펩티드쇄에 추가로 링커 등이 결합된 원자단이어도 된다. 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질은, 펩티드쇄의 N 말단에 링커를 통해 결합하고 있어도 되고, 원자단에 포함되는 Lys의 측쇄의 아미노기가 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 치환되어 있어도 된다. 또한, Lys-Gly-Gly의 Lys의 N 말단은 아세틸화되어 있어도 된다.

[0272] Lys-Gly-Gly를 포함하는 원자단을 통해 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질이 결합된 수식 항체의 구조로서 이하의 구조가 예시된다. 또한, 화살표로 나타낸 -NH-는 Lys 잔기의 측쇄의 아미노기를 나타낸다.

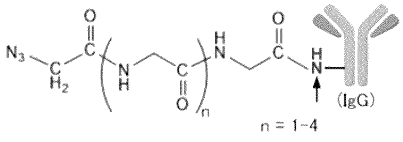


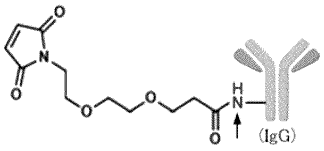


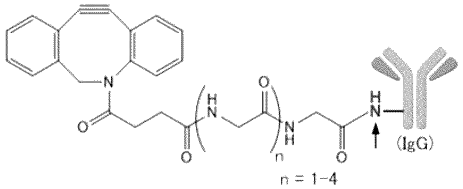


[0273]

[0274] 수식 항체는, IgG의 Fc 영역의 Lys에 1가 또는 2가로 결합한 PEG, Gly 또는 그의 조합을 포함하는 원자단을 통해 결합한 상기의 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 가져도 된다. 당해 수식 항체의 구조로서 이하의 구조가 예시된다. 또한, 화살표로 나타낸 -NH-는 Lys 잔기의 측쇄 아미노기를 나타낸다.







[0275]

[0276] (부기)

[0277] (부기 1) 상기 식 I에 나타내는 화합물 또는 그의 염.

[0278] (부기 2) R^1은 니트로페녹시기인, 부기 1에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0279] (부기 3) R^2는 상기 IgG 결합 펩티드를 갖고, R^3은 존재하지 않는, 부기 1 또는 2에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0280] (부기 4) R^2는, 상기 IgG 결합 펩티드를 R^{2a}로 하여, 상기 식 II에 나타내는, 부기 1로부터 3의 어느 하나에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0281] (부기 5) 상기 IgG 결합 펩티드는 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질로 수식되어 있는, 부기 3 또는 4에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0282] (부기 6) R^3은 상기 IgG 결합 펩티드를 갖고, R^2는 약물, 반응성 관능기 또는 표지 물질을 갖는, 부기 1 또는 2에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0283] (부기 7) R^3은, 상기 IgG 결합 펩티드를 R^{3a}로 하여 상기 식 III, 식 IV 및 식 V의 어느 것으로 나타내는, 부기 1, 2 및 6의 어느 하나에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0284] (부기 8) 상기 IgG 결합 펩티드의 아미노산 서열은, 서열 번호 1로부터 115의 어느 하나에 표시된 아미노산 서열인, 부기 1 내지 7의 어느 하나에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0285] (부기 9) 상기 IgG 결합 펩티드의 아미노산 서열은, 서열 번호 116으로부터 151의 어느 하나에 표시된 아미노산 서열인, 부기 6 또는 7에 기재된 화합물 또는 그의 염.

[0286] (부기 10) 부기 1 내지 9의 어느 하나에 기재된 화합물 또는 그의 염을 포함하는, 항체 수식 시약.

[0287] (부기 11) 부기 10에 기재된 항체 수식 시약과 IgG를 반응시키는 반응 스텝을 포함하는, 수식 항체의 제조 방법.

[0288] **실시예**

[0289] 이하의 실시예에 의해, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0290] 실시예 1: 화합물 A의 합성

[0291] 상술한 화합물 A를 다음과 같이 합성하였다. 0.25mmol의 링크 아미드(Rink Amide) PEG 수지(0.55mmol/g)를 사용하여, PurePep Chorus 펩티드 고상 합성기(Gyros Protein Technologies사제)로 피페리딘/NMP(1:4)에 의한 탈Fmoc과와 Fmoc 보호 아미노산/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1mmol)를 반복하여 보호 펩티드 수지를 구축하였다. 단, Fmoc-Lys(N_3)의 축합은 Fmoc-Lys(N_3)/DIC/Oxyma(0.50mmol/0.50mmol/0.50mmol)로 실시하였다.

[0292] 얻어진 보호 펩티드 수지(0.20mmol)의 N 말단 아민에 대하여, 트리에틸아민(35μL) 존재 하, 글루타릴산 무수물(0.1g)을 N-메틸-2-피롤리돈(NMP) 중에서 1시간 반응시켰다. 그 후, 얻어진 N 말단 카르복실산 수지에 대하여, N-메틸-1,2-페닐렌디아민 이염산염(0.234g)을 커플링 시약 PyAop(0.625g), HOAt(0.163g) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(DIEA)(0.612mL)을 사용하여 축합하였다. 그 후, 4-니트로페닐 클로로포메이트(0.4g)를 디클로로메탄 중 1시간 반응시켜, PMD(페녹시카르보닐화 N-메틸-o-디아미노벤젠)(NO_2) 골격을 구축하였다. 얻어진 수지를 트리플루오로아세트산(TFA) 용액으로 처리하여 탈수지 및 탈보호를 행하고, 디에틸에테르로 고화하여 조펩티드(2SH체)를 721mg 얻었다. 얻어진 조펩티드(2SH체) 중 250mg을 아세트산/물(1:1)에 용해시켜, 빙랭 하, 0.1M의 요오드·메탄올 용액을 1당량분 천천히 첨가하였다. 90초 후, 아스코르브산 수용액으로 반응을 퀜칭하고, 역상 고속 액체 크로마토그래피(HPLC) 칼럼으로 정제, 동결 건조함으로써 원하는 SS체 펩티드인 PMD(NO_2)-αZ34C(화합물 A)를 50mg 얻었다.

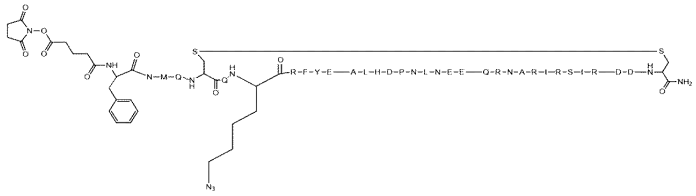
[0293] 실시예 2: 화합물 B의 합성

[0294] 상술한 화합물 B를 다음과 같이 합성하였다. 0.25mmol의 링크 아미드 PEG 수지(0.55mmol/g)를 사용하여, PurePep Chorus 펩티드 고상 합성기(Gyros Protein Technologies사제)로 피페리딘/NMP(1:4)에 의한 탈Fmoc과, Fmoc 보호 아미노산/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1mmol)를 반복하여 보호 펩티드 수지를 구축하였다. 단, Fmoc-

MeDbz의 축합은 Fmoc-MeDbz/HCTU/6-Cl HOBt/DIEA(1mmol/1mmol/1mmol/2mmol)로, Fmoc-Lys(N_3)의 축합은 Fmoc-Lys(N_3)/DIC/HOAt(0.375mmol/0.375mmol/0.375mmol)로 실시하였다.

[0295] 얻어진 보호 펩티드 수지(0.25mmol)에 대하여, 4-니트로페닐 클로로포메이트(0.5g)를 디클로로메탄 중 1시간 반응시켜, PMD(NO_2) 골격을 구축하였다. 얻어진 수지를 TFA 용액으로 처리하고 탈수지 및 탈보호를 행하여, 디에틸에테르로 고화하여 조펩티드(2SH체)를 966mg 얻었다. 얻어진 조펩티드를 역상 HPLC 칼럼으로 정제, 동결 건조함으로써 2SH체를 147mg 얻었다. 그 후, 조펩티드(2SH체)를 아세트산/물(1:1)에 용해시켜, 빙랭 하, 0.1M의 요오드·메탄올 용액을 1당량분 천천히 첨가하였다. 30초 후, 아스코르브산 수용액으로 반응을 퀜칭하고, 역상 HPLC 칼럼으로 정제 및 동결 건조함으로써 원하는 SS체 펩티드인 아지드KGG-PMD(NO_2)-αZ34C(F1Gaba, K7R)(화합물 B)를 87mg 얻었다.

[0296] 비교를 위해서, DSG를 갖는 하기의 화합물을 합성하였다.

[0297] 

[0298] 0.25mmol의 링크 아미드 PEG 수지(0.55mmol/g)를 사용하여, PurePep Chorus 펩티드 고상 합성기(Gyros Protein Technologies사제)로 피페리딘/NMP(1:4)에 의한 탈Fmoc과, Fmoc 보호 아미노산/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1mmol)를 반복하여 보호 펩티드 수지를 구축하였다. 단, Fmoc-Lys(N_3)의 축합은 Fmoc-Lys(N_3)/DIC/Oxyma(0.50mmol/0.50mmol/0.50mmol)로 실시하였다.

[0299] 얻어진 보호 펩티드 수지를 TFA 용액으로 처리하여 탈수지 및 탈보호를 행하여, 조펩티드(2SH체)를 디에틸에테르로 고화하고, 여과 취출하였다. 얻어진 조펩티드(2SH체)를 아세트산/물(1:1)에 용해시켜, 빙랭 하, 0.1M의 요오드·메탄올 용액을 천천히 첨가하였다. 60초 후, 아스코르브산 수용액으로 반응을 퀜칭하고, 역상 HPLC 칼럼으로 정제, 동결 건조함으로써 N 말단 프리 아민 성분을 갖는 전구체 펩티드(SS체)를 61mg 얻었다. 마지막으로, 전구체 펩티드(SS체) 60mg을 DMSO에 용해시켜, DSG(18mg) 및 DIEA(12μL)를 천천히 가하고, N 말단의 아미노기를 숙신이미딜에스테르로 변환하여 활성화하였다. 10분 후, 0.1% TFA수로 희석하고, 역상 HPLC 칼럼으로 정제, 동결 건조함으로써 원하는 DSG-αZ34C(이하, 비교예로 함)를 19mg 얻었다.

[0300] 시험예 1: 안정성의 검토

[0301] 화합물 A, 화합물 B 또는 비교예를 DMSO에 20mg/mL이 되도록 녹여, 실온 또는 -20℃에서 소정 시간 정치하고, HPLC에서 분석하였다.

[0302] (결과)

[0303] 화합물 A, 화합물 B 및 비교예에 대해서, 전체 피크의 면적 합에 대한 메인 피크의 면적 비율(HPLC 순도)을 표 1에 나타낸다. 실온 및 -20℃에서 화합물 A 및 화합물 B는, 비교예보다 안정되었다.

표 1

[0304]

	실온		−20°C	
	0시간	22시간	0일	30일
비교예	85%	83%	92%	85%
화합물 A	94%	93%	94%	94%
화합물 B	98%	92%	98%	98%

[0305] 실시예 3: 화합물 A 및 화합물 B의 인간 IgG에 대한 반응의 평가

[0306] [인간 IgG1과의 반응]

[0307] 화합물 A 또는 화합물 B와 항체(인간 IgG1 항체 의약품 악템라, 토실리주맙)를 4개의 pH 조건 하에서 반응시켰다. 즉, 20mg/ml의 IgG 용액 20μL에, 0.5M 아세트산 완충액(pH5.5), 0.5M 인산 완충액(pH7.0), 0.5M 헤페스(Hepes) 완충액(pH8.0) 또는 0.5M 중 탄산 완충액(pH8.9)을 20μL 첨가하고, 증류수 138.4μL를 첨가하였다. 마지막으로, DMSO 중에 용해한 10mM의 화합물 A 또는 10mM의 화합물 B를 1.56μL씩 첨가하고, 빠르게 교반 후, 전량 200μL로 하였다(최종 반응물에서의 IgG 농도는 15.6μM, 시약은 5배 몰비의 78μM). 2시간 후에 샘플링하고, 최종 농도 10% 포름산으로 반응을 정지 후, LC-MS에서 해석하였다.

[0308] [반응물의 LC-MS 분석]

[0309] 반응을 정지한 반응 용액을 0.1% 포름산으로 5배로 희석 후, 20μL를, Protein BEH C4 칼럼(300Å, 1.7㎛, 2.1×500mm, Waters사제)을 연결한 BioAccord LC-MS system(Waters사제)에서 분석하였다(유속: 0.4mL/분, 용출: 0.1% 포름산을 포함하는 1% CH_3CN으로부터 50% CH_3CN까지의 리니어 구배, 칼럼 온도: 80℃).

[0310] (결과)

[0311] 화합물 A와 IgG의 2시간 후의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도 3 및 도 4에 도시한다. 도 3의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액의 용출 크로마토그램(280nm)이다. 2.23분 또는 2.25분의 피크가 IgG의 용출에 대응하는 피크이다. 도 4의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시한다. 도 4의 (A)에 나타낸 pH5.5의 반응액에 있어서의 질량 147879Da, 148041Da 및 148203Da의 분자종은, IgG의 당쇄의 다양성에 의해 검출되는, 각각 N-G0F×2(분자종 1), N-G0F×1+N-G1F×1(분자종 2) 및 N-G1F×2(분자종 3)이다. pH5.5에서는 펩티드의 부가에 의해 수식된 분자종은 관찰되지 않았다.

[0312] 도 4의 (B)에 도시하는 pH7.0의 반응 용액 및 도 4의 (C)에 도시하는 pH8.0의 반응 용액에서도, pH5.5와 거의 동일하게 수식된 분자종은 관찰되지 않았다. 한편, 도 4의 (D)에 도시하는 pH8.9의 반응 용액에서는, 질량 152195Da, 152357Da 및 152519Da의 분자종이 관찰되었다. 이들은, IgG의 분자종 1, 분자종 2 및 분자종 3의 질량으로부터, 각각 4316Da, 4316Da 및 4317Da 증가하고 있다. 이것은, 화합물 A에 의해 펩티드가 IgG에 부가했을 때에 증가하는 것이 기대되는 질량 4333Da와 거의 일치한 점에서, 화합물 A가 pH8.9에서 IgG와 반응하고 있는 것이 나타났다.

[0313] 화합물 B와 IgG의 2시간 후의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도 5 및 도 6에 도시한다. 도 5의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액의 용출 크로마토그램(280nm)이다. 1.93분 또는 2.02분의 피크가 화합물 B의 용출에 대응하는 피크이다. 2.25분 또는 2.27분의 피크가 IgG의 용출에 대응하는 피크이다. 도 6의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 나타낸다. 도 6의 (A)에 도시하는 바와 같이, pH5.5에서는, IgG의 분자종 1(147882Da), 분자종 2(148044Da), 분자종 3(148208Da)이 관찰되었지만, 도 6의 (B)에 도시하는 pH7.0에서는, 분자종 1이 감소하고, 148193Da의 분자종이 증가하였다. 이 311Da의 차는, 화합물 B의 반응에 의해 부가되는 아지드화 KGG의 부가분(311.33Da)과 일치하였다.

[0314] 또한, 도 6의 (C)에 도시하는 pH8.0 및 도 6의 (D)에 도시하는 pH8.9에서는, 각각 148505Da 및 148501Da의 분자종이 증가하였다. 이들의 분자 종의 질량은, 분자종 1로부터 623Da 또는 619Da 증가하고 있고, 아지드화 KGG의 부가분(311.33)의 2배에 상당하는 점에서, 2개의 아지드화 KGG가 IgG에 부가했다고 생각되는, 또한, 분자종 2에 대해서도, pH7.0에서는 아지드화 KGG가 1개 부가했다고 보이는 148353Da 및 2개 부가했다고 보여지는 148664Da의 분자종의 증가가 보이고, pH8.0 및 8.9라도, 1개에서 2개에의 부가가 계속되어 일어나고 있는 것이 관찰되었다. 이상으로부터, 화합물 B는 pH7.0 이상에서 IgG와 반응하고 있는 것이 나타났다.

[0315] 실시예 4: 화합물 B의 마우스 IgG에 대한 반응의 평가

[0316] [마우스 IgG와의 반응]

[0317] 화합물 B와 마우스 IgG2 항체(항DYKDDDDK 마우스 IgG2b 모노클로날 항체)를 2개의 pH 조건 하에서 다음과 같이 반응시켰다. 0.98mg/mL의 IgG 용액 30μL에, 0.2M 헤페스 완충액(pH8.0) 또는 0.2M 중탄산 완충액(pH8.9)을 22μL 첨가하였다. 마지막으로, DMSO 중에 용해한 50μM의 화합물 B를 8μL씩 첨가하고, 빠르게 교반 후, 전량 60μL로 하였다(최종 반응물에서의 IgG 농도는 1.67μM, 시약은 4배 몰비의 6.67μM이다). 2시간 후에 샘플링

하고, 최종 농도 5% 포름산으로 반응을 정지 후, 실시예 3과 마찬가지로 LC-MS에서 해석하였다.

[0318] (결과)

[0319] 화합물 B와 마우스 IgG의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도 7 및 도 8에 도시한다. 도 7의 (A), (B) 및 (C)는 각각 화합물 B를 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액, 반응 2시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 2시간 후의 pH8.9의 용액 용출 크로마토그램(280nm)이다. 2.30분 및 2.53분의 피크가 마우스 IgG의 용출에 대응하는 피크이다. 도 8의 (A), (B) 및 (C)는 각각 화합물 B를 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액, 반응 2시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 2시간 후의 pH8.9의 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시한다. 도 8의 (A)에 도시된, 화합물 B를 첨가하기 전의 pH8.0의 용액에 있어서의 질량 150094Da, 150256Da 및 150419Da의 분자종은, IgG의 당쇄의 다양성에 의해 검출되는 각각 N-G0F×2(분자종 1), N-G0F×1+N-G1F×1(분자종 2) 및 N-G1F×2(분자종 3)이다.

[0320] 도 8의 (B) 및 (C)에 각각 도시하는 바와 같이, pH8.0 및 pH8.9에서는, 분자종 1 내지 3이 감소하는 한편, 새롭게 150569Da, 150729Da, 150884Da 및 151039Da의 분자종이 증가하고 있었다. 질량 150569Da는 분자종 2로부터 313Da의 증가이다. 질량 150729Da는 분자종 3으로부터 310Da의 증가이고, 분자종 1로부터 635Da의 증가이다. 질량 150884Da는 분자종 2로부터 628Da의 증가이다. 질량 151039Da는 분자종 3으로부터 620Da의 증가이다. 이들 질량의 차는 화합물 B의 반응에 의해 항체에 부가되는 아지드화 KGG의 부가분(311.33Da) 또는 그의 2배에 상당하기 때문에, 1개째의 부가에 계속되어 2개째의 부가가 일어나고 있는 것이 관찰되었다. 이상으로부터, 화합물 B는 마우스 항체에 대해서도, pH8.0 이상에서 반응하고 있는 것이 나타났다.

[0321] 실시예 5: 화합물 B의 래빗 IgG에 대한 반응의 평가

[0322] [래빗 IgG와의 반응]

[0323] 화합물 B와 래빗 항체(항마우스 IgG1 모노클로날 래빗 항체)를 pH8.0의 조건 하에서 다음과 같이 반응시켰다. 1.93mg/mL의 IgG 용액 25μL에, 0.5M 헤페스 완충액(pH8.0) 10μL 및 증류수 5μL를 첨가하였다. 마지막으로, 증류수 중에 용해한 89.3μM의 화합물 B를 60μL씩 첨가하고, 빠르게 교반 후, 전량 100μL로 하였다(최종 반응물에서의 IgG 농도는 6.7μM, 화합물 B는 8배 몰비의 53.6μM). 2시간 후에 샘플링하고, 최종 농도 5% 포름산으로 반응을 정지 후, 실시예 3과 마찬가지로 LC-MS에서 해석하였다.

[0324] (결과)

[0325] 화합물 B와 래빗 IgG의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도 9 및 도 10에 도시한다. 도 9의 (A) 및 (B)는, 각각 화합물 B를 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액 용출 크로마토그램(280nm)이다. 도 10의 (A) 및 (B)는, 각각 화합물 B를 첨가하기 전의 pH8.0의 항체 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시한다. 도 10의 (A)에 도시된, 화합물 B를 첨가하기 전의 pH8.0의 반응액에 있어서의 질량 144237Da, 144397Da 및 144559Da의 분자종은, IgG의 당쇄의 다양성에 의해 검출되는 각각 N-G0F×2(분자종 1), N-G0F×1+N-G1F×1(분자종 2) 및 N-G1F×2(분자종 3)이다.

[0326] 도 10의 (B)에 도시하는 바와 같이, 분자종 1 내지 3이 감소하는 한편, 새롭게 질량 144544Da, 144713Da, 144864Da, 145019Da, 145179Da의 분자종이 증가하고 있었다. 질량 144544D는 분자종 1로부터 307Da의 증가이다. 질량 144713Da는 분자종 2로부터 316Da의 증가이다. 질량 144864Da는 분자종 3으로부터 305Da의 증가이고, 분자종 1로부터 627Da의 증가이다. 질량 145019Da는 분자종 2로부터 622Da의 증가이다. 질량 1445179Da는 분자종 3으로부터 620Da의 증가이다. 이들 질량의 차는 화합물 B의 반응에 의해 부가되는 아지드화 KGG의 부가분(311.33Da) 또는 그의 2배에 상당하기 때문에, 1개째의 부가에 계속되어 2개째의 부가가 일어나고 있는 것이 관찰되었다. 이상으로부터, 화합물 B는 래빗 항체에 대해서도, pH8.0 이상에서 반응하고 있는 것이 나타났다.

[0327] 실시예 6: 화합물 C의 합성

[0328] 상술한 화합물 C를 다음과 같이 합성하였다. 0.25mmol의 링크 아미드 PEG 수지(0.48mmol/g)를 사용하여, PurePep Chorus 펩티드 고상 합성기(Gyros Protein Technologies사제)로 피페리딘/NMP(1:4)에 의한 탈Fmoc와, Fmoc 보호 아미노산/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1mmol)를 반복하여 N 말단 MeDbz를 갖는 보호 펩티드 수지를 구축하였다. 그 후, 0.03mmol분을 사용하여 Fmoc-AEEA(아미노에톡시에톡시아세트산) 및 비오틴을 순차 축합하였다. 단, Fmoc-MeDbz의 축합은 Fmoc-MeDbz/HCTU/6-ClHOBt/DIEA(1mmol/1mmol/1mmol/2mmol)로, Fmoc-AEEA의 축합은 Fmoc-AEEA/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1mmol)로, 비오틴의 축합은 비오틴/DIC/Oxyma(0.5mmol/0.5mmol/0.5mmol)로

실시하였다.

[0329] 얻어진 보호 펩티드 수지(0.03mmol)에 대하여, 4-니트로페닐 클로로포메이트(0.06g)를 디클로로메탄 중 1시간 반응시켜, PMD(NO_2) 골격을 구축하였다. 얻어진 수지를 TFA 용액으로 처리하고 탈수지 및 탈보호를 행하여, 디에틸에테르로 고화하여 조펩티드(2SH체)를 130mg 얻었다. 그 후, 조펩티드(2SH체) 65mg을 아세트산/물(1:1)에 용해시켜, 빙랭 하, 0.1M의 요오드·메탄올 용액을 수 당량분 천천히 첨가하였다. 60초 후, 아스코르브산 수용액으로 반응을 퀜칭하고, 역상 HPLC 칼럼으로 정제 및 동결 건조함으로써 원하는 SS체 펩티드인 비오틴-AEEA-PMD(NO_2)-aZ34C(F1Gaba, K7R)(화합물 C)를 10mg 얻었다.

[0330] 실시예 7: 화합물 D의 합성

[0331] 상술한 화합물 D를 다음과 같이 합성하였다. 0.62mg의 화합물 B를 DMSO 10μL에 녹여, 2배 몰비의 FAM-DBCO를 0.15mg 첨가하고, 정치하였다(최종 반응물에서의 화합물 D의 농도는 10.8mM이다). 1시간 후, 고속 액체 크로마토그래피에서 화합물 B가 소실하여, 화합물 D가 생성된 것을 확인하였다. 정제하지 않고, 그대로 IgG와의 반응에 사용하였다.

[0332] 실시예 8: 화합물 C의 인간 IgG에 대한 반응의 평가

[0333] [인간 IgG와의 반응]

[0334] 화합물 C와 항체(토실리주맙)를 4개의 pH 조건 하에서 반응시켰다. 즉, 20mg/ml의 IgG 용액 20μL에, 0.5M 아세트산 완충액(pH5.5), 0.5M 인산 완충액(pH7.0), 0.5M 헤페스 완충액(pH8.0) 또는 0.5M 중탄산 완충액(pH8.9)을 40μL 첨가하고, 추가로 증류수 138.4μL를 첨가하였다. 마지막으로, DMSO 중에 용해한 10mM의 화합물 C를 1.56μL씩 첨가하고, 빠르게 교반 후, 전량 200μL로 하였다(최종 반응물에서의 IgG 농도는 15.6μM, 화합물 C는 5배 몰비의 78μM). 2시간 후에 샘플링하고, 최종 농도 10% 포름산으로 반응을 정지 후, 실시예 3과 마찬가지로 LC-MS에서 해석하였다.

[0335] (결과)

[0336] 화합물 C와 인간 IgG의 반응 2시간 후의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도 11 및 도 12에 도시한다. 도 11의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액의 용출 크로마토그램(280nm)이다. 2.27분의 피크가 IgG의 용출에 대응하는 피크이다. 도 12의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 pH5.5, 7.0, 8.0 및 8.9의 반응 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시한다. 도 12의 (A)에 도시된 pH5.5의 반응액에 있어서의 질량 147878Da, 148039Da 및 148201Da의 분자종은, IgG의 당쇄의 다양성에 의해 검출되는, 각각 N-G0F×2(분자종 1), N-G0F×1+N-G1F×1(분자종 2) 및 N-G1F×2(분자종 3)이다.

[0337] 도 12의 (A)에 도시된 바와 같이, pH5.5에서는 화합물 C에 의해 수식된 분자종은 관찰되지 않았다. 한편, 도 12의 (B)에 도시하는 pH7.0에서는, 분자종 1이 감소하고, 148248Da의 분자종이 증가하였다. 이 370Da의 차는, 화합물 C의 반응에 의해 부가되는 비오틴-AEEA(이하에서는 단순히 "비오틴-PEG"라고도 함)의 부가분(372.46Da)과 일치하였다.

[0338] 또한, 도 12의 (C)에 도시하는 pH8.0 및 도 12의 (D)에 도시하는 pH8.9에서는, 각각 148620Da 및 148619Da의 분자종이 증가하였다. 이들의 분자종의 질량은, 분자종 1로부터 각각 742Da 및 743Da의 증가이다. 이들 질량의 차는, 비오틴-PEG의 부가분(372.46Da)의 2배에 상당하는 점에서, 2개의 비오틴-PEG가 IgG에 부가했다고 생각되는, 또한, 분자종 2에 대해서도, pH7.0에서는 비오틴-PEG가 1개 부가했다고 보이는 148411Da의 분자종의 증가가 보이고, pH8.0 및 8.9라도, 1개 부가했다고 보이는 148409Da 및 2개 부가했다고 보여지는 148782Da의 분자종의 증가가 보이고, 1개째의 부가에 계속되어 2개째의 부가가 일어나고 있는 것이 관찰되었다. 이상으로부터, 화합물 C는 pH7.0 이상에서 인간 IgG와 반응하고 있는 것이 나타났다.

[0339] 실시예 9: 화합물 D의 인간화 IgG에 대한 반응의 평가

[0340] [IgG와의 반응]

[0341] 화합물 D와 항체(항HER2 인간화 모노클로날 항체 의약품 헤르셉틴, 트라스투주맙)를 pH8.0 또는 8.9의 조건 하에서 다음과 같이 반응시켰다. 20mg/ml의 IgG 용액 20μL에, 0.5M 헤페스 완충액(pH8.0) 또는 0.5M 중탄산 완충액(pH8.9)을 40μL 첨가하고, 추가로 증류수 138μL를 첨가하였다. 마지막으로, 화합물 D의 DMSO 용액 10.8mM을 2μL씩 첨가하고, 빠르게 교반 후, 전량 100μL로 하였다(최종 반응물에서의 IgG 농도는 13.5μM, 화합물 D는 8배 몰비의 108μM). 24시간 후에 샘플링하고, 최종 농도 5% 포름산으로 반응을 정지 후, 실시예 3

과 마찬가지로 LC-MS에서 해석하였다.

[0342] (결과)

[0343] 화합물 D와 인간화 IgG의 반응 용액의 LC-MS의 결과를 도 13 및 도 14에 도시한다. 도 13의 (A), (B) 및 (C)는 각각 화합물 D를 첨가하기 전의 항체 용액, 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.9의 용액의 용출 크로마토그램(280nm)이다. 2.23분의 피크가 IgG의 용출에 대응하는 피크이다. 도 14의 (A), (B) 및 (C)는 각각 화합물 D를 첨가하기 전의 항체 용액, 반응 24시간 후의 pH8.0의 용액 및 반응 24시간 후의 pH8.9의 용액에 있어서의 IgG의 피크를 질량 분석한 결과를 도시한다. 도 14의 (A)에 도시된, 화합물 D를 첨가하기 전의 pH8.0의 반응액에 있어서의 질량 148058Da, 148220Da 및 148381Da의 분자종은, IgG의 당쇄의 다양성에 의해 검출되는 각각 N-G0F×2(분자종 1), N-G0F×1+N-G1F×1(분자종 2) 및 N-G1F×2(분자종 3)이다.

[0344] 도 14의 (B)에 도시하는 바와 같이, pH8.0에서는 분자종 1 내지 3이 감소하는 한편, 새롭게 질량 149048Da, 149209Da, 149371Da, 150036Da, 150196Da 및 150356Da의 분자종이 증가하고 있었다. 질량 149048Da는 분자종 1로부터 990Da의 증가이다. 질량 149209Da는 분자종 2로부터 989Da의 증가이다. 질량 149371Da는 분자종 3으로부터 990Da의 증가이다. 질량 150036Da는 분자종 1로부터 1978Da의 증가이다. 질량 150196Da는 분자종 2로부터 1976Da의 증가이다. 질량 150356Da는 분자종 3으로부터 1975Da의 증가이다. 이들 질량의 차는 화합물 D의 반응에 의해 부가되는 FAM-DBCO-N3-KGG의 부가분(988.03Da) 또는 그의 2배에 상당하기 때문에, 1개째의 부가에 계속되어 2개째의 부가가 일어나고 있는 것이 관찰되었다.

[0345] 또한, pH8.9에 있어서도, 분자종 1 내지 3이 감소하는 한편, 새롭게 질량 149077Da, 149235Da, 149399Da, 150062Da, 150224Da 및 150386Da의 분자종이 증가하고 있었다. 질량 149077Da는 분자종 1로부터 1019Da의 증가이다. 질량 149235Da는 분자종 2로부터 1015Da의 증가이다. 질량 149399Da는 분자종 3으로부터 1018Da의 증가이다. 질량 150062Da는 분자종 1로부터 2004Da의 증가이다. 질량 150224Da는 분자종 2로부터 2004Da의 증가이다. 질량 150386Da는 분자종 3으로부터 2005Da의 증가이다. 이들 질량의 차는 화합물 D의 반응에 의해 부가되는 FAM-DBCO-N3-KGG의 부가분(988.03Da) 또는 그의 2배에 거의 상당하기 때문에, 1개째의 부가에 계속되어 2개째의 부가가 일어나고 있는 것이 관찰되었다. 이상으로부터, 화합물 D는 인간화 모노클로날 항체에 대하여, pH8.0 이상에서 반응하고 있는 것이 나타났다.

[0346] 시험예 2: 펩티드 맵과 질량 분석계에 의한 수식 부위의 특정

[0347] 트라스투주맙 또는 화합물 B와 반응한 트라스투주맙(50μg, 25μL의 수중)을 25μL의 0.2% Rapigest SF(Waters사제)와 혼합하였다. 2.6μL의 100mM 디티오트레이톨(DTT, 최종 농도 5mM)을 첨가한 후, 용액을 60℃에서 30분간 인큐베이트하였다. 5.8μL의 150mM 요오드아세트아미드(최종 농도 15mM)를 첨가한 후, 이 용액을 실온, 암소에서 30분간 인큐베이트하였다. 12.5μL의 0.2μg/μL 트립신을 첨가하여, 37℃에서 3.5시간 인큐베이트한 후, 7.85μL의5% TFA(최종 농도 0.5%)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 원심 분리 후, 상청을 ACQUITY UPLC H-Class FTN system(Waters사제)에 접속한 ACQUITY UPLC 펩티드 BEH130 C18 칼럼(1.7㎛, 2.1×150mm, Waters사제)에 주입하고, 펩티드 매핑을 행하였다. 용출은, 0.1% 포름산을 포함하는 2-90% 아세토니트릴 구배에서 행하고, 칼럼 오븐의 온도를 60℃로 유지하였다. 분리한 펩티드의 질량 분석은, ACQUITY UPLC H-Class FTN system(Waters사제)에 접속한 Xevo G2-XS QTof spectrometer(Waters사제)에서 행하여, 얻어진 질량 스펙트럼의 해석은 MassLynx ver.4.1 또는 UNIFI 1.9.2 소프트웨어에 의해 행하였다.

[0348] (결과)

[0349] 펩티드 맵의 결과를 도 15에 도시한다. 화합물 B와 반응한 트라스투주맙(tCAP 콘쥬게이트)의 결과 및 트라스투주맙의 결과를, 각각 상단 및 하단에 나타낸다. 각 피크의 질량을 해석한 결과, 트라스투주맙에서 보인 44.65분에 용출된 피크(T20)가 2844.45Da의 질량을 나타내고, 트라스투주맙 H쇄의 226-251 잔기에서 유래되는 T20 펩티드의 질량(2844.46Da)과 일치하였다.

표 2

[0350]

프래그먼트명	아미노산 서열
T20	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (서열 번호 154)

[0351] 한편, tCAP 콘쥬게이트의 경우에는, 44.65분에 용출된 피크가 소실하고, 50.77분에 용출되는 피크(T19-21)가 질

량 4461.17Da를 나타냈다. 이 피크는, 하기에 나타내는 바와 같이, 트라스투주맙 H쇄의 잔기 번호 222-258(Eu 넘버링으로 219-255)에서 유래되는 T19-T20-T21 펩티드의 질량에 1개의 N-아세틸아지드 Lys-Gly-Gly가 부가한 질량 4461.20에 일치하였다.

표 3

[0352]

프래그먼트명	아미노산 서열
T19-21	SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (서열 번호 155)

[0353] 이상은, N-아세틸(아지드 Lys)-Gly-Gly가, T19-T20-T21 펩티드(잔기 번호: 222-258)에 1개 부가하고 있는 것을 나타내고, 그의 부가 위치로서, Lys225, Lys249 또는 Lys251(Eu 넘버링으로 Lys222, Lys246 또는 Lys248)이 후보로서 생각되었다. 그래서, tCAP 콘쥬게이트에서 50.77분에 용출되는 피크에 대한 MS/MS의 결과를 도 16에 도시한다. 친 질량인 4461.178로부터 b계열의 질량 데이터를 따르면, Lys-Thr-His(잔기 번호: 245-247)에 대응하는 질량 피크의 차분(b6과 b3의 차분)이 검출된 점에서, Lys225에는 수식이 일어나고 있지 않은 것이 나타났다. 한편, y계열의 질량 데이터를 따르면, Lys-Pro(잔기 번호: 249-248)에 대응하는 질량 피크의 차분(y11과 y9의 차분)이 검출된 점에서, 잔기 번호 Lys249(Eu 넘버링으로 Lys246)에는 수식이 일어나고 있지 않은 것이 나타났다. 이것에 추가하여, N-아세틸(아지드 Lys)-Gly-Gly가 부가된 Lys-Pro(잔기 번호: 251-250)분의 질량 피크의 차분(y9와 y7의 차분)이 검출되었다. 이상은, tCAP 반응에 의한 주된 수식 부위는, 잔기 번호 Lys251(Eu 넘버링으로 Lys248)인 것을 강하게 나타내고 있다.

[0354] 실시예 10: 아지드화 인간 IgG 항체의 항암제 수식 및 형광제 수식

[0355] [트라스투주맙과 항암제 또는 형광제와의 반응]

[0356] 화합물 B와 트라스투주맙을 반응시켜서 조제한 아지드화 트라스투주맙과 항암제(DM1) 또는 형광제(IRDye(상표) 800CW)의 콘쥬게이트를, 클릭 반응에 의해 조제하였다. 먼저, 트라스투주맙을 항암제로 수식하기 위한 시약을 다음과 같이 조제하였다. DMSO에 용해한 100mM 머탄신(Mertansine)(MedChemExpress사제) 50μL, DMSO에 용해한 100mM 브로모아세트아미도(Bromoacetamido)-dPEG(상표) 4-아미도-DBCO(QUANTA BIODESIGN사제) 50μL 및 1M $NaHCO_3$ 용액(pH8.9) 10μL을 혼합하고, 실온에서 1시간 방치하였다. 이와 같이 하여 조제한 DBCO-PEG4-DM1 시약 용액을 DMSO에서 1mM에 희석하고, 1mM DBCO-PEG_4-DM1 시약 용액 10μL와 20μM에 조제한 아지드화 트라스투주맙의 PBS 용액 100μL를 혼합하고(몰비 5:1), 실온에서 0.5시간 방치하였다.

[0357] 트라스투주맙의 형광제 수식에서는, DMSO에 용해한 1mM IRDye(상표) 800CW DBCO 적외선 염료(Infrared Dye)(LI-COR Biosciences사제) 10μL와, 20μM에 조제한 아지드화 트라스투주맙의 PBS 용액 100μL를 혼합하고(몰비로 5:1), 실온에서 1시간 방치하였다. 각 반응액을, 샘플링하고, 최종 농도 5% 포름산으로 반응을 정지 후, 실시예 3과 마찬가지로 LC-MS에서 해석하였다.

[0358] (결과)

[0359] 아지드화 트라스투주맙의 항암제 수식 후 및 형광제 수식 후의 반응 용액의 LC-MS의 결과를, 각각 도 17 및 도 18에 도시한다. 도 17의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 트라스투주맙(미수식 항체), 화합물 B로 수식한 아지드화 트라스투주맙(아지드화 KGG 수식 항체), 항암제와 아지드화 트라스투주맙의 반응물 및 아지드화 트라스투주맙과 형광제의 반응물의 용출 크로마토그램(280nm)이다.

[0360] 도 18의 (A), (B), (C) 및 (D)는 각각 미수식 항체, 아지드화 KGG 수식 항체, 항암제와 아지드화 트라스투주맙의 반응물 및 아지드화 트라스투주맙과 형광제의 반응물에 있어서 용출된 각 항체의 질량 분석의 결과를 도시한다. 도 18의 (A)에 도시하는 바와 같이, 미수식 항체에서는, 당쇄의 다양성 때문에, 148058Da, 148220Da 및 148381Da의 3개의 질량의 분자종이 보였다. 화합물 B로 수식을 행한 결과, 도 18의 (B)에 도시하는 바와 같이, 아지드화 KGG의 1가 또는 2가에서의 부가가 일어나고, 1가로서는 148374Da, 148531Da 및 148682Da의 질량의 분자종이 생성되었다. 2가로서는 148682Da(1가의 피크와 중복), 148841Da 및 149003Da의 질량의 분자종이 생성되었다. 도 18의 (B)의 피크비로부터, 0가(미수식):1가:2가의 반응 후 생성 비율을 산출하면, 0:29:71이었다.

[0361] 아지드화 KGG 수식 항체에 몰비로 5배량의 DBCO-PEG4-DM1을 반응시킨 바, 도 18의 (C)에 도시하는 바와 같이, 1가 또는 2가로 DM1이 부가된 분자종이 생성되었다. 질량이 149672Da, 149833Da 및 149994Da의 분자종이 1가의

수식물이고, 151283Da, 151447Da 및 151609Da의 분자종이 2가의 수식물이다.

[0362] 아지드화 KGG 수식 항체에 몰비로 5배량의 IRDye(상표) 800CW DBCO 적외선 염료를 반응시킨 바, 도 18의 (D)에 도시하는 바와 같이, 1가 또는 2가로 IRDye(상표) 800CW가 부가된 분자종이 생성되었다. 질량이 149630Da, 149792Da 및 149954Da의 분자종이 1가의 수식물이고, 151202Da, 151365Da 및 151526Da의 분자종이 2가의 수식물이다.

[0363] 이와 같이, 아지드화 KGG 수식 항체를 사용하면, DBCO기의 부가된 기능성 리간드를 클릭 반응에서 항체에 부가하고, 항체의 고기능화를 용이하게 할 수 있다.

[0364] 시험예 3: 아지드화 KGG 수식 항체의 Fc 수용체와의 친화성 평가

[0365] Fc 수용체(FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa 및 FcγRIIIb)에 대한 아지드화 KGG 수식 항체의 어피니티 해석을, BIAcore 8K(Cytiva사제)를 사용하여, 25℃에서 실시하였다. CM5 센서 칩에, 항His 태그 항체(Cytiva사제)를 아민 커플링법으로, RU값으로 약 8000의 양까지 고정화하였다. 이것에, 추가로 Fc 수용체(FcgRI-His, FcgRIIaI-His, FcgRIIbI-His, FcgRIIIaI-His 또는 FcgRIIIbI-His, Sino Biological사제)를, 0.4μg/mL의 농도로 주입함으로써, RU값으로 약 100의 양까지 고정화하였다. 분석 대상물로서 1600nM으로부터 12.5nM의 농도(FcγRI의 경우에는 1600nM으로부터 0.05nM의 농도)로 PBST 완충액(PBS, 0.005% Tween20)에 용해한 합계 8종류(FcγRI의 경우에는 16농도)의 농도의 아지드화 KGG 수식 항체 또는 미수식 항체를 유속 30μL/분으로 주입하고, 센서 그램(회합 시간: 150초, 해리 시간: 250초)(FcγRI의 경우에는, 회합 시간: 120초, 해리 시간: 480초)을 얻었다. 부속의 BIA 평가 소프트웨어를 사용하여, 1:1 결합 모델에 의해 해리 상수(Kd)를 산출하였다.

[0366] 한편, 아지드화 KGG 수식 항체의 FcRn(태아성 Fc 수용체)에 대한 어피니티 해석을, BIAcore 8K(Cytiva사제)를 사용하여 25℃에서 다음과 같이 실시하였다. 아세트산나트륨 pH5.5 용액(Cytiva사제)을 사용하여 1.0μg/mL의 농도로 조제한 FcRn(Sino Biological사제)을 아민 커플링 반응용으로 활성화한 CM5 센서 칩에 주입하고, RU값으로 약 300의 양까지 고정화하였다. 분석 대상물로서 1600nM으로부터 12.5nM의 농도로 인산 완충액(50mM 인산나트륨, 150mM NaCl, pH6.0)에 용해한 합계 8종류의 농도의 아지드화 KGG 수식 항체 또는 미수식 항체를 유속 30μL/분으로 주입하고, 센서 그램(회합 시간: 120초, 해리 시간: 150초, 재생(Regeneration): 30초)을 얻었다. 부속의 BIA 평가 소프트웨어를 사용하여, 2가 결합 모델에 의해 해리 상수(Kd)를 산출하였다. 재생 용액에는 100mM TrisHCl, 0.2M NaCl, pH8.0을 사용하였다.

[0367] (결과)

[0368] 아지드화 KGG 수식 항체와 미수식 항체에 대해서, Fc 수용체와의 친화성을 평가한 결과를 이하의 표에 나타낸다. FcγRIIb를 제외하고, 아지드화 KGG 수식 항체와 미수식 항체의 Fc 수용체에 대한 친화성에는 큰 차이는 보이지 않았다. 이것은, 화합물 B를 사용한 수식이, IgG 항체의 이펙터 기능에 중요한 Fc 수용체와의 결합에는, 거의 영향을 주지 않고, 콘쥬게이트 기술로서 유용한 것을 나타내고 있다.

표 4

[0369]

수용체	미수식 항체에 대한 Kd (nM)	아지드화 KGG 수식 항체에 대한 Kd (nM)
FcγRI	5.3	6.6
FcγRIIa	100	88
FcγRIIb	270	2000
FcγRIIIa	66	65
FcγRIIIb	4000	3200
FcRn	570	250

[0370] 상술한 실시 형태는, 본 발명을 설명하기 위한 것이고, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 즉, 본 발명의 범위는, 실시 형태가 아닌, 특허 청구 범위에 의해 나타난다. 그리고, 특허 청구 범위 내 및 그것과 동등한 발명의 의의의 범위 내에서 실시되는 다양한 변형이, 본 발명의 범위 내로 간주된다.

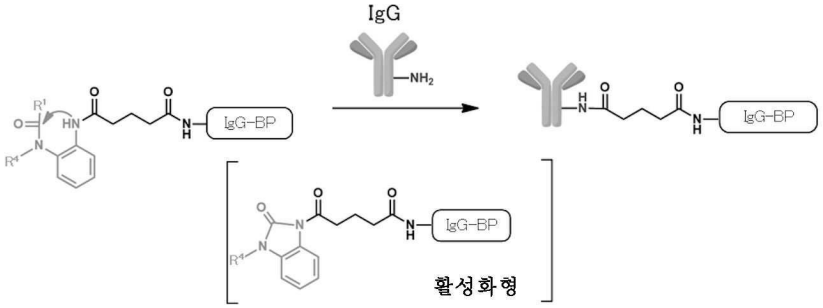
[0371] 본 출원은, 2021년 9월 8일에 출원된, 일본 특허 출원2021-146504호에 기초한다. 본 명세서 중에 일본 특허 출원2021-146504호의 명세서, 특허 청구 범위, 도면 전체를 참조로서 도입하는 것으로 한다.

산업상 이용가능성

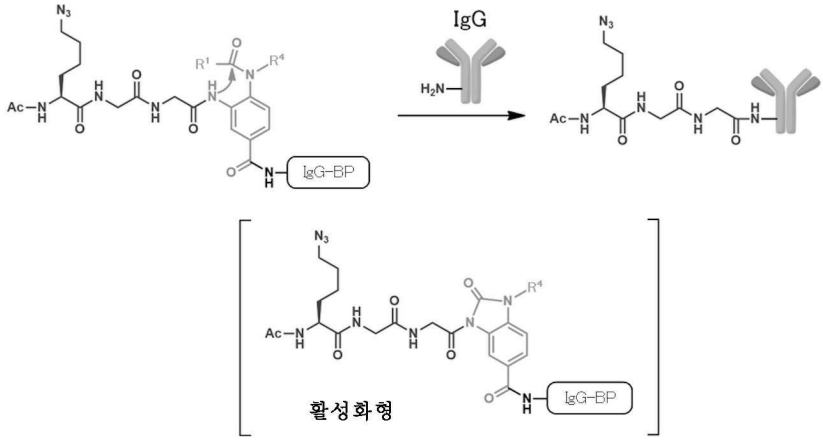
[0372] 본 발명은 수식 항체의 제조, 항체를 포함하는 복합체의 제조 및 연구용 시약에 유용하다.

도면

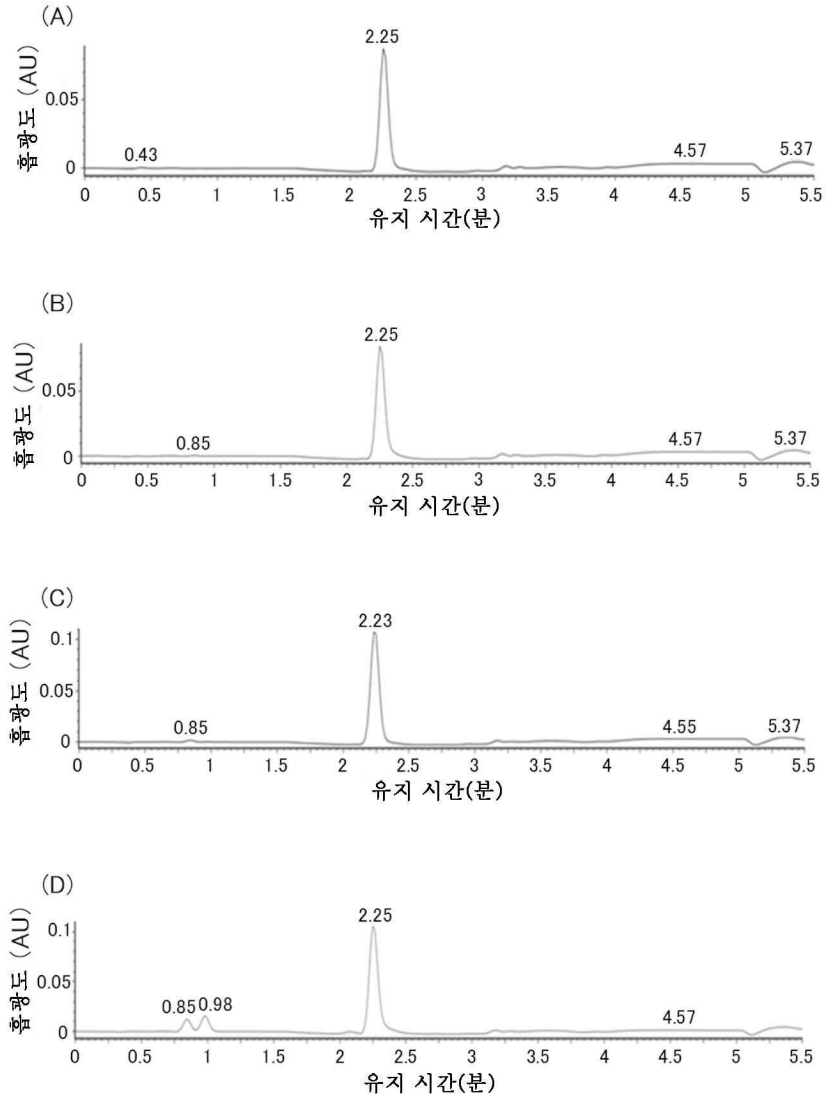
도면1



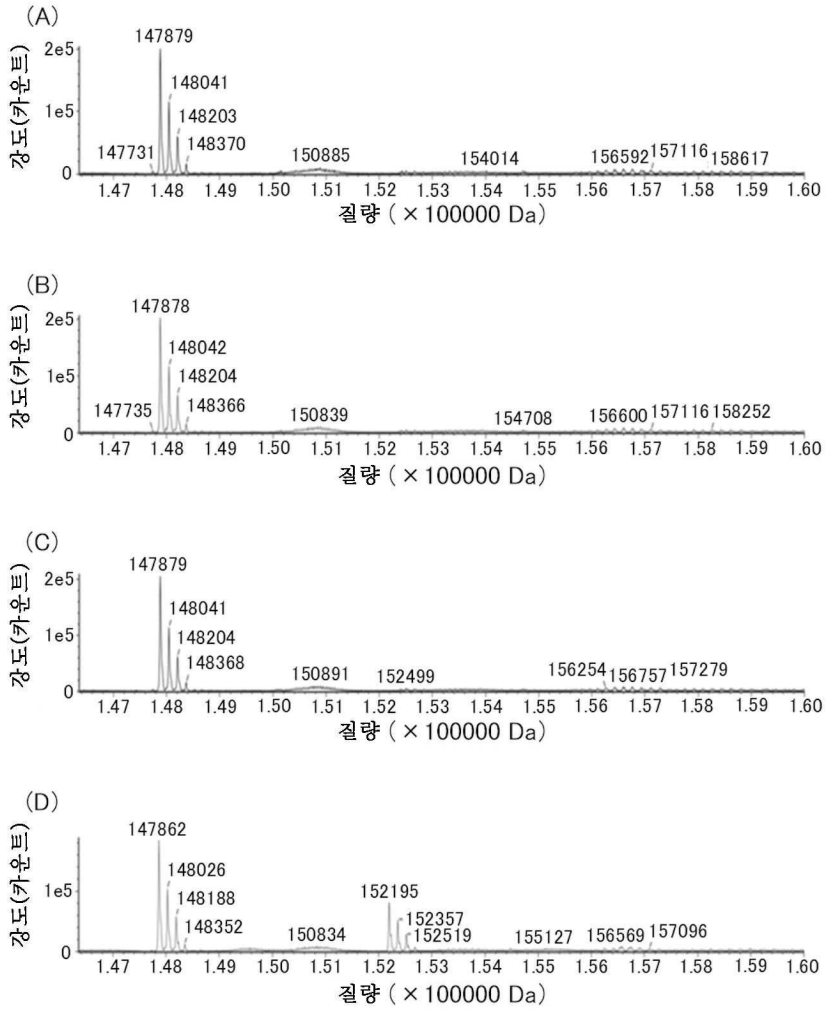
도면2



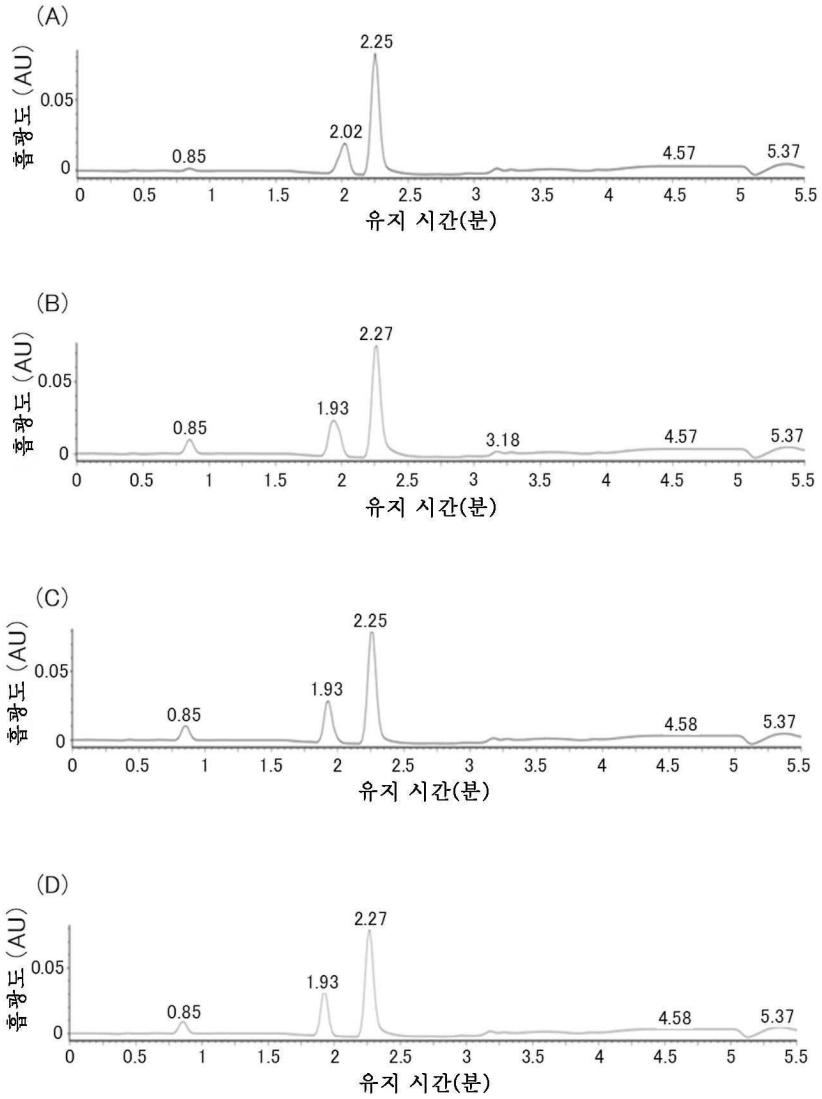
도면3


(A)
흡광도 (AU)
0.05
0
0.43
2.25
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(B)
흡광도 (AU)
0.05
0
0.85
2.25
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(C)
흡광도 (AU)
0.1
0.05
0
0.85
2.23
4.55
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(D)
흡광도 (AU)
0.1
0.05
0
0.85
0.98
2.25
4.57
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)

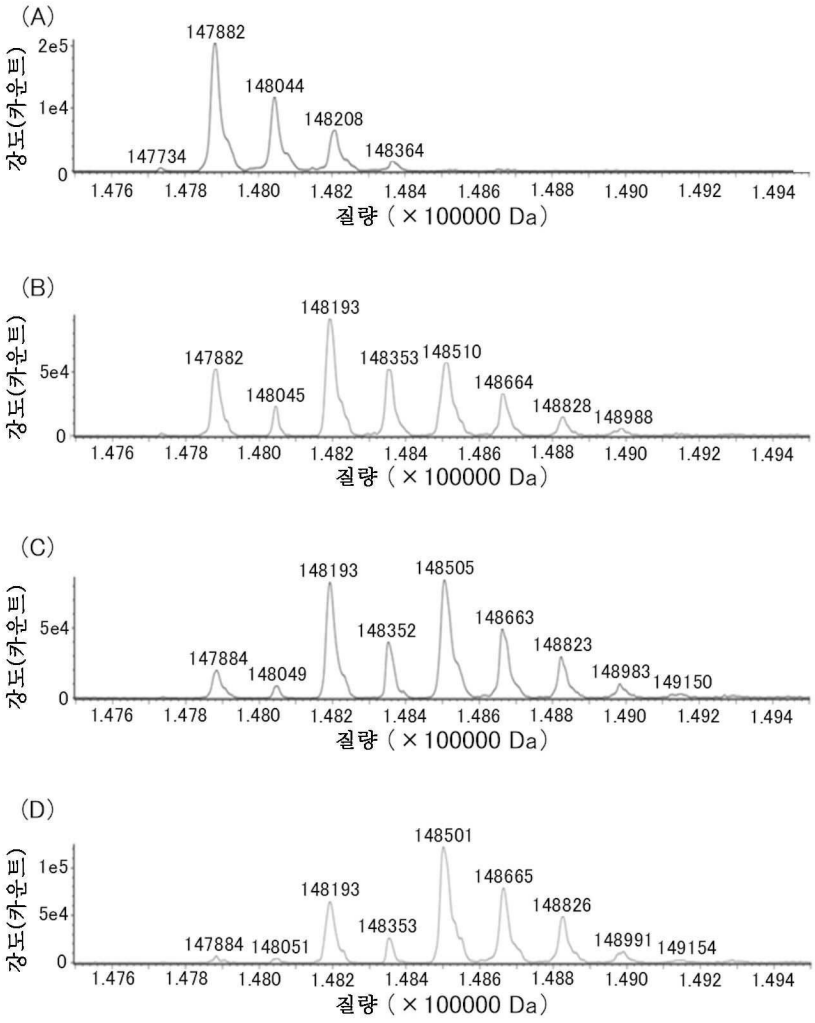
도면4


(A)
강도(카운트)
2e5
1e5
0
147879
148041
148203
148370
147731
150885
154014
156592
157116
158617
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
질량 (× 100000 Da)
(B)
강도(카운트)
2e5
1e5
0
147878
148042
148204
148366
147735
150839
154708
156600
157116
158252
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
질량 (× 100000 Da)
(C)
강도(카운트)
2e5
1e5
0
147879
148041
148204
148368
150891
152499
156254
156757
157279
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
질량 (× 100000 Da)
(D)
강도(카운트)
1e5
0
147862
148026
148188
148352
150834
152195
152357
152519
155127
156569
157096
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
질량 (× 100000 Da)

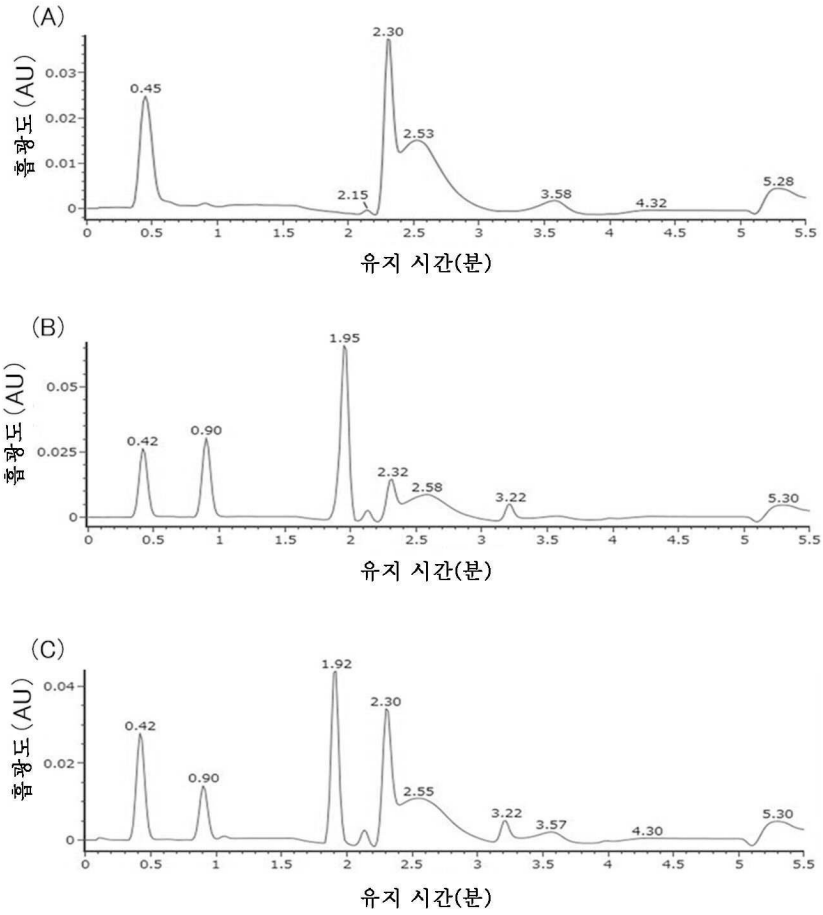
도면5


(A)
흡광도 (AU)
0.05
0
0.85
2.02
2.25
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(B)
흡광도 (AU)
0.05
0
0.85
1.93
2.27
3.18
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(C)
흡광도 (AU)
0.05
0
0.85
1.93
2.25
4.58
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(D)
흡광도 (AU)
0.05
0
0.85
1.93
2.27
4.58
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)

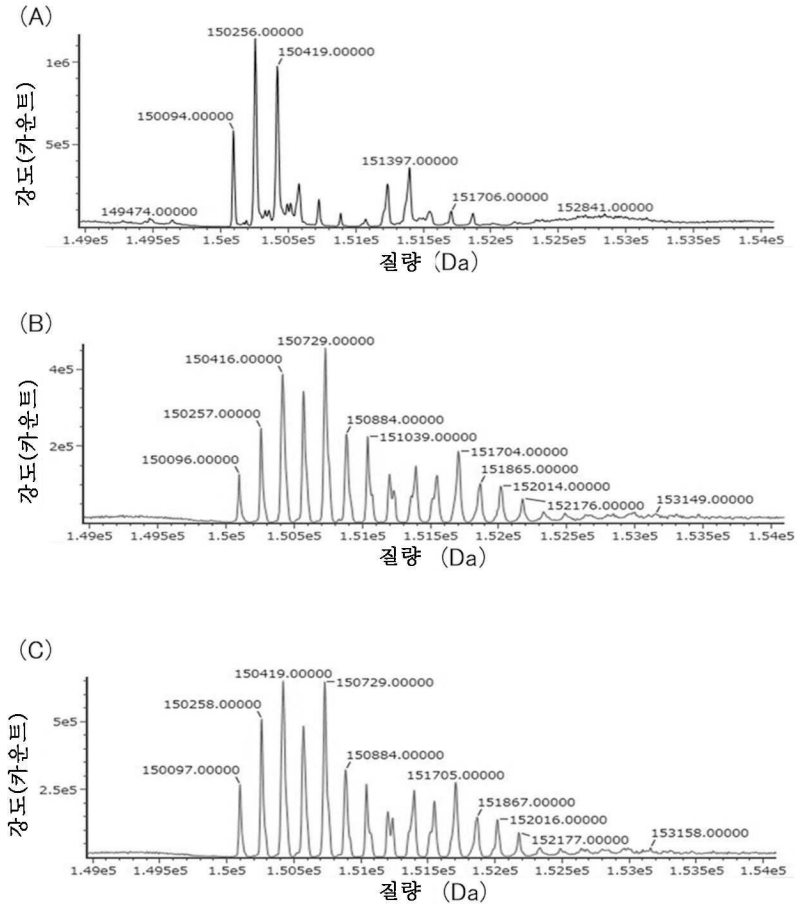
도면6


(A)
강도(카운트)
2e5
1e4
0
147882
148044
148208
148364
147734
1.476 1.478 1.480 1.482 1.484 1.486 1.488 1.490 1.492 1.494
질량 (×100000 Da)
(B)
강도(카운트)
5e4
0
148193
147882
148353
148510
148664
148045
148828
148988
1.476 1.478 1.480 1.482 1.484 1.486 1.488 1.490 1.492 1.494
질량 (×100000 Da)
(C)
강도(카운트)
5e4
0
148193
148505
148663
148352
148823
147884
148049
148983
149150
1.476 1.478 1.480 1.482 1.484 1.486 1.488 1.490 1.492 1.494
질량 (×100000 Da)
(D)
강도(카운트)
1e5
5e4
0
148501
148665
148193
148826
148353
147884
148051
148991
149154
1.476 1.478 1.480 1.482 1.484 1.486 1.488 1.490 1.492 1.494
질량 (×100000 Da)

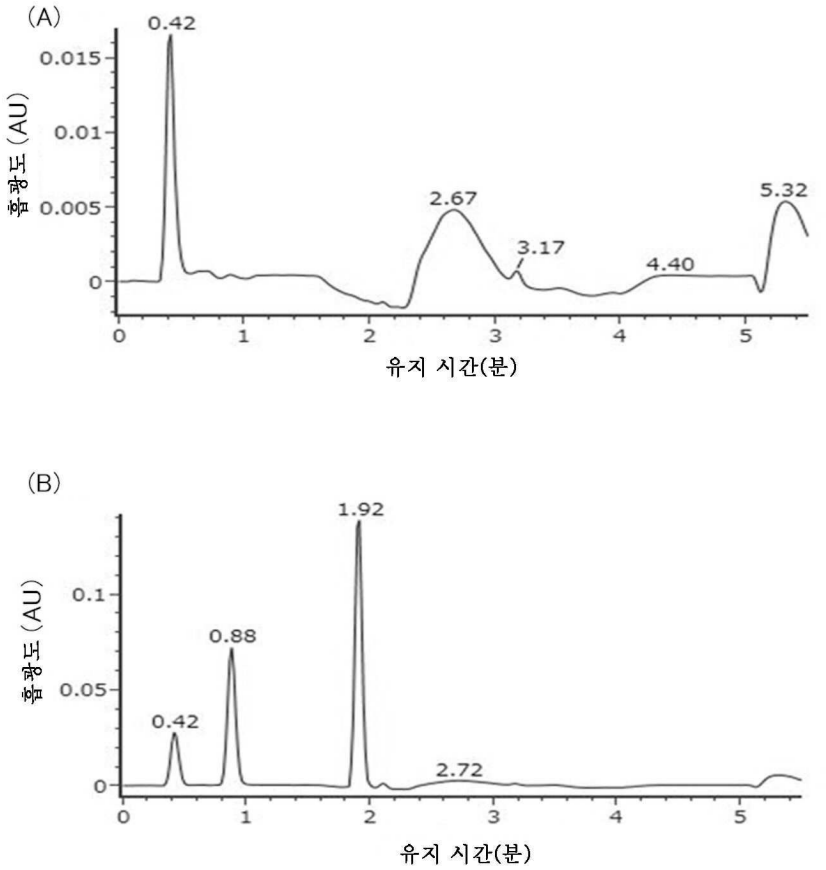
도면7


(A)
흡광도 (AU)
0.45
2.15
2.30
2.53
3.58
4.32
5.28
유지 시간(분)
(B)
흡광도 (AU)
0.42
0.90
1.95
2.32
2.58
3.22
5.30
유지 시간(분)
(C)
흡광도 (AU)
0.42
0.90
1.92
2.30
2.55
3.22
3.57
4.30
5.30
유지 시간(분)

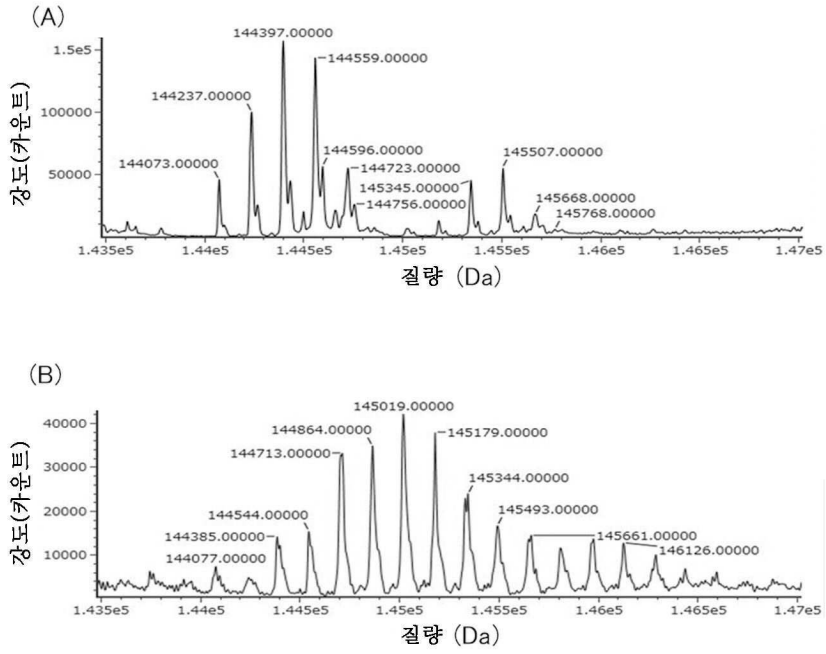
도면8


(A)
150256.00000
150419.00000
150094.00000
151397.00000
151706.00000
152841.00000
149474.00000
1e6
5e5
강도(카운트)
1.49e5 1.495e5 1.5e5 1.505e5 1.51e5 1.515e5 1.52e5 1.525e5 1.53e5 1.535e5 1.54e5
질량 (Da)
(B)
150729.00000
150416.00000
150257.00000
150884.00000
151039.00000
151704.00000
150096.00000
151865.00000
152014.00000
152176.00000
153149.00000
4e5
2e5
강도(카운트)
1.49e5 1.495e5 1.5e5 1.505e5 1.51e5 1.515e5 1.52e5 1.525e5 1.53e5 1.535e5 1.54e5
질량 (Da)
(C)
150419.00000
150729.00000
150258.00000
150884.00000
150097.00000
151705.00000
151867.00000
152016.00000
152177.00000
153158.00000
5e5
2.5e5
강도(카운트)
1.49e5 1.495e5 1.5e5 1.505e5 1.51e5 1.515e5 1.52e5 1.525e5 1.53e5 1.535e5 1.54e5
질량 (Da)

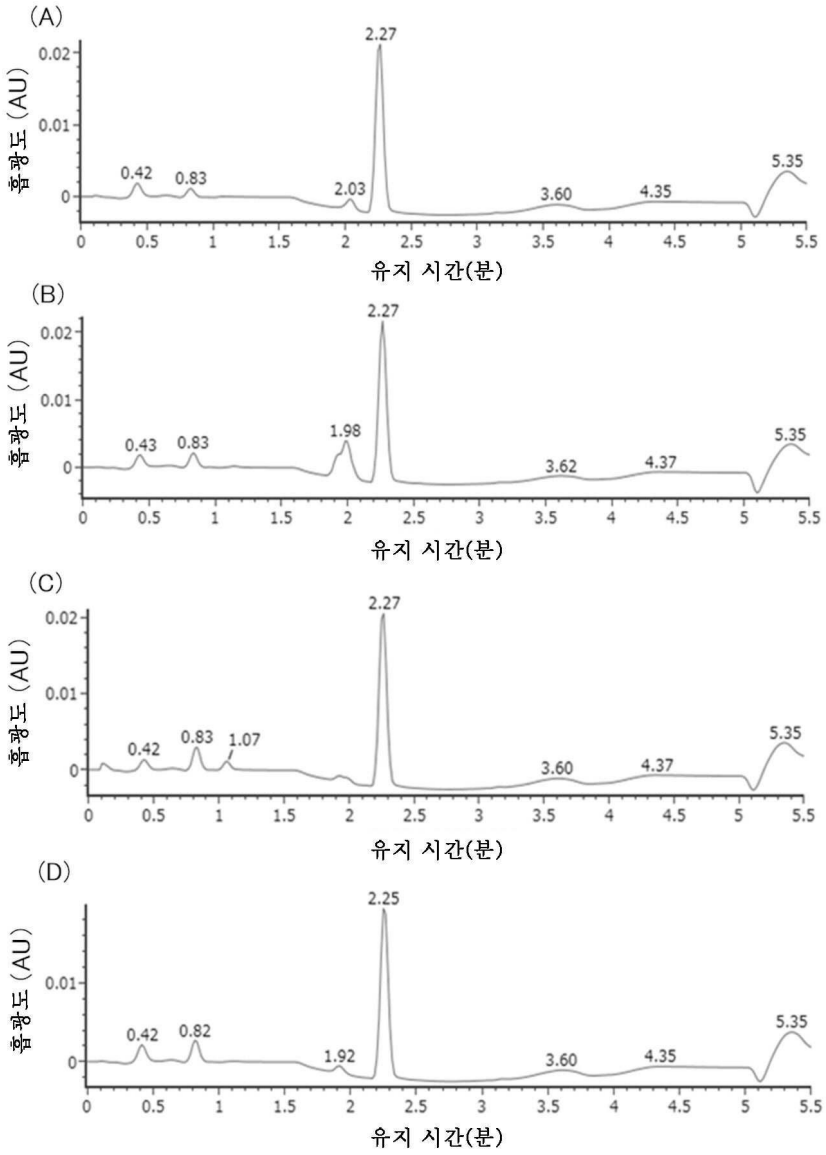
도면9


(A)
0.42
2.67
3.17
4.40
5.32
흡광도 (AU)
유지 시간(분)
(B)
1.92
0.88
0.42
2.72
흡광도 (AU)
유지 시간(분)

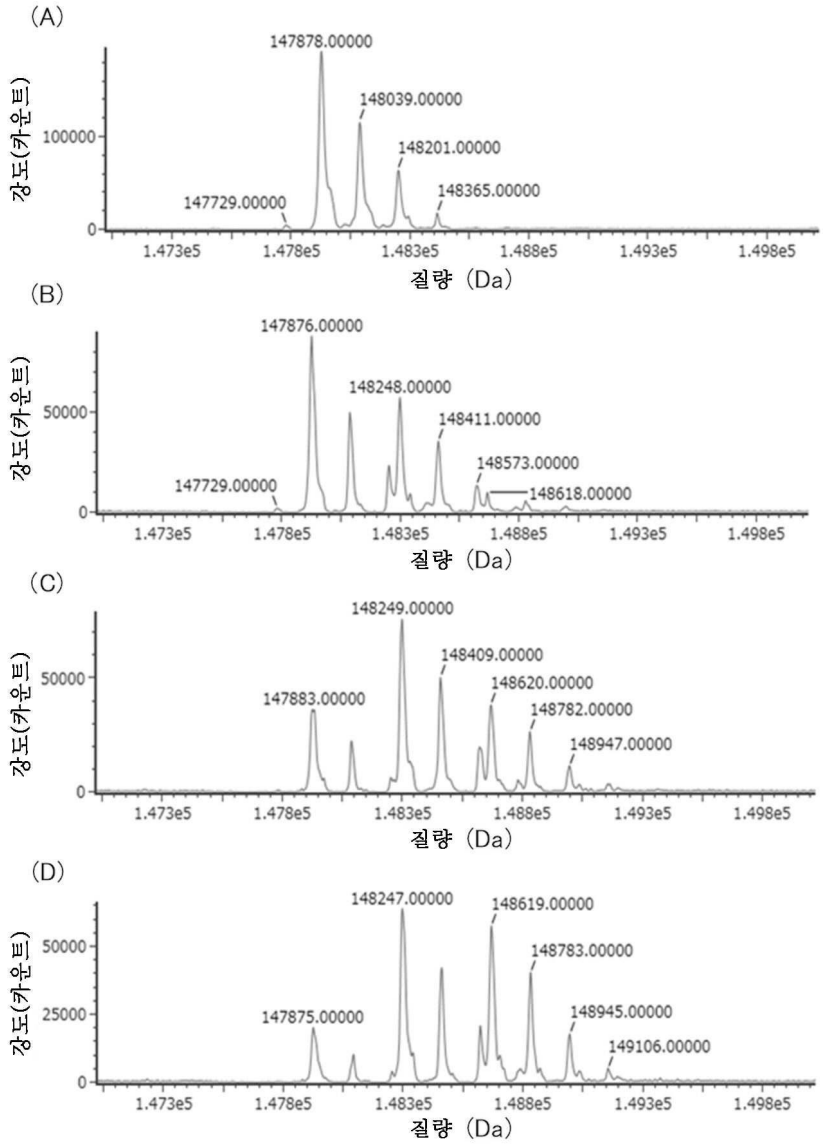
도면10


(A)
144397.00000
144559.00000
144237.00000
144596.00000
144073.00000
144723.00000
145345.00000
144756.00000
145507.00000
145668.00000
145768.00000
강도(카운트)
질량 (Da)
(B)
145019.00000
144864.00000
145179.00000
144713.00000
145344.00000
145493.00000
144544.00000
145661.00000
144385.00000
146126.00000
144077.00000
강도(카운트)
질량 (Da)

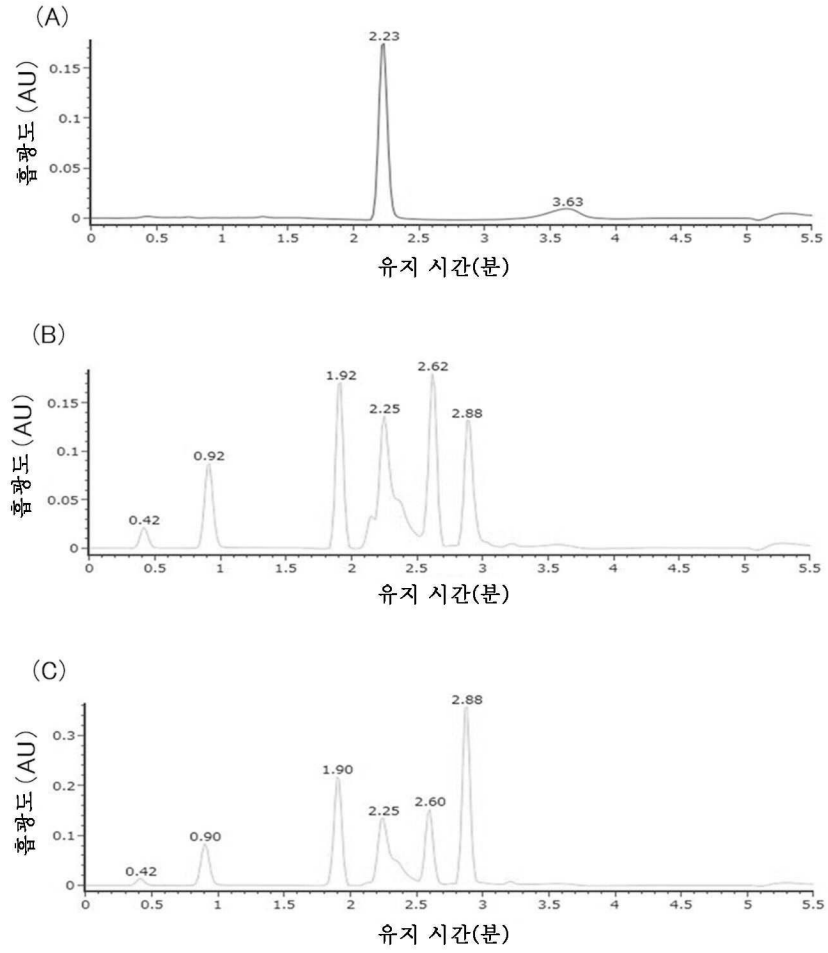
도면11


(A)
흡광도 (AU)
0.02
0.01
0
0.42
0.83
2.03
2.27
3.60
4.35
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(B)
흡광도 (AU)
0.02
0.01
0
0.43
0.83
1.98
2.27
3.62
4.37
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(C)
흡광도 (AU)
0.02
0.01
0
0.42
0.83
1.07
2.27
3.60
4.37
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)
(D)
흡광도 (AU)
0.01
0
0.42
0.82
1.92
2.25
3.60
4.35
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
유지 시간(분)

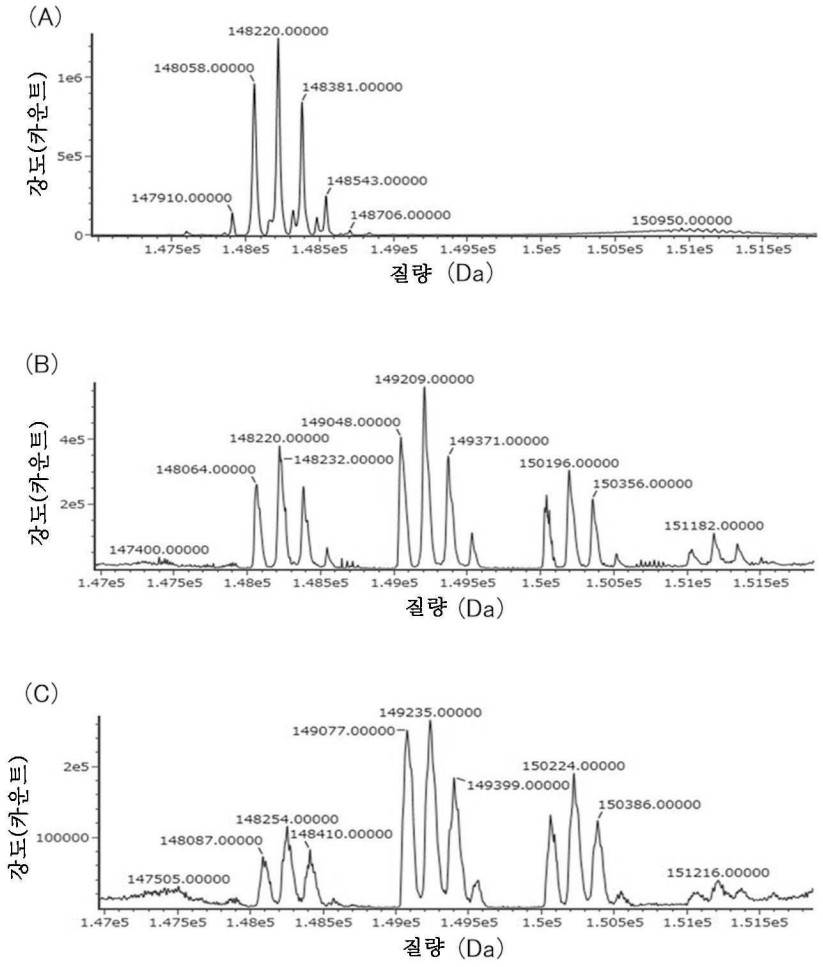
도면12


(A)
147878.00000
148039.00000
148201.00000
148365.00000
147729.00000
강도(카운트)
100000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
질량 (Da)
(B)
147876.00000
148248.00000
148411.00000
148573.00000
148618.00000
147729.00000
강도(카운트)
50000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
질량 (Da)
(C)
148249.00000
148409.00000
148620.00000
148782.00000
148947.00000
147883.00000
강도(카운트)
50000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
질량 (Da)
(D)
148247.00000
148619.00000
148783.00000
148945.00000
149106.00000
147875.00000
강도(카운트)
50000
25000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
질량 (Da)

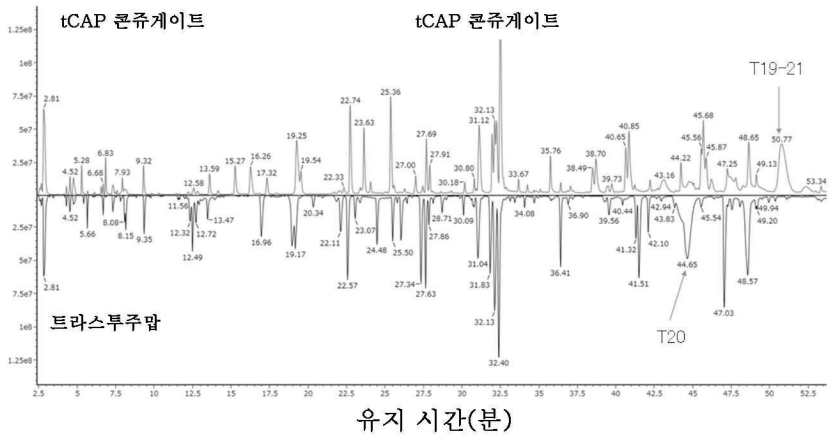
도면13


(A)
흡광도 (AU)
2.23
3.63
유지 시간(분)
(B)
흡광도 (AU)
0.42
0.92
1.92
2.25
2.62
2.88
유지 시간(분)
(C)
흡광도 (AU)
0.42
0.90
1.90
2.25
2.60
2.88
유지 시간(분)

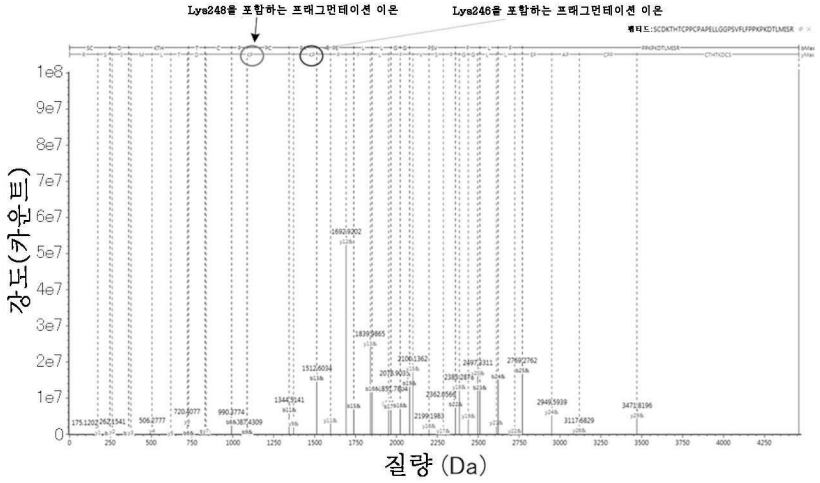
도면14


(A)
148220.00000
148058.00000
148381.00000
148543.00000
147910.00000
148706.00000
150950.00000
강도(카운트)
질량 (Da)
(B)
149209.00000
149048.00000
148220.00000
148232.00000
149371.00000
148064.00000
150196.00000
150356.00000
151182.00000
147400.00000
강도(카운트)
질량 (Da)
(C)
149235.00000
149077.00000
150224.00000
149399.00000
150386.00000
148254.00000
148410.00000
148087.00000
151216.00000
147505.00000
강도(카운트)
질량 (Da)

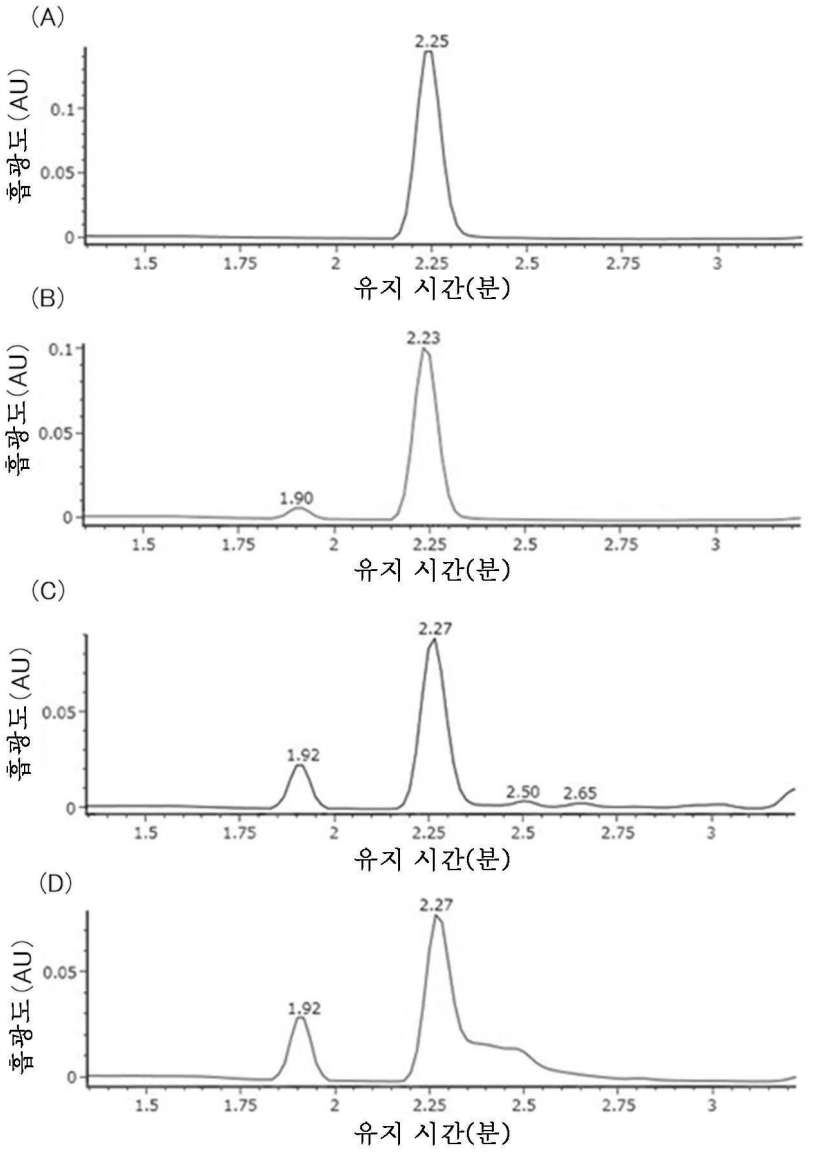
도면15


tCAP 콘쥬게이트
tCAP 콘쥬게이트
T19-21
트라스투주맙
T20
유지 시간(분)

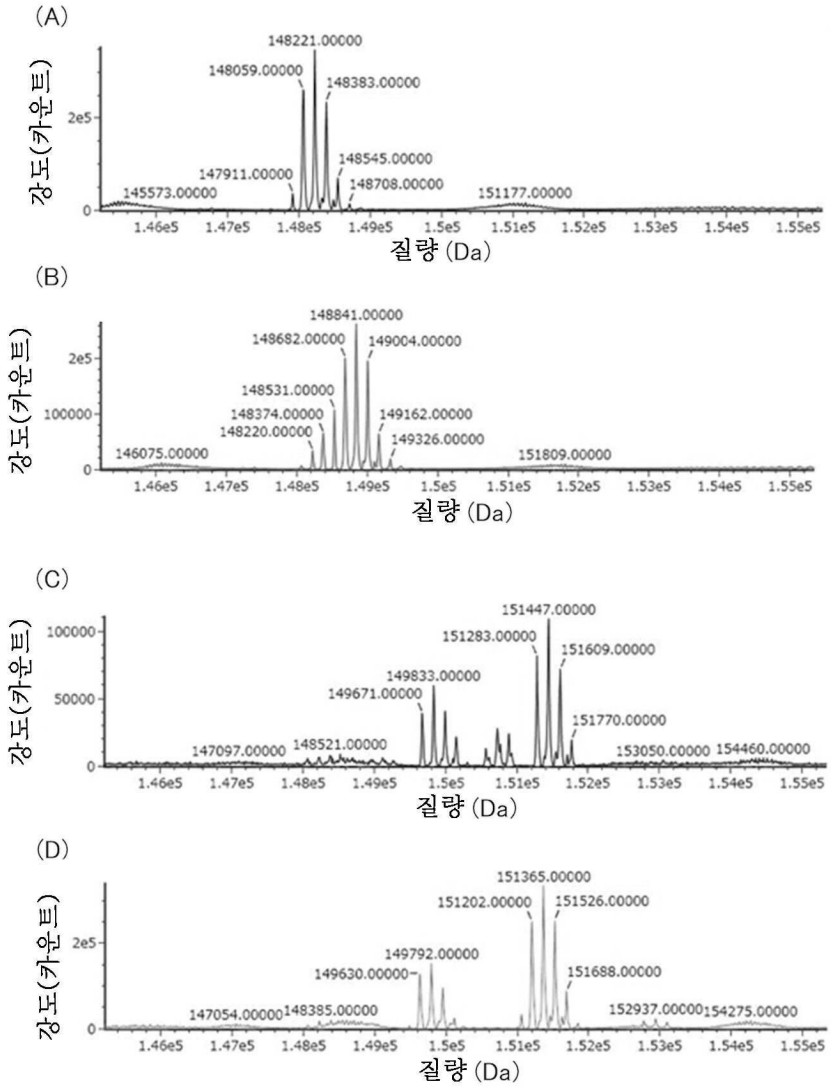
도면16


Lys248을 포함하는 프래그먼테이션 이온
Lys248을 포함하는 프래그먼테이션 이온
강도(카운트)
질량 (Da)

도면17


(A)
흡광도 (AU)
2.25
유지 시간(분)
(B)
흡광도 (AU)
2.23
1.90
유지 시간(분)
(C)
흡광도 (AU)
2.27
1.92
2.50
2.65
유지 시간(분)
(D)
흡광도 (AU)
2.27
1.92
유지 시간(분)

도면18


(A)
148221.00000
148059.00000
148383.00000
148545.00000
147911.00000
148708.00000
145573.00000
151177.00000
강도(카운트)
2e5
0
1.46e5 1.47e5 1.48e5 1.49e5 1.5e5 1.51e5 1.52e5 1.53e5 1.54e5 1.55e5
질량 (Da)
(B)
148841.00000
149682.00000
149004.00000
148531.00000
148374.00000
149162.00000
148220.00000
149326.00000
146075.00000
151809.00000
강도(카운트)
2e5
100000
0
1.46e5 1.47e5 1.48e5 1.49e5 1.5e5 1.51e5 1.52e5 1.53e5 1.54e5 1.55e5
질량 (Da)
(C)
151447.00000
151283.00000
151609.00000
149833.00000
149671.00000
151770.00000
147097.00000
148521.00000
153050.00000
154460.00000
강도(카운트)
100000
50000
0
1.46e5 1.47e5 1.48e5 1.49e5 1.5e5 1.51e5 1.52e5 1.53e5 1.54e5 1.55e5
질량 (Da)
(D)
151365.00000
151202.00000
151526.00000
149792.00000
149630.00000
151688.00000
147054.00000
148385.00000
152937.00000
154275.00000
강도(카운트)
2e5
0
1.46e5 1.47e5 1.48e5 1.49e5 1.5e5 1.51e5 1.52e5 1.53e5 1.54e5 1.55e5
질량 (Da)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.