



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0002594
(43) 공개일자 2014년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7001288
(22) 출원일자(국제) 2011년06월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/IN2011/000426
(87) 국제공개번호 WO 2011/161699
국제공개일자 2011년12월29일
(30) 우선권주장
1805/CHE/2010 2010년06월25일 인도(IN)
61/381,593 2010년09월10일 미국(US)

(71) 출원인
오리진 디스커버리 테크놀로지스 리미티드
인도 방갈로르 560 100 호수르 로드 페이스 II 일렉트로닉 시티 케이아이에이디비 인더스트리얼 에 이리어 39-40
(72) 발명자
사시쿠마르, 팻테일, 고빈단, 나이크
인도 방갈로어 560 100 일렉트로닉 시티 포스트 아난드 나가르 페이스 II 데칸 팜즈 # 3
라마찬드라, 무랄리다라
인도 방갈로어 560 103 벨란두르 포스트 아우터 링 로우드 아다르쉬 팜 리트리트 V173
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정진상

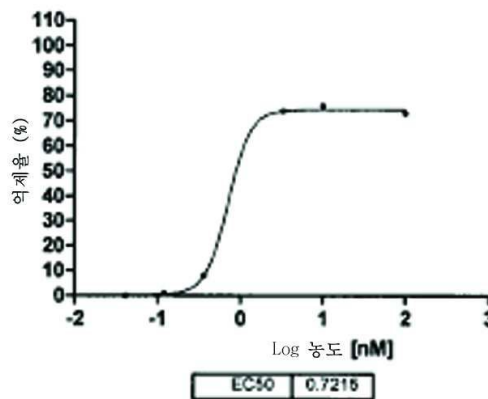
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 면역억제 조절 화합물

(57) 요약

본 발명은 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제할 수 있는 면역억제 화합물을 제공한다. 본 발명은 또한 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2에 의한 면역억제 신호전달의 억제에 의해 야기된 면역강화를 통해 감염을 치료하고 암을 치료하기 위한 펩티드계 조성물; 이들을 이용한 치료; 및 활성성분으로서 포함된 면역강화 기질을 제공한다. 또한, 본 발명은 암, 암 전이, 면역결핍증, 감염 질환 등을 위한 예방 및/또는 치료제에 대한 펩티드 부분을 함유하는 조성물의 이용; 이러한 질병에 대한 시험 또는 진단 시약 또는 연구 시약으로서 펩티드 부분의 이용을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

바들라마니, 수레쉬, 쿠마르

인도 방갈로어 560 100 일렉트로닉 시티 포스트 고
빈다쉬티 팔리야 쿠팔루 라주 셰티 빌딩 B6

베풀라, 코테스와라, 라오

인도 방갈로어 560 100 일렉트로닉 시티 페이즈 II
프라브하카르 레디 빌딩 #34/2B

사티얌, 리나, 카레

인도 방갈로어 560 095 코라망갈라 제6 블록 제6
G-크로스 아크샤야 #584

수바라오, 크리쉬나프라사드

인도 방갈로어 560 094 산제이 나가르 AECS 레이아
웃 파리말라 # 157

슈리말리, 라지브, 케이.

인도 히데라바드 500 072 A.P. 쿠크아트팔리 KPHB IV
레인트리 파크 아파트먼트 말레이지안 타운쉽 플랫
101 블록 # 33

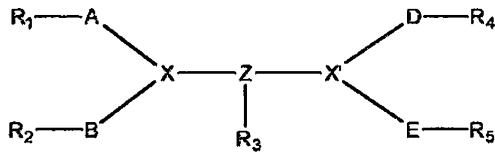
칸데푸, 스리니바스

인도 히데라바드 500 084 콘다푸르 하이테크 시티
화이트 필즈 블록-1A SMR 비네이 아크로폴리스 플
랫. 204호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식(I)을 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염:



(I)

상기 식에서,

화합물은 적어도 5개의 아미노산을 포함하고,

A는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프, BC 루프, C-C' 루프, C 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 A가 존재하지 않고;

B는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, C 스트랜드, D 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 B가 존재하지 않고;

Z는 하기 (i), (ii) 또는 (iii)으로 나타내지고;

(i) 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, G 스트랜드, C 스트랜드, F 스트랜드, C' 스트랜드, C" 스트랜드, C"-D 루프, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드 또는 D 스트랜드 내지 DE 루프로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1 내지 4의 펩티드 서열;

(ii) G-L-Z'

G는 3개의 아미노산으로부터 D-스트랜드의 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 존재하지 않고;

L은 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-$, 및 PEG 2-20 KD로부터 선택되고;

'n'은 2~10의 정수이고; 그리고

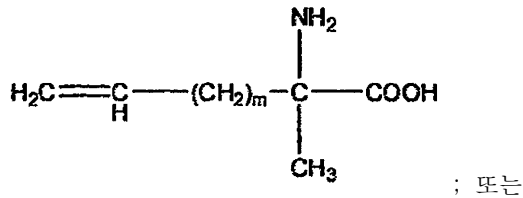
Z'는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프 및 G-스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~3의 펩티드 서열이거나; 또는

(iii) 3개의 아미노산으로부터, D-스트랜드, FG 루프 및 G 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열되고, 펩티드 서열의 2 이상의 아미노산이 서로 조합되어 2개의 단편 사이 또는 단편들 내에서 락탐 결합을 형성하는 1~4의 펩티드 서열;

D는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 2 이하의 펩티드 서열이거나 존재하지 않고;

E는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, G 스트랜드, FG 루프 내지 G 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 4 이하의 펩티드 서열이거나 존재하지 않고;

X 및 X'는 리신, 오르니틴, 디아미노프로피온산, 디아미노부티르산, 또는 부가적인 리신과 임의로 연결되는 하기 화학식의 올레핀성 아미노산으로부터 독립적으로 선택되고:



X 및 X'는 서로 조합되어 부가적인 리신과 임의로 연결되는 올레핀성 아미노산을 갖는 고리를 형성하거나; 또는

X 및 X' 중 하나 또는 모두는 존재하지 않고;

'm'은 1~6의 정수이고;

R₁은 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD 부분으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 존재하지 않고;

R₂ 및 R₃는 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 존재하지 않거나 또는 R_a-L'이고;

R_a는 비오틴 및 말레이미도 프로피온산으로부터 선택되고;

L'는 링커 -CO(CH₂)_n-NH-, -CO(CH₂-CH₂-O-)_nNH 및 -COCH₂(-OCH₂-CH₂)_nNH-로부터 선택되고; 그리고

'n'은 2~10의 정수이고;

R₄ 및 R₅는 독립적으로 NH₂이거나, 또는 R₄ 및 R₅ 중 하나 또는 모두가 존재하지 않고;

단, 상기 화학식(I)의 화합물에서,

- a) 5~25%의 아미노산은 다른 천연 또는 인조 아미노산으로 치환될 수 있고;
- b) 30% 이하의 아미노산은 생략될 수 있고;
- c) 상기 각 펩티드 서열에서 2 이하의 아미노산이 어떠한 위치에서도 개별적으로 부가될 수 있고;
- d) 5~25%의 펩티드 결합은 환원된 아마이드 결합(-CH₂NH-)으로 대체될 수 있고;
- e) 100% 이하의 아미노산은 D-아미노산일 수 있고;
- f) 100% 이하의 아미노산은 역순으로 될 수 있다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 포유동물 PD1 엑토도메인 단편이 인간, 손쥐(murine), 개, 말 또는 쥐 PD1인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 하기와 같이 정의되는 것을 특징으로 하는 화학식(I)의 화합물:

A는 하기 표에서 나타난 바와 같이 3개의 아미노산으로부터, FG 루프, BC 루프, C-C' 루프, C 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 A가 존재하지 않고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESF	SNWSEDL
C 스트랜드	VLNMYRM	MLNWNRL
C-C' 루프	SPSNQ	SPSNQ
C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프	EPED	PCNG
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNQTDKLAAP	SPSNQTEKQAAPC
FG 루프	LAPKA	LHPKA

B는 하기 표에서 나타난 바와 같이 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, C 스트랜드, D 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 B가 존재하지 않고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESF	SNWSEDL
C 스트랜드	VLNWYRM	MLNWNRL
C' 스트랜드 내지 C'-C* 루프	FPED	FCNG
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNQTDKLAAFP	SPSNQTEKQAAPC
D 스트랜드	FRVTQ	FQIIQ
FG 루프	LAPKA	LHPKA

Z는 하기 (i), (ii) 또는 (iii)으로 나타내지고;

(i) 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, G 스트랜드, C 스트랜드, F 스트랜드, C' 스트랜드, C" 스트랜드, C"-D 루프, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드 또는 D 스트랜드 내지 DE 루프로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~4의 펩티드 서열;

(ii) G-L-Z'

G는 3개의 아미노산으로부터 D-스트랜드의 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 존재하지 않고;

L은 $-CO(CH_2)_n-NH-$, 및 PEG 2-20 KD로부터 선택되고;

'n'은 2~10의 정수이고; 및

Z'는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프 및 G-스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~3의 펩티드 서열이거나; 또는

(iii) 3개의 아미노산으로부터, D-스트랜드, FG 루프 및 G 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열되고, 펩티드 서열의 2 이상의 아미노산이 서로 조합되어 2개의 단편 사이 또는 단편들 내에서 락탐 결합을 형성하는 1~4의 펩티드 서열;

여기서 상기 단편들은 하기 표에 정의한 바와 같고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESF	SNWSEDL
C 스트랜드	VLNWYRM	MLNWNRL
C' 스트랜드	TDKLAAFP	TEKQAAPC
C' 스트랜드 내지 C'-C* 루프	FPED	FCNG
C' 스트랜드 내지 C* 스트랜드	TDKLAAFPEDRSQP	TEKQAAPFCNGLSQP
C" 스트랜드	RSQP	LSQP
C"-D 루프	QDQCR	VQDAR
D 스트랜드	FRVTQ	FQIIQ
F 스트랜드	GYLCSAIS	GYLCSAIS
FG 루프	LAPKA	LHPKA
G 스트랜드	QIKE	KIEE
D 스트랜드 내지 DE 루프	FRVTQLPNGR	FQIIQLPNRH

D는 하기 표에 나타낸 바와 같이 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 2 이하의 펩티드 서열이거나, 또는 존재하지 않고;

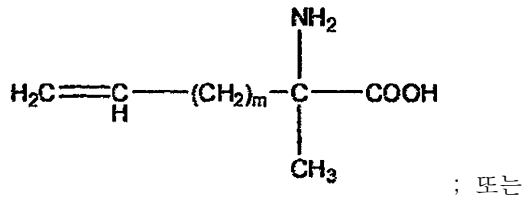
	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESF	SNWSEDL
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNQTDKLAAFP	SPSNQTEKQAAPC
FG 루프	LAPKA	LHPKA

E는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, C'-C' 루프 내지 C' 스트랜드, G 스트랜드, FG 루프

프 내지 G 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 4 이하의 펩티드 서열이거나, 또는 존재하지 않고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SVTSESF	SNWSEDL
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNQTDKLAAP	SPSNQTEKQAAFC
D 스트랜드	FRVTO	FQIIQ
EG 루프	LAPKA	LHPKA
G 스트랜드	QIKE	KIEE
EG 루프 내지 G 스트랜드	LAPKAQIKE	LHPKAKIEE

X 및 X'는 리신, 오르니틴, 디아미노프로피온산, 디아미노부티르산 또는 부가적인 리신과 임의로 연결되는 하기 화학식의 올레핀성 아미노산으로부터 독립적으로 선택되고:



X 및 X'는 서로 조합되어 부가적인 리신과 임의로 연결되는 올레핀성 아미노산을 갖는 고리를 형성하거나; 또는

X 및 X' 중 하나 또는 모두는 존재하지 않고;

'm'은 1~6의 정수이고;

R₁은 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD 부분으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 존재하지 않고;

R₂ 및 R₃는 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 존재하지 않거나 또는 R₃-L'이고;

R₃는 비오틴 및 말레이미도 프로피온산으로부터 선택되고;

L'는 링커 -CO(CH₂)_n-NH-, -CO(CH₂-CH₂-O-)_nNH 또는 -COCH₂(-OCH₂-CH₂)_nNH-로부터 선택되고; 그리고

'n'은 2~10의 정수이고;

R₄ 및 R₅는 독립적으로 NH₂이거나, 또는 R₄ 및 R₅ 중 하나 또는 모두가 존재하지 않고;

단, 화학식(I)의 화합물에서,

- 5~25%의 아미노산은 다른 천연 또는 인조 아미노산으로 치환될 수 있고;
- 30% 이하의 아미노산은 생략될 수 있고;
- 상기 각 펩티드 서열에서 2 이하의 아미노산이 어떠한 위치에서도 개별적으로 부가될 수 있고;
- 5~25%의 펩티드 결합은 환원된 아마이드 결합(-CH₂NH-)으로 대체될 수 있고;
- 100% 이하의 아미노산은 D-아미노산일 수 있고;
- 100% 이하의 아미노산은 역순으로 될 수 있다.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 하나에 있어서, Z가 하나의 상기 펩티드 서열로 이루어지고, A, B, D 및 E 중 적어도 하나가 존재하지 않는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 하나에 있어서, A, B, D 및 E가 존재하지 않는 경우, Z가 2~4의 상기 펩티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 하나에 있어서, Z가 D 스트랜드, FG 루프 및 G 스트랜드의 조합인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 하나에 있어서, X가 리신이고, X'가 존재하지 않는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8

제 1항 내지 제 6항 중 어느 하나에 있어서, X 및 X'가 모두 리신인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 하나에 있어서, R_2 및 R_3 가 C_2-C_{20} 아실로부터 선택되거나, 또는 R_a-L' 이고, 여기서,

R_a 가 말레이미도 프로피온산이고;

L' 가 $-COCH_2(-OCH_2-CH_2)_nNH-$ 이고;

'n'가 2~10의 정수인 것을 특징으로 하는 화합물.

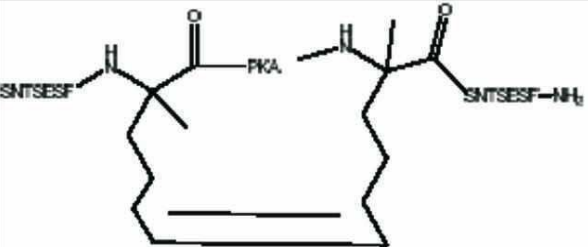
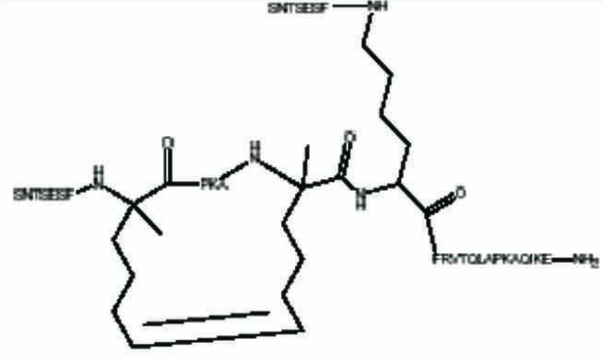
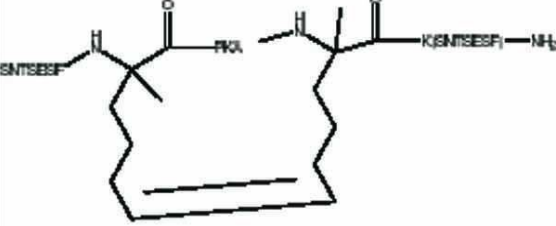
청구항 10

제 1항 내지 제 6항 중 어느 하나에 있어서, X', D, E 및 R_5 가 존재하지 않고, R_4 가 NH_2 인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 11

하기 표에 열거한 화합물들로부터 선택된 화합물:

화합물 번호	화합물	서열 ID
1.	SNTSESF-NH ₂	42.
2.	CH ₃ CO-SNTSESF-NH ₂	43.
3.	SNQTDKLAAFPEDSQPGQD-NH ₂	44.
4.	EDRSQPGQDCR-NH ₂	45.
5.	OGAISLAPKAQIKE-NH ₂	46.
6.	FRVTQK(SNTSESF)FRVTQAhxLAPKAQIKE-NH ₂	47.
7.	FRVTQK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	48.
8.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	49.
9.	SNQTDK(SNQTDK)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	50.
10.	SNQTDK(SNQTDK)VLNWYRM LAPKAQIKE-NH ₂	51.
11.	SNTSESFK(SNQTDK)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	52.
12.	SNTSESFK(SNQTDK)FRVTQK(LAP)AQIKE-NH ₂	53.
13.	sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqike-NH ₂ 모든 D-아미노산	54.
14.	EKIQAkPAYWNLVK(KDTQNS)DTQNS	55.
15.	비오딘-Ahx-SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ Ahx = 6-아미노헥사노산	56.
16.	C6 지질-SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	57.
17.	Ac-SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	58.
18.	SNTSESFK(NH ₂ -[PEG] ₁₁ -CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	59.

특합물 번호	특합물	서열 ID
19.	SNTSESFK(SNTSESF)-NH-[PEG] ₁₁ -CO-)LAPKAQIKE-NH ₂	60.
20.	SNTSESFK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ 분기 내의 지질	61.
21.	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESFK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ 분기 및 N-말단 모두에서의 지질	62.
22.		63.
23.		64.
24.		65.

화합물 번호	화합물	서열 ID
25.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAQIKE-NH ₂	66.
26.	SNTSESFFRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	67.
27.	SNTSESFKFRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	68.
28.	SNTSESFKSNTSESFFRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	69.
29.	SNTSESFK(SNTSESF)-NH ₂	70.
30.	SNTSESFK(SNTSESF)LAPKAQIKE-NH ₂	71.
31.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQKAQIKE-NH ₂	72.
32.	SNTSESFK(SNTSESF)KAQIKE-NH ₂	73.
33.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)E-NH ₂	74.
34.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)AQIKE-NH ₂	75.
35.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQK(LAP)KAQIKE-NH ₂	76.
36.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAK(PKA)QIKE-NH ₂	77.
37.	SNTSESFK(LAP)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	78.
38.	LAPK(LAP)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	79.
39.	LAPKAQIKE-NH ₂	80.
40.	SNTSESFK(SNTSESF)FK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)VTQLAPKAQIKE-NH ₂ Lys 로 치환된 D 스트랜드 내의 Arg	81.
41.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAP-NH ₂	82.
42.	SNTSESFFRVTQK(SNTSESF)LAPKAQIKE-NH ₂	83.
43.	FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	84.

특수물 번호	특수물	서열 ID
44.	SNTSESFK(SNTSESF)FK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)VTQLAPKAQIKE-NH ₂ Lys 로 치환된 D 스트랜드 내의 Arg	85.
45.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)AQIKE-NH ₂	86.
46.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)E	87.
47.	SNTSESFK(sntsesf)FRVTQLAPKAQIKE 분기 내의 D-아미노산	88.
48.	EKIQAQKALQTVRFK(FSESTNS)FSESTNS-NH ₂	89.
49.	ekiqakpalqtvrfk(fsestns)fsestns-NH ₂ Retro inverso (모든 D-아미노산)	90.
50.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(PEG-20KD)E-NH ₂	91.
51.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(PEG-20KD)E-NH ₂	92.
52.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(PEG 20 KD)AQIKE-NH ₂	93.
53.	SNTSESFK(SNTSESF)FK(mini PEG)VTQLAPKAQIKE-NH ₂ Lys 로 치환된 D 스트랜드 내의 Arg	94.
54.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(PEG 10KD)AQIKE-NH ₂	95.
55.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(PEG20KD)E-NH ₂	96.
56.	SNTSESFK(SNTSESF)FK(CH ₃ CO)VTQLAPKAQIKE-NH ₂	97.
57.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(CH ₃ CO)AQIKE-NH ₂	98.
58.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ CO)E-NH ₂	99.
59.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CO)AQIKE-NH ₂	100.

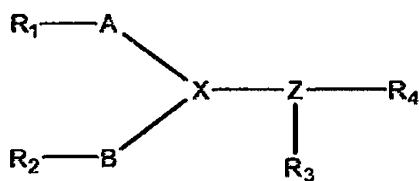
특합물 번호	특합물	서열 ID
60.	비오틴-Ahx-sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqiKE-NH2 모든 D 아미노산	101.
61.	비오틴-Ahx-EKIQA KPAYWN LVK(KDTQNS)DTQNS-NH2	102.
62.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPE*AAIK*E-NH2 아스테리스크(*) 아미노산 사이에 형성된 락탐 결합	103.
63.	SNTSESFK(SNTSESF)FK*VTQE*APKAQIKE-NH2 아스테리스크(*) 아미노산 사이에 형성된 락탐 결합	104.
64.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTE*LAPK*AAIK 아스테리스크(*) 아미노산 사이에 형성된 락탐 결합	105.
65.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₂ (CH ₂) ₆ CO)E	106.
66.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₂ (CH ₂) ₁₀ CO)E	107.
67.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₂ (CH ₂) ₁₀ CO)E at Lys	108.
68.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₂ (CH ₂) ₆ CO)E	109.
69.	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPKAQIEE-NH2	110.
70.	EDK(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	111.
71.	SNTSESFK(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	112.
72.	LAPKAK(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	113.
73.	SNQTD K(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	114.
74.	SNQTD K(SNQTD K)GIYLC GAISLAPKAQIKE-NH2	115.
75.	SNQTD K(VLNWYRM)GIYLC GAISLAPKAQIKE-NH2	116.
76.	EDK(VLNWYRM)GIYLC GAISLAPKAQIKE-NH2	117.
77.	SNTSESFK(SNTSESF)GIYLC GAISLAPKAQIKE-NH2	118.
78.	SNTSESFK(SNTSESF)VLNWYRMLAPKAQIKE-NH2	119.

특합물 번호	특합물	서열 ID
79.	VLNWYRMK(SNQTDK)GIYLC GAISLAPKAQIKE-NH2	120.
80.	GIYLC GAISLAPKAQIKE-NH2	121.
81.	SNQTDKK(SNQTDK)FRVTQ LAPKAQIKE-NH2	122.
82.	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPK(CH ₂ (CH ₂) ₄ CO)AKIEE-NH2	123.
83.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(MPA-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)AQIKE-NH2	124.
84.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	125.
85.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	126.
86.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	127.
87.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(MPA-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)E-NH2	128.
88.	SΨ[CH ₂ NH]NTSESFK(SΨ[CH ₂ NH]NTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	129.
89.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2 N-말단에서의 D-Asn	130.
90.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2 분기 내에서의 D-Asn	131.
91.	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPK(MPA-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)AKIEE-NH2	132.
92.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE	133.
93.	SΨ[CH ₂ NH]NTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	134.
94.	SNTSESFK(SΨ[CH ₂ NH]NTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	135.
95.	SNΨ[CH ₂ NH]TSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	136.
96.	SNTSESFK(SNΨ[CH ₂ NH]TSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	137.
97.	SNΨ[CH ₂ NH]TSESFK(SNΨ[CH ₂ NH]TSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	138.

화합물 번호	화합물	서열 ID
98.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)AQIKE	139.
99.	SNTSESF-Orn-(SNTSESF)KAQIKE-NH ₂	140.
100.	SNTSESF-Dap-(SNTSESF)KAQIKE-NH ₂	141.
101.	SNTSESF-Dab-(SNTSESF)KAQIKE-NH ₂	142.
102.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK*IAQE*KE-NH ₂ 아스테리스크(*) 아미노산 사이에 형성된 락탐 결합	143.
103.	SNTSESFK(SNTSESF)K*RVTE*LAPKAQIKE-NH ₂ 아스테리스크(*) 아미노산 사이에 형성된 락탐 결합	144.
104.	SNTSESFK(SNTSESF)FRK*QLE*PKAQIKE-NH ₂ 아스테리스크(*) 아미노산 사이에 형성된 락탐 결합	145.
105.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVE*QLAK*PAQIKE-NH ₂ 아스테리스크(*) 아미노산 사이에 형성된 락탐 결합	146.
106.	LAPKA-NH ₂	147.
107.	LAPKA(SNQTDK)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	148.

청구항 12

제 3항에 있어서, 하기 화학식(Ia)을 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염:



(Ia)

상기 식에서,

A는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프, BC 루프, C' 스트랜드, C-C' 루프, C' 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 A가 존재하지 않고;

B는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, C 스트랜드, D 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, B가 존재하지 않고;

Z는 3개의 아미노산으로부터, D 스트랜드, FG 루프, G 스트랜드, C 스트랜드 및 F 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~3의 펩티드 서열이고; 그리고

X는 리신이다.

청구항 13

제 12항에 있어서, A 및 B가 독립적으로 3개의 아미노산으로부터 상기 BC 루프의 전체 길이까지의 아미노산 서

열인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 14

제 13항에 있어서, A 및 B가 독립적으로 상기 BC 루프의 전체 길이인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 15

제 12항에 있어서, Z가 D 스트랜드-FG 루프-G 스트랜드인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 16

제 12항에 있어서, R_1 , R_2 및 R_3 가 존재하지 않는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 17

제 12항에 있어서, R_3 가 C_{16} -아실인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 18

제 12항에 있어서, 3 이하의 아미노산이 D-아미노산인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 19

제 12항에 있어서, 모든 아미노산이 D-아미노산인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 20

제 12항에 있어서, 3 이하의 아미드 결합($-CH_2NH-$)을 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 21

약제로서 사용하기 위한, 제 1항에 따른 화학식(I)의 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염.

청구항 22

암 또는 감염 질병을 치료하기 위한 약제로서 사용하기 위한, 제 1항에 따른 화학식(I)의 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염.

청구항 23

제 1항에 따른 화학식(I)의 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염 및 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

청구항 24

환자의 면역 반응이 조절되도록 제 1항 내지 제 20항 중 어느 하나에 다른 화합물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에게서 PD-1 신호전달 경로에 의해 매개된 면역반응을 조절하는 방법.

청구항 25

세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제할 수 있는 제 1항 내지 제 20항 중 어느 하나에 따른 화합물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에게서 종양 세포의 성장 및/또는 전이를 억제하는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 종양 세포가 흑색종, 신장암, 전립선암, 유방암, 결장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 25항에 있어서, 종양 세포가 뼈암, 췌장암, 피부암, 머리 또는 목암, 피부 또는 안구 악성흑색종, 자궁암,

난소암, 직장암, 항문 부위 암, 위암, 고환암, 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 음문 암종, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비 계통의 암, 갑상샘암, 부갑상샘암, 부신 암, 연조직의 육종, 요도암, 음경암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 만성 림프성 백혈병을 포함한 만성 또는 급성 백혈병, 어린이의 고형 종양, 림프성 림프종, 방광암, 신장 또는 요관암, 신우암종, 중추 신경계(CNS)의 신생물, 일차 CNS 림프종, 중앙 혈관형성, 척추축 종양, 뇌 줄기 신경아교종, 하수체 선종, 카포시육종, 표피유사 암, 편평상피세포 암, T-세포 림프종, 석면 유발을 포함한 환경유발, 및 이들 암의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

환자의 감염 질환을 치료하도록 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제할 수 있는 제 1항 내지 제 20항 중 어느 하나에 다른 화합물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에게서 감염 질환을 치료하는 방법.

청구항 29

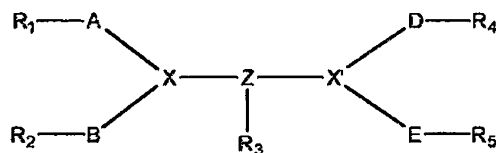
환자의 박테리아 및 바이러스 감염 질환을 치료하도록 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제할 수 있는 제 1항 내지 제 20항 중 어느 하나에 다른 화합물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에게서 박테리아 및 바이러스 감염 질환을 치료하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 본 명세서에서 참고로 하는 출원으로서 2010년 6월 25일 출원된 인도 임시 출원번호 제 1805/CHE/2010 호 및 2010년 9월 10일 출원된 미국 임시 출원번호 제 61/381,593 호의 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 하기 화학식 (I)의 신규한 펩티드 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염에 관한 것이다:



[0003]

[0004] (I)

[0005] 상기 식에서, 화합물은 세포예정사(programed cell death)1 (PD1) 신호전달 경로를 억제할 수 있는 치료제로서 유용한 적어도 5개의 아미노산을 포함한다.

[0006] 본 발명은 또한 치료제의 변형체 및 유도체에 관한 것이다.

[0007] 본 발명은 또한 상기 화학식(I)의 신규 펩티드 화합물 또는 치료제로서 약학적으로 허용되는 그의 염을 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 화합물은 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2로 인해 유발된 면역억제 신호의 억제를 포함하는 면역 강화에 유리한, 특수 질환 또는 그와 관련된 질병을 치료하는 데 유용하다.

[0009] 본 발명은 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제할 수 있는 치료제로서 신규 펩티드에 관한 것이다.

[0010] 본 발명은 또한 치료제의 변형체(modification) 및 유도체에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 또한 치료제로서 상기 신규 펩티드 및 그의 유도체를 포함하는 의약 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 또한 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2으로 인해 유발된 면역 억제 신호의 억제를 포함하는 면역 강화를 통해 질병을 치료하기 위한 상기 치료제, 변형체 및 유도체의 용도를 포함한다.

배경기술

[0013] 세포예정사(Programmed Cell Death) 1 또는 PD-1 ('PDCD1'이라고도 함)는 50 내지 55 kD 형 I 막단백

(membrane glycoprotein)이다 (Shinohara T 일행, Genomics, 1994, Vol. 23, No. 3, pp.704-706). PD-1은 특수 리간드와의 상호작용에 의해 신호전달을 하는 T 세포 항원 수용체를 네가티브 조절하는 CD28 상과(superfamily)의 수용체이고, 자가관용(self tolerance) 유지 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

- [0014] PD-1 펩티드는 자기면역, 종양 면역, 감염 면역, 이식 면역, 알레르기 및 면역학적 특성을 포함한 면역 반응의 거의 모든 양상에 관한 것이다.
- [0015] PD-1 단백질의 구조는 다음을 포함한다:
- [0016] * 다음과 연결되는 세포의 IgV 도메인
- [0017] * 경막(transmembrane) 영역 및
- [0018] * 세포내 테일(tail)
- [0019] 세포내 테일은 면역 수용체 티로신-게 억제 모티프 및 면역 수용체 티로신-게 전환 모티프에 위치한 2개의 인산화 부위를 함유하는 데, 이는 PD-1이 TCR 신호를 네가티브 조절하는 것을 나타낸다. 또한, PD-1은 CTLA-4 ((CD152 (분화무리 152)로 알려진 세포독성 T-림프구 항원 4는 면역 체계에서 중요한 조절 역할을 하는 단백질임)에 비해, PD-1은 면역 반응을 더욱 광범위하게 네가티브 조절하는 것을 암시하며 활성화된 T 세포, B 세포, 및 포식세포의 표면에 발현된다(Y. Agata 일행, *Int Immunol* 8, 765, May 1996).
- [0020] PD-1은, 2개의 리간드, PD-L1 (예정사 리간드 1 또는 PDCD1L1 또는 B7-H1) (Freeman GJ 일행, *Journal of Experimental Medicine*, 2000, Vol. 19, No. 7, pp.1027-1034) 및 PD-L2 (예정사 리간드 2 또는 PDCD1L2 또는 B7-DC) (Latchman Y 일행, *Nature Immunology*, 2001, Vol. 2, No. 3, pp.261-267)를 가지며, 이들은 B7 과(family)의 일원이다. PD-L1은 면역 세포뿐만 아니라 특정 종류의 종양 세포주 (예, 단핵구 백혈병-파생 세포주, 비만세포 종양-파생 세포주, 혈종-파생 세포주, 신경모세포종-파생 세포주, 및 각종 포유동물 유선종양-파생 세포주) 및 다양한 인간 암 조직으로부터 파생된 암 세포 (Latchman Y 일행, *Nature Immunology*, 2001, Vol. 2, No. 3, pp.261-267)에서, 그리고 IFN- γ 로 치료할 때 PA1 골수종, P815 비만세포종, 및 B16 흑색종을 포함한 거의 모든 손쥐(murine) 종양 세포주 상에서 발현되는 것으로 알려져 있다(Y. Iwai 일행, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12293, Sep 17, 2002 및 C. Blank 일행, *Cancer Res* 64, 1140, Feb, 2004). 마찬가지로 PD-L2 발현은 더욱 제한되고, 가지 세포 및 약간의 종양 세포주에 의해 주로 발현된다. PD-L2 발현은 호지킨(Hodgkin) 림프종 세포주 등에서 입증되었다. 암 또는 종양 세포의 일부는 T-세포 면역 반응을 그들 자체로 억제 또는 차단하기 위해 PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2 사이의 상호 작용으로부터 유익을 취한다는 가설이 있다(Iwai Y 일행, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2002, Vol. 99, No. 19, pp.12293-12297).
- [0021] 종양 세포 및 바이러스 (HCV 및 HIV 포함) 감염 세포는 숙주 T 세포에 의한 면역 감시를 피하기 위해서 PD-1 (면역억제 형성)에 대한 리간드를 발현하는 것으로 알려져 있다. PD-1 유전자는 전신홍반루푸스와 같은 자가면역 질환의 원인이 되는 유전자들중 하나라고 보고되었다 (Prokunina 일행, *Nature Genetics*, 2002, Vol. 32, No. 4, 666-669). PD-1-결핍 생쥐가 사구체신염 및 관절염 (Nishimura H 일행, *International Immunology*, 1998, Vol. 10, No. 10, pp.1563-1572; Nishimura H 일행, 면역, 1999, Vol. 11, No. 2, pp.141-151)과 같은 루푸스 자가면역 질환, 및 확장 심근병증 같은 질환(Nishimura H 일행, *Science*, 2001, Vol. 291, No. 5502, pp. 319-332)을 발전시키기 때문에, PD-1은 자가면역 질환의 발병, 특히 말초 자가관용의 조절인자로서 작용하는 것으로 보고되었다. 그러므로, 한 시도로서 PD-1과 그의 리간드 (PD-L1, PD-L2 또는 모두)와의 상호작용을 차단하면 특이 종양 및 바이러스 면역치료에 효과적인 방법을 제공할 수 있다.
- [0022] 우드(Wood) 일행에게 허여된 미국특허 제 6,808,710 호에서는, 네가티브 신호가 PD-1을 통해 변환되어 면역 반응을 하향 조절하도록, PD-1을 발현하는 면역 세포를 PD-1에 다가 형태로 결합(bind)하는 항체와 접촉하는 것을 포함하는 면역 반응을 하향 조절하는 방법에 대해 기재하고 있다. 이러한 항체는 PD-1에 가교된 항체이거나 또는 PD-1에 부동화된 항체일 수 있다.
- [0023] 프리먼(Freeman) 일행에게 허여된 미국특허 제 6936704 호 및 그의 분할출원 제 US 7038013 호에서는, 폴리펩티드가 제1 표면에 존재하고 그리고 T-세포 수용체를 통해 활성 신호를 전달하는 항원 또는 다클론 활성제가 제2의 상이한 표면에 존재할 때, 시험관내 T 세포 증식을 공동으로 자극하는 항-B7-4 항체, 신규 B7-4 폴리펩티드, 분리된 B7-4 단백질, 융합 단백질, 및 항원성 펩티드를 코딩하는 분리된 핵산 분자, 지정된 B7-4 핵산 분자에 대해서 기재하고 있다.

- [0024] PD-1의 면역 억제 작용, 또는 PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2 간의 상호작용, 뿐만 아니라 그의 용도를 나타내는 물질에 대한 일부 보고가 있다. PD-1 억제 항체 또는 PD-1 억제 펩티드의 구조는 국제 공개 WO 01/14557, WO 2004/004771, 및 WO 2004/056875에 보고되어 있다. 한편, PD-L1 억제 항체 또는 PD-L1 억제 펩티드는 국제 공개 WO 02/079499, WO 03/042402, WO 2002/086083, 및 WO 2001/039722에 보고되어 있다. PD-L2 억제 항체 또는 PD-L2 억제 펩티드는 국제 공개 제 WO 03/042402 호 및 제 WO 02/00730 호에 보고되어 있다.
- [0025] 국제 공개 제 WO2007005874 호에서는, 높은 친화력으로 PD-L1에 특별히 결합하는 분리된 인간 단클론 항체에 대해서 기재하고 있다. 이 공개 명세서에서는 항-PD-L1 항체를 이용하여 암을 포함한 각종 질병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0026] 미국 특허출원 제 US2009/0305950 호에서는, PD-1 또는 PD-L1의 세포의 도메인의 다합체, 특히 사합체에 대해서 기재하고 있다. 이 출원에서는 치료용 펩티드에 대해서 기재하고 있다.
- [0027] 또한, 명세서에서는, 이를테면 환자에게 공동 자극(co-stimulation)을 변경함으로써 질병을 치료하는데 펩티드가 사용될 수 있다는 것을 언급하고 있다. 분리된 B7-4 또는 PD-1 단백질, 또는 그의 일부 또는 단편(또는 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자)은, 다클론 및 단클론 항체 제조를 위한 표준 기술을 이용하여 B7-4 또는 PD-1을 결합하는 항체를 생성하기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. B7-4 또는 PD-1 단백질의 전체 길이가 사용될 수 있거나, 아니면 본 발명에서는 면역원으로서 사용하기 위한 B7-4 또는 PD-1의 항원성 펩티드 단편을 제공한다. B7-4 또는 PD-1의 항원성 펩티드는, 펩티드에 대항하여 발생된 항체는 B7-4 또는 PD-1와의 특이 면역 복합체를 형성하도록, 적어도 8의 아미노산 잔기를 갖고 B7-4 또는 PD-1의 에피토프(epitope)를 포함한다. 바람직하게는, 항원성 펩티드는 적어도 10의 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 적어도 15의 아미노산 잔기, 더 더욱 바람직하게는 적어도 아미노산 잔기, 및 가장 바람직하게는 적어도 30의 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0028] 프리먼(Freeman) 일행에게 허여된 미국특허 제 US7432059 호에서는, PD-1-매개 신호의 존재 하에서 T 세포 활성을 향상 조절하는 화합물을 확인하는 방법을 기재하고 특허청구범위로 하고 있다. 이 발명의 조성물을 이용하여 진단 및 치료하는 방법도 또한 상기 특허에 제공되어 있다.
- [0029] 또한, 프리먼(Freeman) 일행에게 허여된 미국특허 US 7,709,214에서는, PD-L2과 PD-1 사이의 상호작용을 억제하는 약품으로 면역 반응을 향상 조절하기 위한 방법을 포함하고 있다.
- [0030] 그러나 수많은 공지 기술이 존재함에도 불구하고, 치료 영역에서 대체 치료제로서 효과적인 펩티드 또는 개선된 펩티드가 부족하기 때문에, 아직까지도 크게 충족하지 못하는 의학적 수요가 존재한다. 합성 펩티드는 세포 물질, 낮은 면역원성, 개선된 효능 및 특이성을 갖고 더욱 새로운 기술, 더 좋은 순도 및 오염없이 용이한 제조와 같이 항체보다 특정한 장점을 제공하는 것으로 알려져 있다. 펩티드는 항체보다 더욱 안정하고 더 좋은 저장성을 제공할 수 있다. 더욱이, 종종 펩티드는 항체에 비해 조직 침투가 더 좋아 더 좋은 효과를 얻을 수 있다. 펩티드는 또한 낮은 독성 및 더 낮은 의약-의약 상호작용과 같이 소분자 치료제 상대방보다 분명한 장점을 제공할 수 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0031] 그러므로, 본 발명은 PD1 엑토도메인을 기본으로 하는 신규 합성 펩티드 및 그의 유도체를 제공함으로써 상술한 충족되지 않은 의학적 수요에 대한 해결책을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 HEK293 세포를 발현하는 hPDL2를 사용하여 PD-L2에 대한 PD1의 결합을 억제하기 위한 분석 시험에서 화합물 번호 8에 대한 효능을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 화합물 8로 쥐 PBMC 증식의 PDL1 매개 억제의 폐지를 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 3은 PD-1/PD-L1 경로의 상황에 있어서 쥐 PBMC 증식 시험에서 화합물 8에 대한 EC₅₀ 측정치를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 인간 PDL1의 상황에서 여러 화합물로 인간 PBMC 증식의 회복을 나타내는 막대 그래프이다.
- 도 5는 화합물 8, 13, 34 및 J43 항체의 생쥐 비세포(splenocyte) 증식 구조(rescue)율(%)을 비교한 막대 그래프

프이다.

도 6은 세포독성 T 림프구 시험에서 IFN- γ 생성에 대한 여러 시험 화합물의 효과를 나타낸 막대 그래프이다.

도 7은 피하주사된 B16F10 세포의 종양 성장 억제에 관한 화합물 8의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 정맥주사된 B16F10 세포의 폐 전이에 관한 화합물 8의 효과를 나타낸 사진이다.

도 9는 B16F10 모델에서 폐 전이에 관한 여러 화합물의 효과를 나타낸 막대 그래프이다.

도 10은 포유동물 지방 패드에 동소(orthotopically) 주사된 4T1 세포의 종양 성장 억제에 관한 화합물 번호 8의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 RENCA 세포로 동소 주사된 신장에서 종양 부담을 감소하는 펩티드의 효과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 대장균 패혈증 모델에 대한 화합물 8의 생체 내 효과를 나타낸 그래프이다.

아미노산 서열 정보:

SEQ ID NO: 1은 인간 PD-1 엑토도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 2는 인간 PD-1 엑토도메인의 A 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 3은 인간 PD-1 엑토도메인의 B 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 4는 인간 PD-1 엑토도메인의 BC 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 5는 인간 PD-1 엑토도메인의 C 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 6은 인간 PD-1 엑토도메인의 C-C' 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 7은 인간 PD-1 엑토도메인의 C' 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 8은 인간 PD-1 엑토도메인 아미노산의 C'-C" 루프의 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 9는 인간 PD-1 엑토도메인의 C" 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 10은 인간 PD-1 엑토도메인의 C"-D 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 11은 인간 PD-1 엑토도메인의 D 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 12는 인간 PD-1 엑토도메인의 D-E 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 13은 인간 PD-1 엑토도메인의 E 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 14는 인간 PD-1 엑토도메인의 F 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 15는 인간 PD-1 엑토도메인의 FG 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 16은 인간 PD-1 엑토도메인의 G 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 17은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 18은 쥐 PD-1 엑토도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 19는 개 PD-1 엑토도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 20은 말 PD-1 엑토도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 21은 인간 PD-1 엑토도메인의 C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 22는 인간 PD-1 엑토도메인의 C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 23은 인간 PD-1 엑토도메인의 C-C' 루프 내지 C' 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 24는 인간 PD-1 엑토도메인의 FG 루프 내지 G 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 25는 인간 PD-1 엑토도메인의 D 스트랜드 내지 DE 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 26은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 B 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 27은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 BC 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 28은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C-스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 29는 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C-C' 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 30은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C'-스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 31은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C" 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 32는 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C"-D-루프의 아미노산 서열을 나타낸다. #SEQ ID NO: 33은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 D-스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 34는 생쥐 PD-1 엑토도메인의 F-스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 35는 생쥐 PD-1 엑토도메인의 F-G 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 36은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 G-스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 37은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 38은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 39는 생쥐 PD-1 엑토도메인의 C-C' 루프 내지 C' 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

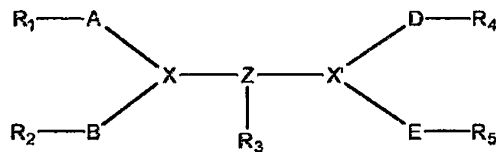
SEQ ID NO: 40은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 FG 루프 내지 G 스트랜드의 아미노산 서열을 나타낸다.

SEQ ID NO: 41은 생쥐 PD-1 엑토도메인의 D 스트랜드 내지 DE 루프의 아미노산 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명에 따라서, 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억압 및/또는 억제할 수 있는 변형된 신규 펩티드가 제공된다.

[0034] 본 발명의 요지는, 하기 화학식(I)의 구조를 갖는 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그의 염을 제공하는 것이다:



[0035]

[0036] (I)

[0037] 상기 식에서,

[0038] 화합물은 적어도 5개의 아미노산을 포함하고,

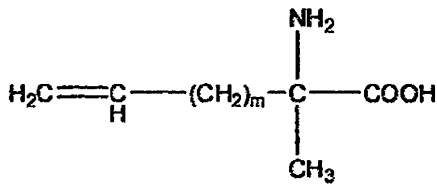
[0039] A는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프, BC 루프, C-C' 루프, C 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 A가 존재하지 않고;

[0040] B는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, C 스트랜드, D 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 B가 존재하지 않고;

[0041] Z는 하기 (i), (ii) 또는 (iii)으로 나타내지고;

[0042] (i) 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, G 스트랜드, C 스트랜드, F 스트랜드, C' 스트랜드, C" 스트랜드, C"-D 루프, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드 또는 D 스트랜드 내지 DE 루프로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1 내지 4의 펩티드 서열;

- [0043] (ii) G-L-Z'
- [0044] G는 3개의 아미노산으로부터 D-스트랜드의 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 존재하지 않고;
- [0045] L은 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-$, 및 PEG 2-20 KD로부터 선택되고;
- [0046] 'n'은 2~10의 정수이고; 그리고
- [0047] Z'는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프 및 G-스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~3의 펩티드 서열이거나; 또는
- [0048] (iii) 3개의 아미노산으로부터, D-스트랜드, FG 루프 및 G 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열되고, 펩티드 서열의 2 이상의 아미노산이 서로 조합되어 2개의 단편 사이 또는 단편들 내에서 락탐 결합을 형성하는 1~4의 펩티드 서열;
- [0049] D는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 2 이하의 펩티드 서열이거나 존재하지 않고;
- [0050] E는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, G 스트랜드, FG 루프 내지 G 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 4 이하의 펩티드 서열이거나 존재하지 않고;
- [0051] X 및 X'는 리신, 오르니틴, 디아미노프로피온산, 디아미노부티르산, 또는 부가적인 리신과 임의로 연결되는 하기 화학식의 올레핀성 아미노산으로부터 독립적으로 선택되고:



- [0052] ; 또는
- [0053] X 및 X'는 서로 조합되어 부가적인 리신과 임의로 연결되는 올레핀성 아미노산을 갖는 고리를 형성하거나; 또는
- [0054] X 및 X' 중 하나 또는 모두는 존재하지 않고;
- [0055] 'm'은 1~6의 정수이고;
- [0056] R₁은 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD 부분으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 존재하지 않고;
- [0057] R₂ 및 R₃는 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 존재하지 않거나 또는 R_a-L'이고;
- [0058] R_a는 비오틴 및 말레이미도 프로피온산으로부터 선택되고;
- [0059] L'는 링커 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-$, $-\text{CO}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n\text{NH}$ 및 $-\text{COCH}_2(-\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ 로부터 선택되고; 그리고
- [0060] 'n'은 2~10의 정수이고;
- [0061] R₄ 및 R₅는 독립적으로 NH₂이거나, 또는 R₄ 및 R₅ 중 하나 또는 모두가 존재하지 않는다.
- [0062] 단, 상기 화학식(I)의 화합물에서,
- [0063] a) 5~25%의 아미노산은 다른 천연 또는 인조 아미노산으로 치환될 수 있고;
- [0064] b) 30% 이하의 아미노산은 생략될 수 있고;
- [0065] c) 상기 각 펩티드 서열에서 2 이하의 아미노산이 어떠한 위치에서도 개별적으로 부가될 수 있고;
- [0066] d) 5~25%의 펩티드 결합은 환원된 아미드 결합($-\text{CH}_2\text{NH}-$)으로 대체될 수 있고;
- [0067] e) 100% 이하의 아미노산은 D-아미노산일 수 있고;

[0068] f) 100% 이하의 아미노산은 역순으로 될 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 요지는, 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제하는 데 유리하고, PD-1에 대한 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 감소할 수 있으며, 그 결과 PD-1에 의한 면역억제 신호전달을 형성할 수 있는, 질병 또는 질환의 치료 또는 예방에 유용한 화학식(I)의 화합물을 제공하는 것이다.

[0070] 본 명세서에서 '펩티드'란 용어는 펩티드 결합 또는 환원된 펩티드 결합에 의해 상기 서열에 결합된 천연 또는 인조 아미노산의 서열을 나타내는데 사용된다.

[0071] 본 명세서에서 '화합물'이란 용어는 본 발명에서 기술된 펩티드를 포함하는 의미이다.

[0072] 본 명세서에서 하기에 나타낸 아미노산의 일반 약어는 다음과 같다:

Gly (또는 G)-글리신	Ala (또는 A)-알라닌	Val (또는 V)-발린
Leu (또는 L)-류신	Ile (또는 I)-이소류신	Orn-오르니틴
Pro (또는 P)-프롤린	Phe (또는 F)-페닐알라닌	Trp (또는 W)-트립토판
Met (또는 M)-메티오닌	Ser (또는 S)-세린	Thr (또는 T)-트레오닌
Cys (또는 C)-시스테인	Tyr (또는 Y)-티로신	Asn (또는 N)-아스파라긴
Gln (또는 Q)-글루타민	Asp (또는 D)-아스파르트산	Glu (또는 E)-글루탐산
Lys (또는 K)-리신	Arg (또는 R)-알기닌	His (또는 H)-히스티딘
DAP-2,3-디아미노프로피온산	DAB-2,4-디아미노부티르산	

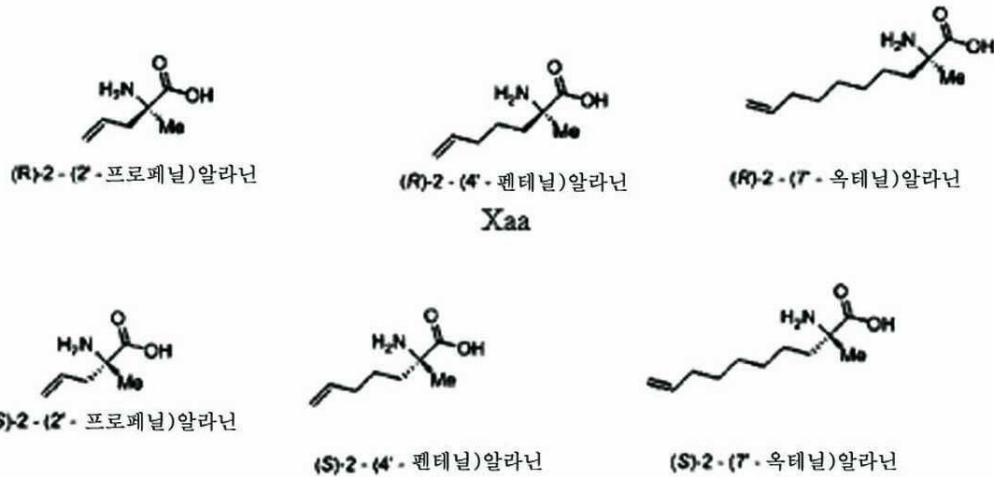
[0073]

[0074] 본 명세서에서 소문자 코드는 D-아미노산을 나타내기 위해 사용된다.

[0075] 이하 설명되는 펩티드의 변형은 어디에 관계되든지 L-아미노산의 일부 또는 모두를 D-아미노산으로 치환하고, α 아미노기 이외에서 아미노산을 결합하고, 분기 사슬에 아미노 또는 카르복시기를 포함하고, 펩티드 서열들 간에 비-펩티드 링커를 포함하고, 가교, 지질화, 스테이플링(stapling), 및 PEG화(PEGylation)를 포함하는 의미이다.

[0076] 이하 설명되는 펩티드의 변형은 어디에 관계되든지 또한 2개의 아미노산 사이에 변형된 펩티드 결합을 포함하는데, 여기서, 2개의 아미노산 사이의 통상적인 펩티드 결합 (-CONH-)은 환원된 아미드 결합 (-CH₂NH-)으로 대체된다. 종래의 확인 방법을 이용할 때, 이는 변형된 펩티드 결합을 나타내는 기호 "Ψ"를 갖는 -Ψ[CH₂NH]-으로서 특징지어진다.

[0077] 본 명세서에서, "인조 아미노산"이란 용어는 포유동물에서 자연적으로 형성되지 않거나(예를 들면, 유전자 코드에 의해 암호화되거나 또는 번역후(posttranslational) 변형으로부터 얻어짐) 또는 자연적으로 발견되지 않는 아미노산을 의미한다. 인조 아미노산은 통상적으로 단백질에 존재하지 않는 아미노산(예, D-구조를 갖는 α-아미노산, 또는 그의 (D,L)-이성질체 혼합물), 자연에 존재하는 아미노산의 동족체(예, β- 또는 γ- 아미노산 유사체), 자연적으로 존재하는 아미노산의 α, α-디-치환된 유사체, 또는 아미노산 측쇄가 디아미노프로피온산(DAP), 디아미노부티르산(DAB), 오르니틴(Orn) 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 메틸렌 기에 의해 짧아지거나; 또는 10 이하의 탄소 원자까지 길어지거나; 또는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는 올레핀기를 갖는 10 이하의 탄소 원자까지 길어지는 α-아미노산을 포함한다:



[0078]

[0079]

기타 인조 아미노산은 (S)-3-(아미노메틸)-5-메틸헥사노산 (프레가발린), 2-[1-(아미노메틸)시클로헥실]아세트산 (가바펜틴), 또는 본 명세서에서 참고로 하는 요기스와리(Yogeeswari) 일행의 "Recent Patents on CNS Drug Discovery 2006;1:113-118"에 기재된 것들과 같은 GABA 유사체인 γ -아미노산을 포함한다.

[0080]

본 발명은 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억압 및/또는 억제할 수 있는 면역억제 조절 펩티드를 제공한다.

[0081]

본 발명은 또한 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 의해 유발된 면역억제 신호의 억제에 의해 야기된 면역 강화작용을 통해 암이나 감염의 치료를 위한 펩티드를 포함하는 펩티드 및 약제 조성물의 변형체, 유도체, 그들 및 활성 성분으로서 포함된 면역-기능성 기질을 이용한 치료를 제공한다.

[0082]

인간 PD-1의 완전한 아미노산 서열은 미국 특허출원 제 5629204 호(Honjo 일행) 및 핑거(Finger)일행의 문헌(유전자, 1997, 197:177-187)에 기술되어 있다. 인간 및 생쥐 PD-1은 아미노산이 약 60%를 차지하는데 반해, 세포 외 IgV 도메인은 CD28 및 CTLA4에 대해 각각 오직 21% 및 16% 서열을 나타낸다.

[0083]

PD-1은 다중 루프 구조와 루프들 사이에 스트랜드를 갖는 엑토도메인을 포함한다. 인간 PD-1 엑토도메인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 1에 나타낸 바와 나타낸 바와 같다.

[0084]

SEQ ID NO: 1 인간 PD-1

[0085]

PPTFSPALLVVTGDNATFTCSFSNTSESFVLNWWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYLCGAISLAPKAQIK
ESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRSAGQFQTLV

[0086]

인간 PD-1 엑토도메인 서열 내의 루프 및 스트랜드 서열은 다음과 같다:

[0087]

A 스트랜드: PPTFS SEQ ID NO: 2

[0088]

B 스트랜드: ATFT CSF SEQ ID NO: 3

[0089]

BC 루프: SNTSESF SEQ ID NO: 4

[0090]

C-스트랜드: VLNWWYRM SEQ ID NO: 5

[0091]

C-C' 루프: SPS NQ SEQ ID NO: 6

[0092]

C'-스트랜드: TDKLAAFP SEQ ID NO: 7

[0093]

C'-C" 루프: ED SEQ ID NO: 8

[0094]

C" 스트랜드: RSQP SEQ ID NO: 9

[0095]

C"-D-루프: GQDCR SEQ ID NO: 10

[0096]

D-스트랜드: FRVTQ SEQ ID NO: 11

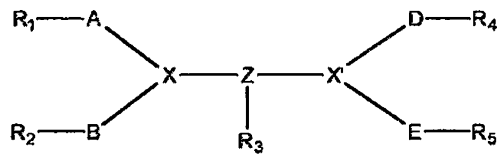
[0097]

DE 루프: LPNG R SEQ ID NO: 12

[0098]	E 스트랜드: DFHMSV	SEQ ID NO: 13
[0099]	F-스트랜드: GTYLC GAIS	SEQ ID NO: 14
[0100]	F-G 루프: LAPKA	SEQ ID NO: 15
[0101]	G-스트랜드: QIKE	SEQ ID NO: 16
[0102]	C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프: FPED	SEQ ID NO: 21
[0103]	C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드: TDKLAAPEDRSQP	SEQ ID NO: 22
[0104]	C-C' 루프 내지 C' 스트랜드: SPSNQTDKLAAFP	SEQ ID NO: 23
[0105]	FG 루프 내지 G 스트랜드: LAPKAQIKE	SEQ ID NO: 24
[0106]	D 스트랜드 내지 DE 루프: FRVTQLPNGR	SEQ ID NO: 25
[0107]	SEQ ID NO: 17 생쥐-PD-1	
[0108]	SLTFYPAWLTVSEGANATFTCSLSNWSEDLMLNWNRLSPSNQTEKQAAFCNGLSQPVQDARFQIIQLPNRHDFHNMNILDTRRNDSGIYLCGAISLHPKAKIE ESPGAELVVTERTILETSTRYPSPSPKPEGRFQGMV	
[0109]	생쥐 PD-1 엑토도메인 서열 내에서의 루프 및 스트랜드 서열은 다음과 같다:	
[0110]	B 스트랜드: ATFT CSL	SEQ ID NO: 26
[0111]	BC 루프: SNWSEDL	SEQ ID NO: 27
[0112]	C-스트랜드: MLNWNRL	SEQ ID NO: 28
[0113]	C-C' 루프: SPSNQ	SEQ ID NO: 29
[0114]	C'-스트랜드: TEKQAAFC	SEQ ID NO: 30
[0115]	C" 스트랜드: LSQP	SEQ ID NO: 31
[0116]	C"-D-루프: VQDAR	SEQ ID NO: 32
[0117]	D-스트랜드: FQIIQ	SEQ ID NO: 33
[0118]	F-스트랜드: GIYLC GAIS	SEQ ID NO: 34
[0119]	F-G 루프: LHPKA	SEQ ID NO: 35
[0120]	G-스트랜드: KIEE	SEQ ID NO: 36
[0121]	C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프: FCNG	SEQ ID NO: 37
[0122]	C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드: TEKQAAFCNGLSQP	SEQ ID NO: 38
[0123]	C'-C' 루프 내지 C' 스트랜드: SPSNQTEKQAAFC	SEQ ID NO: 39
[0124]	FG 루프 내지 G 스트랜드: LHPKAKIEE	SEQ ID NO: 40
[0125]	D 스트랜드 내지 DE 루프: FQIIQLPNRH	SEQ ID NO: 41
[0126]	EQ ID NO: 18 쥐 -PD-1	
[0127]	QLSWQSGWLLVSEGANATFTCSFSNWSEDLKLNWYRLSPSNQTEKQAAFCNGYSQPVQDARFQIVQLPNGHDFHNMNILDARRNDSGIYLCGAISLPPKAQIK ESPGAELVVTERTILETPTRYPRPSPKPEGQFQGLV	
[0128]	SEQ ID NO: 19 개 -PD-1	
[0129]	PLTFSPAQLTVQEGENATFTCSLADIPDSFVLNWYRLSPRNQTDKLAAFPQEDRIEPGRDRFRVMRLPNGRDFHMSIVAARLNDSGIYLCGAIYLPNTQIN ESPRAEISVTERTLEPTQSPSPPPRLSGQLQGLV	
[0130]	SEQ ID NO: 20 말 -PD-1	
[0131]	PLTFSPARLMVPEGANATFTCSFSNTSEHFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDSSQGRSGRFRVTRLPNGRDFHMSVLAARRNDSGIYLCGAISLPPKTQIN	

ESPRAELTVTERIPEPTEHPSPPSPAGQLQLV

- [0132] 이들 아미노산의 루프 및 스트랜드 기능(assignments)은 Lazar-Molnar 일행의 문헌(PNAS, 2008, 105, 30, 10483-10488)에 보고된 인간 및 손쥐 단백질 사이의 아미노산 서열 변이를 고려하여 상기 문헌에 보고된 손쥐 PD-1/PD-L2 복합체의 1.8-Å-분해(resolution) 구조를 기본으로 한다. Lazar-Molnar 일행은 생쥐, 인간, 쥐, 개 및 말 PD-1의 PD-1 엑토도메인의 배열이 서열 상의 화살표 세그먼트로 나타내진 생쥐 PD-1에서 표시된 β 스트랜드로 나타내진다는 것을 기술하고 있다.
- [0133] 본 발명은 또한 손쥐, 쥐, 개 또는 말 PD-1의 엑토도메인 펩티드 단편을 포함하는 화합물을 제공한다(Lazar-Molnar 일행, PNAS, 2008, 105, 30, 10483-10488).
- [0134] 그러므로, 분기된 펩티드를 포함하는 화합물에서, 1 이상의 가지는 상기 엑토도메인 부분의 펩티드 부분으로서 적어도 5개의 아미노산 잔기를 포함하는 인간 PD-1 (SEQ ID NO: 1)을 함유할 수 있다.
- [0135] 본 발명에 따른 일 실시양태에서, 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제하고 PD-1에 대한 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 감소하고 그 결과 PD-1에 의한 면역억제 신호전달을 형성할 수 있는 화합물을 제공하는데, 여기서 화합물은 35 이하, 바람직하게는 30 이하의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드 부분을 포함한다.
- [0136] 본 발명에 따른 화합물 또는 약학적으로 허용되는 그 염의 구조는 하기 화학식(I)으로 나타내진다:



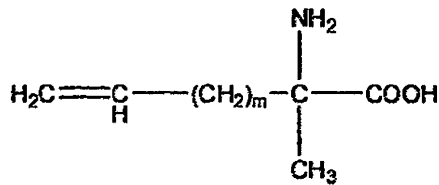
- [0137]
- [0138] (I)
- [0139] 상기 식에서,
- [0140] 화합물은 적어도 5개의 아미노산을 포함하고,
- [0141] A는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프, BC 루프, C-C' 루프, C 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C'' 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 A가 존재하지 않고;
- [0142] B는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C C' 루프 내지 C' 스트랜드, C 스트랜드, D 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C'' 루프로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 B가 존재하지 않고;
- [0143] Z는 하기 (i), (ii) 또는 (iii)으로 나타내지고;
- [0144] (i) 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, G 스트랜드, C 스트랜드, F 스트랜드, C' 스트랜드, C'' 스트랜드, C''-D 루프, C' 스트랜드 내지 C'-C'' 루프, C' 스트랜드 내지 C'' 스트랜드 또는 D 스트랜드 내지 DE 루프로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~4의 펩티드 서열;
- [0145] (ii) G-L-Z'
- [0146] G는 3개의 아미노산으로부터 D-스트랜드의 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 존재하지 않고;
- [0147] L은 $-CO(CH_2)_n-NH-$, 및 PEG 2-20 KD로부터 선택되고;
- [0148] 'n'은 2~10의 정수이고; 및
- [0149] Z'는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프 및 G-스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~3의 펩티드 서열이거나; 또는
- [0150] (iii) 3개의 아미노산으로부터, D-스트랜드, FG 루프 및 G 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열되고, 펩티드 서열의 2 이상의 아미노산이 서로 조합되어 2개의 단편 사

이 또는 단편들 내에서 락탐 결합을 형성하는 1~4의 펩티드 서열;

[0151] D는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 2 이하의 펩티드 서열이거나 존재하지 않고;

[0152] E는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, G 스트랜드, FG 루프 내지 G 스트랜드로부터 선택된 포유동물 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 4 이하의 펩티드 서열이거나 존재하지 않고;

[0153] X 및 X'는 리신, 오르니틴, 디아미노프로피온산, 디아미노부티르산, 또는 부가적인 리신과 임의로 연결되는 하기 화학식의 올레핀성 아미노산으로부터 독립적으로 선택되고:



[0154] ; 또는

[0155] X 및 X'는 서로 조합되어 부가적인 리신과 임의로 연결되는 올레핀성 아미노산을 갖는 고리를 형성하거나; 또는

[0156] X 및 X' 중 하나 또는 모두는 존재하지 않고;

[0157] 'm'은 1~6의 정수이고;

[0158] R₁은 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD 부분으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 존재하지 않고;

[0159] R₂ 및 R₃는 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 존재하지 않거나 또는 R_a-L'이고;

[0160] R_a는 비오틴 및 말레이미도 프로피온산으로부터 선택되고;

[0161] L'는 링커 -CO(CH₂)_n-NH-, -CO(CH₂-CH₂-O)_nNH 및 -COCH₂-(OCH₂-CH₂)_nNH-로부터 선택되고; 그리고

[0162] 'n'은 2~10의 정수이고;

[0163] R₄ 및 R₅는 독립적으로 NH₂이거나, 또는 R₄ 및 R₅ 중 하나 또는 모두가 존재하지 않는다.

[0164] 단, 상기 화학식(I)의 화합물에서,

[0165] a) 5~25%의 아미노산은 다른 천연 또는 인조 아미노산으로 치환될 수 있고;

[0166] b) 30% 이하의 아미노산은 생략될 수 있고;

[0167] c) 상기 각 펩티드 서열에서 2 이하의 아미노산이 어떠한 위치에서도 개별적으로 부가될 수 있고;

[0168] d) 5~25%의 펩티드 결합은 환원된 아마이드 결합(-CH₂NH-)으로 대체될 수 있고;

[0169] e) 100% 이하의 아미노산은 D-아미노산일 수 있고;

[0170] f) 100% 이하의 아미노산은 역순으로 될 수 있다.

[0171] 본 발명의 일 실시양태에 따라서, 특별히 하기와 같이 정의되는 화학식(I)의 화합물을 제공한다:

[0172] A는 하기 표에서 나타낸 바와 같이 3개의 아미노산으로부터, FG 루프, BC 루프, C-C' 루프, C 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 A가 존재하지 않고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESF	SNWSEDL
C 스트랜드	VLNMYRM	MLNWNRL
C-C' 루프	SPSNQ	SPSNQ
C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프	FPED	FCNG
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNQTDKLAAP	SPSNQTEKQAAPC
FG 루프	LAPKA	LHPKA

[0173]

[0174]

B는 하기 표에서 나타낸 바와 같이 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, C 스트랜드, D 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 Glu-Asp이거나, 또는 B가 존재하지 않고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESF	SNWSEDL
C 스트랜드	VLNMYRM	MLNWNRL
C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프	FPED	FCNG
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNQTDKLAAP	SPSNQTEKQAAPC
D 스트랜드	FRVTO	FQLIQ
FG 루프	LAPKA	LHPKA

[0175]

[0176]

Z는 하기 (i), (ii) 또는 (iii)으로 나타내지고;

[0177]

(i) 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, G 스트랜드, C 스트랜드, F 스트랜드, C' 스트랜드, C" 스트랜드, C"-D 루프, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프, C' 스트랜드 내지 C" 스트랜드 또는 D 스트랜드 내지 DE 루프로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~4의 펩티드 서열;

[0178]

(ii) G-L-Z'

[0179]

G는 3개의 아미노산으로부터 D-스트랜드의 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, 또는 존재하지 않고;

[0180]

L은 $-CO(CH_2)_n-NH-$, 및 PEG 2-20 KD로부터 선택되고;

[0181]

'n'은 2~10의 정수이고; 및

[0182]

Z'는 3개의 아미노산으로부터, FG 루프 및 G-스트랜드로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~3의 펩티드 서열이거나; 또는

[0183]

(iii) 3개의 아미노산으로부터, D-스트랜드, FG 루프 및 G 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 순쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열되고, 펩티드 서열의 2 이상의 아미노산이 서로 조합되어 2개의 단편 사이 또는 단편들 내에서 랑탐 결합을 형성하는 1~4의 펩티드 서열;

[0184] 여기서 상기 단편들은 하기 표에 정의한 바와 같고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESE	SNWSEDL
C 스트랜드	VLNWYRM	MLNNRRL
C' 스트랜드	TDKLAAFP	TEKQAAFC
C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프	FPED	FCNG
C' 스트랜드 내지 C'-C" 스트랜드	TDKLAAFPEDRSQP	TEKQAAFCNGLSQP
C" 스트랜드	RSQP	LSQP
C"-D 루프	GGDCR	VQDAR
D 스트랜드	FRVTO	FQIIQ
E 스트랜드	GTYLCGAIS	GIYLCGAIS
FG 루프	LAPKA	LHPKA
G 스트랜드	QIKE	KIEE
D 스트랜드 내지 DE 루프	FRVTOLPNGR	FQIIQLPNRH

[0185]

[0186] D는 하기 표에 나타낸 바와 같이 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 2 이하의 펩티드 서열이거나, 또는 존재하지 않고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESE	SNWSEDL
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNOTDKLAAFP	SPSNOTKQAAFC
FG 루프	LAPKA	LHPKA

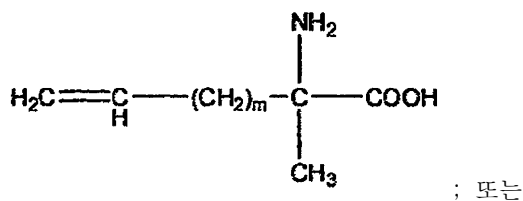
[0187]

[0188] E는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, D 스트랜드, FG 루프, C'-C' 루프 내지 C' 스트랜드, G 스트랜드, FG 루프 내지 G 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 4 이하의 펩티드 서열이거나, 또는 존재하지 않고;

	hPD-1	mPD-1
BC 루프	SNTSESE	SNWSEDL
C-C' 루프 내지 C' 스트랜드	SPSNOTDKLAAFP	SPSNOTKQAAFC
D 스트랜드	FRVTO	FQIIQ
FG 루프	LAPKA	LHPKA
G 스트랜드	QIKE	KIEE
FG 루프 내지 G 스트랜드	LAPKAQIKE	LHPKAKIEE

[0189]

[0190] X 및 X'는 리신, 오르니틴, 디아미노프로피온산, 디아미노부티르산 또는 부가적인 리신과 임의로 연결되는 하기 화학식의 올레핀성 아미노산으로부터 독립적으로 선택되고:



[0191]

[0192] X 및 X'는 서로 조합되어 부가적인 리신과 임의로 연결되는 올레핀성 아미노산을 갖는 고리를 형성하거나; 또는

[0193] X 및 X' 중 하나 또는 모두는 존재하지 않고;

[0194] 'm'은 1~6의 정수이고;

[0195] R₁은 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD 부분으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 존재하지 않고;

[0196] R₂ 및 R₃는 C₂-C₂₀ 아실 및 PEG 2-20 KD로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 존재하지 않거나 또는 R₃-L'이고;

거나, 또는 A가 존재하지 않고;

- [0223] B는 3개의 아미노산으로부터, BC 루프, FG 루프, C-C' 루프 내지 C' 스트랜드, C 스트랜드, D 스트랜드, C' 스트랜드 내지 C'-C" 루프로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지의 아미노산 서열이거나, B가 존재하지 않고;
- [0224] Z는 3개의 아미노산으로부터, D 스트랜드, FG 루프, G 스트랜드, C 스트랜드 및 F 스트랜드로부터 선택된 인간 또는 손쥐 PD1 엑토도메인 단편의 펩티드 서열의 전체 길이까지 임의의 순서로 배열된 1~3의 펩티드 서열이고; 그리고
- [0225] X는 리신이다.
- [0226] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, A 및 B가 독립적으로 3개의 아미노산으로부터 상기 BC 루프의 전체 길이까지의 아미노산 서열인 화학식(Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0227] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, A 및 B가 독립적으로 상기 BC 루프의 전체 길이인 화학식(Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0228] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, A가 BC 루프이고, 모든 아미노산이 역순인 화학식(Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0229] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, Z가 D 스트랜드-FG 루프-G 스트랜드인 화학식(Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0230] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, R₁, R₂ 및 R₃가 존재하지 않는 화학식(Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0231] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, R₃가 C₁₆-아실인 화학식(Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0232] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 3 이하의 아미노산이 D-아미노산인 화학식(I) 또는 (Ia)의 화합물을 특별히 제공한다. 임의적으로는 10% 이하, 대안적으로는 20% 이하, 대안적으로는 50% 이하, 대안적으로는 80% 이하 또는 90% 이하의 아미노산이 D-아미노산이거나, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 80% 또는 적어도 90%가 D-아미노산이다.
- [0233] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 모든 아미노산이 D-아미노산인 화학식(I) 또는 (Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0234] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 5~25%의 펩티드 결합이 환원된 아미드 결합 (-CH₂NH-)으로 치환될 수 있는 화학식(I) 또는 (Ia)의 화합물을 특별히 제공한다. 한편, 1 또는 2 이하 또는 3 또는 20% 이하 또는 10%의 펩티드 결합이 환원된 아미드 결합 (-CH₂NH-)으로 대체될 수 있다.
- [0235] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 모든 아미노산이 역순이거나 또는 2 이상, 임의로는 5 이상, 임의로는 10 이상의 아미노산의 서열이 역순이고, 또는 10 이하, 또는 5 이하가 역순인 화학식(I) 또는 (Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0236] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 5~25%의 아미노산이 기타 천연 또는 인조 아미노산으로 치환될 수 있는 화학식(I) 또는 (Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0237] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 30% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 또는 10% 이하의 아미노산이 생략될 수 있는 화학식(I) 또는 (Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0238] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 상기 각 펩티드 서열에서 3 이하의 아미노산, 바람직하게는 2 이하의 아미노산 또는 오직 하나의 아미노산이 개별적으로 어떠한 위치에도 첨가될 수 있는 화학식(I) 또는 (Ia)의 화합물을 특별히 제공한다.
- [0239] 본 발명의 화합물은 선형 또는 분기형 펩티드를 포함할 수 있으나, 1 이상의 펩티드 부분을 갖는 분기된 펩티드를 포함하는 화합물이 바람직하고, 1 이상의 가지가 존재할 수 있다.
- [0240] 일 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 화합물은 분기되어 있고, 1 이상의 가지는 적어도 5개의 아미노산 잔기의 인간 또는 손쥐 PD-1의 상기 엑토도메인 부분을 포함하는 펩티드 부분을 함유하고, 그리고 상기 화합물은 제1 N-말단 부분과 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하고, 이 두 부분은 분기점에서 C-말단

부분의 펩티드 부분에 결합되어 있다.

- [0241] 또 다른 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 화합물은 분기되어 있고, 1 이상의 가지는 적어도 5 개의 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 상기 엑토도메인 부분을 포함하는 펩티드 부분을 함유하고, 그리고 상기 화합물은 제1 N-말단 부분 및 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하고, 이 두 부분은 분기점에서 중간 펩티드 부분에 결합되어 있고, 이 중간 펩티드 부분은 다시 또 다른 분기점에서 제1 C-말단 부분 및 제2 C-말단 부분의 펩티드 부분의 각각에 결합되어 있다.
- [0242] 본 발명의 또 다른 실시양태는 화합물이 지질화되고 및/또는 글리코실화되어 있는 본 발명에서 기술된 화합물에 관한 것이다.
- [0243] 본 발명의 또 다른 실시양태는 화합물이 PEG 부분을 함유하고 본 발명에서 기술된 화합물에 관한 것이다.
- [0244] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에서 기술된 화합물에 관한 것으로, 이 화합물에서 펩티드 부분의 1 이상의 아미노산이 D-아미노산으로 치환되어 있다.
- [0245] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에서 기술된 화합물에 관한 것으로, 이 화합물에서 펩티드 부분의 1 이상의 아미노산이 D-아미노산으로 치환되어 있고, D-아미노산은 펩티드 부분의 N-말단 또는 C-말단의 아미노산 내에 존재한다.
- [0246] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에서 기술된 화합물에 관한 것으로, 이 화합물에서 펩티드 부분의 1 이상의 아미노산이 D-아미노산으로 치환되어 있고, 상기 D-아미노산은 펩티드 부분의 N-말단 또는 C-말단에 존재한다.
- [0247] 본 발명의 실시양태에서는 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제하고 PD-1에 대한 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 감소하여 PD-1에 의한 면역억제 신호전달을 형성할 수 있는 능력을 갖고, 35 이하의 아미노산 잔기의 펩티드 부분을 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0248] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제하고 PD-1에 대한 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 감소하여 PD-1에 의한 면역억제 신호전달을 형성하는 능력을 갖는 화합물을 제공하고, 상기 화합물이 35 이하의 아미노산 잔기의 펩티드 부분을 포함하고, 상기 펩티드 부분이 다음 3 아미노산 잔기 서열 중 하나를 포함하는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 엑토도메인 부분을 포함하거나 또는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 엑토도메인 부분의 변이체를 함유하고, 상기 잔기들 중 2 이하가 삭제되거나, 치환되거나 변형되거나 2 이하의 추가적인 아미노산 잔기가 첨가된다:

<u>A 스트랜드로부터:</u>	<u>A'-B 루프 및 B 스트랜드로부터:</u>
PPT	NAT
PTF	ATF
TFS	TFT
<u>BC 루프로부터:</u>	FTC
SNT	TCS
NTS	CSF
TSE	<u>C 스트랜드로부터:</u>
SES	VLN
ESF	LNW
<u>C-C' 루프로부터</u>	NWY
SPS	WYR
PSN	YRM
SNQ	<u>C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터:</u>
<u>C' 스트랜드로부터:</u>	SNQ
TDK	NQT
DKL	QTD
KLA	TDK
LAA	<u>C' 스트랜드 내지 C'-C'' 루프로부터:</u>
AFP	PED
<u>C'' 스트랜드로부터:</u>	EDR
RSQ	<u>C'' 스트랜드 내지 C'' D-루프로부터</u>
SQP	QPG
<u>D 스트랜드로부터:</u>	PGQ
FRV	GQD
RVT	QDC
VTQ	<u>D-E 루프로부터:</u>
<u>E 스트랜드로부터:</u>	LPN
DFH	PNG
FHM	NGR
HMS	<u>F 스트랜드로부터:</u>
MSV	GTY
<u>F-G 루프로부터:</u>	TYL
LAP	YLC
APK	LCG
PKA	CGA
<u>F-G 루프 및 G 스트랜드로부터</u>	GAI
KAQ	AIS
AQI	<u>G 스트랜드로부터:</u>
<u>C' 스트랜드 내지 C'' 스트랜드</u>	QIK
TDK	IKE
DKL	<u>D 스트랜드 내지 DE 루프</u>
KLA	FRV
LAA	RVT
AAF	VTQ
AFP	TQL
FPE	LPN
PED	PNG
EDR	NGR
DRS	
RSQ	
SQP	

[0249]

[0250] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 다음 서열들 중 적어도 하나를 포함하는 본 발명에서 기술된 화합물을 제공한다:

[0251]	PPTFS	EDRSQ
[0252]	NATFT	GQDCR
[0253]	FTCSP	FRVTQ
[0254]	SNTSESF	LPNGR
[0255]	VLNWY	DFHMSV
[0256]	NWYRM	GTYLC
[0257]	SNQTDK	CGAIS
[0258]	TDKLAA	LAPKA
[0259]	KLAAFP	QIKE

[0260]

PEDSQP

[0261]

또 다른 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 3개의 아미노산 잔기 서열 내에 포함된 아미노산 잔기 중 1 이하가 삭제, 치환 또는 변형된다.

[0262]

또 다른 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 화합물은 분기되고, 1 이상의 가지는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 상기 엑토도메인 부분을 포함하는 펩티드 부분을 함유한다.

[0263]

또 다른 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 화합물은 분기되고, 1 이상의 가지는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 상기 엑토도메인 부분을 포함하는 펩티드 부분을 함유하고, 그리고 상기 화합물은 제1 N-말단 부분 및 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하고, 여기서 상기 두 말단 부분들은 분기점에서 C-말단 부분의 펩티드 부분에 결합된다.

[0264]

또 다른 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 화합물은 분기되고, 1 이상의 가지는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 상기 엑토도메인 부분을 포함하는 펩티드 부분을 함유하고, 그리고 상기 화합물은 제1 N-말단 부분 및 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하고, 여기서 상기 두 말단 부분들은 분기점에서 중간 펩티드 부분에 결합되고, 펩티드 부분은 다시 또 다른 분기점에서 제1 C-말단 부분 및 제2 C-말단 부분의 펩티드 부분에 각각 결합된다.

[0265]

본 발명의 또 다른 실시양태는 제1 N-말단 부분 및 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하는 본 발명의 분기된 화합물에 관한 것으로, 여기서 상기 제1 및/또는 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분은 다음 3개의 아미노산 잔기 서열들 중 하나를 포함하는 적어도 5의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 엑토도메인 부분을 포함한다:

BC 루프로부터:

SNT

NTS

TSE

SES

ESF

C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터:

SNQ

NQT

QTD

TDK

D-E 루프로부터:

LPN

PNG

NGR

C-C' 루프로부터:

SPS

PSN

SNQ

C '스트랜드 내지 C'-C' 루프로부터:

PED

EDR

F-G 루프로부터:

LAP

APK

PKA

D 스트랜드 내지 DE 루프

FRV

RVT

VTQ

TQL

QLP

LPN

PNG

NGR

[0266]

[0267]

본 발명의 또 다른 실시양태는 제1 N-말단 부분 및 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하는 본 발명의 분기된 화합물에 관한 것으로, 여기서 상기 제1 및/또는 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분은 다음 3개의 아미노산 잔기 서열들 중 하나를 포함하는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 엑토도메인 부분을 포함한다:

<u>A 스트랜드로부터:</u>	<u>A'-B 루프 및 B 스트랜드로부터:</u>
PPT	NAT
PTF	ATF
TFS	TFT
<u>C 스트랜드로부터:</u>	FTC
VLN	TCS
LNW	CSF
NWY	<u>C' 스트랜드로부터:</u>
WYR	TDK
YRM	DKL
<u>C'' 스트랜드로부터:</u>	KLA
RSQ	LAA
SQP	AFP
<u>E 스트랜드로부터:</u>	<u>D 스트랜드로부터:</u>
DFH	FRV
FHM	RVT
HMS	VTQ
MSV	<u>F 스트랜드로부터:</u>
<u>F-G 루프 내지 G 스트랜드로부터</u>	GTY
KAQ	TYL
AQI	YLC
<u>G 스트랜드로부터:</u>	LCG
QIK	CGA
IKE	GAI
	AIS

[0268]

[0269]

또 다른 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 화합물은 분기되고, 1 이상의 가지는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 상기 엑토도메인 부분을 포함하는 펩티드 부분을 함유하고, 그리고 상기 화합물은 제1 N-말단 부분 및 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하고, 여기서 상기 두 말단 부분들은 분기점에서 C-말단 부분 펩티드 부분에 결합되고, 상기 C-말단 부분 또는 제1 및/또는 제2 C-말단 부분은 다음 3개의 아미노산 잔기 서열들 중 하나를 포함하는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 엑토도메인 부분을 포함한다:

<u>A 스트랜드로부터:</u>	<u>A'-B 루프 및 B 스트랜드로부터:</u>
PPT	NAT
PTF	ATF
TFS	TFT
<u>C 스트랜드로부터:</u>	FTC
VLN	TCS
LNW	CSF
NWY	<u>C' 스트랜드로부터:</u>
WYR	TDK
YRM	DKL
<u>C'' 스트랜드로부터:</u>	KLA
RSQ	LAA
SQP	AFP
<u>E 스트랜드로부터:</u>	<u>D 스트랜드로부터:</u>
DFH	FRV
FHM	RVT
HMS	VTQ
MSV	<u>F 스트랜드로부터:</u>
<u>F-G 루프 내지 G 스트랜드로부터</u>	GTY
KAQ	TYL
AQI	YLC
<u>G 스트랜드로부터:</u>	LCG
QIK	CGA
IKE	GAI
	AIS

[0270]

[0271]

또 다른 실시양태는 본 발명의 화합물에 관한 것으로, 상기 화합물은 분기되고, 1 이상의 가지는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 상기 엑토도메인 부분을 포함하는 펩티드 부분을 함유하고, 그리고 상기 화합물은 제1 N-말단 부분 및 제2 N-말단 부분의 펩티드 부분을 포함하고, 여기서 상기 두 말단 부분들은 분기점에서 중간 펩티드 부분에 결합되고, 상기 펩티드 부분은 다시 또 다른 분기점에서 제1 C-말단 부분 및 제2 C-말단 부분의 펩티드 부분 각각에 결합되고, 상기 제 1 및 상기 제2 C-말단 부분 중 하나는 다음 3개의 아미노산 잔기 서열들 중 하나를 포함하는 5 이상의 인접 아미노산 잔기의 인간 PD-1의 엑토도메인 부분을 포함한다:

BC 루프로부터:

SNT
NTS
TSE
SES
ESF

C-C' 루프 내지 C' 스트랜드로부터:

SNQ
NQT
QTD

TDK D-E 루프로부터:

LPN
PNG
NGR

F-G 루프 내지 G 스트랜드로부터

KAQ
AQI

C'스트랜드 내지 C'' 스트랜드

TDK
DKL
KLA
LAA
AAF
AFP
FPE
PED
EDR
DRS
RSQ
SOP

C-C' 루프로부터

SPS
PSN
SNQ

C'-C'' 루프로부터:

PED

EDR F-G 루프로부터:

LAP
APK
PKA

D 스트랜드 내지 DE 루프

FRV
RVT
VTQ
TQL
LPN
PNG
NGR

[0272]

[0273]

본 발명의 일 실시양태에 따라서, 세포예정사 1 (PD1) 신호전달 경로를 억제하고 PD-1에 대한 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 감소하여 PD-1에 의한 면역억제 신호전달을 형성하는 능력을 갖고, 35 이하의 아미노산 잔기의 펩티드 부분을 포함하는 화합물을 제공한다.

[0274]

본 발명의 또 다른 실시양태에 따라서, 하기 표에서처럼 개별 중으로부터 선택된 서열 중 적어도 하나를 포함하는, 본 발명에서 기술된 화합물을 제공한다:

	hPD-1	mPD-1	궤 PD-1	궤 PD-1	궤 PD-1
A 스트랜드	PPTFS	SLTFY	QLSWQ	PLTFS	PLTFS
B 스트랜드	ATFTCSF	ATFTCSL	ATFTCSF	ATFTCSL	ATFTCSF
BC 루프	SNTSESF	SNWSEDL	SNWSEDL	ADIPDSF	SNTSEHF
C 스트랜드	VLNWyRM	MLNWNRL	KLNWyRL	VLNWyRL	VLNWyRM
C-C' 루프	SPSNQ	SPSNQ	SPSNQ	SPRNQ	SPSNQ
C' 스트랜드	TDKLAAFP	TEKQAAFC	TEKQAAFC	TDKLAAFQ	TDKLAAFP
C'-C'' 루프	ED	NG	NG	ED	ED
C'' 스트랜드	RSQP	LSQP	YSQP	RIEP	SSQP
C''-D 루프	GQDCR	VQDAR	VRDAR	GRDRR	GRSGR
D 스트랜드	FRVTQ	FQIIQ	FQIVQ	FRVMR	FRVTR
D-E 루프	LPNGR	LPNRH	LPNGH	LPNGR	LPNGR
E 스트랜드	DFHMSV	DFHMINI	DFHMINI	DFHMSI	DFHMSV
F 스트랜드	GYLGAIS	GYLGAIS	GYLGAIS	GYLGAIV	GYLGAIS
FG 루프	LAPKA	LHPKA	LPPKA	LPPNT	LPPKT
G 스트랜드	QIKE	KIEE	QIKE	QINE	QINE
C' 스트랜드 내 C'-C'' 루프	FPED	FCNG	FCNG	FQED	FPED
C-C' 루프 내 C' 스트랜드	SPSNQTDKLAAFP	SPSNQTEKQAAFC	SPSNQTEKQAAFC	SPRNQTDKLAAFQ	SNQTDKLAAFP

C' 스트랜드 내지 C" 스트 랜드	TDKLAAPEDRSQ P	TEKQAFNGLSQ P	TEKQAFNGYSQP	TDKLAAFQEDRIEP	TDKLAAPEDSSQ P
D 스트랜드 내지 DE 루프	FRVTQLPNGR	FQIIQLPNRH	FQIVQLPNGH	FRVMRLPNGR	FRVTRLPNGR
FG 루프 내지 G 스트랜드	LAPKAQIKE	LHPKAKIEE	LPPKAQIKE	LPPNTQINE	LPPKTQINE

[0276]

[0277]

대표적인 화합물로는 다음과 같은 것들이 있으며, 이들 화합물은 예증적인 것이며 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.







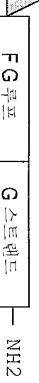
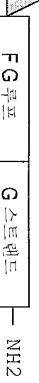
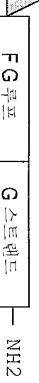
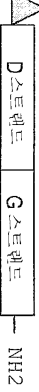
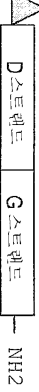
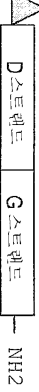
화합물 번호	서열	구조
1. SNTSESF-NH2 (SEQ ID NO: 42)		<div>BC-루프 — NH2</div>
2. CH3CO-SNTSESF-NH2 (SEQ ID NO: 43)		<div>Ac-BC-루프 — NH2</div>
3. SNQTDKLAAPEDSQPGQD-NH2 (SEQ ID NO: 44)		<div>CC'-루프 — K[C'-스트랜드, C'-스트랜드 내지 C'-루프, C'-스트랜드 내지 C'-루프, C'-스트랜드, C'-D-루프] — C''-D-루프 — NH2</div>
4. EDRSQPGQDCR-NH2 (SEQ ID NO: 45)		<div>C'-스트랜드 내지 C'-루프 — C'-스트랜드 — C''-D-루프 — NH2</div>
5. CGAISLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 46)		<div>F'-스트랜드 — FG-루프 — G-스트랜드 — NH2</div>
6. FRVTQK(SNTSESF)FRVTOAhxLAPKAQIKE-NH2 Ahx = 6-아미노헥시노산 (SEQ ID NO: 47)		<div>BC-루프 — D-스트랜드 — Ahx — FG-루프 — G-스트랜드 — NH2</div>
7. FRVTQK(SNTSESF)FRVTO LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 48)		<div>BC-루프 — D-스트랜드 — D-스트랜드 — FG-루프 — G-스트랜드 — NH2</div>

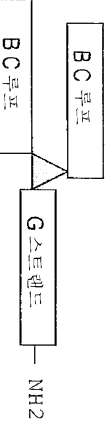
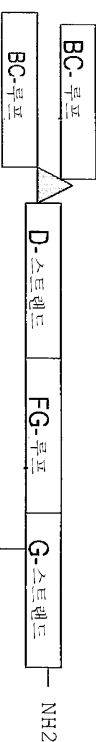
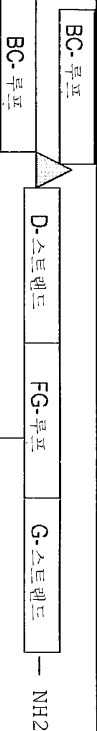
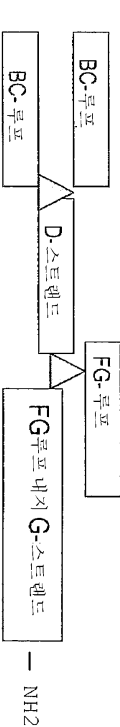
화합물 번호	서열	구조
8.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQ LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 49)	<div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드FG루포G-스트랜드NH2</div> <div>BC-루포</div>
9.	SNQTDK (SNQTDK) FRVTQ LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 50)	<div>CC루포 내지 C-스트랜드</div> <div>D-스트랜드FG루포G-스트랜드NH2</div> <div>CC루포 내지 C-스트랜드</div>
10.	SNQTDK (SNQTDK) VLNWYRM LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 51)	<div>CC루포 내지 C-스트랜드</div> <div>C-스트랜드FG루포G-스트랜드NH2</div> <div>CC루포 내지 C-스트랜드</div>
11.	SNTSESEFK (SNQTDK) FRVTQ LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 52)	<div>CC루포 내지 C-스트랜드</div> <div>D-스트랜드FG루포G-스트랜드NH2</div> <div>BC-루포</div>
12.	SNTSESEFK (SNQTDK) FRVTQ LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 53)	<div>CC-루포</div> <div>D-스트랜드FG-루포G-스트랜드NH2</div> <div>BC-루포</div>

화학물 번호	서열	구조
13.	sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqlke- NH2 모든 D-아미노산 (SEQ ID NO: 54)	<div>BC루프</div> <div>D-스트랜드FG루프G스트랜드—NH2</div>
14.	EKTQAKPAYWNLVK(KDTQNS)DTQNS (SEQ ID NO: 55)	<div>G스트랜드FG루프C스트랜드CC루프배지C'스트랜드</div> <div>—NH2</div>
15.	비오틴-Ahx- SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE- NH2 (SEQ ID NO: 56)	<div>BC루프</div> <div>비오틴-Ahx-BC루프D-스트랜드FG루프G스트랜드—NH2</div>
16.	C6 지질- SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE- NH2 (SEQ ID NO: 57)	<div>BC루프</div> <div>C6지질-BC루프D-스트랜드FG루프G스트랜드—NH2</div>
17.	Ac- SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE- NH2 (SEQ ID NO: 58)	<div>BC루프</div> <div>아세틸-BC루프D-스트랜드FG루프G스트랜드—NH2</div>

화합물 번호	서열	구조				
18.	SNTSESEFK (NH ₂ -[PEG] ₁₁ -CO-SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 59)	<div>PEG-B C 루프</div> <div>D-스트랜드F C 루프G 스트랜드-NH₂</div> <div>B C 루프</div>				
19.	SNTSESEFK (SNTSESEF)-NH-[PEG] ₁₁ -CO-) LAPKAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 60)	<div>B C 루프</div> <div>PEGF C 루프G 스트랜드-NH₂</div> <div>B C 루프</div>				
20.	SNTSESEFK (CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ 분기 내의 지질 (SEQ ID NO: 61)	<div>C 6-지질B C 루프</div> <div>D-스트랜드F C 루프G 스트랜드-NH₂</div> <div>B C 루프</div>				
21.	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESEFK (CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ 두 분기 및 N-말단의 지질 (SEQ ID NO: 62)	<div>C 6-지질B C 루프</div> <div>D-스트랜드F C 루프G 스트랜드-NH₂</div> <div>C 6-지질B C 루프</div>				

화학물 번호	식별	구조
22.		
23.		
24.		

화합물 번호	서열	구조																		
25.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 66)	<table><tr><td>BC 루프</td><td colspan="4"></td></tr><tr><td colspan="5"></td></tr><tr><td>BC 루프</td><td>D-스트랜드</td><td>G 스트랜드</td><td colspan="2">— NH2</td></tr></table>	BC 루프										BC 루프	D-스트랜드	G 스트랜드	— NH2				
BC 루프																				
																				
BC 루프	D-스트랜드	G 스트랜드	— NH2																	
26.	SNTSESEFRVTQLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 67)	<table><tr><td>BC 루프</td><td>D-스트랜드</td><td>FG 루프</td><td>G 스트랜드</td><td>— NH2</td></tr></table>	BC 루프	D-스트랜드	FG 루프	G 스트랜드	— NH2													
BC 루프	D-스트랜드	FG 루프	G 스트랜드	— NH2																
27.	SNTSESEFKFRVTQLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 68)	<table><tr><td>BC 루프</td><td>K</td><td>D-스트랜드</td><td>FG 루프</td><td>G 스트랜드</td><td>— NH2</td></tr></table>	BC 루프	K	D-스트랜드	FG 루프	G 스트랜드	— NH2												
BC 루프	K	D-스트랜드	FG 루프	G 스트랜드	— NH2															
28.	SNTSESEFKSNTSESEFRVTQLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 69)	<table><tr><td>BC 루프</td><td>K</td><td>BC 루프</td><td>D-스트랜드</td><td>FG 루프</td><td>G 스트랜드</td><td>— NH2</td></tr></table>	BC 루프	K	BC 루프	D-스트랜드	FG 루프	G 스트랜드	— NH2											
BC 루프	K	BC 루프	D-스트랜드	FG 루프	G 스트랜드	— NH2														
29.	SNTSESEFK (SNTSESEF)-NH2 (SEQ ID NO: 70)	<table><tr><td>BC 루프</td><td colspan="5"></td></tr><tr><td colspan="6"></td></tr><tr><td>BC 루프</td><td colspan="5">— NH2</td></tr></table>	BC 루프												BC 루프	— NH2				
BC 루프																				
																				
BC 루프	— NH2																			
30.	SNTSESEFK (SNTSESEF) LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 71)	<table><tr><td>BC 루프</td><td colspan="4"></td></tr><tr><td colspan="5"></td></tr><tr><td>BC 루프</td><td>FG 루프</td><td>G 스트랜드</td><td colspan="2">— NH2</td></tr></table>	BC 루프										BC 루프	FG 루프	G 스트랜드	— NH2				
BC 루프																				
																				
BC 루프	FG 루프	G 스트랜드	— NH2																	
31.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 72)	<table><tr><td>BC 루프</td><td colspan="4"></td></tr><tr><td colspan="5"></td></tr><tr><td>BC 루프</td><td>D 스트랜드</td><td>G 스트랜드</td><td colspan="2">— NH2</td></tr></table>	BC 루프										BC 루프	D 스트랜드	G 스트랜드	— NH2				
BC 루프																				
																				
BC 루프	D 스트랜드	G 스트랜드	— NH2																	

화합물 번호	서열	구조
32.	SNTSESEFK (SNTSESEF) KAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 73)	
33.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIK (CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO) E-NH2 (SEQ ID NO: 74)	
34.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPK (CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO) AQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 75)	
35.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQK (LAP) KAQIK E-NH2 (SEQ ID NO: 76)	

화합물 번호	서열	구조
36.	SNTSESEFK (SNTSESE) FRVTQLAPKAQIKE (PKA) QIK E-NH2 (SEQ ID NO: 77)	<div>BC-루포</div> <div>FG-루포</div> <div>D-스트렌드 내지 DE-루포</div> <div>G-스트렌드</div> <div>NH2</div>
37.	SNTSESEFK (LAP) FRVTQLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 78)	<div>FG-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트렌드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트렌드</div> <div>NH2</div>
38.	LAPK (LAP) FRVTQLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 79)	<div>FG-루포</div> <div>FG-루포</div> <div>D-스트렌드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트렌드</div> <div>NH2</div>
39.	LAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 80)	<div>FG-루포</div> <div>G-스트렌드</div> <div>NH2</div>
40.	SNTSESEFK (SNTSESE) FK (CH3 (CH2) 14CO)) VTQLAPKAQIKE-NH2 Lys 로 치환된 D-스트렌드 내의 Arg (SEQ ID NO: 81)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트렌드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트렌드</div> <div>NH2</div> <div>C 16-지질</div>

화합물 번호	서열	구조
41.	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAP-NH2 (SEQ ID NO: 82)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>NH2</div>
42.	SNTSESEFRVTQK(SNTSESEF)LPKKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 83)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>BC-루포</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div>
43.	FRVTQLAPKKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 84)	<div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div>
44.	SNTSESEFK(SNTSESEF)FK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)VTQLAPKKAQIKE-NH2 Lys 로 치환된 D 스트랜드 내의 Arg (SEQ ID NO: 85)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>C-8-지질</div>
45.	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)AQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 86)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>C-8-지질</div>

화합물 번호	서열	구조
46.	SNTSESEFK (SNTSESF) FRVTQLAPKAQIK (CH ₃ (CH ₂) ₆ CO) E (SEQ ID NO: 87)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div> <div>C8-지질</div>
47.	SNTSESEFK (sntsesf) FRVTQLAPKAQIKE 분기 내의 D-아미노산 (SEQ ID NO: 88)	<div>D-아미노산-(BC루포)</div> <div>BC루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG루포</div> <div>G스트랜드</div> <div>NH₂</div>
48.	EKIQAAPALQTVPFK (FSESTNS) FSESTNS-NH ₂ (SEQ ID NO: 89)	<div>BC루포</div> <div>G스트랜드</div> <div>FG루포</div> <div>D스트랜드</div> <div>BC루포</div> <div>NH₂</div>
49.	ekiqakpalqtvrfk(fsestns)fsestns-NH ₂ Retro inverso (모든 D-아미노산) (SEQ ID NO: 90)	<div>BC루포</div> <div>G스트랜드</div> <div>FG루포</div> <div>D스트랜드</div> <div>BC루포</div> <div>NH₂</div>
50.	SNTSESEFK (SNTSESF) FRVTQLAPKAQIK (PE G-20KD) E-NH ₂ (SEQ ID NO: 91)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div> <div>PEG 20 KD</div>

화합물 번호	서열	구조
51.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIK (PE G-20KD) E-NH2 (SEQ ID NO: 92)	<div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>PEG 2 KD</div>
52.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPK (PEG 20 KD) AQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 93)	<div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>PEG 20 KD</div>
53.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FK (mini PEG) VTQLAPKAQIKE-NH2 Lys 로 치환된 D 스트랜드 내의 Arg (SEQ ID NO: 94)	<div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>PEG 2KD</div>
54.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPK (PEG 10KD) AQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 95)	<div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>PEG10 KD</div>
55.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIK (PE G20KD) E-NH2 (SEQ ID NO: 96)	<div>BC-루포</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>PEG20KD</div>

화합물 번호	서열	구조
56.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FK (CH3CO) VTQLAPK AQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 97)	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>Ac</div>
57.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPK (CH3CO) AQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 98)	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>Ac</div>
58.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIK (CH3CO) E-NH2 (SEQ ID NO: 99)	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>Ac</div>
59.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPK (CH3- (CH2) 4-CO) AQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 100)	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH2</div> <div>C-6-지질</div>

회합물 번호	서열	구조
60.	비오틴-Ahx- sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqike- NH ₂ 모든 D 아미노산 (SEQ ID NO: 101)	<div>BC-루프</div> <div>비오틴-Ahx-B C-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
61.	비오틴-Ahx- EKIQAKPAYWNLVK(KDTQNS)DTQNS-NH ₂ (SEQ ID NO: 102)	<div>비오틴-Ahx-B C-루프</div> <div>FG-루프</div> <div>C-스트랜드</div> <div>CC'-루프 내지 C'-스트랜드</div> <div>CC'-루프 내지 C'-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
62.	SNTSESF(KSNTSESF)FRVTQLAPE*AQIK'E-NH ₂ (SEQ ID NO: 103) 아스테리스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	<div>BC-루프</div> <div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
63.	SNTSESF(KSNTSESF)K*VTQE*APKAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 104) 아스테리스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	<div>BC-루프</div> <div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>

화학물 번호	서열	구조
64.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTE*LAPK*AIKE (SEQ ID NO: 105) 아스테리스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	<div><div>BC-루프</div><div>D-스트랜드</div><div>FG-루프</div><div>G-스트랜드</div><div>NH2</div></div> <div><div>BC-루프</div><div></div></div>
65.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)E (SEQ ID NO: 106)	<div><div>Ac-BC-루프</div><div>D-스트랜드</div><div>FG-루프</div><div>G-스트랜드</div><div>NH2</div></div> <div><div>Ac-BC-루프</div><div>C8-지질</div></div>
66.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO)E (SEQ ID NO: 107)	<div><div>Ac-BC-루프</div><div>D-스트랜드</div><div>FG-루프</div><div>G-스트랜드</div><div>NH2</div></div> <div><div>Ac-BC-루프</div><div>C16-지질</div></div>
67.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)E at Lys (SEQ ID NO: 108)	<div><div>Ac-BC-루프</div><div>D-스트랜드</div><div>FG-루프</div><div>G-스트랜드</div><div>NH2</div></div> <div><div>Ac-BC-루프</div><div>C12-지질</div></div>
68.	CH3CO-SNTSESFK(CH3CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO)E (SEQ ID NO: 109)	<div><div>Ac-BC-루프</div><div>D-스트랜드</div><div>FG-루프</div><div>G-스트랜드</div><div>NH2</div></div> <div><div>Ac-BC-루프</div><div>C6-지질</div></div>

화합물 번호	서열	구조
69.	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPKAKIEE-NH2 (SEQ ID NO: 110)	<div>BC 루프</div> <div>△</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>G 스트랜드</div> <div>— NH2</div>
70.	EDK(ED)FRVTQLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 111)	<div>C 스트랜드 내지 C' 스트랜드</div> <div>△</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>G 스트랜드</div> <div>— NH2</div>
71.	SNTSE6FK(ED)FRVTQLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 112)	<div>C 스트랜드 내지 C' 스트랜드</div> <div>BC 루프</div> <div>△</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>G 스트랜드</div> <div>— NH2</div>
72.	LAPKAK(ED)FRVTQLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 113)	<div>C 스트랜드 내지 C' 스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>△</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>G 스트랜드</div> <div>— NH2</div>
73.	SNQTDKK(ED)FRVTQLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 114)	<div>C 스트랜드 내지 C' 스트랜드</div> <div>△</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>G 스트랜드</div> <div>— NH2</div>
74.	SNQTDK(SNQTDK)GYLGAISLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 115)	<div>C 스트랜드 내지 C' 스트랜드</div> <div>△</div> <div>F-스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>G 스트랜드</div> <div>— NH2</div>
75.	SNQTDKK(VLNWYRM)GYLGAISLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 116)	<div>C 스트랜드</div> <div>△</div> <div>F-스트랜드</div> <div>FG 루프</div> <div>G 스트랜드</div> <div>— NH2</div>

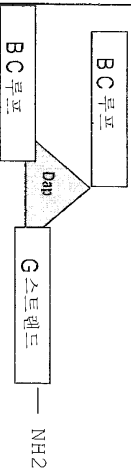
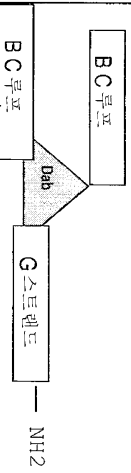
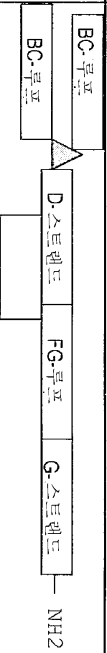
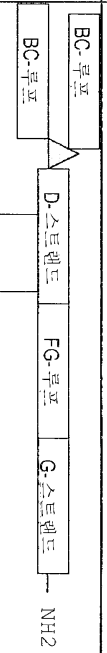
화합물 번호	서열	구조
76.	EDK(VLNWYRM)GYLCGAISLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 117)	<div>C-스트랜드</div> <div>F-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div> <div>C-스트랜드대지C-루프</div>
77.	SNTSESF(K(SNTSESF)GYLCGAISLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 118)	<div>BC-루프</div> <div>F-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div> <div>BC-루프</div> <div>C-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div> <div>BC-루프</div>
78.	SNTSESF(K(SNTSESF)VLNWYRM(LAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 119)	<div>BC-루프</div> <div>C-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div> <div>BC-루프</div> <div>C-루프대지C-스트랜드</div>
79.	VLNWYRM(K(SNQTDK)GYLCGAISLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 120)	<div>C-루프대지C-스트랜드</div> <div>F-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div> <div>C-스트랜드</div>
80.	GYLCGAISLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 121)	<div>F-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div>
81.	SNQTDK(SNQTDK)FRVTQLAPKQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 122)	<div>C-루프대지C-스트랜드</div> <div>D-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div> <div>C-루프대지C-스트랜드</div>
82.	SNWSEDL(K(SNWSEDL)FQILQLHPK(CH ₃ (CH ₃) ₁₄ CO)AKIE-E-NH2 (SEQ ID NO: 123)	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드FG-루프G-스트랜드—NH2</div> <div>BC-루프</div> <div>C 16-지질</div>

화합물 번호	서열	구조				
83.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQ LAPK (MPA- NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO) AQIKE- NH ₂ (SEQ ID NO: 124)	<table><tr><td>BC-루프</td><td rowspan="2"></td></tr><tr><td>BC-루프</td><td></td></tr></table>	BC-루프		BC-루프	
BC-루프						
BC-루프						
84.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQ LAPK A QIKE- NH ₂ (SEQ ID NO: 125)	<table><tr><td>SNTSESEF(BC-루프)</td><td rowspan="2"></td></tr><tr><td>BC-루프</td><td></td></tr></table>	SNTSESEF(BC-루프)		BC-루프	
SNTSESEF(BC-루프)						
BC-루프						
85.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQ LAPK A QIKE- NH ₂ (SEQ ID NO: 126)	<table><tr><td>BC-루프</td><td rowspan="2"></td></tr><tr><td>SNTSESEF (BC-루프)</td><td></td></tr></table>	BC-루프		SNTSESEF (BC-루프)	
BC-루프						
SNTSESEF (BC-루프)						
86.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQ LAPK A QIKE- NH ₂ (SEQ ID NO: 127)	<table><tr><td>SNTSESEF (BC-루프)</td><td rowspan="2"></td></tr><tr><td>SNTSESEF (BC-루프)</td><td></td></tr></table>	SNTSESEF (BC-루프)		SNTSESEF (BC-루프)	
SNTSESEF (BC-루프)						
SNTSESEF (BC-루프)						

화합물 번호	서열	구조
87.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIK (MP A-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO) E-NH ₂ (SEQ ID NO: 128)	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div> <div>링커-MPA</div>
88.	SΨ[CH ₂ NH]NTSESEFK (SΨ[CH ₂ NH]NTSESEF) FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 129)	<div>SΨ[CH₂NH]NTSESEF (BC-루프)</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
89.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIKE- NH ₂ N-말단에서 D-Asn (SEQ ID NO: 130)	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
90.	SNTSESEFK (SNTSESEF) FRVTQLAPKAQIKE- NH ₂ 분기 내의 D-Asn (SEQ ID NO: 131)	<div>SNTSESEF (BC-루프)</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>

화합물 번호	서열	구조
91.	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPK(MPA-NH- CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)AKIEE-NH ₂ (SEQ ID NO: 132)	<div>BC-루프</div> <div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div> <div>링커-MPA</div>
92.	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE (SEQ ID NO: 133)	<div>BC-루프</div> <div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
93.	SΨ[CH ₂ NH]NTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAP KAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 134)	<div>BC-루프</div> <div>SΨ[CH₂NH]NTSESEF(BC-루프)</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
94.	SNTSESEFK(SΨ[CH ₂ NH]NTSESEF)FRVTQLAP KAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 135)	<div>SΨ[CH₂NH]NTSESEF(BC-루프)</div> <div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
95.	SN Ψ[CH ₂ NH]TSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKA QIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 136)	<div>BC-루프</div> <div>SNΨ[CH₂NH]TSESEF(BC-루프)</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>

화합물 번호	서열	구조
96.	SNTSESEFK(SN Ψ[CH2NH]TSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 137)	<div>SNΨ[CH2NH]TSESF(BC-루포)</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스טר랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스טר랜드</div> <div>NH2</div>
97.	SNΨ[CH2NH]TSESEFK(SN Ψ[CH2NH]TSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 138)	<div>SNΨ[CH2NH]TSESF(BC-루포)</div> <div>BC-루포</div> <div>D-스טר랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스טר랜드</div> <div>NH2</div>
98.	SNTSESEFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(CH3(CH2) ¹⁴ CO)AQIKE C-말단 산 (SEQ ID NO: 139)	<div>BC-루포</div> <div>D-스טר랜드</div> <div>FG-루포</div> <div>G-스טר랜드</div> <div>C 16-치 절</div>
99.	SNTSESF-Orn-(SNTSESF)KAQIKE-NH2 (SEQ ID NO: 140)	<div>BC-루포</div> <div>BC-루포</div> <div>Orn</div> <div>G-스טר랜드</div> <div>NH2</div>

화합물 번호	서열	구조
100.	SNTSESF-Dap-(SNTSESF)KAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 141)	
101.	SNTSESF-Dab-(SNTSESF)KAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 142)	
102.	SNTSESF(KSNTSESF)FRVTQLAPK*IAQE*KE-NH ₂ (SEQ ID NO: 143) 아스테라스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	
103.	SNTSESF(KSNTSESF)K*RVTE*LAPKAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 144) 아스테라스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	

화합물 번호	서열	구조
104.	SNTSESFK(SNTSESF)FRK* ¹ QLE* ² PKAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 145) 아스테라스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
105.	SNTSESFK(SNTSESF)FRVE* ¹ QLAK* ² PAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 146) 아스테라스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	<div>BC-루프</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>
106.	LAPKA-NH ₂ (SEQ ID NO: 147)	<div>FG-루프</div> <div>NH₂</div>
107.	LAPKA(SNQTDK)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ (SEQ ID NO: 148)	<div>CC-루프 내지 C-스트랜드</div> <div>D-스트랜드</div> <div>FG-루프</div> <div>G-스트랜드</div> <div>NH₂</div>

△는 리시(K)에 해당

[0299]

[0300]

본 발명의 화합물은, 지질화되고, PEG되고 및/또는 글리코실화되는 펩티드 부분을 포함할 수 있다. 펩티드의 1 이상의 아미노산은 생체 내에서 안정성을 증가시킨다는 면에서 D-아미노산일 수 있다.

[0301]

본 발명은 통상적으로 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와의 조합에 의해 약제 투여를 위해 배합된 상술한 화합물을 포함한다.

[0302]

본 발명은 의학적 치료법, 예를 들면, 암 치료, 세균 및 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 상술한 바와 같은 화합물을 포함한다.

[0303]

본 발명은 또한 PD-1과 PD-1 리간드 사이의 상호작용을 차단하기 위해 화합물을 스크린하는 방법을 포함하며, 이 방법은 상술한 종류의 후보 화합물을 PD-1 또는 PD-1의 부분을 결합하는 PD-1 리간드와 접촉하고 PD-1 리간드 또는 PD-1 리간드의 부분을 결합하는 PD-1과 접촉하는 단계, 및 PD-1/PD-1 리간드의 결합도를 측정하는 단계를 포함한다.

- [0304] 상술한 바와 같이, 본 발명의 화합물은 PEG화에 의해 변형된 펩티드일 수 있다. 중합체는 약물동태학 및 약물력학을 개선하므로 펩티드, 단백질, 및 소분자와 같은 약제의 성능을 개선하기 위해 널리 사용되어 왔다. 약제에 이용하기 위해 가장 널리 사용되는 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG")이다. "PEG화"란 1 이상의 PEG 분자를 약제에 공유결합("coupling")하도록 약제를 화학적으로 변형시키는 방법을 의미한다 (얼마나 많은 부위가 약제 상에서 상호작용하고 PEG에 공액(conjugated)되느냐에 따라 달라짐). 약제의 PEG화와 관련하여 개선된 약학적 및 생물학적 성질은 의학 기술에 잘 알려져 있다. 예를 들면, PEG화는 단백질분해 효소에 의해 열화를 감소하고 그에 따라 약제 농도를 증가하고; 그 효소가 부착되는 약제의 크기를 증가하여 약제 생체분포를 개선하고; 그리고 원하는 경우 면역원성을 감소함에 있어 항원성 에피토프를 차단하는 것을 포함하는 수단에 의해 치료 효과를 증가할 수 있다. 치료 효과를 증가함으로써, 투여 횟수 및/또는 치료 효과를 얻는 데 필요한 약제 투여량을 줄일 수 있다.
- [0305] 선형 폴리에테르로서 PEG는 일반식 $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ (여기서 n 은 통상 약 10~2000임)을 갖는다.
- [0306] PEG는 $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$ (여기서 n 은 통상적으로 약 10~2000임)을 포함하도록 변형될 수 있다.
- [0307] PEG 유도체 (PEG 및 PEG 유도체는 본 기술분야에서 "PEG"로 알려져 있음)를 형성하는 데 있어서 수많은 PEG 변형은 PEG 분자를 약제에 공유결합하기 위해 이용되도록 화학적 반응성 관능기를 부가 또는 변형함에 있어 말단기(관능기)와 관련되어 있다. 여러가지 PEG 유도체가 알려져 있다. PEG를 약제에 결합하기 위해서, 통상적으로 PEG 분자의 관능기는 화학적 반응성을 갖도록 활성화될 필요가 있다. 관능기의 형태 및 특성은 PEG 분자가 결합되는 약제에 대한 화학 반응기의 선택을 기본으로 한다. 단백질 및 펩티드에 대해 가장 일반적인 것으로서, 화학 반응기는 화학 유리 반응기 (예를 들면, 리신, 시스테인, 글루탐산, 세린, 트레오닌 등을 포함, 그러나 이들에 한정되지 않음), N-말단 아미노산 (화학 유리 반응기로서 N-말단 아민 기, 또는 측쇄 아민 기를 가짐), C-말단 아미노산 (화학 유리 반응기로서 C-말단 카복시산, 또는 측쇄 아민 기를 가짐) 또는 이들의 조합물을 함유하는 측쇄를 갖는 내부 아미노산인 아미노산에 존재한다. PEG에 결합될 펩티드의 부위 중에서, 가장 자주 선택되는 것은, 펩티드의 N-말단 아미노산의 N-말단 아민 기 ("알파 아민"), 및 리신 (펩티드의 N-말단 아미노산 또는 C-말단 아미노산이 아닌 아미노산 서열 내에 발견된 리신)의 입실론 아민 기 ("입실론 아민") 또는 리신이 N-말단 아미노산 또는 C-말단 아미노산으로서 펩티드에 존재할 때, 리신의 입실론 아민 기이다.
- [0308] 펩티드에 복수개의 리신 기가 존재하고 그리고 PEG 분자의 복수 결합이 불필요한 경우에, PEG화 과정에서 PEG의 아민-반응성 관능기와 화학 반응으로부터 화학적 보호제로 차단되는 1 이상의 아민기(예를 들면, 1 이상의 알파 아민 또는 입실론 아민)를 합성 과정에서 선택된 아미노산 위치에서 아미노산 서열에 혼입할 수 있고, 그 결과 PEG에 공유결합될 합성 펩티드의 선택된 아미노산 위치에서(화학적 변형을 통해) 유리 아민 기만이 PEG화를 가능하게 된다.
- [0309] PEG화에 사용하기에 바람직한 폴리올은 수용성 폴리 (알킬렌 옥사이드) 중합체를 포함하고, 선형 또는 분기형 사슬을 가질 수 있다. "폴리올"이란 용어는 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG"), 폴리프로필렌 글리콜 ("PPG"), 디에틸렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜, PPG를 포함하는 공중합체 (예, 에틸렌 글리콜/PPG), PEG를 포함하는 공중합체(예, PEG/PPG), mPEG (모노메톡시-폴리 (에틸렌) 글리콜) 등을 포함하는 수용성 폴리알코올을 의미하지만, 이들 화합물에 한정되는 것은 아니다. 적당한 폴리올은 동중중합체 및 공중합체를 포함하며, 본 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 분기형 구조 또는 선형 구조를 포함하는 구조를 가질 수 있다.
- [0310] 바람직하게는, 중합체는 개별적으로 생체내에 이용될 때 사실상 비독성이다. 바람직한 실시양태에서, 중합체는 약 200~40,000 달톤의 분자량을 갖고; 더욱 바람직한 실시양태에서, 중합체는 약 400~10,000 달톤의 분자량을 갖는다. 본 발명에서 이용하기에 바람직한 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG")을 포함하고, 그리고 본 발명에서 이용하기에 더욱 바람직한 중합체는 약 400~20,000 달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0311] 상술한 바와 같이, 통상적으로 말단기 또는 PEG 분자를 약제에 공유결합시키는데 이용되는 화학적 반응성 관능기가 다른 PEG의 여러가지 형태가 있다. 여러 PEG들이 공지되어 있다. 본 발명에 따른 합성 펩티드의 비보호 아민기 1 이상에 결합하는 데 사용하기에 바람직한 PEG는, 1 이상의 비보호 아민기에 PEG를 공유결합하는데 사용될 수 있는 화학적 반응성 기(예를 들면 "관능기")를 갖는다. PEG는 다음과 같은 화합물을 포함할 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다: PEG-트레일레이트, 헥테로이관능성 PEG, PEG 디클로로트리아진, PEG 숙신이미딜 카보네이트, PEG 벤조트리아졸 카보네이트, PEG p-니트로페닐 카보네이트, PEG 트리클로로페닐 카보네이트, PEG 카르보닐이미다졸, PEG 숙신이미딜 숙시네이트, mPEG 숙신이미딜 프로피오네이트, mPEG 숙신이미딜 부타노에이

트, PEG 부티르알데히드, mPEG-프로피온알데히드, PEG 알데히드, PEG-아세트알데히드, PEG 아세트알데히드 디에틸 아세탈, PEG 카르복시산, mPEG 페닐 에테르 숙신이미딜 카보네이트, mPEG 벤즈아미드 숙신이미딜 카보네이트, PEG 티오에스테르, 선형 PEG, 분기된 PEG, 및 선형의 갈라진 PEG.

- [0312] 또한, 본 발명의 화합물은 덴드리머와 같은 운반체 분자, 예를 들면 pAMAM 덴드리머, 리포솜, 마이크로입자 및 나노입자, 이를테면 폴리시아노아크릴레이트 나노입자와 조합될 수 있으며, 그리고 이들은 PEG화 될 수 있다.
- [0313] 본 발명의 화합물과 유사하지만 변형되어 있으며 PD-1 신호전달 경로를 차단하는데 있어 활성을 낮게하는 화합물이 예를 들면 프로토콜을 스크린함에 있어 조절제로서 유용할 수 있다. 이러한 화합물들은 대부분 또는 모든 아미노산이 D-아미노산인 상술한 본 발명의 화합물의 유사체, 대부분 또는 모든 아미노산이 역전된 서열 (레트로-화합물)인 상술한 본 발명의 화합물의 유사체, 그리고 대부분 또는 모든 아미노산이 D-아미노산 또는 레트로 인버스(retroinverso)-화합물인 이러한 레트로-화합물의 유사체로 예상된다.
- [0314] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에서 기술한 화합물에 관한 것으로, 여기서 펩티드 부분의 아미노산 1 이상이 D-아미노산으로 치환된다.
- [0315] 본 발명에서 기술된 화합물은 약제 투여용으로 배합된다.
- [0316] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상술한 화합물 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 의약 조성물을 제공하는 것이다.
- [0317] 본 발명의 또 다른 실시양태는 암을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위해 본 발명에 기술된 화합물의 용도를 제공하는 것이다.
- [0318] 본 발명의 또 다른 실시양태는 세균 및 바이러스 감염을 치료하기 위한 약제를 제조하기 위해 본 발명에서 기술된 화합물의 용도를 제공하는 것이다.
- [0319] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에 따른 화합물 및/또는 펩티드의 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0320] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본 발명에 따른 화합물의 유효량을 환자에 투여함으로써 종양 세포의 성장 및/또는 전이를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0321] 상기 종양 세포는 다음과 같은 암을 포함하지만 이들에 한정되는 것은 아니다: 흑색종, 신장암, 전립선암, 유방암, 결장암 및 폐암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 머리카락의 암, 피부 또는 안구 악성흑색종, 자궁 암, 난소암, 직장암, 항문 부위 암, 위암, 고환암, 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 음문 암종, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비 계통의 암, 갑상샘암, 부갑상샘 암, 부신암, 연조직의 육종, 요도암, 음경암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 만성 림프성 백혈병과 같은 만성 또는 급성 백혈병, 어린이의 고형 종양, 림프성 림프종, 방광암, 신장 또는 요관암, 신우 암종, 중추 신경계(CNS)의 신생물, 일차 CNS 림프종, 종양 혈관형성, 척추축 종양, 뇌 줄기 신경아교종, 하수체선종, 카포시육종, 표피유사 암, 편평상피세포 암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유발된 환경 유발암, 및 상기 암들의 조합.
- [0322] 본 발명의 또 다른 실시양태는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 의해 유발된 면역억제 신호를 억제함으로써 야기된 면역강화를 통해 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공하는데, 이 치료 방법은 본 발명에 따른 화합물 및/또는 펩티드의 유효량을 필요 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0323] 감염성 질병은 다음과 같은 것들이 있으나 이들에 한정되는 것은 아니다: HIV, 인플루엔자, 포진, 편모충, 말라리아, 리슈만편모충(Leishmania), 바이러스 감염 (A, B, 및 C), 포진 바이러스 (예를 들면, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II, 및 CMV, 엡스타인 바 바이러스), 아데노 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키바이러스, 코르노바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 볼거리 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파르브 바이러스, 우두 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기열 바이러스, 유두종 바이러스, 물렁종바이러스, 회색질척수염 바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스 뇌염 바이러스에 의한 병원성 감염; 박테리아 클라미디아, 리케차 박테리아, 미코박테리아, 포도구균, 연쇄구균, 뉴모노코치(pneumococci), 수막구균성 및 코노코치(conococci), 클레브시엘라(klebsiella), 프로테우스, 세라티아(serratia), 슈도모나스, 대장균, 레기오넬라, 디프테리아, 살모넬라, 바실리(bacilli), 콜레라, 파상풍, 보툴리눔독소증, 탄저병, 흑사병, 랩토스피라병 및 라임질환 박테리아에 의한 병원성 감염; 진균 칸디다 (알비칸스, 크루세이, 글라브라타, 트로피칼리스 등), 크립토코쿠스 네오포르만스, 아스페르길루스 (푸미가투스, 니

게르 등), 무코랄스(Mucorales)속 (무코르, 압시디아, 리조푸스), 스포르트릭스 쉐넨키(Sporothrix schenckii), 블라스토마이세스 데르마티티디스 (Blastomyces dermatitidis), 브라질파라코시디오이데스 (Paracoccidioides brasiliensis), 콕시디오이데스 이미티스 (Coccidioides immitis) 및 히스토플라스마 캡슐라툼 (Histoplasma capsulatum)에 의한 병원성 감염; 및 기생충 이질아메바, 대장 발란티듐, 나에글레리아포울레리 (Naegleria fowleri), 가시아메바 종(Acanthamoeba sp.), 람블편모충, 와포자충 종(Cryptosporidium sp.), 쥐폐 포자충, 삼일열원충, 쥐바베스열원충, 트리파노소마 브루세이, 크루스파동편모충, 도너반리슈만편모충, 톡소포 자충, 니포스트롱길루스 브라질리엔시스(Nippostrongylus brasiliensis)에 의한 병원성 감염.

- [0324] 본 발명의 화합물은 의학적 치료 방법에 사용하기 위한 것이다.
- [0325] 본 발명의 화합물은 단일 약제 또는 약학적으로 허용가능한 여러 물질과 혼합되는 의약 조성물로서 사용될 수 있다.
- [0326] 의약 조성물은 통상 비경구 경로로 투여되지만, 경구 또는 흡입 경로로 투여될 수 있다. 비경구 투여의 예로는 주사, 피하, 점막관통, 콧속통과 및 경맥 투여가 있다.
- [0327] 주사 가능한 물질은 용액, 현탁액, 및 사용 전 용매에 용해 또는 현탁되는 고형 주사액이다.
- [0328] 주사액은 1 이상의 활성 성분이 용매에 용해, 현탁 또는 유화된 후 사용된다. 용매의 예로는 수용성 용매 (예를 들면, 증류수, 생리식염수 및 링거액), 오일 용매 (예를 들면, 올리브 기름, 참기름, 목화씨 기름 및 옥수수 기름과 같은 식물성 기름, 및 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 에탄올과 같은 알코올), 및 이들의 조합물이 있다.
- [0329] 또한, 주사액은 다음을 함유할 수 있다: 안정화제 (예를 들면, 인간 혈청 알부민), 용해제 (예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, D-만니톨, 트레할로스, 벤질 벤조에이트, 에탄올, 트리스아미노메탄, 콜레스테롤, 트리에탄올 아민, 탄산나트륨, 구연산나트륨, 살리실산나트륨 및 아세트산나트륨), 현탁제(예를 들면, 계면활성제, 이를테면 스테아릴 트리에탄올 아민, 나트륨 라우릴 설페이트, 라우릴 아미노프로피온산, 레시틴, 벤잘코늄 클로라이드, 벤잘코늄 클로라이드 및 글리세릴 모노스테아레이트; 친수성 중합체, 이를테면 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 히드록시메틸 셀룰로오스, 히드록시메틸 셀룰로오스 및 히드록시프로필 셀룰로오스; 폴리소르베이트; 및 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유), 유화제, 진정제 (예를 들면, 벤질 알코올), 긴장제 (예를 들면, 염화나트륨, 글리세린, D-만니톨, D-소르비톨 및 글루코오스), 완충제, 보존제 (예를 들면, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤질 알코올, 클로로부탄올 및 페놀), 방부제(예를 들면, 파라옥시벤조산 에스테르, 클로로부탄올, 벤질 알코올, 펜에틸알코올, 테하이드로아세트산 및 소르브산), 항산화제 (예를 들면, 설파이트 및 아스코르브산염) 및 분산제 (예를 들면, 폴리소르베이트 80, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 60, 에틸렌 글리콜, 카르복시메틸 셀룰로오스 및 나트륨 알긴산염).
- [0330] 이들 주사제는 조제 기술 분야에서 공지된 방법, 이를테면 여러가지 약전에 설명된 방법에 의해 제조될 수 있다. 주사제는 예를 들면, 최종 단계에서의 멸균법을 통해, 또는 무균 조작법에 의해 제조된다. 또한 무균 고형 배합물, 이를테면 냉동 건조 생성물을 사용할 수 있는데, 여기서 무균 고형 배합물은 사용 전에 주사용 무균 또는 멸균 증류수 또는 기타 용매에 제조 및 용해된다.
- [0331] 이들 비경구 용액은 표준 용량의 용기, 이를테면 플라스틱 또는 유리 바이알, 앰푸울, 주사기 및 인젝터에 넣어져 공급되거나 또는 병과 같은 큰 용량의 용기에 넣어져 공급될 수 있다.
- [0332] 본 발명에 따른 화합물의 투여는 나이, 체중, 증상, 치료 효과, 투여 법 및/또는 치료 시간에 따라 달라진다. 본 발명의 화합물들은 일반적으로 비경구 경로 (바람직하게는 정맥 투여)에 의해, 성인의 경우, 1 ng~100 mg/시간의 양으로, 며칠에 한번, 3일에 한번, 2일에 한번, 하루에 한번 내지 하루 수회 투여될 수 있거나, 또는 하루에 1~24 시간 정맥 투여에 의해 연속적으로 투여될 수 있다. 투여량은 여러 조건에 의해 영향을 받기 때문에, 상기 투여량보다 적은 양으로 때로는 충분히 효과를 내지만, 어떤 경우에는 더 많은 투여량이 필요할 때가 있다.
- [0333] 주사에 의한 비경구 투여는 모든 형태의 주사를 포함하고, 또한 정맥 액을 포함한다. 예를 들면, 근육내 주사, 피하 주사, 피부내 주사, 동맥내 주사, 정맥 주사, 복강내 주사, 척추강(spinal cavity) 주사, 및 정맥 내 방울 주입이 있다.
- [0334] 본 발명의 화합물은, (1) 본 발명에 따른 약제의 예방 및/또는 치료 효과에 대한 보충 및/또는 촉진, (2) 본 발명에 따른 예방 및/또는 치료 약제의 동역학, 흡수 개선, 투여량 감소, 및/또는 (3) 본 발명에 따른 예방 및/또

는 치료 부작용 감소를 위해 기타 약제와 조합되어 투여될 수 있다.

- [0335] 본 발명의 펩티드 및 기타 약제를 포함하는 수반 의약(concomitant medicine)은, 2 성분이 단일 배합물에 함유되는 조합 제제로서 투여되거나 별도의 배합물로서 투여될 수 있다. 별도의 배합물에 의한 투여는 동시 투여 및 수 시간 간격의 투여를 포함한다. 수 시간 간격으로 투여하는 경우에, 본 발명의 화합물이 먼저 투여된 후, 또 다른 약제가 투여되거나, 또는 또 다른 약제가 먼저 투여된 후 본 발명의 화합물이 투여될 수 있다. 각 약제의 투여법은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0336] 기타 약제의 투여량은 임상적으로 사용된 투여량을 기본으로 적절히 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물과 기타 약제의 혼합비는 환자의 나이 및 체중, 투여법, 투여 시간, 치료할 질환, 증상 및 이들의 조합에 따라 적절히 선택될 수 있다. 예를 들면, 기타 약제는 본 발명의 화합물 1 질량부를 기준으로 0.01~100 질량부의 양으로 사용될 수 있다. 기타 약제는 2종 이상의 임의의 약제를 적절한 비로 포함하는 조합물일 수 있다. 본 발명에 따른 화합물의 예방 및/또는 치료 효과를 보충 및/또는 촉진하는 기타 약제는 상기 메커니즘을 기본으로 할 때, 이미 발견된 것뿐만 아니라 장래 발견될 것도 포함한다.
- [0337] 이러한 수반 사용에 의해 예방 및/또는 치료 효과를 나타내는 질병은 특히 제한되지 않는다. 수반 의약은, 본 발명에 따른 화합물의 예방 및/또는 치료 효과를 보충 및/또는 촉진하는 한, 어떠한 질병에도 사용될 수 있다.
- [0338] 특히, 본 발명의 화합물은 림프구 세포를 자극 또는 증식하는 효과를 나타내기 때문에, 다른 약제와 수반하여 사용하면 일반적으로 사용되는 화학치료제의 투여량이나 방사선 치료의 방사선 조사량을 감소할 수 있다. 이는 화학요법 및 방사선 치료에 수반하는 부작용을 억제한다.
- [0339] 본 발명의 화합물은 현존하는 화학치료제와 함께 사용되거나 또는 그 혼합물 형태로 사용될 수 있다. 화학치료제의 예로는 알킬화제, 니트로소우레아제, 항대사물질, 항암 항생제, 식물성 알칼로이드, 국소이성화효소 억제제, 호르몬 약제, 호르몬 길항제, 아로마타제(aromatase) 억제제, P-글리코단백질 억제제, 백금 복합 유도제, 기타 면역 치료 약제 및 기타 항암 약제가 있다. 또한, 이들은 암 치료 보조제, 이를테면 백혈구감소(호중성 백혈구 감소증) 치료약제, 저혈소판증 치료약제, 항구토제 및 암 통증완화제와 함께 사용되거나, 또는 혼합물 형태로 사용될 수 있다.
- [0340] 본 발명의 화합물은 기타 면역조절 물질과 함께 사용되거나 또는 혼합물 형태로 사용될 수 있다. 면역조절물질의 예로는 여러가지 시토킨이 있다. 면역 반응을 자극하는 시토킨스의 예로는 GM-CSF, M-CSF, G-CSF, 인터페론- α , β 또는 γ IL-1, IL-2, IL-3 및 IL-12이 있다.
- [0341] 본 발명에 따른 화합물 및 암 항원을 함께 사용하면 추가 또는 상승 효과를 얻을 수 있다. 암 항원의 예로는 악성 흑색종의 MAGE-1 또는 MAGE-3로부터 유도된 HLA-A1 및 HLA-A2 유도 펩티드, MART-1 및 gp100, 유방 암 및 난소 암의 HER2/뉴펩티드, 아데노 암종의 MUC-1 펩티드 및 전이성 암의 NY-ESO-1가 있다.
- [0342] 본 발명의 화합물은 그의 리간드 분자에 강하고 특이적으로 결합하기 때문에, 그의 라벨링체는 세포 표면 관능성 분자 또는 리간드 분자가 간여하는 질병의 시험 또는 진단 약제 또는 연구 시약으로서 사용될 수 있다.
- [0343] 본 발명의 화합물을 라벨할 수 있는 라벨링체의 예로는 방사성 동위원소, 효소, 형광물질, 발광물질, 자외선 흡수 물질이 있다.
- [0344] 본 발명의 화합물이 효소-연결 면역흡수분석(EIA) 법에 사용될 때, 그 화합물은 효소, 이를테면 알칼리 포스페이트, β -갈락토시다제, 퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제, 글루코오스 옥시다제, 글루코오스-6-포스페이트 탈수소 효소, 아세틸콜린에스테라제, 말레이트 탈수소 효소 및 루시페라제로 라벨링함으로써 사용될 수 있다.
- [0345] 본 발명의 화합물이 방사면역측정(RIA) 법에 사용될 때, 그 화합물은 방사성동위원소, 이를테면 ^{131}I , ^{125}I , $^{90\text{m}}\text{Tc}$, $^{35\text{S}}$, ^{32}P , ^{14}C 및 ^3H 로 라벨링함으로써 사용될 수 있다.
- [0346] 본 발명의 화합물이 형광 면역(FIA) 법에 사용될 때, 그 화합물은 형광물질, 이를테면 플루오레세인, 댄실(dansyl), 플루오레스카민, 쿠마린, 나프틸아민, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 로다민 X 이소티오시아네이트, 설포로다민 101, 루시페(Lucifer) 옐로우, 아크리딘, 아크리딘 이소티오시아네이트, 리보플라빈 및 그 유도체, 그리고 유로피움(Eu)으로 라벨링함으로써 사용될 수 있다.
- [0347] 본 발명의 화합물이 화학발광 면역분석 (CLIA)법에 사용될 때, 그 화합물은 발광물질, 이를테면 루미놀 유도체, 예를 들면, 루시페린, 이소루미놀, 루미놀, 아미노에틸 이소루미놀, 아미노에틸에틸 이소루미놀, 아미노프로필 이소루미놀, 아미노부틸 이소루미놀 및 아미노헥실에틸 이소루미놀; 루시페린; 루시게닌; 및 비스(2,4,6-트리플

루오로페닐) 옥살레이트로 라벨링함으로써 사용될 수 있다.

[0348] 본 발명의 화합물이 자외선 흡수법에 사용될 때, 그 화합물은 특정 자외선 파장에서 흡수를 갖는 물질, 이를테면 페놀, 나프톨, 안트라센 및 그 유도체로 라벨링함으로써 사용될 수 있다.

[0349] 본 발명의 화합물이 전자 스핀 공명 (ESR) 법에 사용될 때, 그 화합물은 옥실 기를 갖는 화합물, 이를테면 4-아미노-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실, 3-아미노-2,2,5,5-테트라메틸피롤리딘-1-옥실, 2,6-디-*t*-부틸- α -(3,5-디-*t*-부틸-4-옥소-2,5-시클로헥사디엔-1-일리덴)-*p*-톨일옥실로 나타내지는 스핀 라벨링제로 라벨링함으로써 사용될 수 있다.

[0350] 또한, 본 발명의 화합물은 본 기술분야에서 통상적으로 사용되는 어떠한 라벨링제로도 라벨될 수 있다.

[0351] 상기 라벨링제를 본 발명에 따른 화합물의 펩티드 부분에 결합하기 위해서, EIA, RIA, FIA 등에 통상적으로 실시되는 공지된 라벨링 방법들, 이를테면 "Medical Chemistry Experimental Course, 제 1판., Vol. 8, 발행인 U. Yamamura, Nakayama Bookstore 출판, 1971; Illustrated Fluorescent Antibody, 제 1판, A. Kawao 저, Softscience 출판, 1983; 및 Enzyme-linked immunoassay, 제 2판, 편집인 E. Ishikawa, T. Kawai 및 K. Muroi, Igakushoin 출판, 1982"에 기재된 방법들이 이용된다.

[0352] 이들 라벨링 방법 중에서, 바람직한 방법은 아비딘 (또는 스트렙타비딘)과 비오틴 간의 반응을 이용하는 방법이다. 아비딘 (또는 스트렙타비딘)과 비오틴 간의 반응을 이용하는 경우에, 비오틴을 본 발명에 따른 화합물의 펩티드 부분과 결합하는 방법은 시중에서 구입할 수 있는 비오틴화제[예를 들면, 숙신이미드 기 (예를 들면, NHS-비오틴)가 도입되는 비오틴 또는 N-히드록시숙신산 이미드(NHS)를 스페이서를 통해 비오틴과 결합함으로써 제조된 약품]를 단백질 내의 아미노 기와 반응시키는 방법 ('Biological Chemistry' 잡지, 1989, Vol. 264, pp.272-279); 시중에서 구입할 수 있는 비오틴-HPDP (N-[6-(비오틴아미드)헥실]-3'-(2'-피리딜티오)프로피온 아미드) 또는 N-요도아세틸-N-비오틴일헥실렌디아민을 단백질 내의 티올 기와 반응시키는 방법 (Ann. New York Acad. Sci., 1975, Vol. 254, No. 203); 또는 히드라진 기가 도입되는 비오틴을 알데히드화 단백질 내의 알데히드 기와 반응시키는 방법 (Biotech. Appl. Biochem., 1987, Vol. 9, pp.488-496)이 있다.

[0353] 본 발명은 이하 실시예에 의해 더욱 상세히 설명된다.

[0354] 자동화 펩티드 합성이 프로테인 테크놀로지 인코포레이티드(Protein Technologies Inc.) 제품의 "심포니 패럴렐 합성기(Symphony Parallel Synthesizer)"에서 실시되었다.

[0355] 심포니 패럴렐 합성기를 사용한 시험법(프로토콜)

[0356] [표 1] 팽윤을 위한 프로그램, 제1 잔기 부착 및 컵핑

번호	단계	시간
1	DCM (7.5 mL)	30 분 x 2
2	DMF (7.5 mL)	30 분 x 2
3	보호해제: 20 % 피페리딘/DMF (5 mL)	7.30 분 x 2
4	세척: DMF, DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3 회
5	결합: 0.25 M Fmoc AA (2.5 mL)/0.25 M HBTU/1 M NMM/DMF (2.5 mL)	2 시간 x 1
6	DMF, DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3 회
7	아실화 (아세트산 무수물:피리딘:DCM: 1:8:8) (5 mL)	7.30 분 x 2
8	DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3 회

[0357]

[0358] [표 2] 아미노산을 결합하기 위한 프로그램

번호	단계	시간
1	보호해제: 20 % 피페리딘 /DMF (5 mL)	7.30 분 x 2
2	세척: DMF, DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3 회
3	결합: 0.25 M Fmoc AA (2.5 mL)/0.25 M HBTU/1 M NMM/DMF (2.5 mL)	2 시간 x 1
4	DMF, DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3 회

[0359]

[0360] [표 3] N-말단 아미노산의 결합 프로그램

번호	단계	시간
1	보호해제: 20 % 피페리딘 /DMF (5 mL)	7.30 분 x 2
2	세척: DMF, DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3회
3	Coupling : 0.25 M Fmoc AA (2.5 mL)/0.25 M HBTU/1 M NMM/DMF (2.5 mL)	2 시간 x 1
4	DMF, DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3회
5	보호해제: 20 % 피페리딘 /DMF (5 mL)	7.30 분 x 2
6	세척: DMF, DCM, DMF (10 mL)	30 초 x 각 3회

[0361]

[0362] 펩티딜 수지의 분해 및 전체적인 보호해제의 과정

[0363] 펩티딜 수지를 MeOH (6 x 15 ml) 및 용매 에테르 (3 x 15 ml)로 세척한 후 진공 하에 건조하였다. 고체 지지체로부터 펩티드의 분해는 펩티드-수지를 실온에서 2.5 시간 동안 각 펩티드에 대해 명시된 분해 혼합물(cleavage cocktail)로 처리함으로써 이루어진다. 분해 혼합물을 여과 수집한 후, 수지를 TFA 및 DCM으로 세척하였다. 과량의 TFA 및 DCM을 질소 하에서 소량으로 농축한 후, DCM을 잔류물에 첨가한 다음 질소 하에서 증발시켰다. 이러한 공정을 3~4회 반복하여 대부분의 휘발성 불순물을 제거하였다. 잔류물을 0℃까지 냉각한 후, 무수 에테르를 첨가하여 펩티드를 침전시켰다. 침전된 펩티드를 원심분리한 후, 상청액 에테르를 제거한 다음, 새로운 에테르를 펩티드에 첨가하여 다시 원심분리하였다. 잔류물을 밀리포어(Millipore) 물에 용해한 후, 동결건조하여 원(crude) 펩티드를 얻었다.

[0364] 분해 혼합물 A= 82.5% TFA/5% 페놀/5% 티오아니솔/2.5% 1,2-에탄디티올/5% 물

[0365] 분해 혼합물 B= 80% TFA/5% 페놀/5% 티오아니솔/2.5% 1,2-에탄디티올/5% DCM/ 2.5 % DMS

[0366] 분해 혼합물 C= 90% TFA/5% TIPS/5% 물

[0367] 펩티드의 정제 및 특성화

[0368] Zorbax Eclipse XDB-C18 실리카 컬럼 (4.6 mm x 250 mm, 5 μm)을 이용하여 역전 상 분석 HPLC를 실시하였다.

[0369] 이용된 용출(elution) 조건은 다음과 같다:

[0370] 방법-1: 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴/물(9:1) 내의 0.1% TFA.

[0371] 2 % 완충액 B로 채워진 컬럼의 평형화 및 2%~70% 완충액 B에 의해 15분 동안 용출.

[0372] 방법-2: 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴/물(9:1) 내의 0.1% TFA.

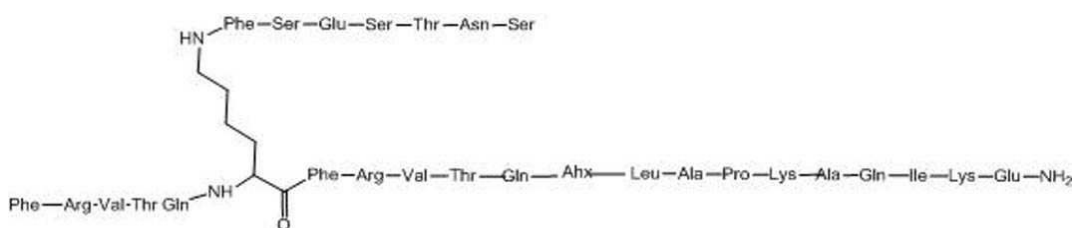
[0373] 2 % 완충액 B로 채워진 컬럼의 평형화 및 2%~25% 완충액 B에 의해 5 분 및 25%~40% 완충액 B에 의해 총 작업 시간 20 분 동안 용출.

[0374] 방법-3: 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴/물(9:1) 중 0.1% TFA.

[0375] 2 % 완충액 B로 채워진 컬럼의 평형화 및 0~15 분=2~70% 완충액 B, 15~20 분 = 70~95 % 완충액 B의 차에 의한 용출.

[0376] LCMS는, Mercury MS 컬럼을 사용하고, G1315 B DAD 다이오드 어레이 검출기를 갖는 Agilent 1100 시리즈 HPLC로 AP1 2000 LC/MS/MS 트리플 쿼드(triple quad) (이용된 바이오시스템) 상에서 실시되었다.

[0377] 실시예 1; 하기 화합물의 합성



[0378]

[0379] (서열 ID NO 47)

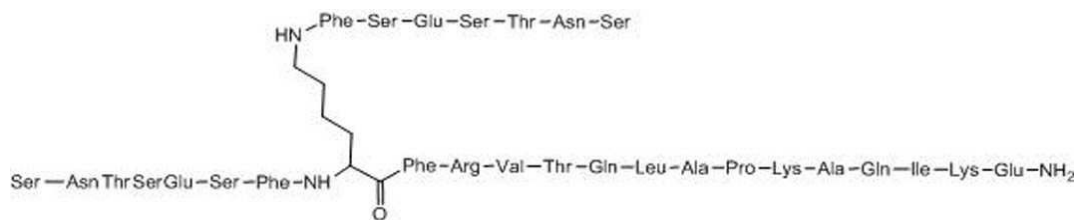
[0380] 선형 단편의 합성: FRVTQKFRVTQ[Ahx]LAPKAQIKE-NH2

[0381] 건조된(desiccated) CLEAR-아미드 수지 ((100-200 메쉬) 0.4 mmol/g, 0.5 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 2 개의 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기(Symphony parallel synthesizer) (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I 의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티드 수지의 캡핑(capping)을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적인 아미노산 결합(coupling)을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ahx-OH (Fmoc-6-아미노헥사노산), Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다. 자동 펩티드 합성기에서 선형 합성 단편화를 종료한 후, 수지를 꺼낸 후 함께 모은 후 수동으로 합성을 실시하였다.

[0382] 펩티드의 선형 사슬에 있는 N-말단 아미노산 페닐알라닌은 N-Fmoc 아미노산에 이용되는 것과 동일한 방법으로 N-Boc 아미노산으로서 결합되었다. 분기점으로서 사용된 제6 리신 (N 말단으로부터)의 ε-아미노기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ε-아미노기의 Dde 보호는 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 5 및 15 분 동안 처리함으로써 직각 방향으로(orthogollally) 보호해제되었다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. 보호해제는 포지티브 닐히드린 시험에 의해 확인되었다. 무수 DMF 내의 **Fmoc-Phe-OH** (0.39 g; 5 당량, 1 mmol)를 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.16 mL; 5 당량) 및 HOBT (0.14 g; 5 당량)로 결합반응(coupling)을 개시하였다. 반응 혼합물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 회전기에 의해 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. 결합 종료 시 펩티드 수지 일정부분(aliquot)에 관한 카이저(Kaiser) 시험은 네가티브이었다. 펩티드 수지의 Fmoc 기는 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 5 및 15 분 (10 mL) 동안 2회 처리함으로써 보호해제 되었다. 수지를 DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 그 다음, 무수 DMF 내의 펩티드 서열 **Fmoc-Ser (OtBu)-OH** (0.39 g; 5 당량 1 mmol)에서 아미노산을 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.16 mL; 5 당량) 및 HOBT (0.14 g; 5 당량)로 결합을 개시하였다. 반응 혼합물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 회전기로 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 세린 결합의 종료 시, 세린 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (10 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 그 다음, 무수 DMF 내의 아미노산 **Fmoc-Glu (OtBu)-OH** (0.43 g; 5 당량 1 mmol)을 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.16 mL; 5 당량) 및 HOBT (0.14 g; 5 당량)로 결합을 개시하였다. 반응 혼합물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 회전기로 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티드 수지 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (10 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 그 다음, 무수 DMF 내의 아미노산 **Fmoc-Ser (OtBu)-OH** (0.39 g; 5 당량 1 mmol)을 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.16 mL; 5 당량) 및 HOBT (0.14 g; 5 당량)로 결합을 개시하였다. 반응 혼합물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 회전기로 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티드 수지 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (10 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 그 다음, 무수 DMF 내의 아미노산 **Fmoc-Thr (OtBu)-OH** (0.4 g; 5 당량 1 mmol)을 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.16 mL; 5 당량) 및 HOBT (0.14 g; 5 당량)로 결합을 개시하였다. 반응 혼합물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 회전기로 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티드 수지 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (10 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 그 다음, 무수 DMF 내의 아미노산 **Fmoc-Asn (Trt)-OH** (0.6 g; 5 당량 1 mmol)을 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.16 mL; 5 당량) 및 HOBT (0.14 g; 5 당량)로 결합을 개시하였다. 반응 혼합

물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 회전기로 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL) 로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티드 수지 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (10 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 그 다음, 무수 DMF 내의 아미노산 **Fmoc-Ser (OtBu)-OH** (0.39 g; 5 당량 1 mmol)을 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.16 mL; 5 당량) 및 HOBt (0.14 g; 5 당량)로 결합을 개시하였다. 반응 혼합물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 회전기로 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL) 로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티드 수지 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (10 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 A를 사용하여 펩티드 수지를 분할하여 수율 69%로서 450 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 아세트니트릴/물(9:1) 내의 완충액 B: 0.1% TFA로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (9.4 mm x 250 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질(crude material)을 정제하였다. 5 mL/분의 유속으로 구배 용리(gradient elution) 0~5 분 = 5~20 % 완충액 B, 5~40 분 = 20~35 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 2): 실온, 14.6 분 (94.4%); LCMS 이론 질량: 3237.83, 측정 질량: 1619.9 $[M/2+H]^+$; 1080.2 $[M/3+H]^+$

[0383] 실시예 2: 하기 화합물의 합성



[0384]

[0385] (서열 ID NO 49)

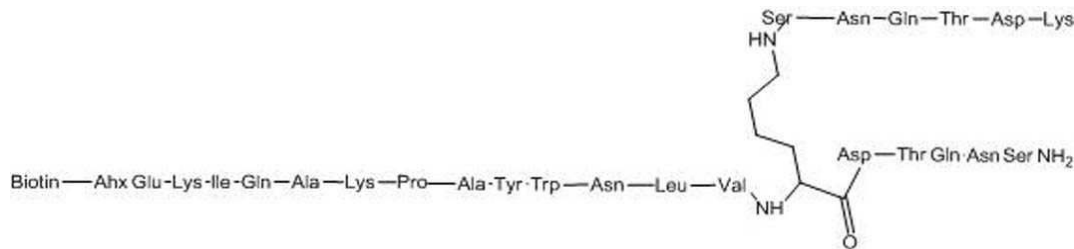
[0386] 선형 단편- Fmoc-FRVTQLAPKAQIKE의 합성

[0387] 건조된 CLEAR-아미드 수지 ((100-200 메쉬) 0.4 mmol/g, 0.5 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 2개의 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 평운하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티드 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적인 아미노산 결합을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다. Fmoc-Phe-OH 결합 종료 후, 수지를 펩티드 합성기로부터 꺼낸 다음, 하기와 같이 결합을 수동으로 실시하였다.

[0388] 자동 합성기로부터 얻어진 Fmoc-Phe-OH 펩티드 수지를 프릿(frit) 처리된 유리 용기에 넣었다. 펩티드 수지의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (10 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 15 mL), DCM (6 x 15 mL) 및 DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 무수 DMF 내의 **Fmoc-Lys (Fmoc)-OH** (0.48 g; 4 당량, 0.8 mmol)를 보호해제된 수지에 첨가한 후, DMF 내의 DIC (0.15 mL; 5 당량, 1 mmol) 및 HOBt (0.08 g; 5 당량, 0.6 mmol)로 결합을 개시하였다. 반응 혼합물 중 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 회전기로 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 15 mL), DCM (6 x 15 mL) 및 DMF (6 x 15 mL)로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티드 수지 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (15 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 15 mL), DCM (6 x 15 mL) 및 DMF (6 x 15 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. Fmoc-Lys(Fmoc)-부착 펩티드 수지 상의 Fmoc 기를 보호해제한 후, 수지 함량(loading)에 대해 8 당량 과량의 아미노산 (1.6 mmol), 8 당량 과량의 HOBt (0.22 g, 1.6 mmol) 및 10 당량 과량의 DIC (0.32 mL, 2 mmol)를 사용하여 유리 아미노 말단 모두로부터 펩티드 사슬을 성장시켰다. 실온에서 3 시간 동안 결합을 실시하였다. 펩티드 수지에 결합된 아미노산은 Fmoc-Phe-OH (0.62 g; 8 당량, 1.6 mmol)이었다.

mmol), Fmoc-Ser (OtBu)-OH (0.62 g; 8 당량, 1.6 mmol), Fmoc-Glu (OtBu)-OH (0.68 g; 8 당량, 1.6 mmol), Fmoc-Ser (OtBu)-OH (0.62 g; 8 당량, 1.6 mmol), Fmoc-Thr (OtBu)-OH (0.64 g; 8 당량, 1.6 mmol), Fmoc-Asn (Trt)-OH (0.95 g; 8 당량, 1.6 mmol) 및 Boc-Ser (OtBu)-OH (0.41 g; 8 당량, 1.6 mmol)로서 N-말단 아미노산이었다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 A를 사용하여 펩티딜 수지를 분할함으로써 수율 70%로 565 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (9.4 mm x 250 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~5 분 = 5~10 % 완충액 B, 10~20 분 = 29 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12 분 (96 %); LCMS 이론 질량: 3261.62, 측정 질량: 1631.6 [M/2+H]⁺; 1088 [M/3+H]⁺; 816.2[M/4+H]⁺;

[0389] 실시예 3: 하기 화합물의 합성



[0390]

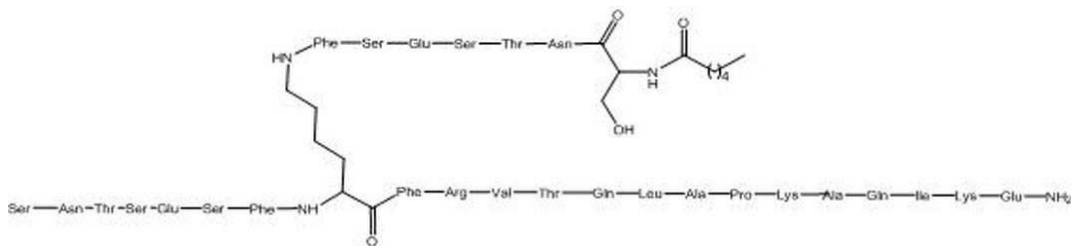
[0391] (서열 ID NO 102)

[0392] 건조된 CLEAR-아미드 수지 ((100-200 메쉬) 0.49 mmol/g, 0.5 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 2개의 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 평운하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Ser (OtBu)-OH] 부착 및 펩티딜 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적인 Fmoc-아미노산 결합을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ahx-OH이었다. 비오틴 결합의 경우에, 비오틴 (2.5 mL DMF 내의 0.15g)을 DMF/DMSO (1:1)에 용해한 후, 자동 펩티드 합성기 내의 반응 용기에 수동으로 첨가한 다음, 표 II의 단계 3 및 4에서처럼 결합반응을 계속하였다(아미노산 대신 비오틴 사용).

[0393] Dde 기의 직각방향 보호해제

[0394] 분기점으로서 사용된 제16 잔기 리신(N 말단으로부터)의 ϵ -아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ϵ -아미노 기의 Dde 보호는 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가하고 자동 합성기에서 직각 방향으로 보호해제되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 패럴렐 합성기에서 수동으로 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 Fmoc-Ser (OtBu)-OH으로 출발하여 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 분기된 펩티딜 수지 내의 N-말단 산에 표 III의 프로그램을 이용하여 Fmoc-Lys(Boc)-OH를 결합하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 B를 사용하여 펩티딜 수지를 분할함으로써 수율 65%로 516 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (9.4 mm x 250 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~4 분 = 10 % 완충액 B, 4~25 분 = 10~28 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 11.94 분 (96 %); LCMS 이론 질량: 3245.69, 측정 질량: 1623 [M/2+H]⁺; 1082.3 [M/3+H]⁺; 811.8 [M/4+H]⁺;

[0395] **실시예 4:** 하기 화합물의 합성



[0396]

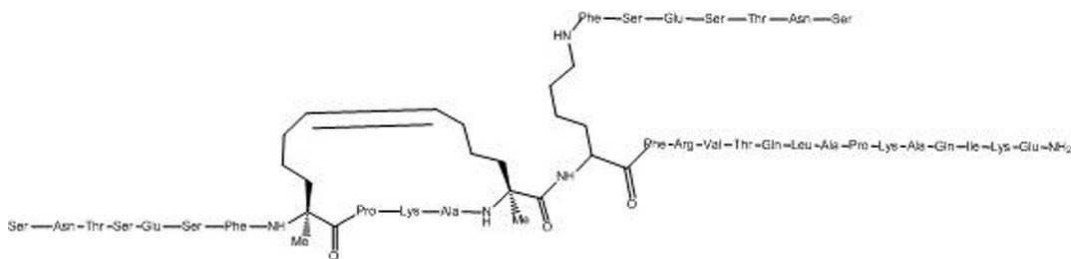
[0397] (서열 ID NO 61)

[0398] 건조된 CLEAR-아미드 수지 ((100-200 메쉬) 0.4 mmol/g, 0.3 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티딜 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적인 Fmoc-아미노산 결합을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다.

[0399] **Dde 기의 직각방향 보호해제**

[0400] N-Fmoc 아미노산에 이용된 것과 동일한 방법으로 N-말단 아미노산 Ser(OtBu)-OH를 펩티드의 선형 사슬에 N-Boc 아미노산으로서 결합하였다. 분기점으로서 사용된 제15 잔기 리신 (C-말단으로부터)의 ε-아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ε-아미노 기의 Dde 보호는 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가하고 자동 합성기에서 직각 방향으로 보호해제 되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 패럴렐 합성기에서 수동 프로그램으로 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 Fmoc-Phe-OH로 출발하여 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. 헥사노산(0.22g, 2.5 mL DMF)을 사용하여 N-말단 아미노산 결합을 실시한 후, 자동 펩티드 합성기 내의 반응 용기에 수동으로 첨가한 다음, 표 II의 단계 3 및 4 에서처럼 결합반응을 계속하였다(아미노산 대신 헥사노산 사용). 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 A를 사용하여 펩티딜 수지를 분할함으로써 수율 74%로 320 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트ونی트릴/물(9:1) 내의 0.1% TFA로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (9.4 mm x 250 mm, 5 μm)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~25분 = 5~50 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.8분(94.4%); LCMS 이론 질량: 3359.62, 측정 질량: 1680.3 [M/2+H]⁺; 1120.4 [M/3+H]⁺; 840.5 [M/4+H]⁺

[0401] **실시예 5:** 하기 화합물의 합성



[0402]

[0403] (서열 ID NO 64)

[0404] 2개의 반응 용기에서 심포니 패럴렐 합성기를 사용하여 펩티드로부터 투명한 아미드 수지(0.46 mmol/g; 500 mg) 상에서 실시예 5의 합성을 실시하였다. 표 1의 시험법에 따라 제1 아미노산 부착 및 펩티딜 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 2의 설명에 따라 후속적으로 아미노산 결합을 실시하였다. 위치 8 및 12의 결합을 위해 자동 합성하는 동안, 표 II의 세척 단계 (단계 2) 후에 Fmoc-(R)-2-(4'-펜테닐) 알라닌을 수동으로 첨가한 다음, 표 2의 단계 3, 4에 언급된 시약을 프로그램에 따라 수동으로 첨가하여 서열을 중단하고, 그리고 후속적으로 아미노산 결

합을 위해 서열을 재개하였다. Fmoc-아미노산을 위해 사용된 유사한 방법을 이용하여 Boc 아미노산으로서 N-말단 아미노산을 부착하였다.

[0405] Dde 기의 직각방향 보호해제

[0406] C-말단으로부터 제15 잔기 리신의 ε-아미노 기는 분기점으로서 사용되고 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ε-아미노 기의 Dde 보호는 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가하고 자동 합성기에서 직각 방향으로 보호해제되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 수동 프로그램으로 다시 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 Fmoc-Phe-OH로 출발하여 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. Fmoc-아미노산을 위해 사용된 유사한 방법을 이용하여 Boc 아미노산으로서 N-말단 아미노산을 부착하였다.

[0407] 올레핀성 아미노산의 스티칭(Stitching)

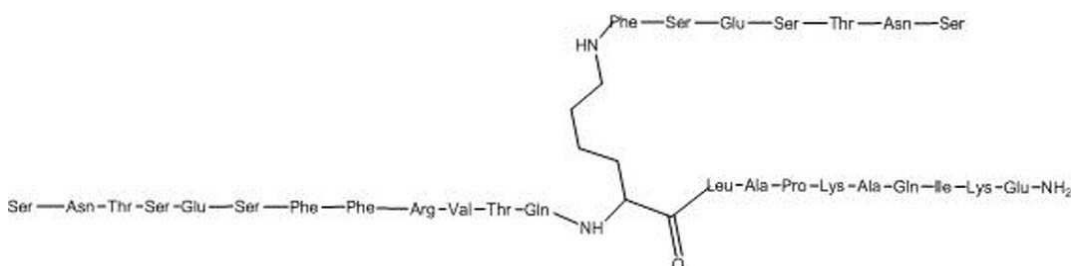
[0408] 소결된 디스크를 갖는 20 mL 용량의 맞춤형 고체상 펩티드 용기에서 2개의 올레핀성 아미노산의 스티칭(stitching)을 실시하였다. 선형 펩티드 서열의 종료 후, 탈기된 1,2-디클로로에탄(DCE) 내의 20 mol% Grubbs 촉매(1.7 g, 15 mL)를 사용하여 실온에서 2 시간 동안 수지 결합 N-말단 캡핑된 펩티드의 고리 폐쇄 병부전위(closure metathesis)를 실시하였다. 2 시간 후 수지를 DCE, DCM, 메탄올로 세척한 다음, 진공에서 철야 건조하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 C를 사용하여 펩티드 수지를 분할함으로써 수율 63%로 530 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트오니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼(9.4 mm x 250 mm, 5 μm)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~30 분 = 10~80 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.9 분(95.4%); LCMS 이론 질량: 3697, 측정 질량: 1232.5 [M/3+H]⁺; 924.9 [M/4+H]⁺; 740.2[M/5+H]⁺

[0409] 실시예 6: 하기 화합물의 합성

[0410] Ser-Asn-Thr-Ser-Glu-Ser-Phe-Lys-Ser-Asn-Thr-Ser-Glu-Ser-Phe-Phe-Arg-Val-Thr-Gln-Leu-Ala-Pro-Lys-Ala-Gln-Ile-Lys-Glu-NH₂ (서열 ID NO 69)

[0411] 건조된 CLEAR-아미드 수지((100-200 메쉬) 0.46 mmol/g, 0.25 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기(PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 평운하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티드 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적으로 Fmoc-아미노산을 결합하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH이었다. 표 III의 프로그램에 대하여 N-말단 아미노산 Fmoc-Ser(OtBu)를 결합하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 A를 사용하여 펩티드 수지를 분할함으로써 수율 70%로 265 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트오니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼(9.4 mm x 250 mm, 5 μm)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~30 분 = 10~80 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.04 분(95.2%); LCMS 이론 질량: 3261.8, 측정 질량: 1630.7 [M/2+H]⁺; 1087.5 [M/3+H]⁺;

[0412] 실시예 7: 하기 화합물의 합성



[0413]

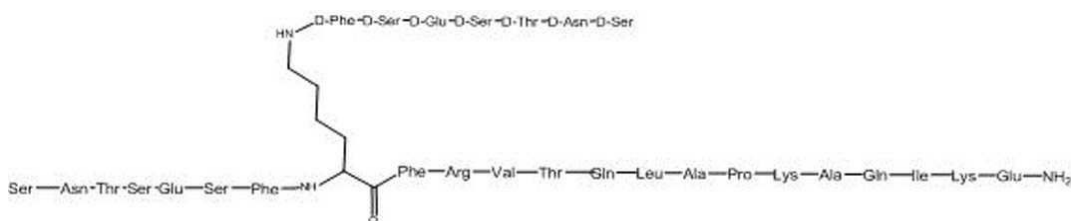
[0414] (서열 ID NO 83)

[0415] 건조된 CLEAR-아미드 수지 ((100-200 메쉬) 0.4 mmol/g, 0.3 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티딜 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에 나타난 바와 같이 후속적으로 아미노산 결합을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다.

[0416] **Dde 기의 직각방향 보호해제**

[0417] 펩티드의 선형 사슬에서 N-Fmoc 아미노산에 이용된 것과 동일한 방법으로 N-말단 아미노산 Ser(OtBu)-OH를 N-Boc 아미노산으로서 결합하였다. 분기점으로서 사용된 제13 잔기 리신의 ϵ -아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ϵ -아미노 기의 Dde 보호는 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가하고 자동 합성기에서 직각 방향으로 보호해제 되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 Fmoc-Phe-OH로 출발하여 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. 표 III의 프로그램에서와 같이 N-말단 아미노산 Fmoc-Ser(OtBu)를 결합하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 A를 사용하여 펩티딜 수지를 분할함으로써 수율 74%로 320 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세토니트릴 내의 0.1% TFA로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 Prep-HT 컬럼 (21.2 mm x 150 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 18 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~5 분 = 5~20 % 완충액 B, 5~22 분 = 20~30 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.5 분 (97.6 %); LCMS 이론 질량: 3261.62, 측정 질량: 1631.6 [M/2+H]⁺; 1088 [M/3+H]⁺; 816.2 [M/4+H]⁺;

[0418] **실시예 8: 하기 화합물의 합성**



[0419]

[0420] (서열 ID NO 88)

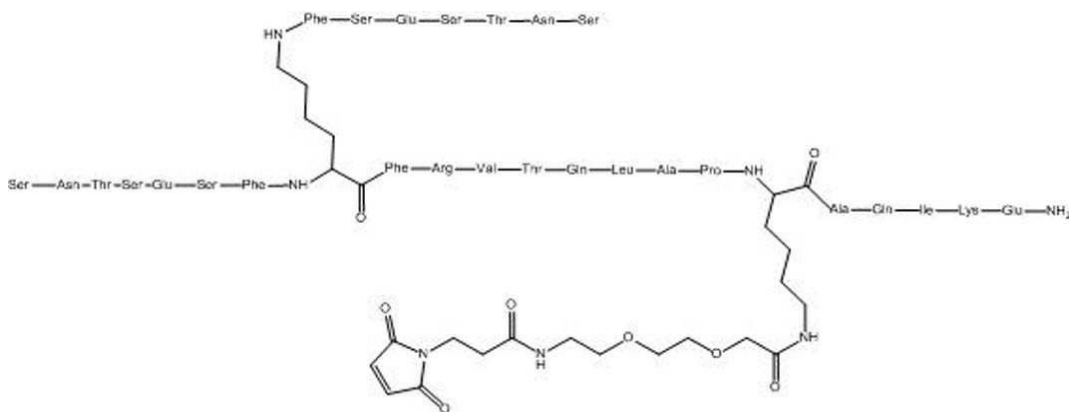
[0421] 건조된 CLEAR-아미드 수지 ((100-200 메쉬) 0.4 mmol/g, 0.3 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티딜 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에 나타난 바와 같이 후속적으로 아미노산 결합을 실시하였다. 수지 함량에 대해 5 당량 과량의 아미노산 및 결합제를 사용하여 결합을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다.

[0422] **Dde 기의 직각방향 보호해제**

[0423] N-Fmoc 아미노산에 이용된 것과 동일한 방법으로 N-말단 아미노산 Ser(OtBu)-OH를 펩티드의 선형 사슬에 N-Boc 아미노산으로서 결합하였다. 분기점으로서 사용된 제8 잔기 리신의 ϵ -아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ϵ -아미노 기의 Dde 보호는 자동 합성기에서 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가함으로써 자동 합성기에서 직각 방향으로 보호해제 되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 Fmoc-D-Phe-OH 로 출발하여 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 D-아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-D-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-D-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH이었다. 표 III의 프로그램에서와 같이 N-말단 아미노산 Fmoc-D-Ser(OtBu)를 결합하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 A를 사용하여 펩티딜 수지를 분할함으

로써 수율 89%로 350 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴 내의 0.1% TFA로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 Prep-HT 컬럼 (21.2 mm x 150 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 18 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~5 분 = 5~20 % 완충액 B, 5~18 분 = 20~27 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.06 분 (96.6%); LCMS 이론 질량: 3261.6, 측정 질량: 1631.6 $[M/2+H]^+$; 1088 $[M/3+H]^+$; 816.2 $[M/4+H]^+$;

[0424] **실시예 9:** 하기 화합물의 합성



[0425]

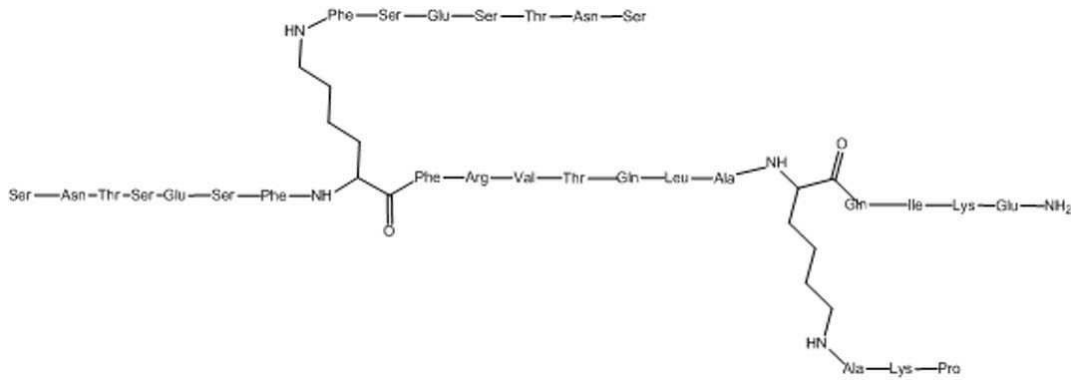
[0426] (서열 ID NO 124)

[0427] 건조된 Rink-아미드 MBHA 수지 ((100~200 메쉬) 0.66 mmol/g, 1 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 4개의 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티드 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적으로 아미노산을 결합하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다. 선형 서열에서 N-말단으로부터 제 8 아미노산 Lys가 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH로서 결합되었다. 그 다음 잔기로부터 계속하여(Fmoc-Phe-OH), 10 당량 과량의 아미노산 (1 M NMM/DMF 내의 0.25 M 아미노산, 0.25 M HBTU 각 5 mL)으로 표 II에서와 같이 후속적인 아미노산의 결합을 실시하고, 결합을 위해 수지 함량에 대한 결합제를 사용하였다. 펩티드의 두 N-말단에서 N-말단 아미노산 Ser(OtBu)-OH는 N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로 N-Boc 아미노산으로서 결합되었다.

[0428] **Dde 기의 직각방향 보호해제**

[0429] 분기점으로서 사용된 N-말단으로부터 제17 잔기 리신의 ϵ -아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ϵ -아미노 기의 Dde 보호는 자동 합성기에서 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가함으로써 직각 방향으로 보호해제되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 수동 프로그램을 이용하여 다시 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 Fmoc-8-아미노 3,6-디옥사옥타노산 (0.24 g, 2.5 mL DMF) 및 말레이미도 프로파노산 (0.1 g, 2.5 mL DMF)로 출발하여 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 C를 사용하여 펩티드 수지를 분할함으로써 수율 70%로 1.6g을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴로 채워진 Phenomenex-C18 실리카 컬럼 (10 mm x 250 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 6 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~9 분 = 10~15 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 11.7 분 (95 %); LCMS 이론 질량: 3557.09, 측정 질량: 1779.8 $[M/2+H]^+$ 1187.1 $[M/3+H]^+$

[0430] 실시예 10: 하기 화합물의 합성



[0431]

[0432] (서열 ID NO 77)

[0433] 건조된 CLEAR -아미드 ((100-200 메쉬) 0.4 mmol/g, 0.3 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티드 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적으로 아미노산을 결합하였다. 선형 서열에서 N-말단으로부터 제 8 아미노산 Lys가 Fmoc-Lys(Dde)-OH로서 결합되었다. 선형 사슬의 제 16 리신 잔기는 Fmoc-Lys (Alloc)-OH로서 결합되었다. N-말단 아미노산 Ser(OtBu)-OH는 N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로 N-Boc 아미노산으로서 결합되었다.

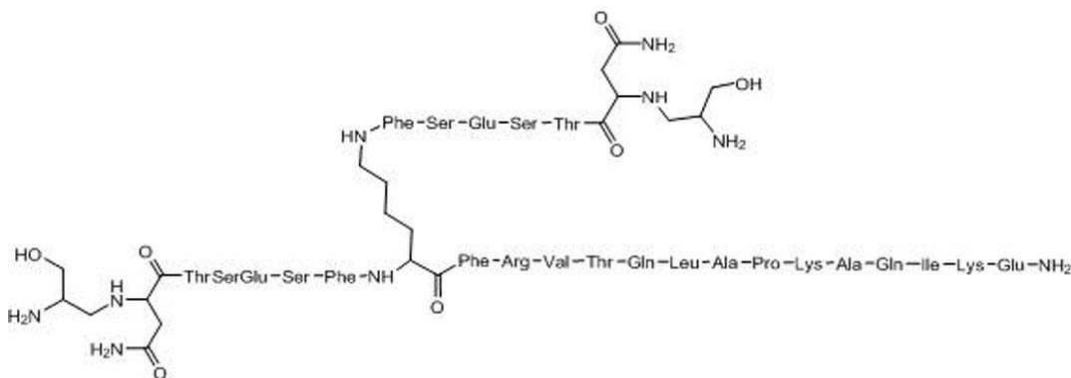
[0434] Dde 기의 직각방향 보호해제

[0435] 분기점으로서 사용된 N-말단으로부터 제8 잔기 리신의 ϵ -아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬을 종료한 후, 리신의 ϵ -아미노 기의 Dde 보호는 자동 합성기에서 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가함으로써 직각 방향으로 보호해제되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 수동으로 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 사용된 아미노산은 Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로, 분기 내의 N-말단 아미노산, 펩티드의 선형 사슬 중 Ser(OtBu)-OH를 N-Boc 아미노산으로서 결합하였다.

[0436] Alloc 보호기의 보호해제

[0437] 선형 서열에서 추가 분기점을 개시하기 위해서 N-말단으로부터 제16 잔기 리신의 ϵ -아미노 기는 Lys(Alloc)로서 결합되었다. Lys (Alloc)의 Alloc 보호기는 클로로포름/N-메틸피롤리딘 (95/5 v/v)의 용액 중에서 테트라키스트리페닐포스핀 팔라듐(0) (5 당량; 2.8 g) 및 페닐실란 (10 당량 0.65 mL)으로 6 시간 동안 아르곤 하에 처리함으로써 펩티드 수지로부터 제거되었다. 클로로포름(6 x 10 mL) 내의 10% NMP, DMF (6 x 10 mL) 내의 1% DIEPA, DCM (6 x 10 mL), DMF (6 x 10 mL)의 용액으로 수지를 세척하였다. Alloc 보호해제를 종료한 후, 수지를 자동 펩티드 합성기에 다시 도입하였다. 유리 아미노 기를 서열에서 제2 분기점으로서 사용하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 사용된 아미노산은 Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Boc-Pro-OH이었다. N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로, 분기 내의 N-말단 아미노산, 프롤린을 N-Boc 아미노산으로서 결합하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 A를 사용하여 펩티드 수지를 분할함으로써 수율 50%로 200 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴 내의 0.1% TFA로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (9.4 mm x 250 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0 ~ 2 분 = 10 ~ 20 % 완충액 B, 2 ~ 8 분 = 20 ~ 25 % 완충액 B, 8 ~ 19 분 = 25 ~ 29 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.3 분 (94 %); LCMS 이론 질량: 3389.8, 측정 질량: 1695.2 $[M/2+H]^+$; 1130.5 $[M/3+H]^+$ 848.3 $[M/4+H]^+$

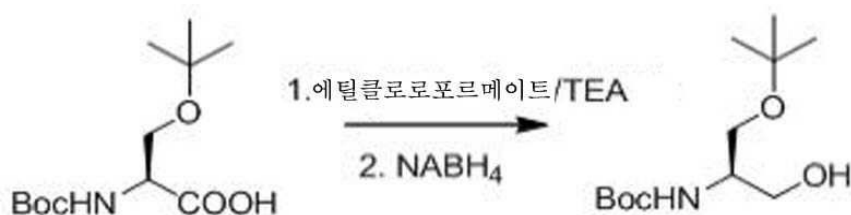
[0438] 실시예 11: 하기 화합물의 합성



[0439]

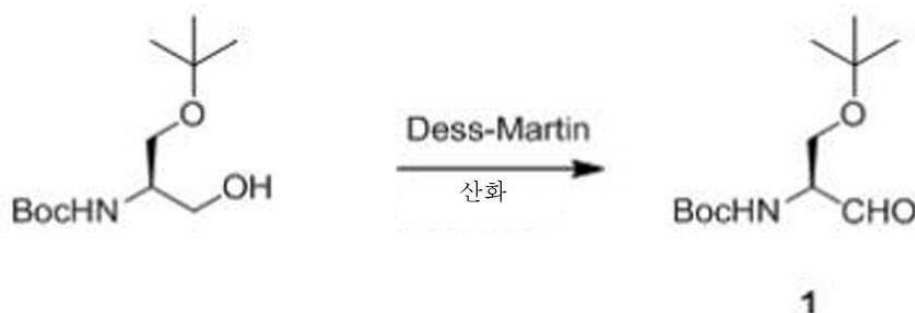
[0440] (서열 ID NO 129)

[0441] 빌딩 블록(building block)의 합성



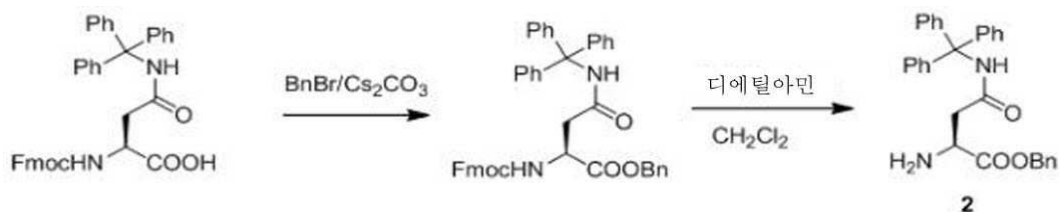
[0442]

[0443] -20 °C의 THF (100 mL) 내의 *N*-Boc 아미노산 (10.0 g, 38.28 mmol)의 용액에, *N*-메틸 모르폴린 (NMM, 4.25 g, 42.11 mmol) 및 에틸클로로포르메이트 (4.57 g, 42.11 mmol)를 첨가하고, 그 혼합물을 동일한 온도에서 20분 동안 교반하였다. 무기 염을 여과 제거한 후, 그 여액을 습윤 NaBH₄ (2.9 g, 76.56 mmol)로 10~15 분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물과 EtOAc 사이에 분리되었다. 유기층을 물, 10% NaHCO₃ 용액 (100 mL x 2) 및 염수로 세척한 후, Na₂SO₄ 상에서 건조한 다음, 감압 하에서 증발하여 *N*-Boc 아민올을 얻었다. 상기에서 얻어진 아민올을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 헥산 내의 0~50% EtOAc)로 정제하여 생성물 8.2 g을 얻었다[수율: 85.4%, 이론 질량: 247.3, 측정 질량: 248.2 (M+1), 270.2 (M+Na)].



[0444]

[0445] 증류된 DCM (30.0 mL) 내의 *N*-Boc-아민올 (3.0 g, 12.13 mmol)의 용액에 Dess-Martin 페리오디난 (10.3 g, 24.27 mmol)을 0 °C에서 소량씩 첨가한 후, 반응물이 TLC 분석에 의해 소비될 때까지 실온의 N₂ 분위기 하에서 30 분 동안 교반하였다. 1.0M Na₂S₂O₃ 용액을 첨가하여 반응 혼합물을 급냉한 후, 생성물을 DCM으로 추출하였다. 유기 추출물을 (5%, 1:1) Na₂S₂O₃/NaHCO₃ 용액 (20 mL x 2), 염수 (20 mL) 로 세척한 후, Na₂SO₄ 상에서 건조하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 얻은 조 생성물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 헥산 내의 0~20% EtOAc)에 의해 더 정제하여 2.4 g의 순수 생성물 1을 얻었다 (수율 82%, 이론 질량 245.32, 측정 질량 247.9 (M+1), 265.1 (M+Na)).



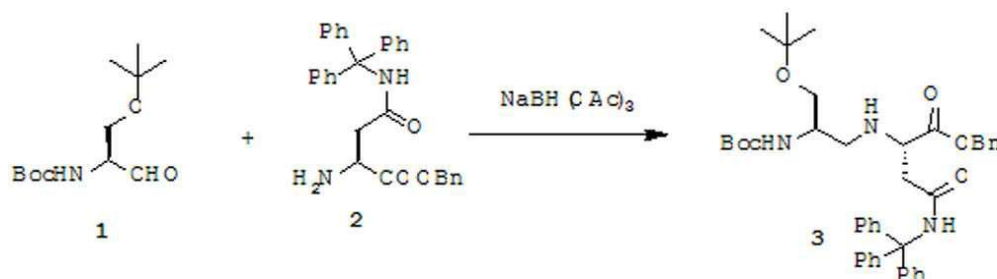
[0446]

[0447]

DMF 30.0 mL 내의 Fmoc-Asn(trt)-OH (4.0 g, 6.7 mmol)의 용액에 Cs_2CO_3 (2.62 g, 8.0 mmol)를 첨가하였다. 그 혼합물을 0 °C까지 냉각한 후, 벤질 브로마이드 (1.37 g, 8.0 mmol)를 첨가한 다음, 얻어진 용액을 0 °C에서 30 분 동안 교반한 후, 실온에서 12 시간 동안 다시 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에서 농축한 후, EtOAc (50 mL)로 희석한 다음, 유기층을 NaHCO_3 (2 x 50 mL) 및 염수 (1 x 50 mL)로 세척한 다음, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 진공에서 여과 및 농축한 다음, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 헥산 내의 0~30% EtOAc)에 의해 정제하여 백색 고체로서 Fmoc-Asn(trt)-Obn를 얻었다[수율: 4.5 g, 98.0%; 이론 질량 686.28, 측정 질량 687.3 (M+1), 709.1 (M+Na)].

[0448]

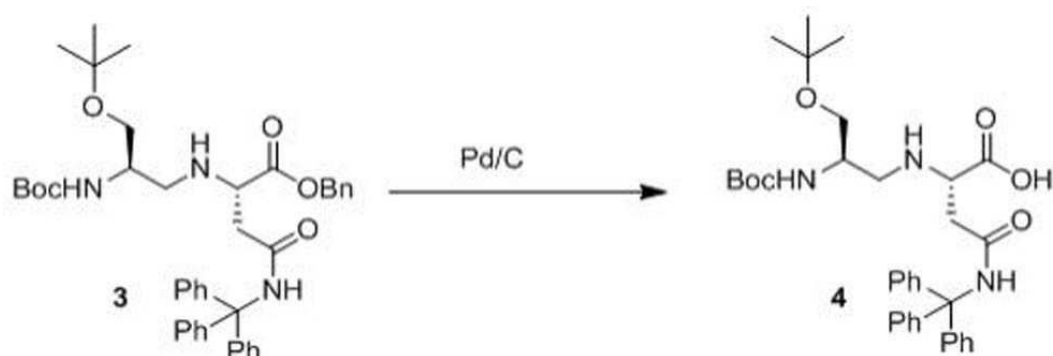
DCM (14.0 mL) 내의 Fmoc-Asn(Trt)-OBn (3.5 g, 5.1 mmol) 용액에, 디에틸아민 (14.0 mL)을 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 그 결과 얻어진 용액을 진공에서 농축하고, 탁한 잔류물을 중성 알루미늄 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 헥산 내의 0~50% EtOAc, 그 다음 CHCl_3 내의 0~5% MeOH)에 의해 정제하여 H-Asn(trt)-Obn 2를 얻었다(수율: 1.75 g, 73.0%; 이론 질량 464.21, 측정 질량 465.3 (M+1), 487.2 (M+Na)).



[0449]

[0450]

H-Asn(Trt)-OBn (4.5 g, 9.7 mmol), DIPEA (2.5 g, 19.4 mmol) 및 Boc-Ser(Obn)-CHO (2.4 g, 9.7 mmol)을 0 °C의 DCM (45 mL) 중에서 혼합한 다음, 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 다시 반응 혼합물을 0 °C까지 냉각한 후, 나트륨 트리옥소세테트 붕수소화물(4.1g, 19.4 mmol)로 처리한 다음, 그 혼합물을, 반응물이 TLC 분석에 의해 소비될 때까지, 실온의 N_2 분위기 하에서 6 시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하여 반응 혼합물을 급냉한 다음, 얻어진 생성물을 DCM으로 추출하였다. 유기 추출물을 5% NaHCO_3 용액 (50 mL x 2), 5% 구연산 용액 (50 mL x 2), 염수 (50 mL)로 세척한 다음, Na_2SO_4 상에서 건조하였다. 용매를 증발시켜 얻은 조 생성물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 헥산 내의 5~40 % EtOAc)에 의해 더 정제하여 목적으로 하는 생성물 3을 얻었다 (수율: 4.2 g, 62.0%; 이론 질량 693.27, 측정 질량 694.4 (M+1), 716.0 (M+Na)).



[0451]

[0452]

메탄올 (70.0 mL) 내의 화합물 3 (4.0 g)의 용액에 10% Pd-C (1.0 g)를 불활성 분위기 하에서 첨가한 후, 그

전조된 Rink-아미드 MBHA 수지 ((100-200 메쉬) 0.66 mmol/g, 1 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티드 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적으로 아미노산을 결합하였다. 수지 함량에 대해 5 당량 과량의 아미노산 및 결합제를 사용하여 결합을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다. 선형 서열에서 N-말단으로부터 제 8 아미노산 Lys가 Fmoc-Lys(Dde)-OH로서 결합되었다. 그 다음 잔기로부터 계속하여(Fmoc-Phe-OH), 10 당량 과량의 아미노산 (1 M NMM/DMF 내의 0.25 M 아미노산, 0.25 M HBTU 각 5 mL)으로 표 II에서와 같이 후속적인 아미노산의 결합을 실시하고, 수지 함량에 대한 결합제를 결합에 사용하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. 두 N-말단에서 N-말단 아미노산 Boc-Ser Ψ[CH₂NH]Asn(Trt)-OH (0.4 g, 5 mL)는 N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로 N-Boc 아미노산으로서 결합되었다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 C를 사용하여 펩티드 수지를 분할함으로써 수율 70%로 150 mg을 얻었다. 원료 샘플은 정제 및 동결건조된 준비된 HPLC이었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (9.4 mm x 250 mm, 5 μm)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~25 분 = 2~30% 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12분(93 %); LCMS 이론 질량: 3232.8, 측정 질량: 1617.4[M/2+H]⁺ 809.6[M/4+H]⁺

Chemical structure of the conjugate: Ser-Asn-Thr-Ser-Glu-Ser-Phe-NH-C(=O)-CH(CH₂CH₂CH₂CH₂NH-Phe-Ser-Glu-Ser-Thr-Asn-Ser)-C(=O)-Phe-Arg-Val-Thr-Gln-Leu-Ala-Pro-NH-C(=O)-CH(CH₂CH₂CH₂CH₂NH-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂NH-C(=O)-Glu-Lys-Ile-Gln-Ala)-NH₂.

- 76 -

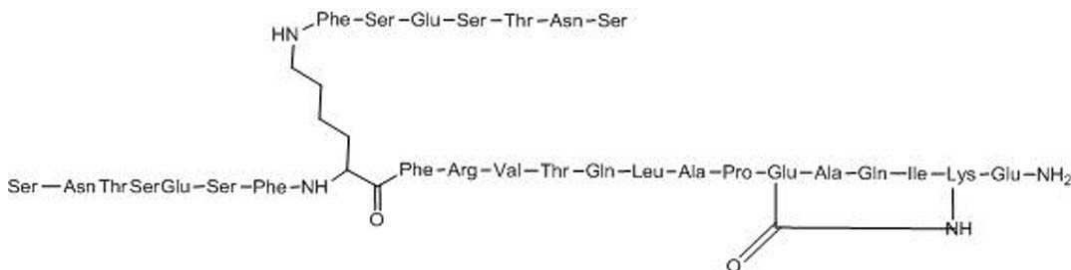
기가 있다면, 그 아미노기는 서열의 종결을 피하기 위해서 아세트산 무수물/피리딘/DCM (1:8:8)을 사용하여 20 분 동안 캡핑되었다. 캡핑 후, 각 반응기 내에 있는 수지를 DCM (6 x 30 mL), DMF (6 x 30 mL), DCM (6 x 30 mL) 및 DMF (6 x 30 mL)으로 세척하였다. 펩티딜 수지에 부착된 C-말단 아미노산 상의 Fmoc 기는 5 및 15 분 (30 mL) 동안 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 30 mL), DCM (6 x 30 mL) 및 DMF (6 x 30 mL)으로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 후속적인 아미노산 Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH 및 Fmoc-Ala-OH는 수지 함량에 대해 5 당량 과량의 아미노산, DIC 및 HOBt를 이용하여 결합되었다. C-말단 Lys로부터 제 6 잔기는 Fmoc-Lys(Dde)-OH로서 결합되었다. 무수 DMF에 용해된 Fmoc-Lys(Dde)-OH (16 g; 3 당량, 29.7 mmol)를 동일한 부피로 5개의 유리 반응기 모두에 분배하였다. 5개의 유리 반응 용기에 동일하게 분배된 DMF에 용해된 DIC (4.5 mL; 3 당량, 29.7 mmol) 및 HOBt (4 g; 3 당량, 29.7 mmol)를 첨가함으로써 결합을 개시하였다. 반응 혼합물 내의 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 회전기에서 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 30 mL), DCM (6 x 30 mL) 및 DMF (6 x 30 mL)로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티딜 수지의 Fmoc 기는 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 5 및 15 분 (30 mL) 동안 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 30 mL), DCM (6 x 30 mL) 및 DMF (6 x 30 mL)로 세척하였다. Fmoc-보호해제 종료 시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 포지티브이었다. 후속적인 아미노산 Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln (Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH는 5 당량 과량의 아미노산, HOBt 및 DIC 법을 이용하여 펩티딜 수지에 결합되었다. 실온에서 3 시간 동안 반응을 실시하였다. C-말단 Lys로부터 제 15 잔기를 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH로서 결합하였다. 무수 DMF에 용해된 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (17.5 g; 3 당량, 29.7 mmol)를 5개의 유리 반응기 모두에 동일한 부피로 분배하였다. 5개의 유리 반응 용기에 동일하게 분배된 DMF에 용해된 DIC (4.5 mL; 3 당량, 29.7 mmol) 및 HOBt (4 g; 3 당량, 29.7 mmol)를 첨가함으로써 결합이 개시되었다. 반응 혼합물 내의 각 반응물의 농도는 약 0.4 M이었다. 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 회전기에서 회전하였다. 수지를 여과한 후, DMF (6 x 30 mL), DCM (6 x 30 mL) 및 DMF (6 x 30 mL)로 세척하였다. 결합 종료시 펩티드 수지 일정부분에 관한 카이저 시험은 네가티브이었다. 펩티딜 수지의 Fmoc 기는 20% (v/v) 피페리딘/DMF 용액으로 5 및 15 분 (30 mL) 동안 2회 처리함으로써 보호해제되었다. 수지를 DMF (6 x 30 mL), DCM (6 x 30 mL) 및 DMF (6 x 30 mL)로 세척하였다. Fmoc-Lys(Fmoc)-부착 펩티딜 수지의 보호해제 후, 수지 함량에 대해 8 당량 과량의 아미노산 (79 mmol), 8 당량 과량의 HOBt (79 mmol) 및 10 당량 과량의 DIC (99 mmol)를 사용하여 유리 아미노 말단 모두로부터 펩티드 사슬을 성장시켰다. 실온에서 2 시간 동안 반응을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asn (Trt)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH 및 Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. DIC/ HOBt 법 (수지 함량에 대해 8 당량 과량)을 이용하여 Boc-Ser(OtBu)-OH으로서 N-말단 아미노산 세린을 결합하였다.

[0459] **Dde 기의 직각방향 보호해제:** 분기점으로서 사용된 N-말단으로부터 제 17 잔기 리신의 ϵ -아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬의 종료 후, 리신의 ϵ -아미노 기의 Dde 보호는, 실시예 1에서 설명한 바와 같이 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리함으로써 직각방향으로 보호해제되었다.

[0460] **팔미트산의 결합**

[0461] 리신의 유리 ϵ -아미노 기에, DMF에 용해된 팔미트산(12 g, 5 당량, 49.5 mmol)을 동일한 비율로 5개의 반응 용기에 넣고, 유사한 방법으로 DMF에 용해된 DIC (7.6 mL; 5 당량, 49.5 mmol) 및 HOBt (6.7 g; 49.5 mmol)를 첨가하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 C를 사용하여 펩티딜 수지를 분할함으로써 수율 65%로 22 g을 얻었다. 원료 샘플은 정제 및 동결건조된 준비된 HPLC이었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 0.1% TFA/아세토니트릴로 채워진 x-Bridge Prep C18-ODB 컬럼 (19 mm x 150 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 15 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~3 분 = 15~25% 완충액 B, 3~5 분 = 25~38% 완충액 B, 5~15 분 = 38~50% 완충액 B, 15~19 분 = 50 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 3): 실온, 17.5 분 (95.4 %); LCMS 이론 질량: 3499.62, 측정 질량: 1750.3 [M/2+H]⁺; 1167.2 [M/3+H]⁺

[0462] 실시예 13: 하기 화합물의 합성



[0463]

[0464] (서열 ID NO 103)

[0465]

건조된 Rink-아미드 MBHA 수지 ((100~200 메쉬) 0.6 mmol/g, 0.28 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티딜 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적으로 아미노산을 결합하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다. 선형 단편에서, C-말단으로부터 제2 아미노산은 Fmoc-Lys(Alloc)-OH로서 결합되었고, 그리고 C-말단으로부터 제 6 아미노산은 Fmoc-Glu(OAl1)-OH로서 결합되었다. 선형 서열에서 N-말단으로부터 제 8 아미노산 Lys가 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH로서 결합되었다. 그 다음 잔기로부터 계속하여(Fmoc-Phe-OH), 결합제로서 1 M NMM/DMF 내의 0.25 M 아미노산, 0.25 M HBTU 각 5 mL를 사용하여 표 II에서와 같이 후속적인 아미노산의 결합을 실시하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. 양 말단에서의 N-말단 아미노산은 Boc-Ser(OtBu)-OH로서 결합되었다.

[0466]

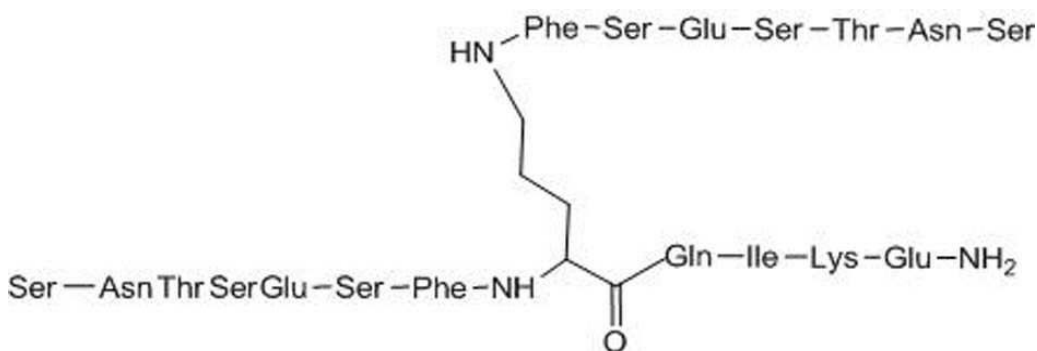
Alloc 보호기의 보호해제

[0467]

모든 펩티드 서열의 종료 후, 리신 및 글루탐산에 존재하는 직각방향 Alloc 및 알릴 보호기는 아르곤 하에서 6 시간 동안 클로로포름/N-메틸피롤리딘 (95/5 v/v) 용액 내의 테트라키스트리페닐포스핀 팔라듐(0) (10 당량; 2.1 g) 및 페닐실란 (20 당량, 0.32 mL)으로 처리함으로써 펩티딜 수지로부터 제거되었다. 수지를 클로로포름 내의 10% NMP (6 x 10 mL), DMF 내의 1% DIEPA (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL), DMF (6 x 10 mL)의 용액으로 세척하였다. 리신의 ε-유리 아미노 기 및 글루탐산의 γ-유리 카르복시기는 NMP에 용해된 HOBt (0.12 g; 0.92 mmol) 및 DIC(0.18 mL; 1.1 mmol)를 사용하여 락탐 연결을 위해 유지되었다. 17 시간 후, 수지를 여과한 다음, DMF (6 x 10 mL), DCM (6 x 10 mL), DMF (6 x 10 mL)로 세척하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 C를 사용하여 펩티딜 수지를 분할함으로써 수율 68%로 407 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트오니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (9.4 mm x 250 mm, 5 μm)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 7 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~4 분 = 10 % 완충액 B, 4~21.5 분 = 10~30.9 % 완충액 B, 21.5~30.9 분 = 30.9~35 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.5 분 LCMS 이론 질량: 3244.12, 측정 질량: 1622.9 [M/2+H]⁺; 1082.1 [M/3+H]⁺

[0468]

실시예 14: 하기 화합물의 합성



[0469]

[0470] (서열 ID NO 140)

[0471] 건조된 Rink-아미드 MBHA 수지 ((100~200 메쉬) 0.66 mmol/g, 0.3 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 팽윤하면서, 표 I의 시험법에 따라 C-말단 아미노산 [Fmoc-Glu(OtBu)-OH] 부착 및 펩티드 수지의 캡핑을 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적으로 아미노산을 결합하였다. 선형 서열에서 N-말단, Orn으로부터 제 8 아미노산은 Fmoc-Orn-(Dde)-OH으로서 결합되었다. 펩티드의 선형 사슬에서 N-말단 아미노산 Ser(OtBu)-OH는 N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로 N-Boc 아미노산으로서 결합되었다.

[0472] **Dde 기의 직각방향 보호해제**

[0473] 분기점으로서 사용된 제 8 잔기 오르니틴의 δ -아미노 기는 Dde 기로 보호되었다. 선형 펩티드 사슬의 종료 후, 오르니틴의 δ -아미노 기의 Dde 보호는 수지를 DMF 내의 2.5% (v/v) 히드라진 수화물 용액으로 처리(2 x 7.30 분)하고, 히드라진 수화물 용액을 수동으로 첨가하고 자동 합성기에서 직각 방향으로(orthogollally) 보호해제되었다. 수지를 표 II의 단계 4에서처럼 합성기에서 수동 프로그램을 이용하여 더 세척하였다. 분기에서 아미노산의 결합은 표 II에서와 같이 아미노산 결합을 위한 프로그램을 이용하여 후속적으로 아미노산을 혼입함으로써 실시되었다. 사용된 아미노산은 Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH이었다. N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로, 분기 내의 N-말단 아미노산, 펩티드의 선형 사슬 중 Ser(OtBu)-OH를 N-Boc 아미노산으로서 결합하였다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 C를 사용하여 펩티드 수지를 분할함으로써 수율 70%로 295 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트오니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (21.2 mm x 150 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 18 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~5 분 = 5~20 % 완충액 B, 5~15 분 = 20~25 % 완충액 B로 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 11.1 분 LCMS 이론 질량: 2135.77, 측정 질량: 1067.9 [M/2]⁺; 711.9 [M/3]⁺

[0474] **실시예 15: 하기 화합물의 합성**



[0475]

[0476] (서열 ID NO 133)

[0477] 건조된 H-Glu (OtBu)-2-클로로트리틸 클로라이드 수지 ((100~200 메쉬) 0.5 mmol/g, 0.35 g)를 폴리프로필렌 필터가 구비된 폴리에틸렌 용기에 넣었다. 하기 표에 나타난 합성 프로그램을 이용하고 심포니 패럴렐 합성기 (PTI)를 사용하여 고체 상으로 선형 펩티드 합성을 자동 실시하였다. 표 II에서 설명한 바와 같이 후속적으로 아미노산을 결합하였다. 합성에 사용된 아미노산은 Fmoc Phe-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH이었다. 선형 서열에서 N-말단 Lys로부터 제 8 아미노산은 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH로서 결합되었다. 그 다음 잔기로부터 계속하여(Fmoc-Phe-OH), 결합제로서 1 M NMM/DMF 내의 0.25 M 아미노산, 0.25 M HBTU 각 5 mL를 사용하여 표 II에서와 같이 후속적인 아미노산의 결합을 실시하였다. 펩티드의 양 N-말단에서 N-말단 아미노산 Ser(OtBu)-OH는 N-Fmoc 아미노산을 위해 이용된 것과 동일한 방법으로 N-Boc 아미노산으로서 결합되었다. 분할 방법에서 설명한 바와 같이, 분할 혼합물 C를 사용하여 펩티드 수지를 분할함으로써 수율 66%로 400 mg을 얻었다. 완충액 A: 0.1% TFA/물, 완충액 B: 아세트오니트릴로 채워진 Zorbax Eclipse XDB-C18 컬럼 (21.2 mm x 150 mm, 5 μ m)에서 준비된 HPLC에 의해 원료 물질을 정제하였다. 18 mL/분의 유속으로 구배 용리 0~5 분 = 5~20 % 완충액 B, 5~18 분 = 20~27 % 완충액 B에 의해 펩티드를 용출하였다. HPLC: (방법 1): 실온, 12.1 분 LCMS 이론 질량: 3262.62, 측정 질량: 1088.6 [M/3+H]⁺; 813.4 [M/4+H]⁺

[0478] 본 발명의 다른 화합물은 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 적당한 변형에 따라 상술한 방법과 유사한 방법으로 제조되었다. 펩티드의 정체는 LCMS (표 IV)에 의해 확인되었다.

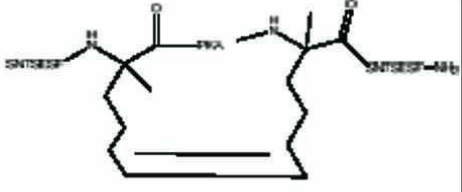
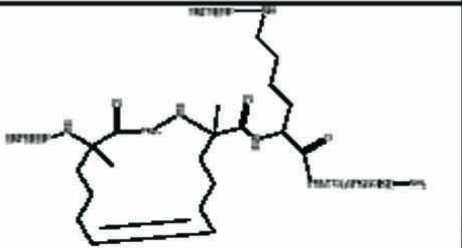
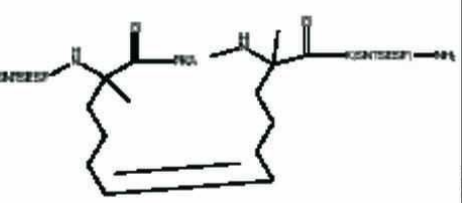
[0479] [표 IV]

화합물 번호	서열	LCMS	
		이론치,	실측치
1	SNTSESF-NH ₂	769.7	770.0[M] ⁺
2	CH ₃ -CO-SNTSESF-NH ₂	811.81	812.3 [M] ⁺
3	SNQTDKLAAPFEDSQPGQD-NH ₂	1047.14	1024.3 [M/2+H] ⁺
4	EDRSQPGQDCR-NH ₂	1288.35	1289.8[M+H] ⁺ ; 645.6[M/2+H] ⁺
5	CGAISLAPKAQIKES-NH ₂	1513.81	1515.2[M+H] ⁺ ; 758.2[M/2+H] ⁺
6	FRVTQK(SNTSESF)FRVTQAhxLAPKAQIKES-NH ₂ Ahx = 6-아미노헥사노산	1619.9 3237.83	[M/2+H] ⁺ ; 1080.2 [M/3+H] ⁺
7	FRVTQK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKES-NH ₂	3140.62	1571.2 [M/2+H] ⁺ ; 1047.8 [M/3+H] ⁺
8	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKES-NH ₂	3261.62	1631.6 [M/2+H] ⁺ ; 1088 [M/3+H] ⁺ ; 816.2[M/4+H] ⁺
9	SNQTDK (SNQTDK) FRVTQLAPKAQIKES-NH ₂	2975.34	1487.7 [M/2+H] ⁺ ; 992.2 [M/3+H] ⁺ ; 744.5 [M/4+H] ⁺
10	SNQTDK (SNQTDK) VLNWYRM LAPKAQIKES-NH ₂	3306.78	1653.8 [M/2+H] ⁺ ; 1102.7 [M/3+H] ⁺ ; 827.4[M/4+H] ⁺
11	SNTSESFK(SNQTDK)FRVTQLAPKAQIKES-NH ₂	3182.57	1591.8 [M/2+H] ⁺ ; 1061.7 [M/3+H] ⁺ ; 796.6[M/4+H] ⁺
12	SNTSESFK(SNQTDK)FRVTQK(LAP)AQIKES-NH ₂	3182.57	1591.7 [M/2+H] ⁺ ; 1061.2[M/3+H] ⁺ ; 796.3 [M/4+H] ⁺

[0480]

13	sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqiKE-NH2	3261.62	1630.8 [M/2+H] ⁺ ; 1087.5 [M/3+H] ⁺ ; 815.8 [M/4+H] ⁺ ;
14	EKIQAKPAYWNLVK(KDTQNS)DTQNS	2906	1454.2 [M/2+H] ⁺ 969.5 [M/3+H] ⁺ ; 727.6 [M/4+H] ⁺
15	비오던-Ahx- SNTSEFk(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE -NH2	3601.22	1200.9 [M/3+H] ⁺ ; 901.0 [M/4+H] ⁺
16	C6 지질- SNTSEFk(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE -NH2	3359.62	1680.4 [M/2+H] ⁺ ; 1120.5[M/3+H] ⁺ ; 840.7[M/4+H] ⁺ ;
17	Ac- SNTSEFk(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE -NH2	3303.66	1653.2 [M/2+H] ⁺ ; 1101.9 [M/3+H] ⁺ ; 826.9 [M/4+H] ⁺ ;
18	SNTSEFk(NH-(PEG)11-CO- SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	3861.42	1773.6 [M/5+H] ⁺ ;
19	SNTSEFk(SNTSESF)(PEG)1APKAQIKE- NH2	3229.89	1615.17[M/2+H] ⁺ ; 1077.1 [M/3+H] ⁺ ; 808.3 [M/4+H] ⁺
20	SNTSEFk(CH3(CH2)4CO- SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2 분기 내의 C6 지질	3359.62	1680.3 [M/2+H] ⁺ ; 1120.4 [M/3+H] ⁺ ; 840.5 [M/4+H] ⁺

[0481]

21	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO- SNTSESEFK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO- SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ 분기 및 N-말단 모두에서 지질화	3457.62	1729.1 [M/2+H] ⁺ ; 1152 [M/3+H] ⁺ ;
22		2070.6	1035.5 [M/2+H] ⁺ ;
23		3697	1232.5 [M/3+H] ⁺ ; 924.9 [M/4+H] ⁺ ; 740.2 [M/5+H] ⁺
24		2198.8	1099.4 [M/2+H] ⁺ ;
25	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAQIKE- NH ₂	2965.25	1483 [M/2+H] ⁺ ; 988.9 [M/2+H] ⁺
26	SNTSESEFRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2380.71	1191.0 [M/2+H] ⁺ ; 794.3 [M/3+H] ⁺ ;
27	SNTSESEFKFRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2508.88	1254.9 [M/2+H] ⁺ ; 837.0 [M/3+H] ⁺ ;
28	SNTSESEFKSNTSESEFRVTQLAPKAQIKE- NH ₂	3261.8	1630.7 [M/2+H] ⁺ ; 1087.5 [M/3+H] ⁺ ;

[0482]

29	SNTSESEFK(SNTSESEF)-NH ₂	1650.69	1650.5 [M] ⁺ 825.9 [M/2+H] ⁺
30	SNTSESEFK(SNTSESEF)LAPKAQIKE-NH ₂	2629.89	1315.1 [M/2+H] ⁺ ; 877.0 [M/3+H] ⁺ ;
31	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQKAQIKE-NH ₂	2980.27	1489.9 [M/2+H] ⁺ ; 993.9 [M/3+H] ⁺ ; 745.7 [M/4+H] ⁺ ;
32	SNTSESEFK(SNTSESEF)KAQIKE-NH ₂	2348.53	1174.5 [M/2+H] ⁺ ; 783.2 [M/3+H] ⁺
33	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)E-NH ₂	3499.62	1166.8 [M/3+H] ⁺
34	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)AQIKE-NH ₂	3499.62	1750.3 [M/2+H] ⁺ ; 1167.2 [M/3+H] ⁺
35	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQK(LAP)KAQIKE-NH ₂	3389.8	1695 [M/2+H] ⁺ ; 1130.2 [M/3+H] ⁺ ; 848.3 [M/4+H] ⁺
36	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAK(PKA)QIKE-NH ₂	3389.8	1695.2 [M/2+H] ⁺ ; 1130.5 [M/3+H] ⁺ ; 848.3 [M/4+H] ⁺
37	SNTSESEFK(LAP)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2790.24	1395.2 [M/2+H] ⁺ ; 930.6 [M/3+H] ⁺ ; 698.4 [M/4+H] ⁺
38	LAPK(LAP)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2318.86	1159.7 [M/2+H] ⁺ ; 773.6 [M/3+H] ⁺ ; 580.6 [M/4+H] ⁺
39	LAPKAQIKE-NH ₂	996.23	996.7 [M] ⁺

[0483]

40	SNTSESEFK(SNTSESEF)FK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)) VTQLAPKAQIKE-NH ₂ Lys로 치환된 D 스트랜드 내의 Arg	3471.61	1736.5 [M/2+H] ⁺ ; 1158.2 [M/3+H] ⁺ ; 869.1 [M/4+H] ⁺
41	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAP-NH ₂	2563.78	1282.1 [M/2+H] ⁺ ; 855.1 [M/3+H] ⁺ ;
42	SNTSESEFFRV TQK(SNTSESEF)LAPKAQIKE -NH ₂	3261.62	1631.6 [M/2+H] ⁺ ; 1088 [M/3+H] ⁺ ; 816.2 [M/4+H] ⁺ ;
43	FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	1627.97	1627.7 [M] ⁺ ; 814.3 [M/2+H] ⁺ ; 543.3 [M/3+H] ⁺ ;
44	SNTSESEFK(SNTSESEF)FK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)V TQLAPKAQIKE-NH ₂ Lys로 치환된 D 스트랜드 내의 Arg	3359.61	1680.2 [M/2+H] ⁺ ; 1121.1 [M/3+H] ⁺
45	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(CH ₃ (C H ₂) ₁₄ CO)AQIKE-NH ₂	3387.62	1129.9 [M/3+H] ⁺ ; 847.3 [M/4+H] ⁺ ;
46	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)E-NH ₂	3387.62	1693.8 [M/2+H] ⁺ ; 1129.7 [M/3+H] ⁺ ; 847.5 [M/4+H] ⁺ ;
47	SNTSESEFK(sntsesf)FRVTQLAPKAQIKE- NH ₂	3261.62	1631.6 [M/2+H] ⁺ ; 1088 [M/3+H] ⁺ ; 816.2 [M/4+H] ⁺ ;
48	EKIQAQPALQTVRFK(FSESTNS)FSESTNS -NH ₂	3261.62	1631.6 [M/2+H] ⁺ ; 1088 [M/3+H] ⁺ ; 816.2 [M/4+H] ⁺ ;
49	e kiqakpalqtvrfk(fsestns)fsestns-NH ₂	3261.62	1630.6 [M/2+H] ⁺ ; 1087.5 [M/3+H] ⁺ ; 815.7 [M/4+H] ⁺ ;

[0484]

57	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(CH ₃ CO)AQIKE-NH ₂	3304.61	1653.3 [M/2+H] ⁺ ; 1102.5 [M/3+H] ⁺ ;
59	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO)AQIKE-NH ₂	3359.62	1681.3 [M/2+H] ⁺ ; 1121.2 [M/3+H] ⁺ ;
60	비오딘-Ahx- sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqike-NH ₂	3601.22	1201.1 [M/3+H] ⁺ 901.3[M/4+H] ⁺
61	비오딘-Ahx- EKIQAKPAYWNLVK(KDTQNS)DTQNS-NH ₂	3245.69	1623 [M/2+H] ⁺ ; 1082.3 [M/3+H] ⁺ ; 811.8 [M/4+H] ⁺ ;
62	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPE*AQIK*E-NH ₂ 아스테리스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	3244.12	1622.9 [M/2+H] ⁺ ; 1082 [M/2+H] ⁺ ;
63	SNTSESEFK(SNTSESEF)FK*VTQE*APKAQIKE-NH ₂ 아스테리스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	3232.57	1615.4 [M/2+H] ⁺ ; 1078 [M/3+H] ⁺ ;
64	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTE*LAPK*AQIKE-NH ₂ 아스테리스크(*) 사이에 형성된 락탐 결합 아미노산	3244.12	1622.4 [M/2+H] ⁺ ; 1082.4 [M/3+H] ⁺ ;
65	CH ₃ CO-SNTSESEFK(CH ₃ CO-SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₆ CO)E-NH ₂	3471	1736 [M/2+H] ⁺ ;1158 [M/3+H] ⁺
66	CH ₃ CO-SNTSESEFK(CH ₃ CO-SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO)E-NH ₂	3583	1792.6 [M/2+H] ⁺ ;1195.4 [M/3+H] ⁺
67	CH ₃ CO-SNTSESEFK(CH ₃ CO-SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO)E-NH ₂	3529.2	1764.7 [M/2] ⁺ ;1176.8 [M/3] ⁺

[0485]

68	CH ₃ CO-SNTSESFK(CH ₃ CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO)E-NH ₂	3442.1	1722.1 [M/2+H] ⁺ ; 1148.1 [M/3+H] ⁺
69	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPKAKIEE-NH ₂	3484.09	1742.9 [M/2+H] ⁺ ; 1162.3 [M/3+H] ⁺
70	EDK(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2245.54	1122.8 [M/2+H] ⁺ ; 748.9 [M/3+H] ⁺
71	SNTSESFK(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2754.07	918.4 [M/3+H] ⁺ ; 689.3 [M/4+H] ⁺
72	LAPKAK(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2481.0	828 [M/3+H] ⁺ ; 621.1 [M/4+H] ⁺
73	SNQTDKK(ED)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2674.03	892.0 [M/3+H] ⁺ ; 669.2 [M/4+H] ⁺
74	SNQTDK(SNQTDK)GIYLCGAISLAPKAQIKE-NH ₂	3227.66	1077.5 [M/3+H] ⁺ ;
75	SNQTDKK(VLNWYRM)GIYLCGAISLAPKAQIKE-NH ₂	3639.22	1214.5 [M/3+H] ⁺ ; 727.8 [M/5+H] ⁺
76	EDK(VLNWYRM)GIYLCGAISLAPKAQIKE-NH ₂	3208.44	1605.8 [M/2+H] ⁺ ; 1070.8 [M/4+H] ⁺
77	SNTSESFK(SNTSESF)GIYLCGAISLAPKAQIKE-NH ₂	3506.74	874.0 [M/4+H] ⁺
79	VLNWYRMK(SNQTDK)GIYLCGAISLAPKAQIKE-NH ₂	3638.32	1214.1 [M/3+H] ⁺ ; 727.7 [M/5+H] ⁺
80	GIYLCGAISLAPKAQIKE-NH ₂	1873.29	937.6 [M/2+H] ⁺
81	SNQTDKK (SNQTDK) FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	3103.51	1552.4 [M/2+H] ⁺ ; 1035.7 [M/3+H] ⁺ ; 777.0 [M/4+H] ⁺

[0486]

82	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPK(CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CO)AKIEE-NH ₂	3727.8	1241.9[M ₃] ⁺
83	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(MPA-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)AQIKE-NH ₂	3557.09	1779.8[M ₂ +H] ⁺ 1187.1[M ₃ +H] ⁺
84	SNTSESEFK(sNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ (분기 내의 D-ser)	3261.62	1631 [M ₂ +H] ⁺ ; 1088.2 [M ₃ +H] ⁺ ; 816.2 [M ₄ +H] ⁺ ;
88	SΨ[CH ₂ NH]NTSESEFK(SΨ[CH ₂ NH]NTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	3232.8	1617.4[M ₂ +H] ⁺ 809.6[M ₄ +H] ⁺
89	S _n TSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ N-말단에서의 D-Asn	3261.62	1631.6 [M ₂ +H] ⁺ ; 1087.8 [M ₃ +H] ⁺ ; 816.2 [M ₄ +H] ⁺ ;
90	SNTSESEFK(S _n TSESEF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂ 분기 내에서의 D-Asn	3261.62	1631.5 [M ₂ +H] ⁺ ; 1088.1 [M ₃ +H] ⁺ ; 816.1 [M ₄ +H] ⁺ ;
91	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPK(MPA-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)AKIEE-NH ₂	3779.2	1261.1[M ₂ +H] ⁺ 946.0[M ₄ +H] ⁺
92	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIKE	3262.62	1088.6 [M ₃ +H] ⁺ ; 813.4 [M ₄] ⁺ ;
98	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CO)AQIKE	3500.62	1167.4 [M ₃ +H] ⁺
99	SNTSESEF-Om-(SNTSESEF)KAQIKE-NH ₂	2135.77	1067.9 [M ₂] ⁺ ; 711.9 [M ₃] ⁺
100	SNTSESEF-Dap-(SNTSESEF)KAQIKE-NH ₂	2107.8	1053.9 [M ₂] ⁺ ; 703.0 [M ₃] ⁺
101	SNTSESEF-Dab-(SNTSESEF)KAQIKE-NH ₂	2121.22	1060.5 [M ₂] ⁺ ;

106	LAPKA-NH ₂	497.64	498.3 [M+H] ⁺ ;
107	LAPKA(SNQTDK)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	2910.44	971.2[M ₃ +H] ⁺ 728.5[M ₄ +H] ⁺

실시예 16: 흐름 세포측정법(Flow Cytometry)에 의한 바인딩(binding) 억제 분석

시약:

포유동물 세포에서의 손쉬운 Fc 영역과 PD1 융합의 발현: 인간 PD1 (1-167 아미노산 잔기)의 세포외(extracellular) 도메인은 pFUSE-Fc (Invivogen, CA)에 클론되었다. 이러한 구조는 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 HEK293 세포 (CRL 1573, ATCC) 속으로 전달감염되고 일시적으로 발현되었다. 손쉬운 IgG의 Fc 영역과 융합된 세포의 PD1 단백질을 함유하는 숨겨진 재조합 단백질은 전달감염된 세포가 성장한 배지

로부터 정제되었다.

[0492] PD1을 위한 리간드의 소스로서 세포주: MDA-MB-231 세포는 RT-PCR에 의해 PD-L1을 발현하는 것으로 밝혀졌으므로 분석에서 PD-L1의 소스로서 사용되었다. HEK293 세포를 발현하는 재조합 PDL2는 세포와 관련하여 PDL2의 소스로서 사용되었다.

[0493] 흐름 세포측정법을 기본으로 하는 PD1과 그의 리간드와의 바인딩 측정:

[0494] 이 분석은 PD1과 그의 리간드 PD-L1 및 PD-L2와의 바인딩에 미치는 화합물의 영향을 측정하기 위해 실시되었다. 요약하면, 재조합 hPDL-을 안정한 방법으로 과도하게 발현하는 HEK 293 세포 (ATCC:CRL-1573)와 pcDNA Myc HisA 전달감염된 HEK 293 (네가티브 대조용) 세포주는 완전한 DMEM 배지(Sigma D5648-1L)를 사용하여 60~70% 합류율(confluency)까지 성장되었다. 세포는 세포 용해 완충액 (Invitrogen-13151-014)으로 용해된 후, 그 수를 셀 다음, 2×10^5 세포가 FACS 튜브에서 완전한 DMEM 배지 $50\mu\text{l}$ 에 재현탁되었다.

[0495] 세포를 용해하기 전에, Fc (일시적으로 전달감염된 세포의 농축된 상층액으로부터 유도)로 태그된 가용성 PD1은 총 부피 $10\mu\text{l}$ 에서 1 시간 동안 시험 화합물 번호 8과 함께 배양되었다. PD1-중화 항체 (생쥐 단클론 IgG2B clone 192106, 카달로그 번호 MAB1086; R&D Labs, USA)는 또한 PD1이 그의 리간드에 바인딩하는 것을 억제하기 위한 포지티브 대조군으로서 사용되도록 가용성 PD1과 함께 미리 배양되었다. PD1/pFuse의 혼합물은 여러 투여량의 화합물 번호 8로 미리 배양되고; 화합물이 세포에 첨가되어 바인딩되게 하였다.

[0496] 세포를 발현하는 리간드에 대한 PD1의 연합을 측정하기 위해서, 1:1000의 희석비로 Alexafluor 488 (Invitrogen, 카달로그 번호 11001)에 콘주게이트된 항-생쥐 2차 항체를 세포에 첨가하고 4°C 에서 30분 동안 배양하였다. 30분 후에 $500\mu\text{l}$ FACS 호액(sheath fluid) (BD, 카달로그 번호 336524)를 이들 튜브에 첨가하고, BD FACS 캘리버(Calibur) 장치로 분석을 실시하였다. 화합물 번호 8은, 도1에 나타난 유력한 방법으로 HEK 293 세포에서 발현된 PD-L2에 대한 PD1의 바인딩을 억제할 수 있었다.

[0497] 실시예 17: 쥐 PBMC 증식의 복원 측정

[0498] 이 분석시험은 PBMC의 기능에 미치는 펩티드의 영향을 시험하기 위해 실시되었다. PD1 (PBMC에 발현) 및 그의 리간드 (종양 세포에 발현) 사이의 상호 작용에 미치는 펩티드의 영향의 결과로서, PBMC 증식은 영향을 받는다. PBMC 증식은 방해 펩티드의 존재 하에서 PD1과 그의 리간드 사이에 바인딩 폐지(abrogation) 시 증가할 것으로 예상된다. 이러한 상호작용에 미치는 시험 화합물의 영향을 측정하기 위해서, hPDL1 발현 MDA-MB231 세포 (ATCC:CRL HTB-26)은 완전한 DMEM 배지 (Sigma 카달로그 번호 D5648)를 함유하는 24-웰(well) 플레이트에 접종되었고, 여기에 제네티신(Geneticin) $100\mu\text{g/ml}$ (Sigma, 카달로그 번호 G8168)가 hPDL2 세포를 위해 첨가되었다.

[0499] PMA (Phorbol 12-미리스테이트 13-아세테이트) 6.25 ng/ml (Sigma, 카달로그 번호 8139) 및 이오노마이신 (Ionomycin) $0.5\mu\text{g/ml}$ (Sigma, 카달로그 번호 I0634)과 함께 5X DMEM 배지로 희석된 쥐 혈액 1 ml 를 세포의 상부에 놓이게 하였다. 시험 화합물을 $10\mu\text{l}$ /웰을 초과하지 않는 부피에서 적절한 농도로 혈액과 함께 각 웰에 첨가한 후, 플레이트를 37°C 의 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[0500] 48 시간 후, 쥐 PBMC들은 히스토파크(Histopaque)1077 (Sigma, 카달로그 번호 10771)를 사용하여 분리되었고, 샘플은 70% 에탄올에 고정된 다음, RNase (Sigma, R6513)로 처리된 후, 프로피듐(Propidium) 요오드화물(Sigma 카달로그 번호 81845)로 착색 처리되었다. 이들 샘플은 BD FACS 캘리버 흐름 세포측정기에서 분석되었다. 도 2에서 나타난 바와 같이, MDA-MB231 세포를 발현하는 리간드의 존재 하에서 PMA 자극 PBMC 세포에 대해서 최소한의 증식이 관찰됨과 동시에, 화합물 번호 8의 도입은 증식을 효과적으로 회복할 수 있었다.

[0501] 실시예 18: 쥐 PBMC 증식 구조 분석시험에서 화합물 8의 효능 측정

[0502] 이 연구는 상기 실시예 17에서 설명된 시험법을 이용하여 실시되었다. 여러 농도의 화합물 8을 사용하여 이 분석시험에서 시험하였으며, 펩티드 화합물 8의 효능은 PMA 자극 PBMC의 증식의 회복으로 측정되었다. 이 분석시험은 도 3에 나타난 바와 같이, MDA-MB231를 발현하는 PD-L1과 관련하여 실시되었다.

[0503] 실시예 19: 인간 PBMC 증식의 회복 측정

[0504] 인간 혈액을 헤파린과 함께 수집하여 포스페이트 완충 식염수로 희석한 다음, 히스토파크를 사용하여 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. 24-웰 플레이트를 항-Cd3 및 항-Cd28 ($5\mu\text{g/ml}$)로 3 시간 동안 미리 코팅하였다. 증식 유도를 위한 네가티브 대조용으로 사용하기 위해 동종형(Isotype) 대조용 항체 (IgG1/IgG2a)

로 또 다른 플레이트를 미리 코팅하였다. PBMC의 수를 세고, 웰당 재조합 hPDL1 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 함께 웰당 600,000 세포/ml로 접종한 다음, 적절한 농도로 시험 화합물을 첨가하였다. 플레이트를 48 시간 동안 배양하고, PBMC를 수집하여 프로피듐 요오드화물 착색(staining)에 의해 세포 사이클 프로파일(cycle profile)의 분석시험을 위해 에탄올로 고정하였다. 시험 화합물에 대한 인간 PBMC 증식의 회복 자료는 도 4에 나타났다.

[0505] 실시예 20: PDL1을 발현하는 MD MBA231 종양 세포에 의해 억제된 생쥐 비세포 증식에 미치는 펩티드의 영향

[0506] PD-L1의 소스로서 MDA-MB-231 세포의 사용:

[0507] MDA-MB-231 세포는 RT-PCR에 의해 PD-L1을 발현하는 것으로 밝혀졌으므로, 분석시험에서 PD-L1의 소스로서 사용되었다.

[0508] 요건:

[0509] 6~8 주령 C57 BL6 생쥐로부터 채취된 생쥐 비세포; RPMI 1640 (GIBCO, 카탈로그 번호 11875); 고 글루코오스 (GIBCO, 카탈로그 번호 D6429)을 갖는 DMEM; 우태아 혈청[Hyclone, 카탈로그 번호 SH30071.03]; 펜실린(10000 유닛/ml)-스트렙토마이신(10,000 $\mu\text{g/ml}$) 액(GIBCO, 카탈로그 번호 15140-122); MEM 나트륨 피루베이트 용액 100mM (100x), Liquid (GIBCO, 카탈로그 번호 11360); 비필수 아미노산 (GIBCO, 카탈로그 번호 11140); L-글루타민 (GIBCO, 카탈로그 번호 25030); 항-CD3 항체 (eBiosciences-16-0032); 항-CD28 항체 (eBiosciences-16-0281); ACK 용해(lysis) 완충액 (1mL) (GIBCO, 카탈로그 번호 A10492); Histopaque (밀도 1.083 gm/ml) (SIGMA 10831); Trypan 블루 용액 (SIGMA-T8154); Hemacytometer (Bright line-SIGMA Z359629); FACS 완충액 (PBS/0.1% BSA): 0.1% 소 혈청 알부민 (BSA) (SIGMA A7050) 및 나트륨 아지드 (SIGMA 08591)을 갖는 포스페이 트 완충 식염수(PBS) pH 7.2 (HiMedia TS1006); CFSE의 원액(stock solution) 5 mM: CFSE 원액은 동결건조된 CFSE를 180 μl 의 디메틸 술폭사이드(DMSO $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$, SIGMA-D-5879)로 희석함으로써 제조되고, 추가 사용을 위해 튜브 내에 분배되었다. 실험 농도는 10 μM ~1 μM 로 적정되었다. (eBioscience-650850-85); 96-웰 포맷 ELISA 플레이트 (코닝 CLS3390); BD FACS 캘리버 (E6016).

[0510] 프로토콜

[0511] 비세포 준비:

[0512] 40 μm 세포 스트레이너(strainer)에서 비장을 분쇄함으로써 50 ml 팔콘 튜브에 수집된 비세포는 실온에서 5분 동안 1 ml ACK 용해 완충액으로 추가 처리하였다. 9 ml의 RPMI 완전 배지로 세척한 후, 세포를 15 ml 튜브에서 3 ml의 1 x PBS에 재현탁하였다. 비세포 현탁액의 도포(overlaying)를 방해하지 않고 튜브의 바닥까지 매우 주의깊게 3ml의 히스토파크(histopaque)를 첨가하였다. 실온에서 20분 동안 800 xg 에서 튜브를 스핀하였다. 림프 구의 불투명한 층은 층들을 동요/혼합하지 않고 주의깊게 수집되었다. 세포를 차가운 1 x PBS로 2회 세척한 후, 트리판 블루(trypan blue) 배제법을 이용하여 총 세포 수를 센다음, 추가 세포 기본 분석시험을 위해 사용하였다.

[0513] CFSE 증식 분석시험:

[0514] 종양 세포 (MD MBA231)를 배양한 후, 고 글루코오스 완전 DMEM 배지에 유지하였다. 1 x 10⁵ 종양 세포는 PD1 유도 펩티드의 필요 농도로 96 웰 플레이트에 도포된 다음, 37°C에서 4 시간 동안 유착되었다. 수집된 비세포 1 x 10⁶ 세포/ml를 37°C에서 10분 동안 미리 가온된 1xPBS/0.1% BSA 용액에 5 μM 의 CFSE로 처리하였다. 세포에 대해 5 배 부피의 얼음 냉각 배양 배지를 사용하여 과량의 CFSE를 급냉한 후, 얼음에서 5분 동안 배양하였다. CFSE 라벨 비세포를 얼음 냉각된 완전 DMEM 배지로 3회 세척하였다. 상기 웰에 첨가된 CFSE 라벨 1 x 10⁵ 비세포는 종양 세포 및 시험 화합물을 함유하였다. 비세포는 항-CD3 및 항-CD28 항체 (각각 1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극된 후, 공동 배양물을 37°C에서 72 시간 동안 5% CO₂ 중에서 배양하였다. 세포를 수집하여 얼음 냉각 FACS 완충액으로 3회 세척한 후, 488 nm 자극 및 521 nm 배출 필터가 구비된 FACS 캘리버를 사용하여 증식율(%)을 분석하였다. 각 실험 조건을 3회 반복 실시하고, 각 실험은 적어도 3회 실시하였다. 세포 탐색 FACS 프로그램을 이용하여 비세포 증식을 분석하고, 개별적인 값을 배경 증식율(%)로 표준화함으로써 폴드 유도(fold induction)를 계산하였다.

[0515] 폴드 유도 = 비세포 증식율(%) / 배경 증식율(%)

[0516] 자극된 비세포: 비세포 + 항-CD3/CD28 자극

[0517] 배경 증식: 비세포 + 항-CD3/CD28 + 증양

[0518] 증식 구조율(%) = {(화합물 증식율(%) - 배경 증식율(%) / (자극된 증식율(%) - 배경 증식율(%))} * 100.

[0519] (a) 화합물 8, 13 및 34와 mAb J43 항체에 있어서 증식 구조율의 비교.

[0520] 상기 프로토콜에서 설명된 CFSE 법을 이용하여 생쥐 비세포 증식 구조 연구를 위해 mAb J43 (Int. Immunol. 1996-8(5):765-72) 및 시험 펩티드를 분석하고, 그 결과를 도 5에 요약하였다.

[0521] (b) CFSE 기본 생쥐 비세포 증식 구조 연구에서 화합물의 작용

[0522] 상기 프로토콜에서 언급한 방법을 이용하여 생쥐 비세포 증식 구조 연구를 위해 시험 화합물을 분석하고, 화합물 8 펩티드와 비교하여 데이터를 표 V에서처럼 활성율(%)로 나타냈다.

[0523] 표 V: CFSE 법을 이용한 생쥐 비세포 증식 분석을 통해 얻어진 여러 화합물의 활성율(%)

화합물 번호	서열	생쥐 비세포 증식 CFSE 기본 분석에서 여러 화합물의 구조율(%) (100nM 농도에서 스크린 및 100nM Comp 8 과 비교)
1	SNTSESF-NH2	96.5
3	SNQTDKLAAPEDSQPGQD-NH2	37.3
4	EDRSQPGQDCR-NH2	74.7
5	CGAISLAPKAQIKES-NH2	68
7	FRVTQK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE- NH2	61.5
8	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE- NH2	100
9	SNQTDK (SNQTDK) FRVTQ LAPKAQIKE- NH2	11.3
10	SNQTDK (SNQTDK) VLNWYRM LAPKAQIKE-NH2	10.6
11	SNTSESFK(SNQTDK)FRVTQLAPKAQIKE- NH2	12.4
13	sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqike-NH2	0-12 nM-대조용 펩티드
14	EKIQAKPAYWNLVK(KDTQNS)DTQNS- NH2	18
16	C6 지질- SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE- NH2	45.8
17	Ac- SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE- NH2	32.9
20	SNTSESFK(CH3(CH2)4CO- SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH2	27.8

[0524]

21	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESFK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO-SNTSESF)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	76.7
22	SNTSESF ₅ PKAR ₅ SNTSESF	71.4
25	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAQIKE	27.6
26	SNTSESF ₅ FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	86.6
27	SNTSESFKFRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	73.6
28	SNTSESF ₅ SNTSESF ₅ FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	56.5
29	SNTSESFK(SNTSESF)-NH ₂	31.1
30	SNTSESFK(SNTSESF)LAPKAQIKE-NH ₂	58.8
31	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQKAQIKE-NH ₂	11.3
32	SNTSESFK(SNTSESF)KAQIKE-NH ₂	14.8
33	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPKAQIK(C ₆ H ₅ (CH ₂) ₁₁ CO)E-NH ₂	98
34	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CO)AQIKE-NH ₂	106
35	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQK(LAP)KAQIKE-NH ₂	81.2
36	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAK(PKA)QIKE-NH ₂	89.7
37	SNTSESFK(LAP)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	89.60
38	LAPK(LAP)FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	51.5
40	SNTSESFK(SNTSESF)FK(CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CO))VTQLAPKAQIKE-NH ₂ Lys 로 치환된 D 스트랜드에서의 Arg	82
41	SNTSESFK(SNTSESF)FRVTQLAP-NH ₂	5.1
42	SNTSESF ₅ FRVTQK(SNTSESF)LAPKAQIKE-NH ₂	52.9
43	FRVTQLAPKAQIKE-NH ₂	66

[0525]

45	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO)AQIKE-NH ₂	68
46	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPKAQIK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO)E-NH ₂	67
48	EKIQAQKPALQTVRFK(FSESTNS)FSESTNS-NH ₂	25
49	ekiqakpalqtvrfk(fsestns)fsestns-NH ₂	73
50	비오딘-Ahx- sntsesfk(sntsesf)frvtqlapkaqike-NH ₂	14.9
51	비오딘-Ahx- EKIQAQKPAYWNLVK(KDTQNS)DTQNS-NH ₂	67
52	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPE* AQIK*E-NH ₂	37
53	SNTSESEFK(SNTSESEF)FK*V TQE*APKAQIKE	68
54	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTE*LAPK* AQIKE	69.1
59	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPKAKIEE-NH ₂	48
62	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPK(CH ₃ (CH ₂) ₄ CO)AKIEE-NH ₂	58.3
64	SNTSESEFK(SNTSESEF)FRVTQLAPK(MPA-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)AQIKE-NH ₂	80.5
91	SNWSEDLK(SNWSEDL)FQIIQLHPK(MPA-NH-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-CO)AKIEE-NH ₂	69.4

[0526]

[0527]

실시예 21: 세포독성 T 림프구 IFN- γ 분석시험

[0528]

종양 세포 (MDMBA231)를 배양한 후, 고 글루코오스 완전 DMEM 배지에 유지하였다. 1×10^5 종양 세포는 시험 화합물의 필요 농도로 96 웰 플레이트에 도포된 다음, 37 °C에서 4 시간 동안 유착되었다. 수집된 비세포 1×10^5 를 종양 세포 및 시험 화합물 함유 웰에 첨가하였다. 비세포는 항-CD3 및 항-CD28 항체 (각각 1 μ g/ml)로 자극된 후, 공동 배양물을 37°C에서 72 시간 동안 5% CO₂ 중에서 배양하였다. 배양 72 시간 후, 세포 배양 상청액을 수집하고 제조업체의 ELISA 프로토콜(e Biosciences; 88-7314)에 의해 생쥐 IFN γ 측정을 위한 처리를 하였다.

[0529]

ELISA: 제조업체의 프로토콜에 대하여

[0530]

요약하면, 96 웰 ELISA 플레이트를 코팅 완충액 중 캡처 항체의 100 μ l/웰로 코팅한 후, 4°C에서 철야 배양하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한 후, 200 μ l의 1x 분석 희석액으로 실온에서 1 시간 동안 블로킹하였다. 세척 단계 후, 100 μ l의 세포 배양 상청액을 웰에 첨가한 다음, 실온에서 2 시간 동안 더 배양하였다. 적절한 표준물도 또한 포함하였다. 세척 단계 후, 플레이트를 100 μ l/웰의 검출 항체와 함께 1 시간 동안 배양하였다. 세척 단계를 반복하고 플레이트를 100 μ l/웰의 Avidin-HRP와 함께 30 분 동안 배양하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 수회 다시 세척한 후, 100 μ l/웰의 기질 용액과 함께 15분 동안 배양하였다. 50 μ l의 정지 용액을 각 웰에 첨가한 후, 플레이트를 450 nm에서 관찰하였다. 표준물에 대한 흡수치를 작도한 후, IFN- γ 농도는 Graph Pad Prism 소프트웨어를 이용하여 측정되었다(도 6). 각 실험 조건을 3회 반복 실시하고, 각 실험은 적어도 3회 실시하였다.

- [0531] 폴드 유도 = 화합물/배경 IFN- γ 방출의 존재 또는 부재 하에 자극된 비세포에 의해 방출된 IFN- γ
- [0532] 자극된 비세포: 비세포 + 시험 화합물의 존재 또는 부재 하에 항-CD3/CD28 자극
- [0533] 배경 IFN- γ 방출: 비세포 + 항-CD3/CD28 + 종양
- [0534] **실시예 22:** B16F10 피하 흑색종 모델에서 일차 종양 성장 및 폐 전이에 대한 화합물 번호 8의 생체내 효과
- [0535] **동물:**
- [0536] 6~8주령의 C57/Black6 암컷 생쥐 (Aurigene, Bangalore, India)를 실험에 사용하였다. 실험을 실시하기 전에 실험실에서 1 주일 동안 동물을 적응시켰다.
- [0537] 0일 켜, 70~75% 융합도로 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 성장된 B16F10 세포를 수집한 후, 동물당 1×10^6 세포를 생쥐의 오른쪽 옆구리 피하에 주사하였다. 1일째, PBS에 용해된 펩티드 (화합물 번호 8) (5mg/kg의 투여량, pH 7.4)을 매일 한번씩 14일 동안 10ml/kg 부피비로 피하 투여하였다. 생쥐의 매개체 대조군은 식염수만을 섭취하게 하였다. 각 군은 10 마리의 동물로 구성되었다. 체중과 임상적 증상을 매일 기록하였다. 종양 부피를 슬라이드 캘리퍼로 측정하였다. 5 mg/kg으로 투여된 화합물 번호 8은, 종양 성장을 44 % 정도까지 억제하였다($p < 0.001$, 2-웨이 ANOVA). 투여하는 기간 동안 체중 감소가 없었고, 임상적 증상이 관찰되지 않았다. 14 일의 투여 기간의 말기에 매개체로 처리된 동물의 평균 종양 부피는 496 mm^3 이었고, 화합물 번호 8로 처리된 동물의 종양 부피는 276 mm^3 이었다(도 7). 투여 기간 말기에, 폐를 적출하여 검은 결절의 수를 셈으로써 전이 분석을 하였다. 화합물 8은 전이율을 60% 이상 감소된 것이 관찰되었다. 매개체와 화합물 8로 처리된 폐의 사진을 도 8에 나타냈다.
- [0538] **실시예 23** B16F10 전이 모델에서 전이 억제에 미치는 화합물 번호 8, 34, 69, 82, 83, 91의 생체내 효과
- [0539] 전이 모델의 경우에, 0.1×10^6 B16F10 세포를 C57/Black6 생쥐에게 정맥 주사하였다. pH 7.4의 PBS에 용해된 시험 화합물을 매일 한번 5 mg/kg의 양으로 피하 투여하였다. 매개체 대조군의 생쥐는 식염수만을 섭취하게 하였다. 각 군은 10 마리의 동물로 구성되었다. 체중과 임상적 증상을 매일 기록하였다. 처리 11일 후, 폐 전이는 해부 현미경으로 결절의 수를 측정하여 평가되었다. 도 9는 투여한 지 11일 말기에 대한 것을 나타낸다.
- [0540] **실시예 24** 4T1 동소 포유동물 암종 모델로 화합물 번호 8의 효과
- [0541] 0일 켜, 70~75% 융합도(confluency)에서 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 에서 성장된 4T1 세포를 수집한 후, 동물당 1×10^6 세포를 포유동물 지방 피드에 매트릭셀(matrigel) 동소적으로 주사하였다. 1일째, pH 7.4의 PBS에 용해된 펩티드 (화합물 번호 8) (3mg/kg의 투여량)을 매일 한번 5.5주 동안 10ml/kg 부피비로 피하 투여하였다. 생쥐의 매개체 대조군은 식염수만을 섭취하게 하였다. 각 군은 10 마리의 동물로 구성되었다. 체중과 임상적 증상을 매일 기록하였다. 종양 부피를 슬라이드 캘리퍼로 측정하였다. 연구 말기에, 폐 전이는 해부 현미경으로 결절의 수를 측정하여 평가되었다. 도 10은 투여한 지 40일 말기에 대한 것을 나타낸다. 3 mg/kg으로 투여된 화합물 번호 8은 일차 종양의 부피를 44 % 정도까지 억제하였다. 투여하는 기간 동안 체중 감소가 없었다. 화합물 번호 8로 처리된 군의 동물중 10%는 완전 회복되었고, 또 다른 10%는 종양 성장의 부분 회복을 나타냈다. 40일째, 동물을 안락사시킨 후, 그들의 폐에서 해부 현미경으로 종양 결절을 관찰하였다. 종양 부피가 매체 처리된 군과 유사할지라도, 한 동물에서는 전이가 완전 억제되었다 (종양 결절이 관찰되지 않음). 일차 종양 부피의 완전한 회복을 나타낸 동물에서는 또한 종양 결절이 관찰되지 않았다. 화합물 번호 8로 처리된 동물은 >60 % 이상까지 평균 전이 감소율을 나타냈다.
- [0542] **실시예 25** 신장 세포 암종 모델에서 화합물 34 및 83의 효과
- [0543] 6~8주령의 BALB/c 암컷 생쥐를 임의로 제공된 음식과 물의 12/12 h 명암 스케줄로 온도 제어된 방에 유지하였다. 비융합성 단층으로부터 수집된 RENCA 세포는 복막을 개복하지 않고 1일째 신장 캡슐 하에 주입하였다. 피부 절개는 자동 봉합 클립으로 밀봉하였다. 1일째, 배지 $40 \mu\text{l}$ 내의 신장 세포 (15×10^4)를 생쥐의 신장 캡슐 하에 주입하였다. 펩티드를 5 mpk에서 2일부터 피하 투여하고, 21일 동안 평가하였다. 투여 말기(21일)에 동물을 안락사시킨 후, 좌우 신장(대조용)의 종양의 중량을 측정한 다음, 11에 나타낸 것처럼 억제율(%)을 작도하였다.
- [0544] **실시예 26: 액체 배지 미세회석법에 의한 최소 억제 농도(MIC) 측정 방법**
- [0545] 화합물의 필요량을 평량한 후, 물/디메틸 술폭시드/적합한 용매에 용해하여 1 mg/ml의 원액을 얻었다. 원액을

MHB/CAMHB에 희석하여 요건에 맞는 8 $\mu\text{g/ml}$ 또는 64 $\mu\text{g/ml}$ 또는 512 $\mu\text{g/ml}$ 용액을 얻었다. 멀티채널 피펫을 사용하고 MHB/CAMHB를 사용하여 96 웰 마이크로적정 트레이에서 연속 2배 희석액의 화합물을 준비하였다. 유기체를 $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 110 ± 10 rpm에서 4~5 시간 동안 MHB/CAMHB에서 성장시켰다. 배양액의 광학 밀도(OD)는 0.5 McFarland 표준($1 \sim 2 \times 10^8$ cfu/ml)에 해당하는 625 nm까지 조절된 후, $(5 \pm 5) \times 10^4$ cfu/웰의 최종 접종물을 얻도록 희석되었다. 액체 배지, 화합물 및 유기체 대조군을 고정하였다. 미세 희석 트레이를 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 주위 공기 인큐베이터에서 16~20 시간 동안 배양하였다. 배양 기간 후, 웰 내의 유기체 성장은 관측 장치에 의해 맨눈으로 검사하였다. 맨눈으로 측정된 유기체의 성장을 완전 억제하는 가장 낮은 농도의 항균제를 MIC로서 취했다. MIC 값 측정 결과, 시험 화합물 8 (MIC ($\mu\text{g/ml}$)- >32)이 항박테리아 작용을 나타내지 않고, 표준 시약 즉, 레보플록사신 및 시프로플록사신은 동일한 실험에서 MIC ($\mu\text{g/ml}$) 값 0.015 및 0.007을 나타냈다.

[0546] 실시예 27: 대장균 패혈증의 생쥐 모델에서 화합물의 생체내 효과

[0547] 물질 및 방법

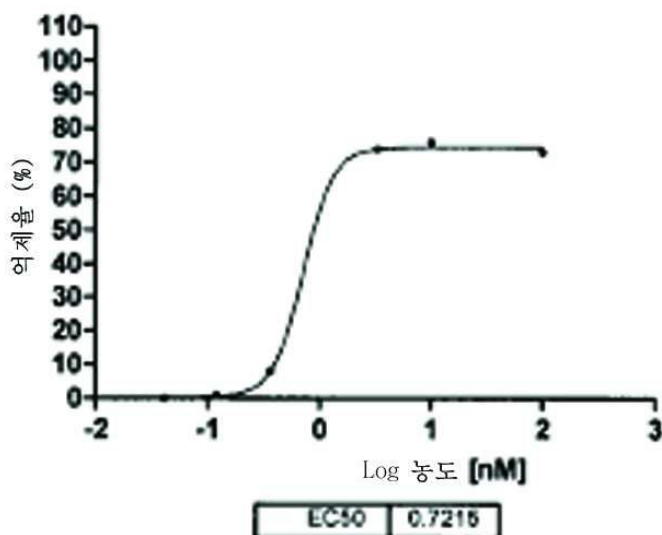
[0548] 사용된 박테리아 균주는 대장균 ATCC 25922이고, 박테리아 현탁액을 보통 식염수로 제조되어 접종물 약 5×10^8 CFU/ml를 얻었다. BALB/c 또는 스위스 알비노 생쥐(체중 18~22 g)를 연구용으로 사용하였다. 동물을 개별적으로 환기되는 케이지 (IVCs)에서 5일 동안 격리시켰다. 음식과 물을 임의로 제공하였다. 약간 어두운 곳에서 12 시간의 주기로 $22 \sim 26^\circ\text{C}$ 에서 온도를 유지하였다.

[0549] 과정

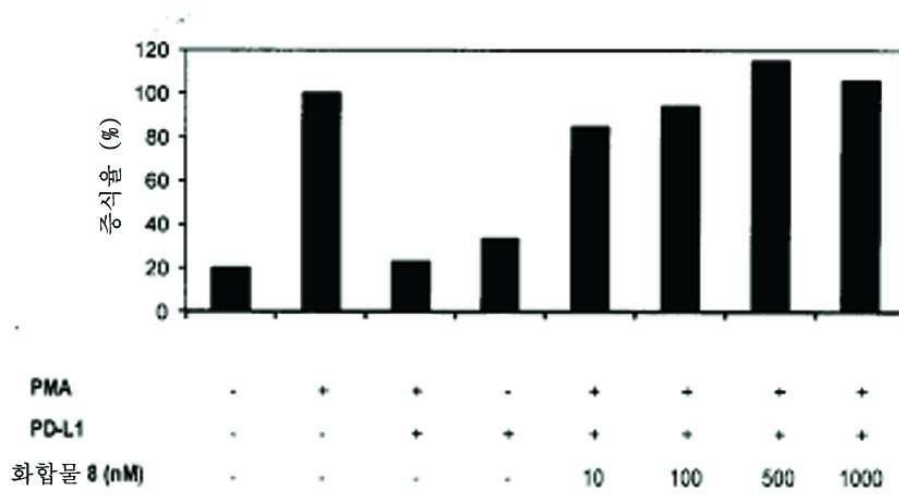
[0550] 약 $1 \sim 2 \times 10^8$ CFU/ml를 함유하는 최종 접종물을 정맥 경로로 동물에 투여되었다. 감염 24 시간 후에 처리를 개시하고, 화합물을 2일 동안 3 시간 간격으로 하루 3회 투여하였다. 동물의 한 그룹은 처리하지 않은 채 감염 대조용으로 사용하였다. 2일 동안 처리를 종료한 다음, 마지막 투여 3 시간 후 모든 동물(처리 및 비처리)을 죽이고, 여러 기관(신장, 비장 및 폐)을 무균상태로 적출하여 박테리아 수를 측정하기 위해 처리하였다. 적출된 기관 샘플을 균질화 한 후, 보통 식염수로 연속적으로 희석한 다음, TSA 플레이트에 도포하였다. 플레이트를 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 18~24 시간 동안 배양한 후, 박테리아 수를 측정하였다. 처리된 동물과 대조용 동물을 비교 분석하고, 적절한 통계법을 이용하여 도 12에 나타난 바와 같이 통계치를 계산하였다.

도면

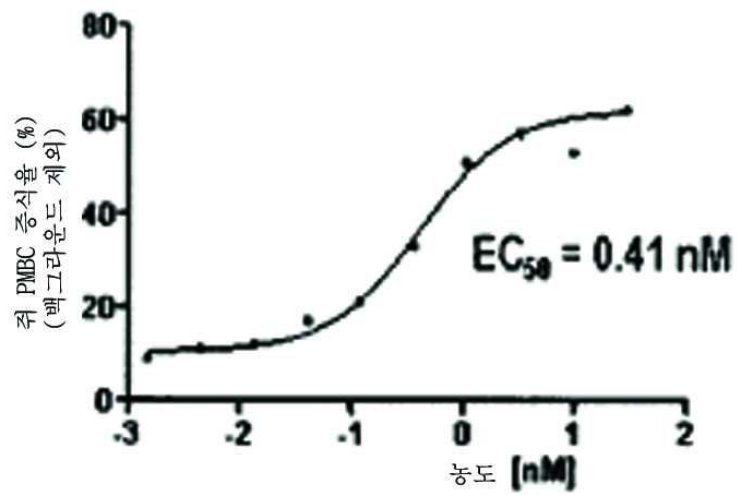
도면1



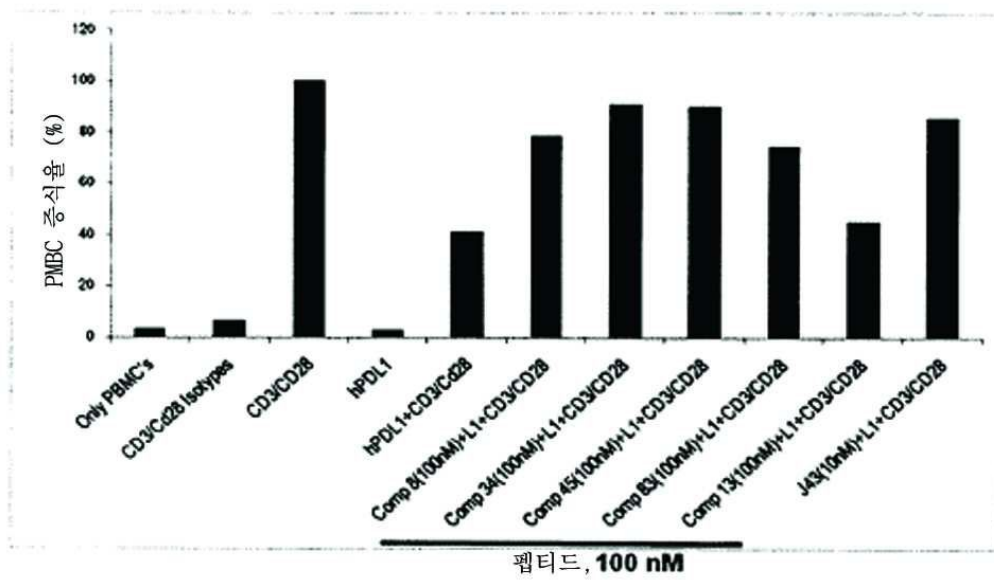
도면2



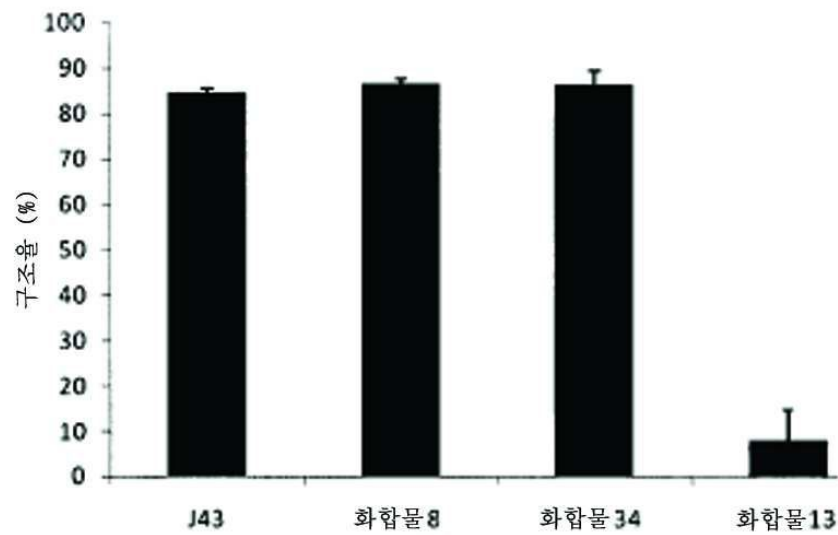
도면3



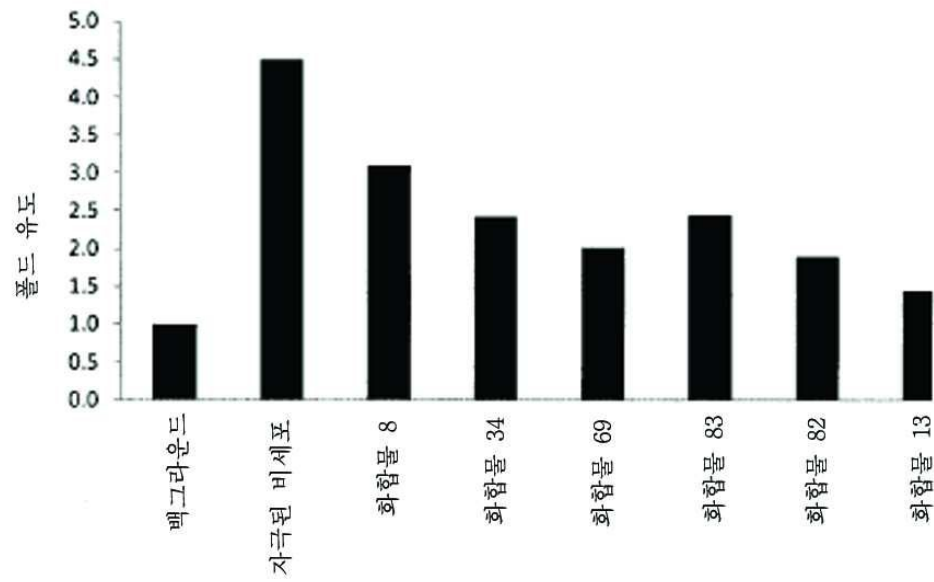
도면4



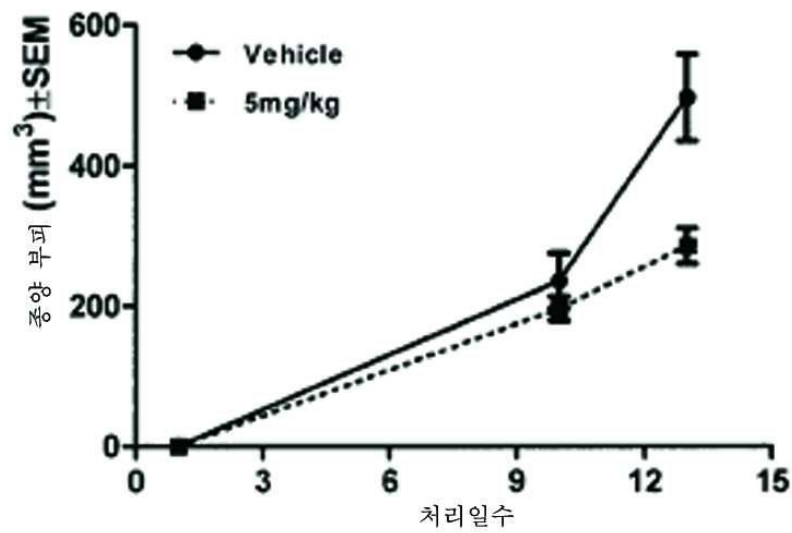
도면5



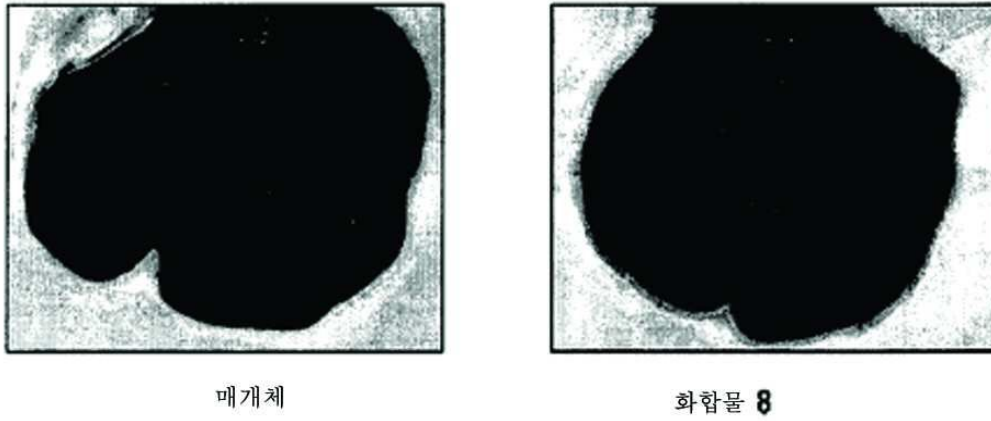
도면6



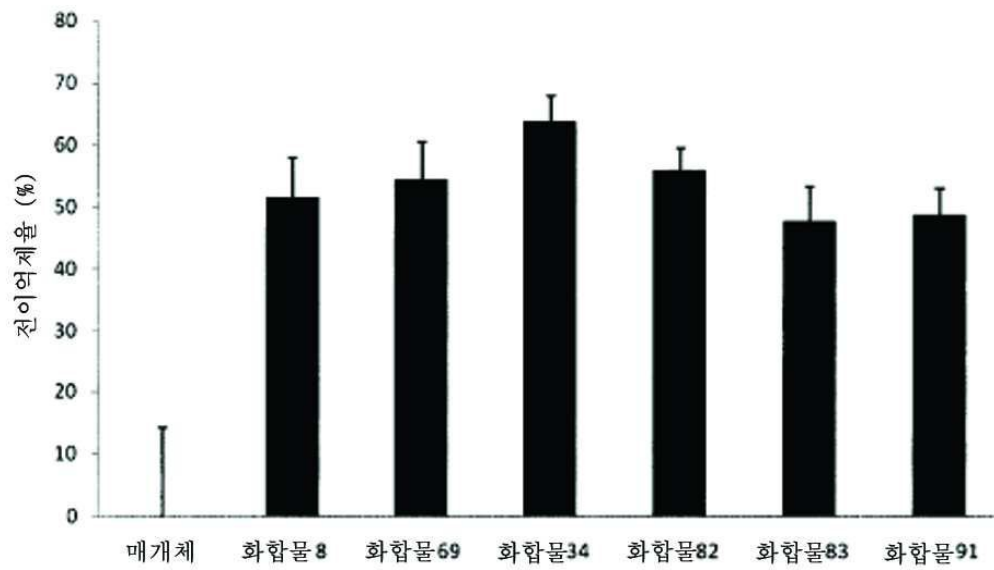
도면7



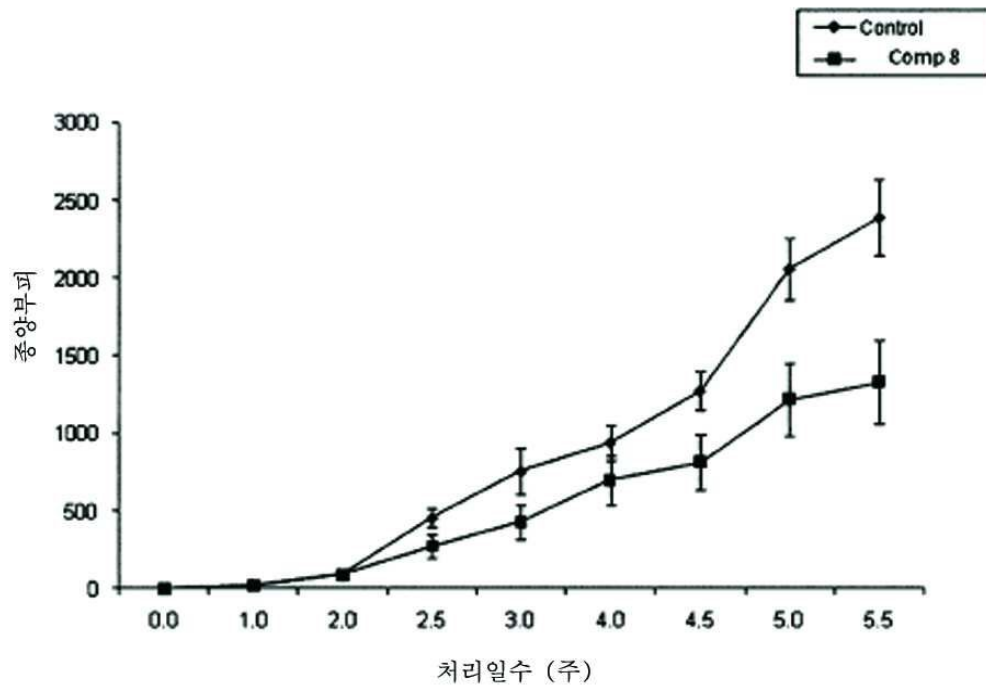
도면8



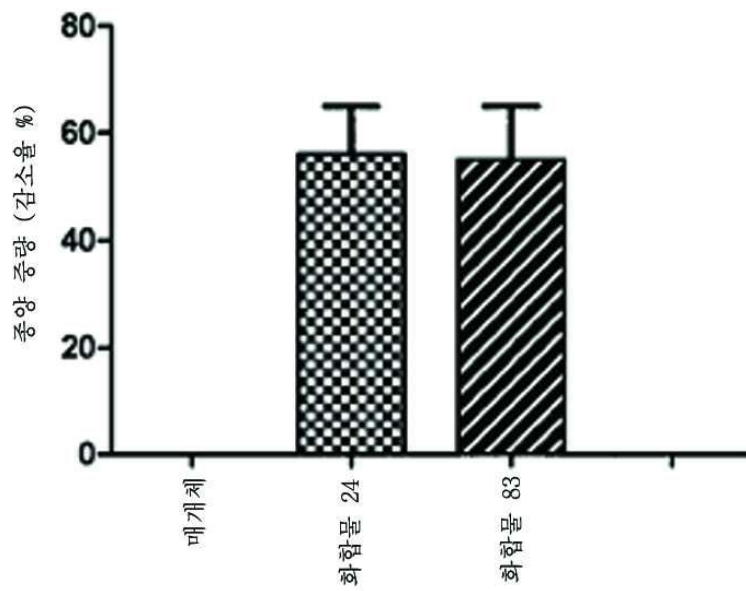
도면9



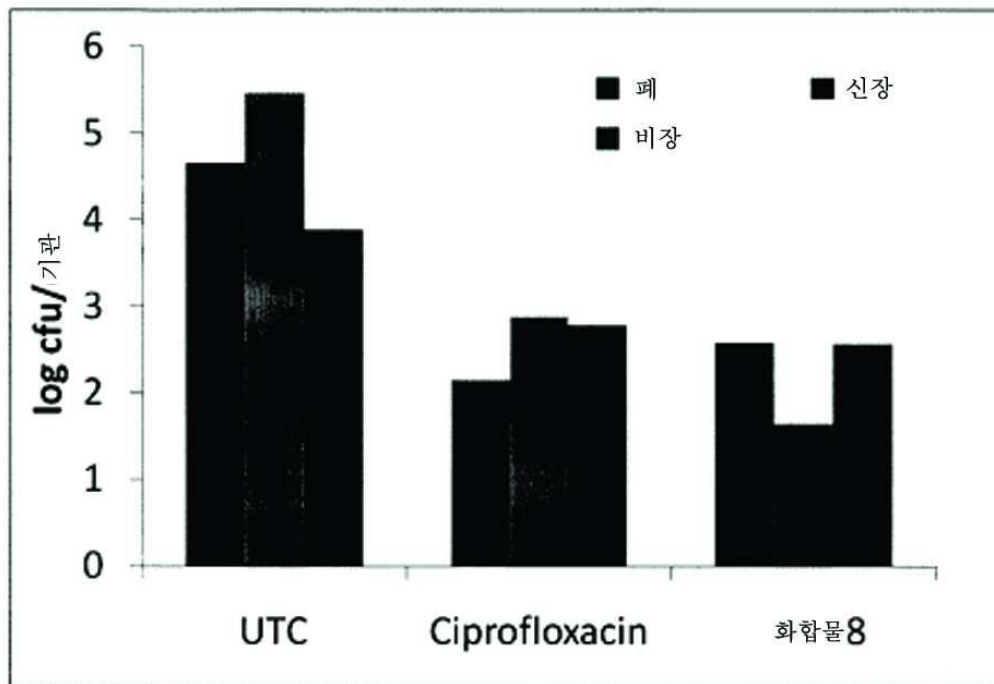
도면10



도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> AURIGENE DISCOVERY TECHNOLOGIES LIMITED

<120> IMMUNOSUPPRESSION MODULATING COMPOUNDS

<130> FPAA2481PCT

<150> 1805/CHE/2010

<151> 2010-06-25

<150> US 61/381,593

<151> 2010-09-10

<160> 148

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapien

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(137)

<223> Human PD-1 ectodomain

<400> 1

Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn
1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu
20 25 30

Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala
35 40 45

Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val
50 55 60

Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala
65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala
85 90 95

Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
100 105 110

Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg
115 120 125

Ser Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val
130 135

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(5)

<223> A strand

<400> 2

Pro Pro Thr Phe Ser

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (17)..(23)

<223> B strand

<400> 3

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (24)..(30)

<223> BC loop

<400> 4

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe

1 5

<210>

> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (31)..(37)

<223> C-Strand

<400> 5

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (38)..(42)

<223> C-C' loop

<400> 6

Ser Pro Ser Asn Gln

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (43)..(50)

<223> C'-strand

<400> 7

Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro

1 5

<210> 8

<211> 2

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (51)..(52)

<223> C'-C" loop

<400> 8

Glu Asp

1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (53)..(56)

<223> C" strand

<400> 9

Arg Ser Gln Pro

1

<210> 10

<211> 5

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (57)..(61)
 <223> C"-D-loop
 <400> 10
 Gly Gln Asp Cys Arg
 1 5

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (62)..(66)
 <223> D-strand
 <400> 11
 Phe Arg Val Thr Gln
 1 5

<210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (67)..(71)
 <223> DE loop
 <400> 12
 Leu Pro Asn Gly Arg
 1 5

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (72)..(77)

<223> E strand

<400> 13

Asp Phe His Met Ser Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (86)..(94)

<223> F-strand

<400> 14

Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (95)..(99)

<223> F-G loop

<400> 15

Leu Ala Pro Lys Ala

1 5

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (100)..(103)

<223> G-strand

<400> 16

Gln Ile Lys Glu

1

<210> 17

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(137)

<223> Mouse-PD-1

<400> 17

Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn

1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu

20 25 30

Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala

35 40 45

Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile

50 55 60

Ile Gln Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr

65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His

85 90 95

Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr

100 105 110

Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys

115 120 125

Pro Glu Gly Arg Phe Gln Gly Met Val

130 135

<210> 18

<211> 137

<212> PRT

<213> Rattus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(137)

<223> Rat- PD-1

<400> 18

Gln Leu Ser Trp Gln Ser Gly Trp Leu Leu Val Ser Glu Gly Ala Asn

1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Leu

20 25 30

Asn Trp Tyr Arg Leu Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala

35 40 45

Phe Cys Asn Gly Tyr Ser Gln Pro Val Arg Asp Ala Arg Phe Gln Ile

50 55 60

Val Gln Leu Pro Asn Gly His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Ala

65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Pro

85 90 95

Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr

100 105 110

Glu Arg Ile Leu Glu Thr Pro Thr Arg Tyr Pro Arg Pro Ser Pro Lys

115 120 125

Pro Glu Gly Gln Phe Gln Gly Leu Val

130 135

<210> 19

<211> 137

<212> PRT

<213> Canis sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(137)

<223>

Dog -PD-1

<400> 19

Pro Leu Thr Phe Ser Pro Ala Gln Leu Thr Val Gln Glu Gly Glu Asn

1 5 10 15

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu Ala Asp Ile Pro Asp Ser Phe Val Leu

20 25 30

Asn Trp Tyr Arg Leu Ser Pro Arg Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala
 35 40 45
 Phe Gln Glu Asp Arg Ile Glu Pro Gly Arg Asp Arg Arg Phe Arg Val
 50 55 60

Met Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Ile Val Ala Ala
 65 70 75 80
 Arg Leu Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Tyr Leu Pro
 85 90 95
 Pro Asn Thr Gln Ile Asn Glu Ser Pro Arg Ala Glu Leu Ser Val Thr
 100 105 110
 Glu Arg Thr Leu Glu Pro Pro Thr Gln Ser Pro Ser Pro Pro Pro Arg
 115 120 125

Leu Ser Gly Gln Leu Gln Gly Leu Val
 130 135

<210> 20
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Equus sp
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(137)
 <223> Horse -PD-1
 <400> 20

Pro Leu Thr Phe Ser Pro Ala Arg Leu Met Val Pro Glu Gly Ala Asn
 1 5 10 15
 Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu His Phe Val Leu
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala

35 40 45
 Phe Pro Glu Asp Ser Ser Gln Pro Gly Arg Ser Gly Arg Phe Arg Val
 50 55 60
 Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Leu Ala Ala
 65 70 75 80

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Pro

85

90

95

Pro Lys Thr Gln Ile Asn Glu Ser Pro Arg Ala Glu Leu Thr Val Thr

100

105

110

Glu Arg Ile Pro Glu Pro Pro Thr Glu His Pro Ser Pro Pro Pro Ser

115

120

125

Pro Ala Gly Gln Leu Gln Gly Leu Val

130

135

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (49)..(52)

<223> C' strand to C'C'' loop

<400> 21

Phe Pro Glu Asp

1

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (43)..(56)

<223> C' strand to C'' strand

<400> 22

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

1

5

10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (38)..(50)

<223> CC' loop to C' strand

<400> 23

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

1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (95)..(103)

<223> FG loop to G strand

<400> 24

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (62)..(71)

<223> D strand to DE loop

<400> 25

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (17)..(23)

<223> B strand

<400> 26

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (24)..(30)

<223> BC loop

<400> 27

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (31)..(37)

<223> C-Strand

<400> 28

Met Leu Asn Trp Asn Arg Leu

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (38)..(42)

<223> C-C' loop

<400> 29

Ser Pro Ser Asn Gln

1 5

<210> 30

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus sp
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (43)..(50)
 <223> C'-strand
 <400> 30

Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys

1 5

<210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Mus sp
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (53)..(56)
 <223> C" strand
 <400> 31

Leu Ser Gln Pro

1
 <210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (57)..(61)
 <223> C"-D-loop

<400> 32

Val Gln Asp Ala Arg

1 5
 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp
 <220><221> PEPTIDE

<222> (62)..(66)

<223> D-strand

<400> 33

Phe Gln Ile Ile Gln

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (86)..(94)

<223> F-strand

<400> 34

Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (95)..(99)

<223> F-G loop

<400> 35

Leu His Pro Lys Ala

1 5

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (100)..(103)

<223> G-strand

<400> 36

Lys Ile Glu Glu

1

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (49)..(52)

<223> C' strand to C'C'' loop

<400> 37

Phe Cys Asn Gly

1

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (43)..(56)

<223>

> C' strand to C'' strand

<400> 38

Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln Pro

1 5 10

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (38)..(50)

<223> CC' loop to C' strand

<400> 39

Ser Pro Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys

1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (95)..(103)

<223> FG loop to G strand

<400> 40

Leu His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu

1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp

<220><221> PEPTIDE

<222> (62)..(71)

<223> D strand to DE loop

<400> 41

Phe Gln Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C terminal modified with NH2 group

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> BC loop having C terminal modified with NH2 group

<400> 42

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Ac or CH3CO group attached at the N terminal and C terminal

modified with NH₂ group

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> Ac group added on N terminal

<400> 43

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe

1 5

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C terminal modified with NH₂

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> C terminal modified with NH₂

<400> 44

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

1 5 10 15

Gly Gln Asp

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> C terminal modified with NH₂ group

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> C terminal modified with NH₂

<400> 45

Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> C terminal modified with NH2 group
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> C terminal modified with NH2 group
 <400> 46
 Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal ;
 branching at Lys6
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222>
 (1)..(20)
 <223> Branch sequence Sequence ID 4 attached to Lys6
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(20)
 <223> Amino Hexanoic acid present in between Gln 11 and Lys12
 <400> 47
 Phe Arg Val Thr Gln Lys Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala
 1 5 10 15
 Gln Ile Lys Glu
 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Branched at LYS6 with Seq ID 4 and C terminal modified with NH2
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(20)

<223> branched amino acid sequence, Seq ID 4 attached to the Lys6 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> C terminal modified with NH2

<400> 48

Phe Arg Val Thr Gln Lys Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala

1 5 10 15

Gln Ile Lys Glu

20

<210> 49

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide at LYS8 with Seq ID 4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branched amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 49

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched at LYS6 with a peptide of sequence SNQTDK and C terminal
modified with NH2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> branched amino acid sequence SNQTDK attached to the Lys6 residue

<400> 50

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

1 5 10 15

Gln Ile Lys Glu

20

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and branch
amino acid sequence at Lys6 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branched amino acid sequence SNQTDK attached to the Lys6 residue

<400> 51

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Leu Ala Pro

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 52

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and branch
amino acid sequence at Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branched amino acid sequence SNQTDK attached to the Lys8 residue

<400> 52

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 53

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and two
branched amino acid sequence; attached at Lys8 residue and Lys14
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> first branch amino acid sequence SNQTDK attached to the Lys8
residue and the second branch amino acid sequence LAP
attached to the Lys14 residue

<400> 53

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Arg Val Thr Gln Lys Ala Gln

1 5 10 15

Ile Lys Glu

<210> 54

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal ; branch
amino acid sequence attached to the Lys8 residue; and all amino
acids are D amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 54

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 55

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and branch
amino acid sequence attached to the Lys14 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> branch amino acid sequence, KDTQNS attached to the Lys14
residue

<400> 55

Glu Lys Ile Gln Ala Lys Pro Ala Tyr Trp Asn Leu Val Lys Asp Thr

1 5 10 15

Gln Asn Ser

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
Biotin-Ahx attached to the N terminal; and branching at Lys8
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 56

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 57

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; C6 lipid
attached to the N terminal; and branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 57

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 58

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; Ac
(CH3CO) group attached to the N terminal; and branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 58

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 59

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branch
amino acid sequence at Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence attached to the Lys8 residue; the
branch amino acid sequence is Sequence ID 4 with a modified PEG
molecule (NH₂-[PEG]11-CO-) attached to its N terminal

<400> 59

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal; branching
at Lys8 ; and a modified PEG molecule (NH-[PEG]11-CO-) between
Lys8 and Lue9

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> Branched amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 60

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys

1 5 10 15

Glu

<210> 61

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal; branching
at Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence is Sequence ID 4 with a C6 lipid group attached to its N terminal

<400> 61

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 62

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching at Lys8; and C6 lipid group attached to both Branch & N-terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8 residue

<400> 62

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 63

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; and two olefinic amino acids joined together forming a loop structure

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> Two Xaa are olefinic amino acids in position 8 and 12, where the olefinic amino acids are joined forming a loop structure

<

<400> 63

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Xaa Pro Lys Ala Xaa Ser Asn Thr Ser

1 5 10 15

Glu Ser Phe

<210> 64

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; with two
olefinic amino acids joined together forming a loop structure and
a branch amino acid sequence attached to Lys13 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(34)

<223> two Xaa residues are olefinic amino acids positioned at 8 and 12,

where the olefinic amino acids are joined forming a loop
structure

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(34)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys13
residue

<400> 64

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Xaa Pro Lys Ala Xaa Lys Ser Asn Thr

1 5 10 15

Ser Glu Ser Phe Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile

20 25 30

Lys Glu

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; having
two Xaa (olefinic amino acids) in position 8 and 12, and a
branching at Lys13

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(13)

<223> Two olefinic amino acids (Xaa) are in position 8 and 12, and are
joined forming a loop structure

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(13)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys13
residue

<400> 65

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Xaa Pro Lys Ala Xaa Lys

1 5 10

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 66

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

1 5 10 15

Ile Lys Glu

<210> 67

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide Sequence with NH2 modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<400> 67

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

1 5 10 15

Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 68

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide Sequence with NH2 modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<400> 68

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 69

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide Sequence with NH2 modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(29)

<400> 69

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Phe

1 5 10 15

Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

25

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 70

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys

1 5

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> Branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 71

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys

1 5 10 15

Glu

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and

branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> Branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 72

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Arg Val Thr Gln Lys Ala Gln

1 5 10 15

Ile Lys Glu

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> Branched amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 73

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Lys Ala Gln Ile Lys Glu

1 5 10

<210> 74

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching
at Lys8 residue; and a lipid attached to Lys 21

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8

residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C16 lipid attached to Lys 21

<400> 74

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 75

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching
at Lys8 and a lipid attached to Lys 17

<220><221> MISC_FEATURE

<222

> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C16 lipid attached to Lys 17

<400> 75

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; with two
branches

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> first branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the
Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> a second branch LAP attached to Lys 14

<400> 76

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Arg Val Thr Gln Lys Lys Ala

1 5 10 15

Gln Ile Lys Glu

20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; with two

branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> first branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the
Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> second branch PKA attached to Lys 16

<400> 77

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

1 5 10 15

Gln Ile Lys Glu

20

<210> 78

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; with

branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence LAP attached to the Lys8 residue

<400> 78

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 79

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching

at Lys4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(18)

<223> branch amino acid sequence LAP attached to the Lys4 residue

<400> 79

Leu Ala Pro Lys Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile

1 5 10 15

Lys Glu

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide Sequence with NH2 modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<400> 80

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

1 5

<210> 81

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8 residue; and a lipid attached to Lys 10

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C16 lipid attached to Lys 10

<400> 81

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Lys Val Thr Gln Leu Ala Pro

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 82

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

1 5 10 15

<210> 83

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys13

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys13
residue

<400> 83

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 84

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide Sequence with NH2 modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<400> 84

Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

1 5 10

<210> 85

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8 and a lipid attached to Lys 10

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> Branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8

residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> C8 (CH₃(CH₂)₆CO) lipid attached to Lys 10

<400> 85

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Lys Val Thr Gln Leu Ala Pro

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 86

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal and
branching at Lys8 and a lipid attached to Lys 17

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8

residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C8 lipid attached to Lys 17

<400> 86

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 87

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and

branching at Lys8 ; and a lipid attached to Lys 21

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C8 (CH3(CH2)6CO) lipid attached to Lys 21

<400> 87

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 88

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and

branching at Lys8 and D-amino acids in the branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence Sequence ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 88

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 89

<211

> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys15

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, FSESTNS attached to the Lys15
residue

<400> 89

Glu Lys Ile Gln Ala Lys Pro Ala Leu Gln Thr Val Arg Phe Lys Phe

1 5 10 15

Ser Glu Ser Thr Asn Ser

20

<210> 90

<211> 22

<212> PRT

<213>

> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys15; The peptide sequence is an retro inverso and
contains all D-amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, FSESTNS attached to the Lys15
residue

<400> 90

Glu Lys Ile Gln Ala Lys Pro Ala Leu Gln Thr Val Arg Phe Lys Phe

1 5 10 15

Ser Glu Ser Thr Asn Ser

20

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and

branching at Lys8 residue and PEG-20 attached to Lys21

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 91

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 92

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8 and PEG-20 attached to Lys21

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 92

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 93

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8 and PEG-20 attached to Lys17

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8 residue

<400> 93

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 94

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and branching at Lys8 residue and a mini PEG molecule attached to Lys10

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8 residue

<400> 94

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Lys Val Thr Gln Leu Ala Pro

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 95

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and branching at Lys8 residue and PEG-10 attached to Lys17

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8 residue

<400> 95

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 96

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal and
branching at Lys8 residue and PEG-20 attached to Lys21

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 96

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 97

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal and
branching at Lys8 residue and CH₃CO group attached to the Lys10

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 97

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Lys Val Thr Gln Leu Ala Pro

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 98

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal and
branching at Lys8 and CH₃CO group attached to Lys17

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> CH₃CO group attached to the Lys17

<400> 98

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 99

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> CH₃CO group attached to the Lys21

<400> 99

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 100

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal and
branching at Lys8 and lipid group attached

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C6lipid group attached to the Lys17

<400> 100

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 101

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
Biotin-Ahx attached at the N terminal; and branching at Lys8
residue; all are D Amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 101

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 102

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

Biotin-Ahx attached at the N terminal; and branching at Lys14 ;

all are D Amino acids

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> branch amino acid sequence, KDTQNS attached to the Lys14

residue

<400> 102

Glu Lys Ile Gln Ala Lys Pro Ala Tyr Trp Asn Leu Val Lys Asp Thr

1 5 10 15

Gln Asn Ser

<210> 103

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 and lactum bond present between Glu17 and

Lys21

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 103

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

1 5 10 15

Glu Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 104

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 , lactum bond present between Lys10 and Glu14

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 104

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Phe Lys Val Thr Gln Glu Ala Pro

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 105

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 residue, lactum bond present between Glu13 and

Lys17

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, Sequence ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 105

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 106

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
 branching at Lys8 residue; a lipid attached to Lys21 and Ac
 (CH3CO) group attached to both N terminal and branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C8 lipid attached to the Lys21 residue

<400> 106

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
 branching at Lys8 residue; lipid attached to Lys21 and Ac

(CH3CO) group attached to both N terminal and branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
 residue; Ac (CH3CO) group is attached to its N terminal

<400> 107

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 108

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223>

Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal; a

branching at Lys8 ; a lipid attached to Lys21 and Ac (CH₃CO)

group attached to both N terminal of straight chain and branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue; with Ac (CH₃CO) group attached to its N terminal

<400> 108

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 109

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH₂ modified C terminal;

branching at Lys8 ; a lipid attached to Lys21 and Ac (CH₃CO)

group attached to both N terminal and branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue with Ac (CH₃CO) group attached to its N terminal

<400> 109

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 110

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SNWSEDL attached to the Lys8 residue

<400> 110

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Phe Gln Ile Ile Gln Leu His Pro

1 5 10 15

Lys Ala Lys Ile Glu Glu

20

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 8 attached to the Lys3
residue

<400> 111

Glu Asp Lys Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys

1 5 10 15

Glu

<210> 112

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 8 attached to the Lys8

residue

<400> 112

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys6

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 8 attached to the Lys6

residue

<400> 113

Leu Ala Pro Lys Ala Lys Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala

1 5 10 15

Gln Ile Lys Glu

20

<210> 114

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys7

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 8 attached to the Lys7
residue

<400> 114

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

1 5 10 15

Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 115

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys6

<

220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(24)

<223> Branch amino acid sequence, SNQTDK attached to the Lys6 residue

<400> 115

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

1 5 10 15

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 116

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys7

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(25)

<223> Branch amino acid sequence, VLNWYRM attached to the Lys7 residue

<400> 116

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Lys Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser

1 5 10 15

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20 25

<210> 117

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> Branch amino acid sequence, VLNWYRM attached to the Lys3 residue

<400> 117

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

1 5 10 15

Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 118

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(26)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 118

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Lys Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile

1 5 10 15

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20 25

<210> 119

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(24)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 119

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

1 5 10 15

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 120

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(26)

<223> Branch amino acid sequence, SNQTDK attached to the Lys8 residue

<400>

> 120

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Lys Gly Ile Tyr Leu Cys Gly Ala Ile

1 5 10 15

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20 25

<210> 121

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide Sequence with NH2 modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(18)

<400> 121

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

1 5 10 15

Lys Glu

<210> 122

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys7

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> Branch amino acid sequence, SNQTDK attached to the Lys7 residue

<400> 122

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

1 5 10 15

Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 123

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching

at Lys8 and lipid attached to Lys19

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, SNWSEDL attached to the Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> C16 lipid branch attached to the Lys19 residue

<400> 123

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Phe Gln Ile Ile Gln Leu His Pro

1 5 10 15

Lys Ala Lys Ile Glu Glu

20

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; with two branches

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> First branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Second branch MPA-NH-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-CO attached to the Lys17 residue

<400> 124

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 125

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> branch amino acid sequence, sNTSESF attached to the Lys8 residue

<400> 125

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 126

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
branching at Lys8 and Ser1 is D amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 126

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 127

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
branching at Lys8 and Ser in N terminal and branch are D amino
acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 127

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 128

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; with two
branches

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> First branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the
Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Second branch MPA-NH-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-CO attached to the Lys21
residue

<400> 128

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 129

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 residue; with amide bond between Ser1 and Asn2
reduced at both the N terminal and branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400

> 129

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 130

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 residue; and D-Asn at N-terminus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 130

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 131

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching

at Lys8 residue; and D-Asn in the branch

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8 residue

<400> 131

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 132

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; two branches

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> First branch amino acid sequence, SNWSEDL attached to the Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (1)..(22)

<223> Second branch MPA-NH-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-CO attached to the Lys17 residue

<400> 132

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Lys Phe Gln Ile Ile Gln Leu His Pro

1 5 10 15

Lys Ala Lys Ile Glu Glu

20

<210> 133

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with branching at Lys8

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 133

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 134

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 ; the amide bond between Ser1 and Asn2 at the

N terminal is reduced

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue

<400> 134

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 135

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 ;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue; the amide bond between Ser1 and Asn2 at the N terminal

of the branch SEQUENCE ID 4 is reduced

<400> 135

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 136

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 residue; the amide bond between Asn2 and Thr3

at the N terminal is reduced

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 136

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 137

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 ;

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8

residue; the amide bond between Asn2 and Thr3 at the N terminal
of the branch SEQUENCE ID 4 is reduced

<400> 137

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 138

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Lys8 residue; the amide bonds between Asn2 and Thr3
at the N terminal and the branch are reduced

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue ; the amide bonds between Asn2 and Thr3 at the N
terminal of the branch is reduced

<400> 138

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 139

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence; with two branches

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> First branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the
Lys8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Second branch C16 lipid attached to the Lys 17 residue

<400> 139

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 140

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; Xaa is

Orn residue present at the 8th position and branch amino acid

sequence attached to the Orn8 residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Orn8 residue

<400> 140

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Xaa Lys Ala Gln Ile Lys Glu

1 5 10

<210> 141

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; Xaa is 2,3-diaminopropionic acid

residue present at the 8th position and a branch amino acid

sequence attached to the Xaa residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Dpr8 residue

<400> 141

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Xaa Lys Ala Gln Ile Lys Glu

1 5 10

<210> 142

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; Xaa is 2,4-diaminobutric acid residue present at the 8th position and a branch amino acid sequence, attached to the Xaa residue

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Dbu8 residue

<400> 142

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Xaa Lys Ala Gln Ile Lys Glu

1 5 10

<210> 143

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching at Lys8 residue; lactum bond present between Lys17 and Glu21

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(23)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8 residue

<400> 143

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

1 5 10 15

Lys Ile Ala Gln Glu Lys Glu

20

<210> 144

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching
at Lys8 residue; lactum bond present between Lys9 and Glu13

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 144

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 145

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal; branching
at Lys8 residue; lactum bond present between Lys11 and Glu15

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 145

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

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 146

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;
branching at Lys8 residue; lactum bond present between Glu12 and
Lys16

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> Branch amino acid sequence, SEQUENCE ID 4 attached to the Lys8
residue

<400> 146

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

1 5 10 15

Pro Ala Gln Ile Lys Glu

20

<210> 147

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Peptide Sequence with NH2 modified C terminal

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<400> 147

Leu Ala Pro Lys Ala

1 5

<210> 148

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Branched peptide Sequence with NH2 modified C terminal;

branching at Ala5

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> Branch amino acid sequence, SNQTDK attached to the Ala5 residue

<400> 148

Leu Ala Pro Lys Ala Phe Arg Val Thr Gln Leu Ala Pro Lys Ala Gln
1 5 10 15
Ile Lys Glu