(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0031551
(43) 공개일자 2016년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/64 (2006.01) *A61K 38/12* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/64 (2013.01)
A61K 38/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7004512
(22) 출원일자(국제) 2014년07월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년02월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/047377
(87) 국제공개번호 WO 2015/013168
국제공개일자 2015년01월29일
(30) 우선권주장
61/858,263 2013년07월25일 미국(US)
62/015,854 2014년06월23일 미국(US)

(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
브루스, 알렉산드라 마샬
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 100 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
그로슈, 필리페
스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파마 아게
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **심부전의 치료를 위한 시클릭 폴리펩티드**

(57) 요 약

본 발명은 하기 화학식 I의 시클릭 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체를 제공하며, 여기서 X1, X3, X4, X7, X8, X9, X10, X11, X12 및 X13은 본원에 정의된다. 폴리펩티드는 APJ 수용체의 효능제이다. 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체를 제조하는 방법, 및 그의 치료 용도, 예컨대 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 약리학적 활성제의 조합물 및 제약 조성물을 제공한다.

<화학식 I>

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/48284 (2013.01)
A61K 47/48369 (2013.01)
C07K 14/47 (2013.01)
C07K 16/461 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
(72) 발명자
길마레스, 카를라
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 100 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
캔터, 아론
미국 02143 매사추세츠주 소머빌 브라스토우 애비뉴 20
로우, 창강
미국 49024 미시건주 포티지 아파트먼트 1 펀 코브 레인 3681
유세라, 에이미 리차드슨
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 100 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
야소시마, 가요
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 100 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
유안, 준
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 400 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
제크리, 프레드릭
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 100 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
자오, 홍주안
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I을 갖는 시클릭 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염; 또는 그와 실질적으로 동등한 폴리펩티드.

<화학식 I>

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

상기 식에서:

X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 Q, A 또는 pE이거나, 또는 X1은 C, c, hC, D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

X3은 P이거나 또는 X3은 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

X4는 R이거나 또는 X4는 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

여기서 X1, X3 및 X4 중 오직 1개는 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택된 황 함유 아미노산이고;

X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X1, X3 또는 X4의 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

X8은 K 또는 F이고;

X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

X10은 P이거나 또는 부재하고;

X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 또는 D-Abu이고;

X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택되고; 여기서:

Nle는 L-노르류신이고;

D-Nle는 D-노르류신이고;

D-hC는 D-호모시스테인이고;

hC는 L-호모시스테인이고;

Nal은 L-나파탈린이고;

D-Nva는 D-노르발린이고;

D-Abu는 D-2-아미노부티르산이고;

pE는 L-피로글루탐산이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 화학식 II를 갖는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

<화학식 II>

X1-R-P-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

상기 식에서:

X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 Q, A 및 pE로부터 선택되고;

X4는 C, c, hC 또는 D-hC이고;

X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X4의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

X8은 K 또는 F이고;

X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

X10은 P이거나 또는 부재하고;

X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

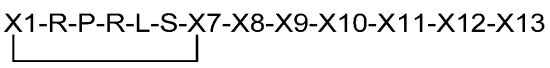
X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 F, (N-Me)F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

청구항 3

제1항에 있어서, 하기 화학식 III을 갖는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

<화학식 III>



상기 식에서

X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고;

X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; 여기서 X7의 측쇄는 X1의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

X8은 K 또는 F이고;

X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

X10은 P이거나 또는 부재하고;

X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

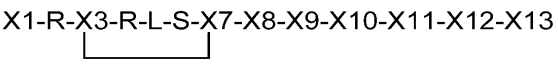
X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

청구항 4

제1항에 있어서, 하기 화학식 IV를 갖는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

<화학식 IV>



상기 식에서:

X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 Q, A 또는 pE이고;

X3은 C, c, hC 또는 D-hC이고; C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄;

X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X3의 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

X8은 K 또는 F이고;

X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

X10은 P이거나 또는 부재하고;

X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

청구항 5

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X1이 pE인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 6

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X1이 부재하는 것인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 7

제1항 내지 제4항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, N-말단이 아미드인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염.

청구항 8

제7항에 있어서, N-말단이 화학식 -NHR의 아미드이고, R이 아세틸, 벤조일, 페나실, 숙시닐, 옥타노일, 4-페닐부타노일, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3$C(O)-, 또는 Ph-CH_2CH_2NHC(O)-인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, X13이 F 또는 f인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, X13이 부재하는 것인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, X12가 부재하는 것인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, C-말단이 아미드인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염.

청구항 13

제12항에 있어서, C-말단이 화학식 -C(O)-R2의 아미드이고, R2가 $-NH_2$, -NH-Me, -NH-NHBn, 또는 -NH-$(CH_2)_2$-Ph인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, X8이 K인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, X9가 G인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, X10이 P인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, X11이 Nle 또는 D-Nle인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 18

제1항에 있어서,

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(페네틸)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(페네틸)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(페네틸)*
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH_2
*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(페네틸)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(페네틸)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(페네틸)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*

*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

로부터 선택되며, 여기서 "*"로 표지된 2개의 아미노산은 디술피드를 형성하는 아미노산을 나타내는 것인 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염.

청구항 19

a. 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 및

b. 반감기 연장 모이어티

를 포함하며; 여기서 상기 펩티드 또는 폴리펩티드 및 반감기 연장 모이어티는 임의로 링커를 통해 공유적으로 연결 또는 융합된 것인 생체접합체 또는 그의 다량체.

청구항 20

제19항에 있어서, 반감기 연장 모이어티가 IgG 불변 도메인 또는 그의 단편 또는 인간 혈청 알부민인 생체접합체 또는 그의 다량체.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 반감기 연장 모이어티가 LALA 돌연변이 (L234A, L235A)를 갖는 FcLALA 변형된 Fc 단편인 생체접합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 반감기 연장 모이어티가 링커를 통해 화학식 I, II, III 또는 IV의 폴리펩티드에 융합된 Fc 도메인이고, 여기서 링커는 하기 화학식: -[GGGGS]n-을 가지며, n은 1, 2 또는 3이거나, 또는 링커는 GS 또는 GG이고, 화학식 I, II, III 또는 IV의 폴리펩티드는 자연 발생 아미노산을 함유하는 것인 생체접합체.

청구항 23

제22항에 있어서, 폴리펩티드가 QRPC*LSC*KGPMPF, C*RPRLSC*KGPMPF 및 QRC*RLSC*KGPMPF로부터 선택된 화학식 I의 폴리펩티드이고, 여기서 "*"로 표지된 2개의 아미노산은 그의 측쇄를 통해 디술피드 또는 아미드 결합을 형성하는 아미노산을 나타내는 것인 생체접합체.

청구항 24

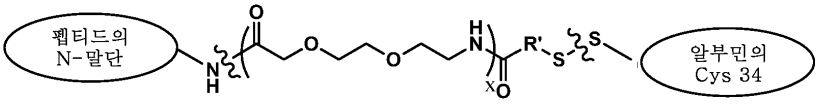
제22항 또는 제23항에 있어서, 반감기 연장 모이어티가 C-말단 리신이 결실되거나 알라닌으로 대체된 변형된 Fc 도메인인 생체접합체.

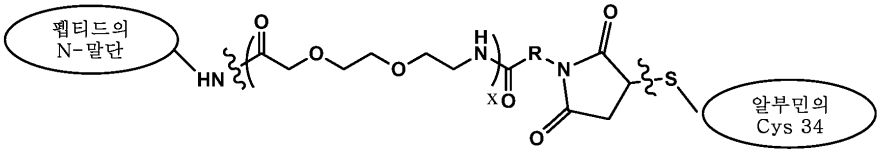
청구항 25

제19항 또는 제20항에 있어서, 반감기 연장 모이어티가 인간 혈청 알부민인 생체접합체 또는 그의 다량체.

청구항 26

제25항에 있어서, 인간 혈청 알부민이 하기 화학식의 링커:

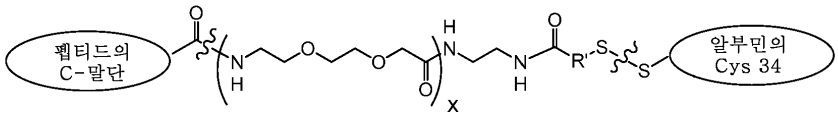


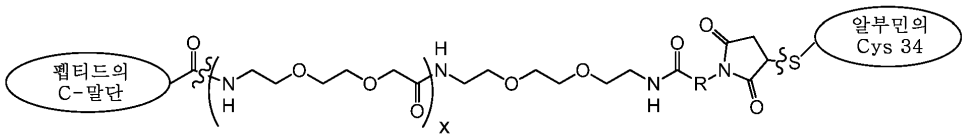


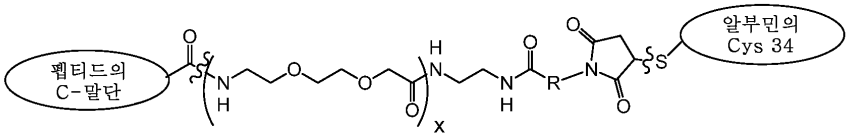
를 통해 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드의 N-말단에 화학적으로 연결되며, 여기서 x는 1-20이고, R은 선형 또는 분지형 알킬렌, 시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 또는 그의 조합이고, R'는 선형 또는 분지형 알킬렌, 아릴 또는 시클로알킬 또는 그의 조합인 생체접합체.

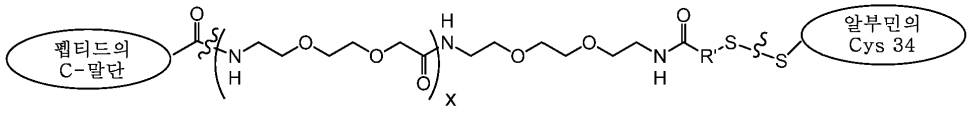
청구항 27

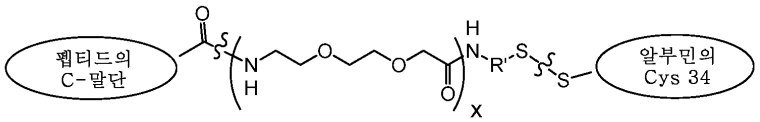
제19항 또는 제20항에 있어서, 인간 혈청 알부민이 하기 화학식의 링커:

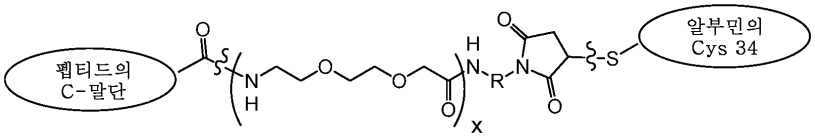












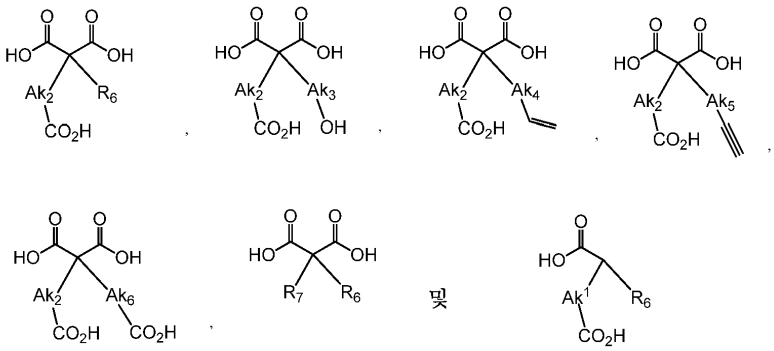
를 통해 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드의 C-말단에 화학적으로 연결되며, 여기서 x는 1-20이고, R은 선형 또는 분지형 알킬렌, 시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 또는 그의 조합이고, R'는 선형 또는 분지형 알킬렌, 아릴 또는 시클로알킬 또는 그의 조합인 생체접합체.

청구항 28

제19항에 있어서, 반감기 연장 모이어티가 지방산인 생체접합체.

청구항 29

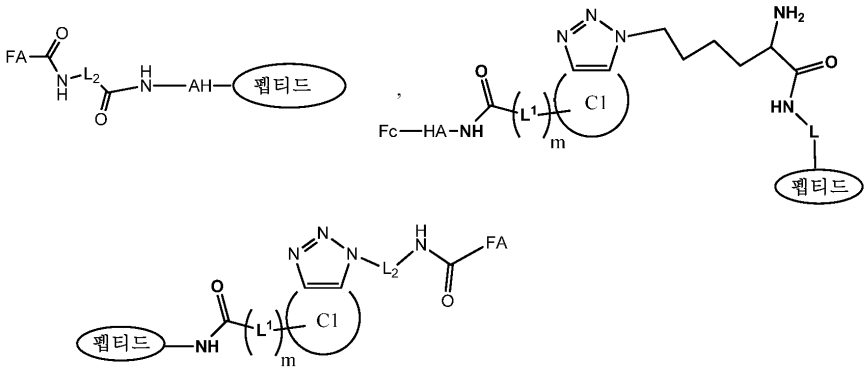
제28항에 있어서, 지방산이



로부터 선택되며, 여기서 Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 및 Ak^6은 독립적으로 (C_{8-20})알킬렌이고, R^6 및 R^7은 독립적으로 (C_{8-20})알킬인 생체접합체.

청구항 30

제19항, 제28항 및 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 화학식:



또는

을 가지며, 여기서 펩티드는 펩티드의 N-말단이고, n은 1, 2 또는 3이고, m은 0 또는 1이고, A는 알라닌이고, H는 히스티딘이고, L2는 링커이고, C1은 플루오린으로 임의로 치환된 모노, 디 또는 트리시클릭 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 고리계이고, L^1은 C1-C20 알킬렌 링커이고, 여기서 알킬렌 쇄는 옥소 (=O)로 임의로 치환되고, 여기서 1개 이상의 탄소는 O 또는 NH로 대체된 것인 생체접합체.

청구항 31

APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 질환 또는 장애가 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체.

청구항 34

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체.

청구항 35

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 또는 전자간증의 치료에 사용하기 위한 폴리펩티드, 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체.

청구항 36

치료 유효량의 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 1종 이상의 치료 활성 공동-작용제를 포함하는 조합물.

청구항 37

제36항에 있어서, 공동-작용제가 수축촉진제, 베타 아드레날린성 수용체 차단제, HMG-Co-A 리덕타제 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 억제제, 칼슘 채널 차단제 (CCB), 엔도텔린 길항제, 레닌 억제제, 이뇨제, ApoA-I 모방체, 항당뇨병제, 비만-감소제, 알도스테론 수용체 차단제, 엔도텔린 수용체 차단제, 알도스테론 신타제 억제제 (ASI), CETP 억제제, 항응고제, 렐락신, BNP (네시리티드) 및/또는 NEP 억제제로부터 선택된 것인 조합물.

청구항 38

치료 유효량의 제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 투여되는 대상체에서 심혈관 질환을 치료하기 위해 설계되고, 그의 야생형 대응물보다 큰 분해 저항성, 및 그와 동등하거나 또는 그보다 큰 생물활성을 나타내는 변형된 펩티드 및 폴리펩티드 서열을 포함하는 신규 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 조성물을 제조하는 방법 및 상기 조성물을 심혈관 질환을 치료하기 위한 제약 활성제로서 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 서양에서 심부전의 발생률은 65세 이후 성인에서 대략 1/100이다. 가장 흔한 병리상태는 심장 수축성에서의 만성 결핍, 및 그에 의한 심장 박출량, 즉 시간의 경과에 따라 각 심실에 의해 배출되는 혈액의 유효 부피에서의 만성 결핍이다. 만성 심부전을 가진 환자는 대상부전 (즉, 심장이 충분한 혈액 순환을 유지하지 못함)의 급성 에피소드를 가질 수 있으며, 이때 심장 수축성이 더 저하된다. 미국에서만 "급성 대상부전성 심부전" (ADHF)으로 인한 입원이 1년에 ~500K 건이다.

[0003] ADHF에 대한 현행 요법은 이뇨제, 혈관확장제 및 수축촉진제를 포함하며, 이는 직접적으로 심장 수축성을 증가시킨다. 현행 정맥내 수축촉진제 (도부타민, 도파민, 밀리논, 레보시멘단)는 유해 사례, 예컨대 부정맥 및 증가된 장기 사망률과의 연관성에도 불구하고, 급성 상황에서 사용된다. 이들 부담은 만성 심부전에서 그의 적용을 방해해 왔다. 디곡신은 경구 수축촉진제이지만, 좁은 치료 지수, 증가된 부정맥유발 잠재력 및 신기능부전에서의 금기에 의해 제한된다.

[0004] 부정맥유발 또는 사망률 부담 없이 심장 수축성을 증가시키는 심부전에 대한 요법이 ADHF를 위해 긴급히 필요하지만, 이는 또한 만성 심부전에서의 막대한 미충족 의료 필요를 다룰 수 있다.

[0005] 아펠린은 아펠린 수용체, 안지오텐신-유사-1 수용체, 안지오텐신 II-유사-1 수용체 등으로서도 지칭되는, 이전의 고아 G-단백질-커플링된 수용체 (GPCR), APJ에 대한 내인성 리간드이다. 아펠린/APJ 경로는 심혈관계에서 광범위하게 발현되고 아펠린은 전임상 모델에서 주요 유익한 심혈관 효과를 나타내었다. 인간에서의 급성 아펠린 투여는 말초 및 관상동맥 혈관확장을 유발하고, 심장 박출량을 증가시킨다 (Circulation. 2010; 121:1818-1827). 그 결과, APJ 효능작용은 심부전을 가진 환자에 대한 중요한 치료 표적으로서 부상하고 있다. 아펠린 수용체 APJ의 활성화는 현행 요법의 부담 없이, 심장 수축성을 증가시키고 심장보호를 제공하는 것으로 생각된다. 그러나, 천연 아펠린은 생체내에서 매우 짧은 반감기 및 작용 지속기간을 나타낸다. 매우 짧은 반감기는 신속한 혈청 클리어런스 및 펩티다제의 작용을 통한 단백질분해로 인해 이러한 치료 내인성 펩티드의 전달과 관련하여 인식되는 주요 난제이다.

[0006] 이러한 단점을 극복하기 위해 현재 사용되고 있는 한 방법은 일부 치료 펩티드가 분해되더라도 충분히 치료상 유효하게 잔류하도록 많은 투여량의 관심 치료 펩티드를 환자에게 투여하는 것이다. 그러나, 이러한 방법은 환자에게 불편하다. 대부분의 치료 펩티드가 경구 투여될 수 없기 때문에, 치료 펩티드는 정맥내 주사에 의해 일정하게 주입되어야 하거나, 빈번하게 주입되어야 하거나, 또는 불편한 피하 주사의 경로에 의해 빈번하게 투여되어야 할 것이다. 빈번한 투여에 대한 필요성은 또한 받아들일 수 없는 높은 예상 치료 비용을 갖는 많은 잠재적인 펩티드 치료를 야기한다. 대량의 분해된 펩티드의 존재는 또한 바람직하지 않은 부작용을 발생시킬 수 있다.

[0007] 투여에서의 불편 및 높은 비용은 매력적인 생물활성 프로파일을 갖는 대부분의 치료 펩티드가 약물 후보로서 개발될 수 없는 2가지 이유이다.

[0008] 따라서, 펩티드의 반감기를 연장시키기 위한 한가지 접근법은 치료 펩티드를 생물학적 활성은 여전히 유지되게 하면서 그의 분해가 둔화되도록 하는 방식으로 변형시키는 것이다.

[0009] 따라서, 아펠린의 기능을 모방하지만, 증가된 반감기를 갖고 자연 발생 아펠린과 동등하거나 또는 그보다 큰 생물활성을 나타내는 펩티드 및 폴리펩티드를 확인하는 것이 바람직하다. 또한, 증가된 입체형태 제약, 즉 펩티드 및 폴리펩티드가 추가의 폴딩 또는 재배치를 필요로 하지 않고 그의 수용체 및/또는 다른 경로 표적과 상호작용할 수 있도록 활성 입체형태 상태를 달성하고 유지하는 능력을 나타내는 아펠린 유사체 펩티드 및 폴리펩티드를 확인하는 것이 바람직하다. 추가의 접근법은 펩티드를 신장을 통한 그의 제거를 방지하는 분자에 접합시킴으로써 클리어런스 속도를 감소시키는 것을 포함한다.

[0010] 따라서, 여전히 변형된 펩티드의 치료 이점을 보유하면서 낮은 독성을 유지하는 한편, 보다 긴 생체내 작용 지속기간을 제공하기 위해 증가된 반감기를 갖는 변형된 치료 펩티드에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 관심 치료 펩티드 또는 폴리펩티드, 즉 APJ 효능제를 변형시킴으로써 체내 펩티드 분해 문제를 극복하는 것에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 목적은 APJ 효능제로서 유용하고, 또한 모두 야생형 아펠린과 동일하거나 또는 그보다 큰 생물학적 활성을 나타내면서, 야생형 아펠린 및 다른 기지의 아펠린 유사체를 능가하는 하기 개선사항: 증가된 반감기; 투여 시 및/또는 가용화 시 분해에 대한 더 큰 면역; 및 증가된 입체형태 제약 중 적어도 하나를 보유하는 신규

펩티드 및 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체를 제공하는 것이다. 따라서, 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 심혈관 질환, 예컨대 심부전, 심부전과 연관된 장애 및 상태, 및 APJ 수용체 활성의 활성화에 반응성인 장애 및 상태의 치료 또는 예방에 특히 유용하다.

[0013] 한 실시양태에서, 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 심부전과 연관된 장애 또는 상태, 또는 APJ 수용체 활성의 활성화 (또는 효능작용)에 반응성인 장애의 치료 또는 예방에 특히 유용하다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증의 치료에 유용하다.

[0014] 본 발명은, 본원에 기재된 바와 같은 펩티드 및 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체, 제약 조성물, 및 그의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드의 예는 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드 및 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 뿐만 아니라 실험 실시예를 포함하나 이에 제한되지는 않는 본원에 구체적으로 열거된 임의의 펩티드 또는 폴리펩티드, 및 그의 생체접합체를 포함한다.

[0015] 따라서, 본 발명은 하기 화학식 I의 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염; 또는 그와 실질적으로 동등한 폴리펩티드를 제공한다.

[0016] <화학식 I>

[0017] X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

[0018] 상기 식에서:

[0019] X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 Q, A 또는 pE이거나, 또는 X1은 C, c, hC, D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0020] X3은 P이거나 또는 X3은 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0021] X4는 R이거나 또는 X4는 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0022] 여기서 X1, X3 및 X4 중 오직 1개는 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택된 황 함유 아미노산이고;

[0023] X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X1, X3 또는 X4의 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0024] X8은 K 또는 F이고;

[0025] X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

[0026] X10은 P이거나 또는 부재하고;

[0027] X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

[0028] X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 또는 D-Abu이고;

[0029] X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택되고; 여기서:

[0030] Nle는 L-노르류신이고;

[0031] D-Nle는 D-노르류신이고;

[0032] D-hC는 D-호모시스테인이고;

[0033] hC는 L-호모시스테인이고;

[0034] Nal은 L-나파탈린이고;

[0035] D-Nva는 D-노르발린이고;

[0036] D-Abu는 D-2-아미노부티르산이고;

[0037] pE는 L-피로글루탐산이다.

[0038] 본원에 추가로 설명된 바와 같이, 관련 기술분야에서 인식되는 3문자 또는 1문자 약어는 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 잔기를 나타내는데 사용된다. "D"로 시작되는 경우를 제외하고, 아미노산은 L-아미노산이다. 1문자 약어가 대문자인 경우에, 그것은 L-아미노산을 지칭한다. 1문자 약어가 소문자인 경우에, 그것은 D-아미노산을 지칭한다. 대안적으로, D-아미노산은 약어 문자(들) 앞에 D-문자를 사용하여 나타내어질 수 있다. 즉, "D"로 시작되는 경우에, 아미노산은 D-아미노산이다.

[0039] 화학식 I, 또는 본원에 기재된 그의 관련 화학식, 예를 들어 화학식 I 내지 IV의 상기 열거된 임의의 아미노산 잔기는 보존적 방식으로 치환될 수 있으며, 단 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드는 여전히 기능적 활성 및 구조적 특성 (예를 들어, 반감기 연장, 분해로부터의 보호, 입체형태 제약)을 보유한다. 허용가능한 보존적 아미노산 치환의 원칙 및 예는 본원에 추가로 설명된다.

[0040] 본 발명은 추가로

[0041] a. 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 펩티드 또는 폴리펩티드,

[0042] b. 반감기 연장 모이어티

[0043] 를 포함하며; 여기서 상기 펩티드 또는 폴리펩티드 및 상기 반감기 연장 모이어티는 임의로 링커를 통해 공유적으로 연결 또는 융합된 것인 생체접합체 또는 그의 다량체를 제공한다.

[0044] "임의로 링커를 통해"는 화학식 I-IV에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드가 반감기 연장 모이어티에 직접 (즉, 링커 없이) 공유적으로 연결 또는 융합되거나, 또는 링커를 통해 반감기 연장 모이어티에 공유적으로 연결 또는 융합되는 것을 의미한다.

[0045] 본 발명의 반감기 연장 모이어티는 펩티드 또는 폴리펩티드 유사체에 공유적으로 융합, 부착, 연결 또는 접합될 수 있다. 반감기 연장 모이어티는 예를 들어 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 콜레스테롤 기, 탄수화물 또는 올리고사카라이드; 지방산 또는 샐비지 수용체에 결합하는 임의의 천연 또는 합성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드일 수 있다. 바람직하게는, 반감기 연장 모이어티는, 임의로 링커를 통해 긴 혈청 반감기를 갖는 혈장 단백질 (알부민 및 이뮤노글로불린)에 공유적으로 연결된다. 다른 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는 알부민 결합 잔기이다. 본원에 사용된 "알부민 결합 잔기"는 인간 혈청 알부민에 비-공유 결합하는 잔기를 의미한다. 한 실시양태에서 알부민 결합 잔기는 친지성 잔기이다. 또 다른 실시양태에서, 알부민 결합 잔기는 생리학적 pH에서 음으로 하전된다. 알부민 결합 잔기는 전형적으로 음으로 하전될 수 있는 카르복실산을 포함한다. 알부민 결합 잔기의 예는 지방산을 포함한다. 다른 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는 IgG 불변 도메인 또는 그의 단편 (예를 들어, Fc 영역), 인간 혈청 알부민 (HSA), 또는 알부민-결합 폴리펩티드 또는 예를 들어 지방산과 같은 잔기이다. 바람직하게는, 생체접합체의 반감기 연장 모이어티 부분은 인간 혈청 알부민 또는 Fc 영역이다. 가장 바람직하게는, 생체접합체의 반감기 연장 모이어티 부분은 Fc 영역이다.

[0046] 반감기 연장 모이어티는 본 발명의 생체접합체의 구성성분 부분, 예를 들어 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드 (화학식 I-IV)의 생물학적 기능을 증진시키고/거나 그를 방해하지 않는 방식으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 임의로 링커를 통해 반감기 연장 모이어티에 융합될 수 있다. 반감기 연장 모이어티는 단백질, 예컨대 IgG 불변 도메인 또는 그의 단편 (예를 들어, Fc 영역), 인간 혈청 알부민 (HSA), 또는 알부민-결합 폴리펩티드 또는 잔기 (예를 들어, 지방산)일 수 있다. 본원에 개시된 이러한 단백질은 또한 다량체를 형성할 수 있다.

[0047] 일부 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티 (예를 들어, HSA, Fc, 지방산 등)는 화학식 I-IV 중 어느 하나의 펩티드 또는 폴리펩티드의 N-말단에 공유적으로 연결 또는 융합된다. 다른 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티 (예를 들어, HSA, Fc, 지방산 등)는 본 발명의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 펩티드 또는 폴리펩티드의 C-말단에 공유적으로 연결 또는 융합된다.

[0048] 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 APJ 수용체의 활성화를 통해 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및

전자간증의 치료에서 유용성을 갖는다.

[0049] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 급성 대상부전성 심부전 (ADHF)의 치료에 유용하다.

[0050] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 장애 또는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 유효량을 투여하여 대상체에서 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 장애 또는 질환을 치료하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 장애 또는 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0051] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0052] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 1종 이상의 치료 활성제를 포함하는 조합물 (제약 조합물)에 관한 것이다.

[0053] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 APJ 수용체의 활성화를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 APJ 수용체의 활성화 방법에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 명세서를 해석하기 위한 목적으로, 달리 명시되지 않는 한 하기 정의가 적용될 것이고, 적절한 경우에는 언제든지 단수형으로 사용된 용어가 또한 복수형을 포함할 것이고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

[0055] 본원에 사용된 "APJ 수용체의 조절에 반응성인 장애 또는 질환", "APJ의 조절에 반응성인 장애 및 상태", "APJ 수용체 활성의 조절에 반응성인 장애 및 상태", "APJ 수용체 활성의 활성화 (또는 효능작용)에 반응성인 장애" 등의 용어는 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증을 포함한다.

[0056] 본원에 사용된 "APJ 수용체 활성의 활성화" 또는 "APJ 수용체의 활성화"는 APJ 수용체 활성에서의 증가를 지칭한다. APJ 수용체 활성의 활성화는 또한, 예를 들어 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드의 투여에 의한 APJ 수용체의 "효능작용"으로서 지칭된다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드" 및 "펩티드"는 함께 연결된 2개 이상의 아미노산을 지칭하는 것으로 상호교환가능하게 사용된다. 하기 표 1에 제시된 비통상 또는 비천연 아미노산에 대한 약어를 제외하고는, 관련 기술분야에서 인식되는 3문자 또는 1문자 약어를 사용하여 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 잔기를 나타낸다. "D"로 시작되는 경우를 제외하고, 아미노산은 L-아미노산이다. 1문자 약어가 대문자인 경우에, 그것은 D-아미노산을 지칭한다. 1문자 약어가 소문자인 경우에, 그것은 L-아미노산을 지칭한다. 군 또는 문자열 또는 아미노산 약어를 사용하여 펩티드를 나타낸다. 펩티드는 왼쪽이 N-말단으로 표시되고, 서열은 N-말단에서 C-말단으로 기재된다.

[0058] 본 발명의 펩티드는 비-천연 아미노산 (즉, 자연에서 발생되지 않는 화합물) 및 관련 기술분야에서 대안적으로 사용될 수 있는 것으로 공지되어 있는 다른 아미노산 유사체를 함유한다.

[0059] 특정 비-천연 아미노산은 문헌 [Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang et al., Science 292:498-500, 2001; Zhang et al., Science 303:371-373, 2004] 또는 미국 특허 번호 7,083,970에 기재된 기술에 의해 도입될 수 있다. 간략하게, 이들 발현 시스템 중 일부는 넌센스 코돈, 예컨대 앰버 태그를 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임 내로 도입하기 위한 부위-지정 돌연변이유발을 수반한다. 이어서, 이러한 발현 벡터는 도입된 넌센스 코돈에 특이적이며 선택된 비-천연 아미노산을 수반하는 tRNA를 사용할 수 있는 숙주 내로 도입된다. 본 발명의 폴리펩티드에 모이어티를 접합시키는 목적에 유익한 특정한 비-천연 아미노산은 아세틸렌 및 아지도 측쇄를 갖는 것을 포함한다.

[0060] 본 발명의 펩티드 내의 천연 또는 비-천연 아미노산 중 1개 이상이, 예를 들어 탄수화물 기, 포스페이트 기, 파

르네실 기, 이소파르네실 기, 지방산 기, 접합을 위한 링커와 같은 화학 엔티티의 첨가, 관능화 또는 다른 변형 등에 의해 변형될 수 있다. 상기 변형은 부위-특이적 또는 비-부위-특이적 방식으로 이루어질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 펩티드의 변형은 보다 안정한 펩티드 (예를 들어, 보다 긴 생체내 반감기를 나타내는 것)를 생성한다. 이들 변형은 추가의 D-아미노산 등의 혼입을 포함할 수 있다. 변형 중 어느 것도 펩티드의 목적하는 생물학적 활성을 실질적으로 방해하지 않아야 하지만, 이러한 변형이 펩티드에 목적하는 특성, 예를 들어 증진된 생물학적 활성을 부여할 수 있다.

[0061] 상기 변형은 야생형 단백질에 비해 본 발명의 단백질의 생물학적 특성을 증진시키고, 뿐만 아니라 일부 경우에는, 예를 들어 표지 및 단백질 반감기 연장제에 대한 부착 지점으로서, 및 고체 지지체의 표면에 상기 변이체를 고정시키기 위한 목적으로 작용한다.

[0062] 특정 실시양태에서, 이러한 변형, 예를 들어 부위-특이적 변형은, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 펩티드의 반감기를 연장시키거나 또는 달리 생물학적 특성을 개선시키기 위한 목적으로 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 펩티드에 접합체, 예를 들어 PEG 기를 부착시키는데 사용된다. 상기 기술은 본원에 추가로 기재되어 있다.

[0063] 다른 실시양태에서, 이러한 변형, 예를 들어 부위-특이적 변형은 본 발명의 폴리펩티드의 반감기를 연장시키는 다른 중합체 및 소분자 및 재조합 단백질 서열을 부착시키는데 사용된다. 한 이러한 실시양태는 폴리펩티드 및/또는 펩티드에 대한 지방산 또는 특정 알부민 결합 화합물의 부착을 포함한다. 다른 실시양태에서, 변형은 특정한 아미노산 유형에서 이루어지고, 폴리펩티드 상의 하나 이상의 부위에 부착될 수 있다.

[0064] 다른 실시양태에서, 이러한 변형, 예를 들어 부위-특이적 변형은 야생형 및/또는 변이 다량체, 예를 들어 이량체 (동종이량체 또는 이종이량체) 또는 삼량체 또는 사량체의 생성을 위한 부착 수단으로서 사용된다. 이들 다량체 단백질 분자는 아미노-말단 또는 카르복시-말단에서 다른 단백질, 예컨대 Fc, 인간 혈청 알부민 (HSA) 등에 부착되거나 또는 융합된 PEG, 당 및/또는 PEG-콜레스테롤 접합체와 같은 기를 추가로 가질 수 있다.

[0065] 다른 실시양태에서, 이러한 부위-특이적 변형은 부위-특이적으로 혼입된 피롤리신 또는 피롤리신 유사체 또는 비-자연 발생 아미노산 (파라-아세틸-Phe, 파라-아지도-Phe)의 위치가 단백질, 폴리펩티드 및/또는 펩티드의 고체 지지체 표면에 대한 제어된 배향 및 부착을 허용하는 이러한 단백질, 폴리펩티드 및/또는 펩티드를 생산하는데 사용되거나, 또는 PEG, 당 및/또는 PEG-콜레스테롤 접합체와 같은 기가 부착되도록 하는데 사용된다.

[0066] 다른 실시양태에서, 이러한 부위-특이적 변형은 단백질, 폴리펩티드 및/또는 펩티드를 부위-특이적으로 가교시켜 이종이량체 및 이종삼량체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 이종-올리고머를 형성하는데 사용된다. 다른 실시양태에서, 이러한 부위-특이적 변형은 단백질, 폴리펩티드 및/또는 펩티드를 부위-특이적으로 가교시켜 단백질-단백질 접합체, 단백질-폴리펩티드 접합체, 단백질-펩티드 접합체, 폴리펩티드-폴리펩티드 접합체, 폴리펩티드-펩티드 접합체 또는 펩티드-펩티드 접합체를 형성하는데 사용된다. 다른 실시양태에서, 부위 특이적 변형은 하나 초과의 유형의 분자가 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 단일 부위에 부착되도록 하는 분지 지점을 포함할 수 있다.

[0067] 다른 실시양태에서, 본원에 열거된 변형은 비-부위-특이적 방식으로 이루어져, 본 발명의 단백질-단백질 접합체, 단백질-폴리펩티드 접합체, 단백질-펩티드 접합체, 폴리펩티드-폴리펩티드 접합체, 폴리펩티드-펩티드 접합체 또는 펩티드-펩티드 접합체를 생성할 수 있다.

[0068] 일부 실시양태에서, 본 발명은 항체, 예컨대 본원에 개시된 바와 같은 펩티드 또는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체에 결합된 화학식 I-IV 중 어느 하나의 펩티드 또는 폴리펩티드를 하나 이상 포함하는 복합체를 제공한다.

[0069] 통상의 기술자는 다양한 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환이 그의 활성을 반드시 감소시키지 않으면서 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드의 서열에서 이루어질 수 있다는 것을 인지할 것이다. 본원에 사용된 "그의 치환기로서 통상적으로 사용되는 아미노산"은 보존적 치환 (즉, 비슷한 화학적 특징의 아미노산으로의 치환)을 포함한다. 보존적 치환을 위한 목적으로, 비-극성 (소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 글리신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함한다. 극성 (친수성), 중성 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음으로 하전된 (산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 아미노산 치환의 예는 L-아미노산으로 그의 상응하는 D-아미노산을 치환하는 것, 시스테인으로 호모시스테인 또는 티올-함유 측쇄를 갖는 다른 비천연 아미노산을 치환하는 것, 리신으로 호모리신, 디아미노부티르산, 디아미노

프로피온산, 오르니틴 또는 아미노 함유 측쇄를 갖는 다른 비천연 아미노산을 치환하는 것, 또는 알라닌으로 노르발린을 치환하는 것 등을 포함한다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 자연 발생 아미노산, 비천연 아미노산, 아미노산 유사체, 및 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 모방체를 지칭하며, 이들 모두는 그의 구조가 D 및 L 입체이성질체 형태를 허용하는 경우에 이러한 입체이성질체이다. 아미노산은 본원에서 그의 명칭, 그의 통상적으로 공지된 3문자 기호에 의해, 또는 IUPAC-IUB 생화학적 명명 위원회에 의해 권고된 1-문자 기호에 의해 지칭된다.

[0071] 용어 "자연 발생"은 자연에서 발견되고 인간에 의해 조작되지 않은 물질을 지칭한다. 유사하게, 본원에 사용된 "비-자연 발생", "비-천연" 등은 자연에서 발견되지 않거나 또는 인간에 의해 구조적으로 변형되거나 합성된 물질을 지칭한다. 아미노산과 관련하여 사용되는 경우에, 용어 "자연 발생"은 20개의 통상의 아미노산 (즉, 알라닌 (A 또는 Ala), 시스테인 (C 또는 Cys), 아스파르트산 (D 또는 Asp), 글루탐산 (E 또는 Glu), 페닐알라닌 (F 또는 Phe), 글리신 (G 또는 Gly), 히스티딘 (H 또는 His), 이소류신 (I 또는 Ile), 리신 (K 또는 Lys), 류신 (L 또는 Leu), 메티오닌 (M 또는 Met), 아스파라긴 (N 또는 Asn), 프롤린 (P 또는 Pro), 글루타민 (Q 또는 Gln), 아르기닌 (R 또는 Arg), 세린 (S 또는 Ser), 트레오닌 (T 또는 Thr), 발린 (V 또는 Val), 트립토판 (W 또는 Trp), 및 티로신 (Y 또는 Tyr))을 지칭한다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "비-천연 아미노산" 및 "비천연 아미노산"은 동일하든지 또는 상이하든지 관계없이 임의의 유기체로부터의 비변형 또는 변형된 유전자를 사용하여 임의의 유기체에서 생합성적으로 생성될 수 없는 아미노산 구조를 나타내기 위해 상호교환가능하게 의도된다. 상기 용어는 자연 발생 (야생형) 아켈린 단백질 서열 또는 본 발명의 서열에 존재하지 않는 아미노산 잔기를 지칭한다. 이들은 20개의 자연 발생 아미노산 중 하나가 아닌 변형된 아미노산 및/또는 아미노산 유사체, 셀레노시스테인, 피롤리신 (Pyl) 또는 피롤린-카르복시-리신 (Pcl, 예를 들어 PCT 특허 공개 WO2010/48582에 기재된 바와 같음)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 비-천연 아미노산 잔기는 자연 발생 아미노산의 치환에 의해, 및/또는 비-천연 아미노산의 자연 발생 (야생형) 아켈린 단백질 서열 또는 본 발명의 서열 내로의 삽입에 의해 도입될 수 있다. 또한, 비-천연 아미노산 잔기는 목적하는 관능기, 예를 들어 관능성 모이어티 (예를 들어, PEG)를 연결하는 능력을 아켈린 분자에 부여하도록 혼입될 수 있다. 아미노산과 관련하여 사용되는 경우에, 기호 "U"는 본원에 사용된 바와 같은 "비-천연 아미노산" 및 "비천연 아미노산"을 의미할 것이다.

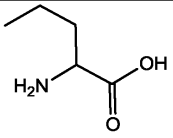
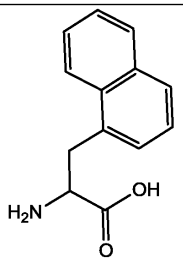
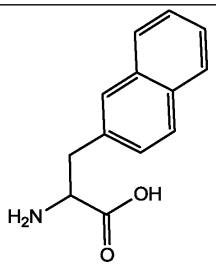
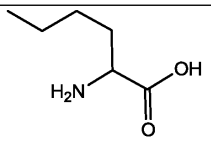
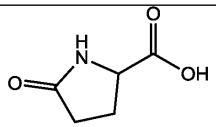
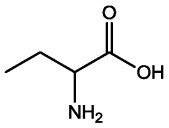
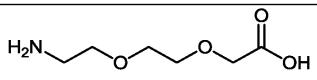
[0073] 또한, 이러한 "비천연 아미노산"은 단백질 내로의 혼입을 위해 변형된 tRNA 및 변형된 tRNA 신테타제 (RS)를 필요로 하는 것으로 이해된다. 이들 "선택된" 직교 tRNA/RS 쌍은 슐츠(Schultz) 등에 의해 개발된 선택 방법에 의해 또는 무작위 또는 표적화 돌연변이에 의해 생성된다. 예로서, 피롤린-카르복시-리신은 한 유기체로부터 숙주 세포로 전달된 유전자에 의해 생합성적으로 생성된다는 점 및 천연 tRNA 및 tRNA 신테타제 유전자를 사용하여 단백질 내로 혼입된다는 점에서 "천연 아미노산"인 반면, p-아미노페닐알라닌 (문헌 [Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9] 참조)은 생합성적으로 생성될지라도, "선택된" 직교 tRNA/tRNA 신테타제 쌍에 의해 단백질 내로 혼입되기 때문에 "비천연 아미노산"이다.

[0074] 변형된 코딩된 아미노산은 히드록시프롤린, γ-카르복시글루타메이트, O-포스포세린, 아제티딘카르복실산, 2-아미노아디프산, 3-아미노아디프산, 베타-알라닌, 아미노프로피온산, 2-아미노부티르산, 4-아미노부티르산, 6-아미노카프로산, 2-아미노헵탄산, 2-아미노이소부티르산, 3-아미노이소부티르산, 2-아미노피멜산, 3급-부틸글리신, 2,4-디아미노이소부티르산, 데스모신, 2,2'-디아미노피멜산, 2,3-디아미노프로프리온산, N-에틸글리신, N-메틸글리신, N-에틸아스파라긴, 호모프롤린, 히드록시리신, 알로-히드록시리신, 3-히드록시프롤린, 4-히드록시프롤린, 이소데스모신, 알로-이소류신, N-메틸알라닌, N-메틸글리신, N-메틸이소류신, N-메틸펜틸글리신, N-메틸발린, 나프틸알라닌, 노르발린, 노르류신, 오르니틴, 펜틸글리신, 피페콜산 및 티오프롤린을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "아미노산"은 또한 특정 유기체 내에서의 대사물이지만 단백질 내로의 혼입을 위한 유전자 코드에 의해 코딩되지 않는 자연 발생 아미노산을 포함한다. 이러한 아미노산은 오르니틴, D-오르니틴 및 D-아르기닌을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "아미노산 유사체"는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 단지 예로서 수소, 카르복실 기, 아미노 기 및 R 기에 결합된 α-탄소를 갖는 화합물을 지칭한다. 아미노산 유사체는, 가역적으로 또는 비가역적으로 화학적으로 차단되거나, 또는 그의 C-말단 카르복시 기, 그의 N-말단 아미노 기 및/또는 그의 측쇄 관능기가 화학적으로 변형된 천연 및 비천연 아미노산을 포함한다. 이러한 유사체는 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 술폰, S-(카르복시메틸)-시스테인, S-(카르복시메틸)-시스테인 술폭시드, S-(카르복시메틸)-시스

테인 술폰, 아스파르트산-(베타-메틸 에스테르), N-에틸글리신, 알라닌 카르복스아미드, 호모세린, 노르류신 및 메티오닌 메틸 술포늄을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0076] <표 1> 본 발명에 기재된 바와 같은 비-천연 아미노산:

기호	명칭	구조
Nva 또는 nva (D-Nva)	L-노르발린 또는 D-노르발린	
1-Nal	1-나프틸알라닌	
2-Nal	2-나프틸알라닌	
Nle 또는 nle (D-Nle)	L-노르류신 또는 D-노르류신	
pE	피로글루탐산	
Abu 또는 abu (D-Abu)	2-아미노-부티르산	
O2Oc	8-아미노-3,6-디옥사옥탄산	

[0077]

[0078] Nal은 1-나프틸알라닌 및 2-나프틸알라닌 둘 다, 바람직하게는 2-나프틸알라닌을 지칭한다.

[0079] 본원에 사용된 용어 "아미드"는 C-말단에서의 카르복실산 기의 아미드 유도체 (예를 들어, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NH-C_{1-6}$ 알킬, $-C(O)NH-C_{1-2}$알킬페닐, -C(O)NH-NHBn, -C(O)-4 페녹시피페리딘 또는 $-C(O)N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$)를 지칭한다.

[0080] 용어 "아미드"는 또한 N-말단에서의 아미노 기의 유도체 (예를 들어, $-NHC(O)C_{1-16}$알킬, $-NHC(O)(CH_2)_nPh$ (n은 1 내지 6의 정수임), $-NHC(O)(CH_2)_2CO_2H$, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)NH-$, $C_{11}H_{23}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-NH-$, $C_{13}H_{27}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-NH-$; $C_{15}H_{27}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)NH-$, $Ph-CH_2CH_2NHC(O)-NH-$ 또는 $CH_3(OCH_2CH_2)_mC(O)NH-$ (m은 1 내지 12의 정수임)를 지칭한다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "에스테르"는 C-말단에서의 카르복실산 기의 에스테르 유도체 (예를 들어, -COOR) 형태를 지칭하고, 여기서 에스테르의 R은 C_{1-6} 알킬 기, 예컨대 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸 등, C_{3-8} 시클로알킬 기, 예컨대 시클로펜틸, 시클로헥실 등, C_{6-10} 아릴 기, 예컨대 페닐, α-나프틸 등, C_{6-10} 아릴-C_{1-6} 알킬 기, 예를 들어 페닐-C_{1-2} 알킬 기, 예컨대 벤질, 페네틸, 벤즈히드릴 등, 및 α-나프틸-C_{1-2} 알킬 기, 예컨대 α-나프틸메틸 등을 지칭한다. 경구 투여를 위한 에스테르로서 통상적으로 사용되는 피발로일옥시메틸 에스테르 등을 또한 언급할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 C 말단 이외의 위치에서 추가의 카르복실 또는 카르복실레이트 기를 보유하는 경우에, 이러한 기가 아미드화 또는 에스테르화된 이들 폴리펩티드 또한 본 발명의 폴리펩티드의 카테고리에 속한다. 이러한 경우에, 에스테르는 예를 들어 상기 언급된 C-말단 에스테르와 동일한 종류의 에스테르일 수 있다.

[0082] 용어 알킬은 1 내지 20개의 탄소 원자를 포함하는 완전 포화 분지형 또는 비분지형 (또는 직쇄 또는 선형) 탄화수소 모이어티를 지칭한다. 바람직하게는, 알킬은 1 내지 7개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 1 내지 4개의 탄소 원자를 포함한다.

[0083] 용어 아릴은 고리 부분에 6-10개의 탄소 원자를 갖는 모노시클릭 또는 비시클릭 방향족 탄화수소 기를 지칭한다. 아릴의 대표적인 예는 페닐 또는 나프틸이다.

[0084] 용어 헤테로아릴은 탄소 원자 및 1 내지 5개의 헤테로원자로부터 선택된 5-10개의 고리원을 함유하는 모노시클릭 또는 비시클릭 헤테로아릴을 포함하고, 각각의 헤테로원자는 독립적으로 O, N 또는 S로부터 선택되고, 여기서 S 및 N은 다양한 산화 상태로 산화될 수 있다. 비시클릭 헤테로아릴계의 경우에, 상기 계는 완전 방향족이다 (즉, 모든 고리가 방향족임).

[0085] 용어 시클로알킬은 포화 또는 불포화되었지만 비-방향족인, 3-12개의 탄소 원자, 바람직하게는 3-8, 또는 3-7개의 탄소 원자의 모노시클릭, 비시클릭 또는 트리시클릭 탄화수소 기를 지칭한다. 비시클릭 및 트리시클릭 시클로알킬계의 경우에, 모든 고리는 비-방향족이다.

[0086] 용어 헤테로시클릴은 4-, 5-, 6- 또는 7-원 모노시클릭이고, O, S 및 N으로부터 선택된 적어도 1개의 헤테로원자를 함유하고, 여기서 N 및 S가 또한 다양한 산화 상태로 임의로 산화될 수 있는 것인, 포화 또는 불포화 비-방향족 (부분 불포화) 고리를 지칭한다. 한 실시양태에서, 헤테로시클릴 모이어티는 5-7개의 고리 원자를 함유하고 O, S 또는 N으로부터 선택된 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하는 포화 모노시클릭 고리를 나타낸다.

[0087] 용어 "APJ" ("아펠린 수용체", "안지오텐신-유사-1 수용체", "안지오텐신 II-유사-1 수용체" 등으로서도 지칭됨)는 유전자가 인간에서 염색체 11의 긴 아암 상에 국재화된, 380개 잔기, 7개 막횡단 도메인, Gi 커플링된 수용체 (NCBI 참조 서열: NP_005152.1, 및 NCBI 참조 서열: NM_005161에 의해 코딩됨)를 나타낸다. APJ는 축중성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 게놈 인간 DNA로부터 1993년에 처음 클로닝되었고 (O'Dowd et al. Gene, 136:355-60, 1993), 안지오텐신 II 수용체 유형 1과 유의한 상동성을 공유한다. 그러나, 이러한 상동성에도 불구하고, 안지오텐신 II는 APJ에 결합하지 않는다. 수년 동안 고아 상태였지만, 내인성 리간드가 단리되어 아펠린으로 명명되었다 (Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

[0088] 용어 "아펠린"은 77개 잔기 단백질 전구물 (NCBI 참조 서열: NP_0059109.3, 및 NCBI 참조 서열: NM_017413.3에 의해 코딩됨)을 나타내고, 이는 아펠린 펩티드의 생물학적 활성 형태, 예컨대 아펠린-36, 아펠린-17, 아펠린-16, 아펠린-13, 아펠린-12로 프로세싱된다. "아펠린-36"으로 지칭되는 전장 성숙 펩티드는 36개 아미노산을 포함하지만, 가장 강력한 이소형은 "Pyr-1-아펠린-13 또는 Pyr^{1}-아펠린-13"으로 지칭되는 13량체의 아펠린 (아펠린-13)의 피로글루타메이트화 형태이다. 다양한 아펠린 형태가 예를 들어 미국 특허 6,492,324B1에 기재되어 있다.

[0089] 용어 "접합체" 및 "생체접합체"는 상호교환가능하게 사용되고, 임의로 링커를 통해 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드와 반감기 연장 모이어티 사이의 공유 부착의 결과로서 형성된 엔티티를 지칭하는 것으로 의도된다. 용어 "접합체" 또는 "생체접합체"는 또한 APJ 효능제 폴리펩티드 또는 화학식 I, II, III 또는 IV의 폴리펩티드와 반감기 연장 모이어티 사이의 융합의 결과로서 형성된 엔티티를 포함하는 것으로 의도된다.

[0090] 용어 반감기 연장 모이어티는 펩티드 또는 폴리펩티드 유사체에 공유적으로 연결/부착되거나 또는 융합될 수 있다. 반감기 연장 모이어티는, 예를 들어 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 지방산, 콜레스테롤 기, 탄수화물 또는 올리고사카라이드; 또는 샐비지 수용체에 결합하는 임의의 천연 또는 합성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드일 수 있다. 다른 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는 알부민 결합 잔기이다. 본원에 사용된 "알

부민 결합 잔기"는 인간 혈청 알부민에 비-공유 결합하는 잔기를 의미한다. 한 실시양태에서 알부민 결합 잔기는 친지성 잔기이다. 또 다른 실시양태에서, 알부민 결합 잔기는 생리학적 pH에서 음으로 하전된다. 알부민 결합 잔기는 전형적으로 음으로 하전될 수 있는 카르복실산을 포함한다. 알부민 결합 잔기의 예는 지방산을 포함한다. 다른 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는, 임의로 링커를 통해 긴 혈청 반감기를 갖는 혈장 단백질(알부민 및 이뮤노글로불린)에 공유적으로 연결된다. 예를 들어, 반감기 연장 모이어티는 IgG 불변 도메인 또는 그의 단편 (예를 들어, Fc 영역), 인간 혈청 알부민 (HSA), 또는 알부민-결합 폴리펩티드 또는 잔기 (예를 들어, 지방산)이다. 가장 바람직하게는, 생체접합체의 반감기 연장 모이어티 부분은 Fc 영역이다.

[0091] 용어 "증가된 반감기" 또는 "혈청 반감기를 증가시키다" 또는 "반감기를 연장시키는 것"은 그의 비-변형된 형태(또는 펩티드의 네이키드 형태)에 비해 변형된 생물학적 활성 분자 (예를 들어, 아펠린 13)의 순환 반감기의 긍정적 변화를 의미한다. 혈청 반감기는 생물학적 활성 분자의 투여 후에 다양한 시점에서 혈액 샘플을 채취하고, 각각의 샘플에서 그러한 분자의 농도를 결정하는 것에 의해 측정된다. 시간 경과에 따른 혈청 농도의 변화를 측정하는 것은 변형된 분자 (예를 들어, 접합된 분자)의 혈청 반감기의 계산을 가능하게 한다. 변형된 분자 (예를 들어, 접합된 분자)와 비변형된 분자 (예를 들어, 아펠린 13)의 혈청 반감기를 비교함으로써, 혈청 반감기 또는 t1/2의 상대적 증가를 결정할 수 있다. 증가는 바람직하게는 적어도 약 2-배이지만, 더 적은 증가가 유용할 수 있다.

[0092] 본 발명의 폴리펩티드:

[0093] 본 발명의 다양한 실시양태가 본원에 기재되어 있다. 각 실시양태에 명시된 특징은 다른 명시된 특징과 조합되어 추가의 실시양태를 제공할 수 있는 것으로 인지될 것이다.

[0094] 제1 실시양태에서, 본 발명은 따라서 하기 화학식 I의 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염; 또는 그와 실질적으로 동등한 폴리펩티드를 제공한다.

[0095] <화학식 I>

[0096] X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

[0097] 상기 식에서:

[0098] X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 Q, A 또는 pE이거나, 또는 X1은 C, c, hC, D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0099] X3은 P이거나 또는 X3은 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0100] X4는 R이거나 또는 X4는 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고; 여기서 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄는 X7의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0101] 여기서 X1, X3 및 X4 중 오직 1개는 C, c, hC 및 D-hC로부터 선택된 황 함유 아미노산이고;

[0102] X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X1, X3 또는 X4의 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0103] X8은 K 또는 F이고;

[0104] X9는 G, A 또는 a이거나 또는 부재하고;

[0105] X10은 P이거나 또는 부재하고;

[0106] X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

[0107] X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 또는 D-Abu이고;

[0108] X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택되고; 여기서:

[0109] Nle는 L-노르류신이고;

[0110] D-Nle는 D-노르류신이고;

[0111] D-hC는 D-호모시스테인이고;

[0112] hC는 L-호모시스테인이고;

[0113] Nal은 L-나파탈린이고;

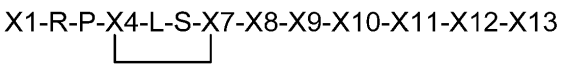
[0114] D-Nva는 D-노르발린이고;

[0115] D-Abu는 D-2-아미노부티르산이고;

[0116] pE는 L-피로글루탐산이다.

[0117] 제2 실시양태에서, 본 발명은 따라서 하기 화학식 II의 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그와 실질적으로 동등한 폴리펩티드를 제공한다.

[0118] <화학식 II>



[0119]

[0120] 상기 식에서:

[0121] X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 Q, A 및 pE이고;

[0122] X4는 C, c, hC 또는 D-hC이고;

[0123] X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X4의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0124] X8은 K 또는 F이고;

[0125] X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

[0126] X10은 P이거나 또는 부재하고;

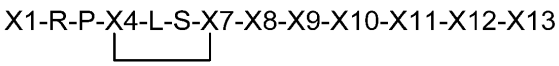
[0127] X11은 D-Nle, M, Nle 또는 f이고;

[0128] X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

[0129] X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 F, (N-Me)F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

[0130] 제2A 실시양태에서, 본 발명은 따라서 하기 화학식 II의 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그와 실질적으로 동등한 폴리펩티드를 제공한다.

[0131] <화학식 II>



[0132]

[0133] 상기 식에서:

[0134] X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 pE이고;

[0135] X4는 C, c, hC 또는 D-hC이고;

[0136] X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X4의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0137] X8은 K 또는 F이고;

[0138] X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

[0139] X10은 P이거나 또는 부재하고;

[0140] X11은 D-Nle, Nle 또는 f이고;

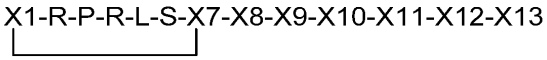
[0141] X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

[0142] X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 F, (N-Me)F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

[0143] 제3 실시양태에서, 본 발명은 따라서 하기 화학식 III의 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드,

에스테르 또는 염을 제공한다.

[0144] <화학식 III>

[0145] 

[0146] 상기 식에서

[0147] X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, C, c, hC 및 D-hC로부터 선택되고;

[0148] X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; 여기서 X7의 측쇄는 X1의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0149] X8은 K 또는 F이고;

[0150] X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

[0151] X10은 P이거나 또는 부재하고;

[0152] X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

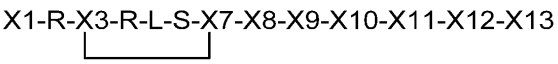
[0153] X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

[0154] X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

[0155] 제3A 실시양태에서, 본 발명은 X11이 D-Nle, Nle 또는 f인 화학식 III의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0156] 제4 실시양태에서, 본 발명은 따라서 하기 화학식 IV의 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염을 제공한다.

[0157] <화학식 IV>

[0158] 

[0159] 상기 식에서:

[0160] X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 Q, A 또는 pE이고;

[0161] X3은 C, c, hC 또는 D-hC이고; C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄;

[0162] X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X3의 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0163] X8은 K 또는 F이고;

[0164] X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

[0165] X10은 P이거나 또는 부재하고;

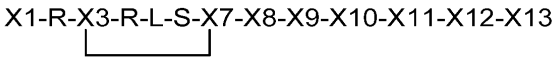
[0166] X11은 D-Nle, Nle, M 또는 f이고;

[0167] X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

[0168] X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

[0169] 제4A 실시양태에서, 본 발명은 따라서 하기 화학식 IV의 펩티드 또는 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염을 제공한다.

[0170] <화학식 IV>

[0171] 

[0172] 상기 식에서:

[0173] X1은 폴리펩티드의 N-말단이고, 부재하거나 또는 pE이고;

[0174] X3은 C, c, hC 또는 D-hC이고; C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄;

[0175] X7은 C, c, hC 또는 D-hC이고; X7의 측쇄는 X3의 C, c, hC 또는 D-hC의 측쇄와 디술피드 결합을 형성하고;

[0176] X8은 K 또는 F이고;

[0177] X9는 G, A, a이거나 또는 부재하고;

[0178] X10은 P이거나 또는 부재하고;

[0179] X11은 D-Nle, Nle 또는 f이고;

[0180] X12는 부재하거나 또는 P, f, a, D-Nva 및 D-Abu로부터 선택되고;

[0181] X13은 C-말단이고, 부재하거나 또는 (N-Me)F, F, f, a, y 및 Nal로부터 선택된다.

[0182] 제5 실시양태에서, 본 발명은 X1이 pE인 제1, 제2 및 제4 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0183] 제5A 실시양태에서, 본 발명은 X1이 A 또는 Q인 제1, 제2 및 제4 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다. 이러한 실시양태의 특정한 측면에서, 펩티드는 그의 A 또는 Q N-말단을 통해 반감기 연장 모이어티에 화학적으로 연결 또는 융합된다.

[0184] 제6 실시양태에서, 본 발명은 X1이 부재하는 것인 제1, 제2, 제4 및 제4A 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0185] 제7 실시양태에서, 본 발명은 N-말단이 아미드인 제1 내지 제4 및 제6 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염에 관한 것이다.

[0186] 제8 실시양태에서, 본 발명은 N-말단이 화학식 -NHR의 아미드이고, R이 아세틸, 벤조일, 페나실, 숙시닐, 옥타노일, 4-페닐부타노일, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3$C(O)-, 또는 Ph-CH_2CH_2NHC(O)-인 제7 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염에 관한 것이다.

[0187] 제8A 실시양태에서, 본 발명은 N-말단이 화학식 NHR1의 아미드이고, 여기서 R1이 CH_3C(O)-, CH_3-$(O-CH_2CH_2)_m$-C(O)-, 팔미토일(O2Oc)$_p$, 미리스토일(O2Oc)$_p$, 라우로일(O2Oc)$_p$ 또는 Ph-CH_2CH_2NHC(O)-이고; 여기서

[0188] p가 1 내지 4의 정수이고;

[0189] m이 1 내지 12의 정수이고;

[0190] 라우로일(O2Oc)이 $C_{11}H_{23}$C(O)NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-이고;

[0191] 미리스토일(O2Oc)이 $C_{13}H_{27}$C(O)NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-이고;

[0192] 팔미토일(O2Oc)이 $C_{15}H_{31}$C(O)NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-인 제1 내지 제4 및 제7 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염에 관한 것이다. N-말단 아미드의 예는 2012년 1월 27일에 출원된 미국 가출원 번호 61/591,557 (대리인 문서 번호 PAT054961-US-PSP)에 기재되어 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0193] 제9 실시양태에서, 본 발명은 X13이 F 또는 f인 제1 내지 제8A 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0194] 제10 실시양태에서, 본 발명은 X13이 부재하는 것인 제1 내지 제8A 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0195] 제11 실시양태에서, 본 발명은 X12가 부재하는 것인 제1 내지 제10 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0196] 제12 실시양태에서, 본 발명은 C-말단이 아미드인 제1 내지 제11 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염에 관한 것이다.

[0197] 제13 실시양태에서, 본 발명은 C-말단이 화학식 -C(O)-R2의 아미드이고, R2가 -NH_2, -NH-Me, -NH-NHBn,

-N(CH_3)-(CH_2)$_2$-Ph 또는 -NH-(CH_2)$_2$-Ph인 제12 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 염에 관한 것이다.

[0198] 제14 실시양태에서, 본 발명은 X8이 K인 제1 내지 제13 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0199] 제15 실시양태에서, 본 발명은 X9가 G인 제1 내지 제14 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0200] 제16 실시양태에서, 본 발명은 X10이 P인 제1 내지 제15 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0201] 제17 실시양태에서, 본 발명은 X11이 Nle 또는 D-Nle인 제1 내지 제16 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드; 또는 폴리펩티드의 아미드, 에스테르 또는 염에 관한 것이다.

[0202] 제17A 실시양태에서, 본 발명은 X11-X12-X13 모이어티로 이루어진 C-말단이 Nle-P-페네틸아민, Nle-P-(N-Me)F, Nle-P-NH2, Nle-페네틸아민, (D-Nle)-페네틸아민, Nle-P-f, D-Nle-a-f, (D-Nle)-NH2, (D-Nle)-f, (D-Nle)-a-d, (D-Nle)-a-y, (D-Nle)-(D-Nva)-f, Nle-P-F, Nle-P-a, Nle-P-NaI 및 (D-Nle)-(D-Abu)-f로부터 선택된 것인 제1 내지 제17 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드의 염에 관한 것이다. 이러한 실시양태의 한 특정한 측면에서, 본 발명은 X11-X12-X13 모이어티로 이루어진 C-말단이 (D-Nle)-페네틸아민, (D-Nle)-a-f 및 f-a-f로부터 선택된 것인 제17A 실시양태에 따른 폴리펩티드, 또는 폴리펩티드의 염에 관한 것이다.

[0203] 제17B의 한 실시양태에서, 본 발명은 아미노산 X1, X3, X4 및 X7 내지 X13 중 적어도 2개가 Pyr-1-아펠린-13에 존재하는 상응하는 아미노산과 상이한 것인 제1 내지 제17 실시양태 중 어느 한 실시양태의 펩티드 또는 폴리펩티드에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 아미노산 X1, X3, X4 및 X7 내지 X13 중 적어도 3개가 Pyr-1-아펠린-13에 존재하는 상응하는 아미노산과 상이한 것인 제1 내지 제18 실시양태 중 어느 한 실시양태의 펩티드 또는 폴리펩티드에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 아미노산 X1, X3, X4 및 X7 내지 X13 중 적어도 4개가 Pyr-1-아펠린-13에 존재하는 상응하는 아미노산과 상이한 것인 제1 내지 제18 실시양태 중 어느 한 실시양태의 펩티드 또는 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0204] 또 다른 실시양태에서, X1, X3, X4 및 X7-X13 아미노산은 하기 실시예 섹션에서 X1, X3, X4, 및 X7-X13 아미노산에 의해 정의된 것이다.

[0205] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 개별 폴리펩티드는 하기 실시예 섹션에 열거된 것 또는 그의 제약상 허용되는 염이다.

[0206] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "본 발명의 폴리펩티드"는 화학식 I 및 그의 하위화학식 (화학식 II, III 또는 IV)의 폴리펩티드; 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염을 지칭한다.

[0207] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "본 발명의 폴리펩티드", "본 발명의 펩티드", "아펠린 펩티드 효능제" 등은 화학식 I 및 그의 하위화학식 (화학식 II, III 또는 IV)의 펩티드 및 폴리펩티드; 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염을 지칭한다. 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 야생형 아펠린, 아펠린-13 및 pyr-1-아펠린-13을 포함하나 이에 제한되지는 않는 본원에 기재된 기지의 아펠린 펩티드 및 폴리펩티드와 실질적으로 동등하거나 또는 그에 비해 개선된 활성 및/또는 혈장 안정성을 나타낸다.

[0208] 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 또한 화학식 I, II, III 또는 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드 및 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 뿐만 아니라 실험 실시예를 포함하나 이에 제한되지는 않는 본원에 구체적으로 열거된 임의의 펩티드 또는 폴리펩티드와 적어도 약 95% 동일한 펩티드 및 폴리펩티드를 포괄한다.

[0209] 본원에 사용된 어구 "상동 아미노산 서열" 또는 그의 변형은 아미노산 수준에서 적어도 명시된 백분율의 상동성을 특징으로 하는 서열을 지칭하고, "서열 동일성"과 상호교환가능하게 사용된다. 상동 아미노산 서열은 보존적 아미노산 치환을 함유하고 폴리펩티드가 동일한 결합 및/또는 활성을 갖는 것인 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열은 비교 서열과 적어도 60% 이상, 99% 이하의 동일성을 갖는 경우에 상동이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열은 비교 서열과 1개 이상, 60개 이하의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 공유하는 경우에 상동이다. 일부 실시양태에서, 상동 아미노산 서열은 5개 이하 또는 3개 이하의 보존

적 아미노산 치환을 갖는다.

[0210] 상동성은 또한 폴리펩티드 수준일 수 있다. 본 발명의 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 그의 부분, 및 상이한 아미노산 서열의 동일성 정도 또는 백분율은 "본 발명 서열" 또는 "외래 서열" 중 어느 것이든 가장 짧은 것의 길이에 의해 나눠진 2개의 서열의 정렬에서 정확한 매치의 수로서 계산된다. 그 결과는 퍼센트 동일성으로서 표현된다.

[0211] 구체적 예에 기재된 아미노산 서열과 약 80-99.9%, 바람직하게는 90-99.9%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 아펠린-13 또는 pyr-1-아펠린-13보다 우수한 혈장 안정성을 보유하는 폴리펩티드가 본 발명의 폴리펩티드의 카테고리에 속한다. 한 실시양태에서, 혈장 안정성 개선은 적어도 2배이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 적어도 30분의 혈장 안정성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 적어도 60분, 또는 적어도 80분, 바람직하게는 적어도 100분, 보다 바람직하게는 적어도 150분의 혈장 안정성을 갖는다.

[0212] 용어 "실질적으로 동등한"은 수용체-결합 활성, 신호 전달 활성 등의 속성이 동등하다는 것을 의미한다. 따라서, 이는 등급, 예컨대 수용체 결합 활성의 강도 및 폴리펩티드의 분자량 사이에 차이가 존재하는 경우에도 허용될 수 있다.

[0213] 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 또는 아미노산 중 1개 이상의 치환, 결실, 부가 또는 삽입에 의한 그와 실질적인 등가물은 상기 의미에서 아미노산 서열의 실질적인 등가물(들)을 함유하는 폴리펩티드로서 언급될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 또는 천연 또는 비-천연 아미노산에 의한 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 바람직하게는 1 또는 2개의 아미노산의 치환에 의한 그와 실질적인 등가물은, 상기 의미에서 아미노산 서열의 실질적인 등가물(들)을 함유하는 폴리펩티드로서 언급될 수 있다. 추가의 변형 및 변경은, 화학식 I, II, III 또는 IV의 펩티드 또는 폴리펩티드의 아펠린 효능작용 활성이 유지되고 혈장 안정성이 아펠린-13의 피로글루타메이트화 형태에 비해 개선되는 한, L-아미노산의 D-아미노산으로의 대체, 또는 인산화, 카르복실화, 알킬화 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 변형을 포함할 수 있다.

[0214] 제19 실시양태에서, 본 발명은 추가로

[0215] a. 제1 내지 제18 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 화학식 I, II, III 또는 IV의 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 염 또는 에스테르;

[0216] b. 반감기 연장 모이어티

[0217] 를 포함하며; 여기서 상기 펩티드 또는 폴리펩티드 및 상기 반감기 연장 모이어티가 임의로 링커를 통해 공유적으로 연결 또는 융합된 것인 생체접합체 또는 그의 다량체에 관한 것이다.

[0218] 제19A 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는 임의로 링커 모이어티를 통해 화학식 I, II, III 또는 IV의 펩티드의 N-말단에 부착된다.

[0219] 제19B 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는 임의로 링커 모이어티를 통해 화학식 I, II, III 또는 IV의 펩티드의 C-말단에 공유적으로 연결 또는 융합된다.

[0220] 제19C 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는 화학식 I, II, III 또는 IV의 펩티드의 측쇄에 공유적으로 연결 또는 융합되고, 예를 들어 반감기 연장 모이어티는 임의로 링커 모이어티를 통해 K, Orn, Dab, Dap, hK 또는 4-아미노-Isn의 측쇄 내의 아미노 기에 공유적으로 연결 또는 융합된다. 바람직하게는, 반감기 연장 모이어티는 임의로 링커 모이어티를 통해 화학식 I, II, III 또는 IV의 펩티드의 N-말단에 부착된다.

[0221] 제20 실시양태에서, 본 발명은 반감기 연장 모이어티가 IgG 불변 도메인 또는 그의 단편, 지방산 또는 인간 혈청 알부민인 제19 실시양태에 따른 생체접합체 또는 그의 다량체에 관한 것이다.

[0222] 제21 실시양태에서, 본 발명은 반감기 연장 모이어티가 LALA 돌연변이 (L234A, L235A)를 갖는 FcLALA 변형된 Fc 단편인 제19 또는 제20 실시양태에 따른 생체접합체에 관한 것이다.

[0223] 제22 실시양태에서, 본 발명은 반감기 연장 모이어티가 링커를 통해 화학식 I, II, III 또는 IV의 폴리펩티드에 융합 또는 공유적으로 연결된 Fc 도메인이고, 여기서 링커는 하기 화학식: -[GGGGS]n-을 가지며, n은 1, 2 또는 3이거나, 또는 링커는 GG 또는 GS이고, 화학식 I, II, III 또는 IV의 폴리펩티드는 자연 발생 아미노산을 함유하는 것인 제21 실시양태에 따른 생체접합체에 관한 것이다.

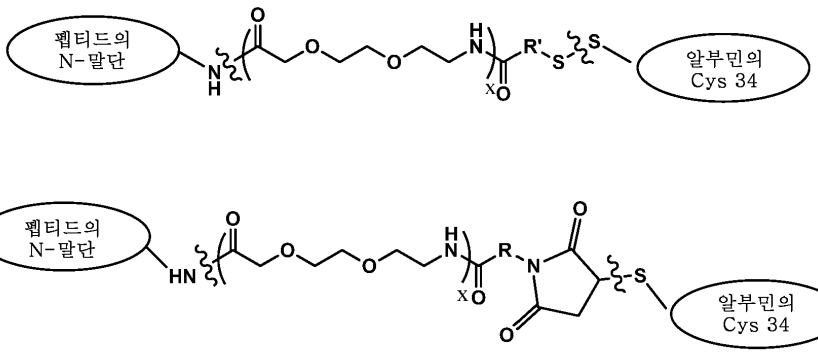
[0224] 제23 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드가 QRPC*LSC*KGPMPF, C*RPRLSC*KGPMPF 및 QRC*RLSC*KGPMPF로부터 선

택된 화학식 I의 폴리펩티드이고, 여기서 "*"로 표지된 2개의 아미노산은 그의 측쇄를 통해 디술피드 또는 아미드 결합을 형성하는 아미노산을 나타내는 것인 제22 실시양태에 따른 생체접합체에 관한 것이다.

[0225] 제23A 실시양태에서, 본 발명은 반감기 연장 모이어티가 C-말단 리신이 결실되거나 알라닌으로 대체된 변형된 Fc 도메인인 제22 또는 제23 실시양태에 따른 생체접합체에 관한 것이다. 이러한 Fc-변이체는 함께-출원된 출원 (미국 가출원 번호 62/015848: 대리인 문서 번호 PAT055781-US-PSP02)에 기재되어 있고, 아펠린 펩티드/폴리펩티드와 보다 안정한 융합 단백질을 생성한다.

[0226] 제24 실시양태에서, 본 발명은 반감기 연장 모이어티가 인간 혈청 알부민인 제19 또는 제20 실시양태에 따른 생체접합체 또는 그의 다량체에 관한 것이다.

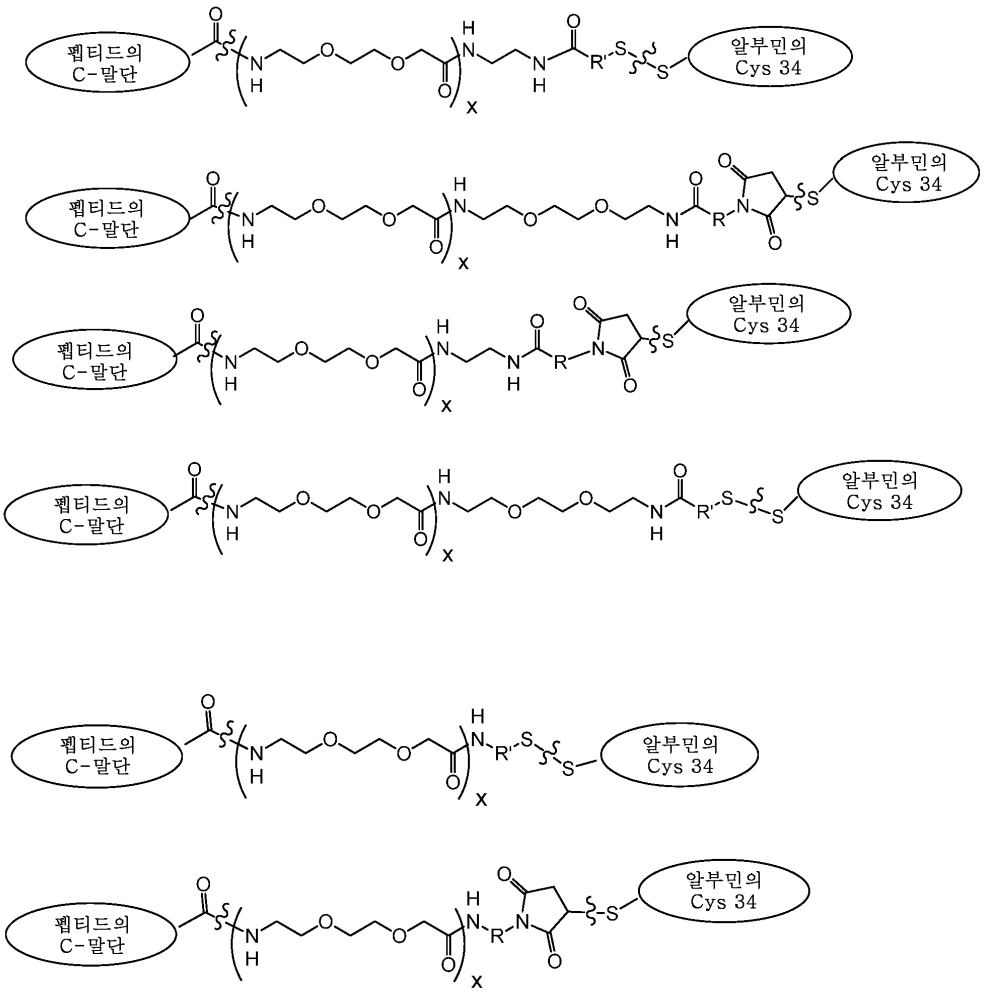
[0227] 제25 실시양태에서, 본 발명은 인간 혈청 알부민이 하기 화학식의 링커:



[0228]

[0229] 를 통해 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드의 N-말단에 화학적으로 연결되며, 여기서 x는 1-20이고, R은 선형 또는 분지형 알킬렌, 시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 또는 그의 조합이고, R'는 선형 또는 분지형 알킬렌, 아릴 또는 시클로알킬 또는 그의 조합인 제24 실시양태에 따른 생체접합체에 관한 것이다.

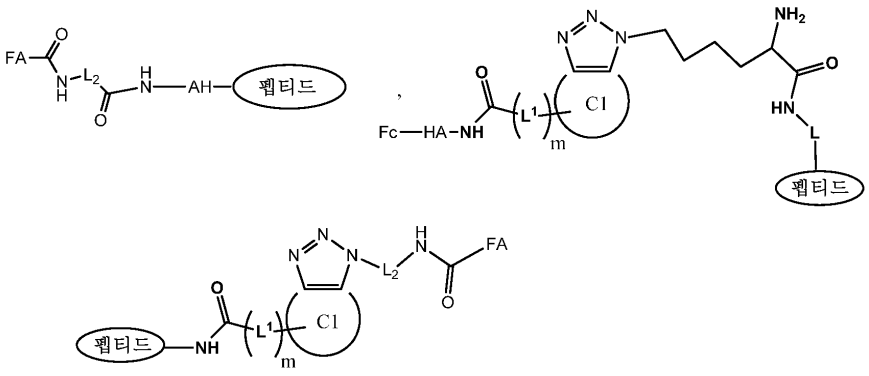
[0230] 제26 실시양태에서, 본 발명은 인간 혈청 알부민이 하기 화학식의 링커:



[0231]

[0232] 를 통해 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드의 C-말단에 화학적으로 연결되며, 여기서 x는 1-20이고, R은 선형 또는 분지형 알킬렌, 시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 또는 그의 조합이고, R'는 선형 또는 분지형 알킬렌, 아릴 또는 시클로알킬 또는 그의 조합인 제19 또는 제20 실시양태에 따른 생체접합체에 관한 것이다.

[0233] 다른 실시양태에서, 본 발명의 생체접합체는 하기 화학식을 가지며:



또는

[0234]

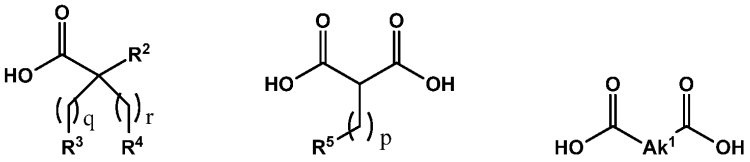
[0235] 여기서 펩티드는 펩티드의 N-말단이고, A는 알라닌이고, H는 히스티딘이고, n은 1, 2 또는 3이고, m은 0 또는 1이고, L 및 L2는 링커이고, C1은 플루오린으로 임의로 치환된 모노, 디 또는 트리시클릭 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 고리계이고, L^1은 C1-C20 알킬렌 링커이며, 여기서 알킬렌 쇄는 옥소 (=O)로 임의로 치환되고, 여기서 1개 이상의 탄소는 O 또는 NH로 대체된다. 이러한 실시양태의 특정한 측면에서, L 및 L2는 PEG 링커이다.

[0236] 반감기 연장 모이어티

[0237] 본 발명의 반감기 연장 모이어티는 펩티드 또는 폴리펩티드 유사체에 공유적으로 부착, 연결, 접합 또는 융합될 수 있다. 반감기 연장 모이어티는, 예를 들어 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 지방산, 콜레스테롤기, 탄수화물 또는 올리고사카라이드; 또는 샐비지 수용체에 결합하는 임의의 천연 또는 합성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드일 수 있다. 바람직하게는, 반감기 연장 모이어티는, 임의로 링커를 통해 긴 혈청 반감기를 갖는 혈장 단백질 (알부민 및 이뮤노글로불린)에 공유적으로 연결된다. 예를 들어, 반감기 연장 모이어티는 IgG 불변 도메인 또는 그의 단편 (예를 들어, Fc 영역), 인간 혈청 알부민 (HSA), 또는 알부민-결합 폴리펩티드 또는 잔기 (예를 들어, 지방산)이다. 바람직하게는, 생체접합체의 반감기 연장 모이어티 부분은 인간 혈청 알부민, 지방산 또는 Fc 영역이다.

[0238] 반감기 연장 모이어티는 기원 종에 따라, 그의 단량체 형태에서 대략 65 내지 67 킬로달톤의 분자량을 갖는, 혈장에서 가장 풍부한 단백질을 지칭하는 알부민을 포함한다. 용어 "알부민"은 "혈청 알부민"과 상호교환가능하게 사용되고, 본 발명의 변형된 펩티드와 접합체를 형성하는 알부민의 공급원을 정의하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "알부민"은 천연 공급원, 예컨대 혈액 또는 장액으로부터 정제된 알부민을 지칭할 수 있거나, 또는 이는 화학적으로 합성되거나 재조합적으로 생산된 알부민을 지칭할 수 있다. 본 발명의 변형된 펩티드 또는 폴리펩티드는 임의로 링커를 통해 알부민 표면 상의 시스테인-34의 유리 티올 기에 우선적으로 테더링된다.

[0239] 반감기 연장 모이어티는 지방산을 포함하며, 이는 C6-70알킬, C6-70알케닐 또는 C6-70알키닐 쇄로서 정의될 수 있고, 이들 각각은 적어도 1개의 카르복실산 (예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 CO2H)으로 치환되고 히드록실 기로 임의로 추가로 치환된다. 지방산의 예는 하기 화학식 A1, A2 및 A3; 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 제약상 허용되는 염에 의해 정의되며:



A1 A2 또는 A3

[0240]

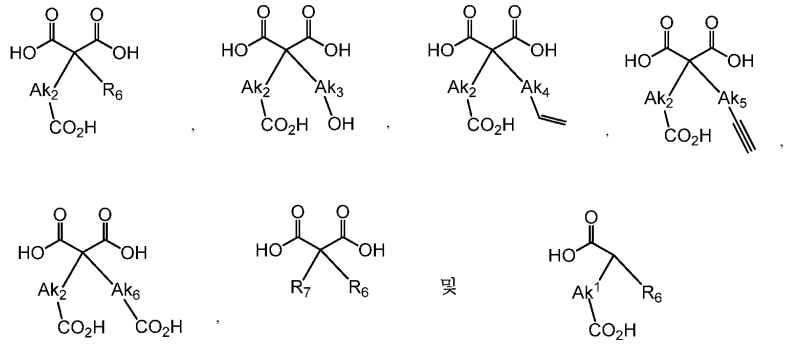
[0241] R^2는 CO_2H, H이고;

[0242] R^3, R^4 및 R^5는 서로 독립적으로 H, OH, CO_2H, $-CH=CH_2$ 또는 $-C\equiv CH$이고;

[0243] Ak^1은 분지형 C_6-C_{30}알킬렌이고;

[0244] q, r 및 p는 서로 독립적으로 6 내지 30의 정수이다.

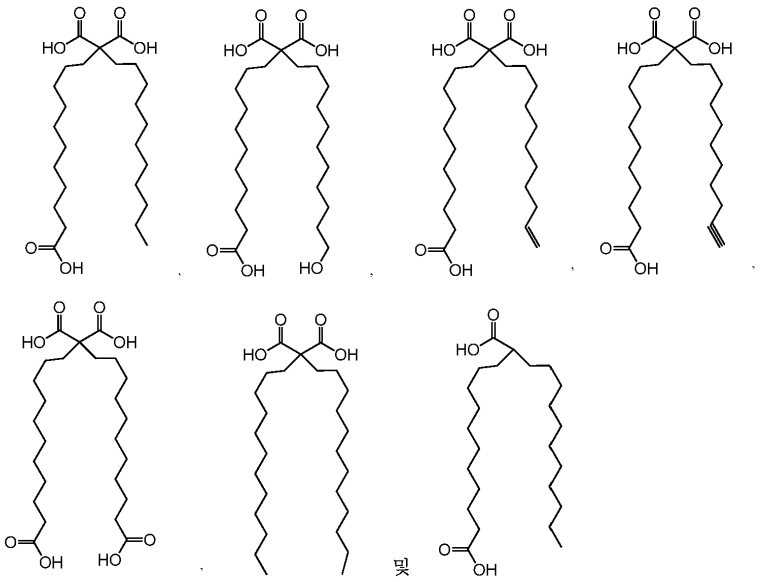
[0245] 지방산의 예는 하기로부터 선택되며:



[0246]

[0247] 여기서 Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 및 Ak^6은 독립적으로 (C_{8-20})알킬렌이고, R^6 및 R^7은 독립적으로 (C_{8-20})알킬이다.

[0248] 보다 구체적으로, 지방산은 하기로부터 선택된다:



[0249]

[0250] 이들 지방산 모이어티는 함께-출원된 출원, 미국 가출원 번호 62/015862 대리인 문서 번호 PAT056274-US-PSP에 기재되어 있다.

[0251] 반감기 연장 모이어티는, 단량체 또는 다량체 형태에 관계없이 전체 항체의 소화로부터 생성되거나 다른 수단에 의해 생산되는 비-항원-결합 단편의 서열을 포함하는 분자 또는 서열을 지칭하고 힌지 영역을 함유할 수 있는, "천연 Fc"를 포함한다. 천연 Fc의 원래의 이뮤노글로불린 공급원은 바람직하게는 인간 기원의 것이고, 임의의 이뮤노글로불린일 수 있지만, IgG1 및 IgG2가 바람직하다. 천연 Fc 분자는 공유 (즉, 디술피드 결합) 및 비-공유 회합에 의해 이량체 또는 다량체 형태로 연결될 수 있는 단량체 폴리펩티드로 이루어진다. 천연 Fc 분자의 단량체 서브유닛 사이의 분자간 디술피드 결합의 수는 부류 (예를 들어, IgG, IgA 및 IgE) 또는 하위부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 및 IgGA2)에 따라 1 내지 4개의 범위이다. 천연 Fc의 하나의 예는 IgG의 파파인 소화로부터 생성되는 디술피드-결합 이량체이다 (문헌 [Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9] 참조). 본원에 사용된 용어 "천연 Fc"는 단량체, 이량체 및 다량체 형태의 총칭이다.

[0252] 반감기 연장 모이어티는, 천연 Fc로부터 변형되었지만 여전히 샐비지 수용체, FcRn (네오나탈 Fc 수용체)에 대한 결합 부위를 포함하는 분자 또는 서열을 지칭하는, "Fc 변이체"를 포함한다. 국제 공개 번호 WO 97/34631 및 WO 96/32478은 예시적인 Fc 변이체, 뿐만 아니라 샐비지 수용체와의 상호작용을 기재하고, 이는 본원에 참조로 포함된다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 비-인간 천연 Fc로부터 인간화된 분자 또는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 천연 Fc는 본 발명의 생체접합체에 필요하지 않은 구조적 특징 또는 생물학적 활성을 제공하기 때문에 제거될 수 있는 영역을 포함한다. 따라서, 용어 "Fc 변이체"는 (1) 디술피드 결합 형성, (2) 선택된 숙주 세포와의 비상용성, (3) 선택된 숙주 세포에서 발현 시 N-말단 이질성, (4) 글리코실화, (5) 보체와의 상호작용, (6) 샐비지 수용체 이외의 Fc 수용체에 대한 결합 또는 (7) 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 영향을 미치거나 이에 관여하는 하나 이상의 천연 Fc 부위 또는 잔기가 결여되거나 하나 이상의 Fc 부위 또는 잔기가 변형된 분자 또는 서열을 포함한다. Fc 변이체는 하기에 추가로 상세하게 기재되어 있다.

[0253] 반감기 연장 모이어티는 C-말단 리신이 결실되거나 알라닌으로 대체된 Fc 변이체를 포함한다.

[0254] 반감기 연장 모이어티는 상기 정의된 바와 같은 천연 Fc 및 Fc 변이체 및 서열을 포괄하는 "Fc 도메인"을 지칭한다. Fc 변이체 및 천연 Fc 분자에서와 같이, 용어 "Fc 도메인"은 전체 항체로부터 소화된 것이든 다른 수단에 의해 생산된 것이든 관계없이 단량체 또는 다량체 형태의 분자를 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 예를 들어 Fc 도메인과 펩티드 서열 사이의 공유 결합을 통해 화학식 I' 또는 화학식 I-IV 중 어느 하나의 폴리펩티드에 접합될 수 있다. 이러한 Fc 단백질은 Fc 도메인의 회합을 통해 다량체를 형성할 수 있고, 이들 Fc 단백질 및 그의 다량체 둘 다는 본 발명의 측면이다.

[0255] 반감기 연장 모이어티는, 변형된 서열을 포함하는 항체의 Fc 단편을 의미할 것인, "변형된 Fc 단편"을 포함한다. Fc 단편은 CH2, CH3 및 힌지 영역의 일부를 포함하는 항체의 부분이다. 변형된 Fc 단편은, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 유래될 수 있다. FcLALA는 LALA 돌연변이 (L234A, L235A)를 갖는 변형된 Fc 단편이고, 이는 ADCC를 저하된 효율로 유발하고, 인간 보체에 약하게 결합하여 활성화시킨다. 문헌 [Hessell et al. 2007 Nature 449:101-104]. Fc 단편에 대한 추가의 변형은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,217,798에 기재되어 있다.

[0256] Fc 도메인 또는 Fc 도메인을 포함하는 분자에 적용되는 용어 "다량체"는 공유적으로 회합된 2개 이상의 폴리펩티드 쇄를 갖는 분자를 지칭한다. 예를 들어, IgG 분자는 전형적으로 이량체를 형성하고, 따라서 이량체 IgG 분자를 포함하는 생체접합체는 화학식 I, IA, II, III 또는 IV 중 2개의 폴리펩티드 쇄에 융합될 것이다.

[0257] 링커

[0258] 임의의 링커 기는 임의적이다. 존재하는 경우에, 링커는 주로 스페이서로서 작용하기 때문에 그의 화학 구조는 중요하지 않다.

[0259] 링커는 2개의 반응성 기/관능기를 함유하고, 그 중 하나는 폴리펩티드와 반응할 수 있고 다른 것은 반감기 연장 모이어티와 반응할 수 있는 화학적 모이어티이다. 링커의 2개의 반응성 기는 연결 기를 통해 연결되고, 그의 구조는 링커가 펩티드 및 반감기 연장 모이어티에 커플링되는 것을 방해하지 않는 한 중요하지 않다.

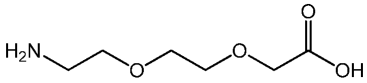
[0260] 링커는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산으로 이루어질 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 링커는 펩티드 결합에 의해 연결된 1 내지 20개의 아미노산으로 이루어지고, 여기서 아미노산은 20개의 자연 발생 아미노산으로부터 선택된다. 다양한 실시양태에서, 1 내지 20개의 아미노산은 아미노산 글리신, 세린, 알라닌, 프롤린, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인 및 리신으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 링커는 입체 비장애인 다수의 아미노산, 예컨대 글리신 및 알라닌으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리글리신, 폴리알라닌, 글리신과 알라닌의 조합 (예컨대 폴리(Gly-Ala)), 또는 글리신과 세린의 조합 (예컨대 폴리(Gly-

Ser))이다. 일부 실시양태에서, 링커는 히스티딘, 알라닌, 메티오닌, 글루타민, 아스파라긴 및 글리신으로부터 선택된 다수의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리-히스티딘 모이어티를 함유한다. 링커의 예는 모티프 AH, MHA 또는 AHA를 포함하는 링커이다. 이러한 모티프는 동시계류 출원 및 함께-출원된 출원, 대리인 문서 번호 미국 가출원 번호 62/015862: PAT056274-US-PSP 및 미국 가출원 번호 62/015868: PAT056275-US-PSP에 기재되어 있고, 이는 펩티드 또는 폴리펩티드의 N-말단에서의 선택적 접합에 유익하다.

[0261] 링커의 다른 예는 모티프 GGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGS, GGGGS, GS 또는 GG를 포함한다.

[0262] 일부 다른 실시양태에서, 링커는 효소에 대한 인식 모티프를 포함한다. 예는 C-말단에 포함될 수 있는 LPXTG/A 모티프이며, 여기서 X는 임의의 아미노산, 가장 통상적으로는 E: 글루탐산이다. (L: 류신, P: 프롤린, T: 트레오닌, G: 글리신, A; 알라닌). (Carla P. Guimaraes et al.: "Site specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions", Nature protocols, vol 8, No 9, 2013, 1787-1799)

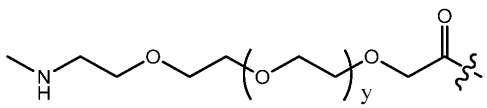
[0263] 다른 실시양태에서, 링커는 비천연 아미노산으로부터 선택된 1 내지 20개의 아미노산을 포함한다. 3-15개의 아미노산 잔기의 링커가 반감기 연장 모이어티와의 접합을 위해 바람직하지만, 본 발명은 임의의 길이 또는 조성의 링커를 고려한다. 바람직한 아미노산 링커는 하기 화학식:

[0264]  의 O2Oc 또는 그의 반복 단위이다.

[0265] 본원에 기재된 링커는 예시적인 것이고, 훨씬 더 길고 다른 잔기를 포함하는 링커가 본 발명에 의해 고려된다. 비-펩티드 링커도 본 발명에 의해 고려된다.

[0266] 링커의 연결부는 1개 이상의 알킬 기, 알콕시 기, 알케닐 기, 시클로알킬 기, 아릴 기, 헤테로아릴 기 및 헤테로시클릭 기 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 알킬 링커, 예컨대 -NH-(CH_2)z-C(O)- 또는 -S-(CH_2)z-C(O)- 또는 -O-(CH_2)z-C(O)- (여기서 z는 2-20임)가 사용될 수 있다. 이들 알킬 링커는 저급 알킬 (예를 들어, C1-C6), 저급 아실, 할로겐 (예를 들어, Cl, Br), CN, NH2, 또는 페닐을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 비-입체 장애 기에 의해 추가로 치환될 수 있다.

[0267] 링커는 또한 중합체 속성의 것일 수 있다. 링커는 생체안정하거나 생분해성인 중합체 쇄 또는 유닛을 포함할 수 있다. 반복 연결을 갖는 중합체는 결합 불안정성에 따라 생리학적 조건 하에 다양한 정도의 안정성을 가질 수 있다. 중합체는 폴리카르보네이트 (-O-C(O)-O-), 폴리에스테르 (-C(O)-O-), 폴리우레탄 (-NH-C(O)-O-), 폴리아미드 (-C(O)-NH-)와 같은 결합을 함유할 수 있다. 이들 결합은 예로서 제공되고, 본 발명의 중합체 쇄 또는 링커에서 사용가능한 결합의 유형을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 적합한 중합체는, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알콜, 폴리아미노산, 디비닐에테르 말레산 무수물, N-(2-히드록시프로필)-메타크릴릭아미드, 덱스트란, 덱스트란 유도체, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 폴리사카라이드, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 전분 및 전분 유도체, 폴리알킬렌 글리콜 및 그의 유도체, 폴리알킬렌 글리콜 및 그의 유도체의 공중합체, 폴리비닐 에틸 에테르 등 및 그의 혼합물을 포함한다. 중합체 링커는 예를 들어 PEG이다. 예시적인 비-펩티드 링커는 폴리에틸렌 글리콜 링커이며:

[0268] 

[0269] 여기서 y는 링커가 100 내지 5000 kD, 예를 들어 100 내지 500 kD의 분자량을 갖게 하는 것이다.

[0270] 바람직하게는, 연결 모이어티는 1개 이상의 아미노산 모이어티, 예컨대 예를 들어 (O2Oc) 유닛 또는 글리신 또는 세린, C_{1-4}알킬렌-C(O)-, C_{1-4}알킬렌, -NH-C_{2-6}알킬렌-NH- 또는 -NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH- 디아미노 유닛 또는 그의 조합, 및 2개의 반응성 기 또는 관능기를 연결하는 연결 모이어티를 함유한다.

[0271] 바람직하게는, 반응성 기 또는 관능기는 말레이미드, 티올 또는 피리딘-2-일디술파닐이다.

[0272] 반감기 연장 모이어티에의 부착을 위한 펩티드 또는 폴리펩티드 및 펩티드-링커 구축물의 제조:

[0273] 본 발명의 아펠린 펩티드 및 폴리펩티드 및/또는 펩티드-링커 구축물은 합성 화학적 공정에 의해 또는 재조합

방법 또는 둘 다의 방법의 조합에 의해 생성될 수 있다. 아펠린 펩티드 및/또는 펩티드-링커 구축물은 전장으로서 제조될 수 있거나, 또는 비-전장 단편으로서 합성되어 연결될 수 있다. 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드는 펩티드 합성에 대해 공지된 절차 그 자체에 의해 생성될 수 있다. 펩티드 합성 방법은 임의의 고체-상 합성 및 액체-상 합성일 수 있다. 따라서, 관심 펩티드 및 폴리펩티드는 단백질을 구성할 수 있는 부분 펩티드 또는 아미노산을 그의 잔여 부분과 축합시킴으로써 생성될 수 있고, 생성물이 보호기를 갖는 경우에는, 보호기를 탈착시켜 목적하는 펩티드를 제조할 수 있다. 축합 및 탈보호에 대해 공지된 방법은 하기 문헌 (1) - (5)에 기재된 절차를 포함한다.

[0274] (1) M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York, 1966,

[0275] (2) Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965,

[0276] (3) Nobuo Izumiya et al.. Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis, Maruzen, 1975,

[0277] (4) Haruaki Yajima and Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977, 및

[0278] (5) Haruaki Yajima (ed.), Development of Drugs-Continued, 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten.

[0279] 반응 후에, 펩티드는 통상의 정제 기술, 예컨대 용매 추출, 칼럼 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피 및 재결정화의 조합에 의해 정제 및 단리될 수 있다. 상기와 같이 단리된 펩티드가 유리 화합물인 경우에, 그것을 공지된 방법에 의해 적합한 염으로 전환시킬 수 있다. 반대로 단리된 생성물이 염인 경우에는, 그것을 공지된 방법에 의해 유리 펩티드로 전환시킬 수 있다.

[0280] 폴리펩티드의 아미드는 아미드화에 적합화된 펩티드 합성을 위한 수지를 사용하여 수득될 수 있다. 수지는 클로로메틸 수지, 히드록시메틸 수지, 벤즈히드릴아민 수지, 아미노메틸 수지, 4-벤질옥시벤질 알콜 수지, 4-메틸벤즈-히드릴아민 수지, PAM 수지, 4-히드록시메틸메틸페닐아세트아미도메틸 수지, 폴리아크릴아미드 수지, 4-(2',4'-디메톡시페닐-히드록시메틸)페녹시 수지, 4-(2',4'-디메톡시페닐-Fmoc-아미노메틸)페녹시 수지, 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 등을 포함한다. 이러한 수지를 사용하여, α-아미노 기 및 측쇄의 관능기가 적합하게 보호되어 있는 아미노산을, 그 자체로 공지된 다양한 축합 기술에 의해 목적 펩티드의 서열에 따라 수지 상에서 축합시킨다. 일련의 반응의 말미에, 펩티드 또는 보호된 펩티드를 수지로부터 제거하고, 보호기를 제거하고, 필요한 경우에 디술피드 결합을 형성하여 목적 폴리펩티드를 수득한다.

[0281] 상기 언급된 보호된 아미노산의 축합을 위해, 펩티드 합성을 위한 다양한 활성화 시약, 예컨대 HATU, HCTU, 또는 예를 들어 카르보디이미드를 사용할 수 있다. 카르보디이미드는 DCC, N,N'-디이소프로필카르보디이미드 및 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드를 포함한다. 이러한 시약으로의 활성화를 위해, 라세미화 억제제 첨가제, 예를 들어 HOBt 또는 옥시마 퓨어(Oxyma Pure)를 사용할 수 있다. 보호된 아미노산은 직접적으로 활성화 시약 및 라세미화 억제제와 함께 수지에 첨가될 수 있거나, 또는 대칭 산 무수물, HOBt 에스테르 또는 HOOBt 에스테르로서 사전-활성화된 다음 수지에 첨가될 수 있다. 보호된 아미노산의 활성화 또는 수지와의 축합을 위한 용매는 펩티드 축합 반응에 유용한 것으로 공지된 용매 중에서 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, N,N-디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈, 클로로포름, 트리플루오로에탄올, 디메틸 술폭시드, DMF, 피리딘, 디옥산, 메틸렌 클로라이드, 테트라히드로푸란, 아세토니트릴, 에틸 아세테이트 또는 그의 적합한 혼합물이 언급될 수 있다.

[0282] 반응 온도는 펩티드 결합 형성에 유용한 것으로 지금까지 공지된 범위로부터 선택될 수 있고, 통상적으로 약 -20℃ - 50℃의 범위로부터 선택된다. 활성화된 아미노산 유도체는 일반적으로 1.5-4배 과량의 비율로 사용된다. 축합이 닌히드린 반응을 사용한 시험에 의해 불충분한 것으로 밝혀진 경우에는, 보호기를 제거하지 않고 축합 반응을 반복하여 충분한 축합을 달성할 수 있다. 반복된 축합이 여전히 충분한 축합 정도를 제공하지 못하는 경우에는, 미반응 아미노 기를 아세트산 무수물 또는 아세틸이미다졸로 아세틸화시킬 수 있다.

[0283] 출발 물질 아미노산에 대한 아미노 기의 보호기는 Z, Boc, 3급-아밀옥시카르보닐, 이소보르닐옥시카르보닐, 4-메톡시벤질옥시카르보닐, Cl-Z, Br-Z, 아다만틸옥시카르보닐, 트리플루오로아세틸, 프탈릴, 포르밀, 2-니트로페닐술페닐, 디페닐포스피노티오일 또는 Fmoc를 포함한다. 사용할 수 있는 카르복시-보호기는 상기 언급된 C_{1-6} 알킬, C_{3-8} 시클로알킬 및 C_{6-10}아릴-C_{1-2}알킬, 뿐만 아니라 2-아다만틸, 4-니트로벤질, 4-메톡시벤질, 4-클로로벤질, 페나실, 벤질옥시카르보닐히드라지도, 3급-부톡시카르보닐히드라지도 및 트리틸히드라지도를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0284] 세린 및 트레오닌의 히드록시 기는 에스테르화 또는 에테르화에 의해 보호될 수 있다. 상기 에스테르화에 적합화된 기는 탄소-유래 기, 예컨대 저급 알카노일 기, 예를 들어 아세틸 등, 아로일 기, 예를 들어 벤조일 등, 벤질옥시카르보닐 및 에톡시카르보닐을 포함한다. 상기 에테르화에 적합화된 기는 벤질, 테트라히드로피라닐 및 3급-부틸을 포함한다. 티로신의 페놀성 히드록실 기에 대한 보호기는 Bzl, Cl_2-Bzl, 2-니트로벤질, Br-Z, 및 3급-부틸을 포함한다.

[0285] 히스티딘에 대한 이미다졸의 보호기는 Tos, 4-메톡시-2,3,6-트리에틸벤젠술포닐, DNP, 벤질옥시메틸, Bum, Boc, Trt 및 Fmoc를 포함한다.

[0286] 출발 아미노산의 활성화된 카르복실 기는 상응하는 산 무수물, 아지드 및 활성 에스테르, 예를 들어 알콜, 예컨대 펜타클로로페놀, 2,4,5-트리클로로페놀, 2,4-디니트로페놀, 시아노메틸 알콜, p-니트로페놀, HONB, N-히드록시숙신이미드, N-히드록시프탈이미드, HOBt 등과의 에스테르를 포함한다. 출발 아미노산의 활성화된 아미노 기는 상응하는 포스포르아미드를 포함한다.

[0287] 보호기의 제거 방법은 촉매, 예컨대 팔라듐 블랙 또는 탄소상 팔라듐의 존재 하에 수소 기체를 사용하는 촉매 환원, 무수 플루오린화수소, 메탄술폰산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리플루오로아세트산, 또는 이러한 산의 혼합물에 의한 산 처리, 디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민, 피페리딘, 피페라진에 의한 염기 처리, 액체 암모니아 중 나트륨 금속에 의한 환원을 포함한다. 상기 언급된 산 처리에 의한 제거 반응은 일반적으로 -20℃ -40℃의 온도에서 수행되고, 유리하게는 양이온 수용자, 예컨대 아니솔, 페놀, 티오아니솔, m-크레졸, p-크레졸, 디메틸 술피드, 1,4-부탄디티올, 1,2-에탄디티올의 첨가와 함께 수행될 수 있다. 히스티딘의 이미다졸 기를 보호하는데 사용되는 2,4-디니트로페닐 기는 티오페놀로의 처리에 의해 제거될 수 있고, 한편 트립토판의 인돌 기를 보호하는데 사용되는 포르밀 기는 묽은 수산화나트륨 용액 또는 묽은 수성 암모니아로의 알칼리 처리 뿐만 아니라, 1,2-에탄디티올, 1,4-부탄디티올의 존재 하의 상기 언급된 산 처리에 의해 제거될 수 있다.

[0288] 출발 물질의 반응에 참여하면 안 되는 관능기를 보호하는 방법, 사용할 수 있는 보호기, 보호기를 제거하는 방법, 및 반응에 참여하는 관능기를 활성화시키는 방법은 모두 공지된 기 및 방법 중에서 신중하게 선택될 수 있다.

[0289] 폴리펩티드의 아미드 형태를 수득하는 또 다른 방법은 처음에 C-말단 아미노산의 α-카르복실 기를 아미드화시킨 다음, 목적하는 쇄 길이까지 N-측으로 펩티드 쇄를 연장하고, 이어서 C-말단 펩티드의 α-아미노 기 및 아미노산 또는 펩티드의 α-카르복시 기를 선택적으로 탈보호시켜 목적 폴리펩티드의 나머지를 형성하고, α-아미노 기 및 측쇄 관능기가 상기 언급된 적합한 보호기로 보호된 2개의 단편을 상기 언급된 것과 같은 혼합 용매 중에서 축합시키는 것을 포함한다. 이러한 축합 반응의 파라미터는 상기 기재된 것과 동일할 수 있다. 축합에 의해 수득된 보호된 펩티드로부터, 모든 보호기를 상기 기재된 방법에 의해 제거함으로써 목적하는 조 펩티드를 제공한다. 이러한 조 펩티드는 공지된 정제 절차에 의해 정제될 수 있고, 주요 분획을 동결건조시켜 목적 아미드화 폴리펩티드를 제공할 수 있다. 폴리펩티드의 에스테르를 수득하기 위해서는, C-말단 아미노산의 a-카르복실 기를 목적하는 알콜과 축합시켜 아미노산 에스테르를 수득한 다음, 아미드의 생성에 대해 상기 기재된 절차를 따른다.

[0290] 대안적으로, 재조합 발현 방법이 특히 유용하다. 숙주 세포 (전사 및 번역될 펩티드의 서열을 코딩하는 핵산을 포함하고, 임의로 세포 성장 배지로 펩티드를 분비하도록 인공적으로 조작된 세포)를 사용한 재조합 단백질 발현은 관련 기술분야에 상용적으로 사용된다. 재조합 생산 공정을 위해, 펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산은 전형적으로 통상의 방법에 의해 합성되고 발현 벡터 내로 통합될 것이다. 이러한 방법은 추가의 펩티드 서열 또는 다른 단백질 또는 단백질 단편 또는 도메인에 융합된 펩티드를 포함하는 폴리펩티드 조성물의 제조에 특히 바람직하다. 숙주 세포는 임의로 이.콜라이(E.Coli), COS-1, COS-7, HEK293, BHT21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, heLa, 골수종, 림프종, 효모, 곤충 또는 식물 세포, 또는 그의 임의의 유도체, 불멸화 또는 형질전환된 세포로부터 선택된 적어도 1종일 수 있다.

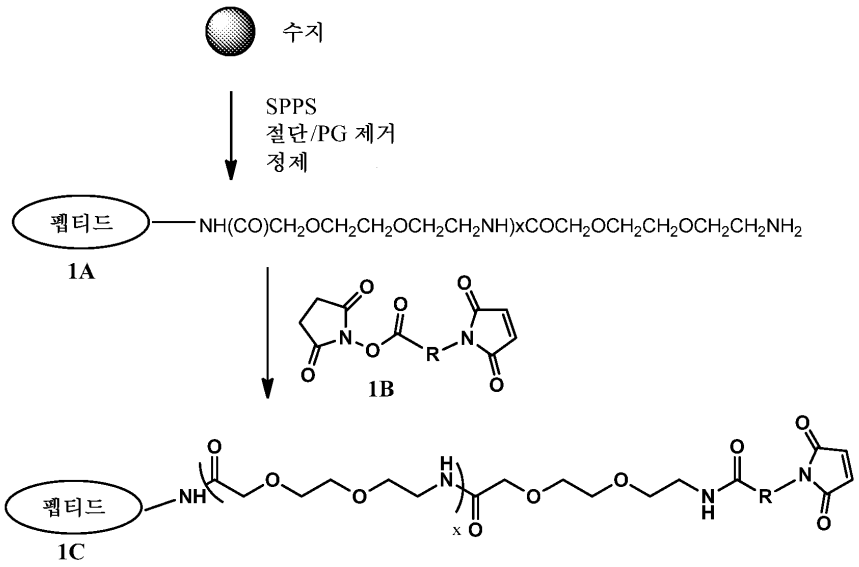
[0291] 변형된 치료 펩티드 또는 폴리펩티드 및/또는 펩티드-링커 구축물은 반감기 연장 모이어티 상의 이용가능한 반응성 관능기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 반응성 기를 포함한다. 반응성 기는 공유 결합을 형성할 수 있는 화학적 기이다. 반응성 기는 일반적으로 카르복시, 포스포릴, 아실 기, 에스테르 또는 혼합 무수물, 말레이미드, 이미데이트, 피리딘-2-일-디술파닐일 수 있으며, 그에 의해 알부민 또는 Fc 도메인의 표적 부위에서 아미노 기, 히드록실 기, 카르복시 기 또는 티올 기와 같은 관능기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 알부민에의 연결을 위한 특정한 관심 반응성 기는 말레이미도-함유 기 및 피리딘-2-일-디술파닐 함유 기를 포함한다.

[0292] 관능기는 변형된 펩티드 또는 폴리펩티드 상의 반응성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 알부민 또는 Fc 도메인 상의 기이다. 관능기는 에스테르 반응성 엔티티와 결합하는 히드록실 기, 말레이미드, 말레이미도-함유 기 또는 피리딘-2-일디술파닐, 이미데이트 및 티오에스테르 기와 반응하는 티올 기; 카르복실산, 포스포릴 기, 아실 기에 결합하는 아미노 기; 및 히드라진, 히드라지드 또는 히드록실아민과 반응하는 카르복시 기를 포함한다.

[0293] 반응식 1 내지 3은 펩티드가 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드인 펩티드-링커 구축물의 합성을 기재한다.

[0294] 반응식 1은 화학식 I 내지 IV의 폴리펩티드의 N-말단에 부착된 말레이미드 함유 링커의 합성을 기재한다.

[0295] <반응식 1>

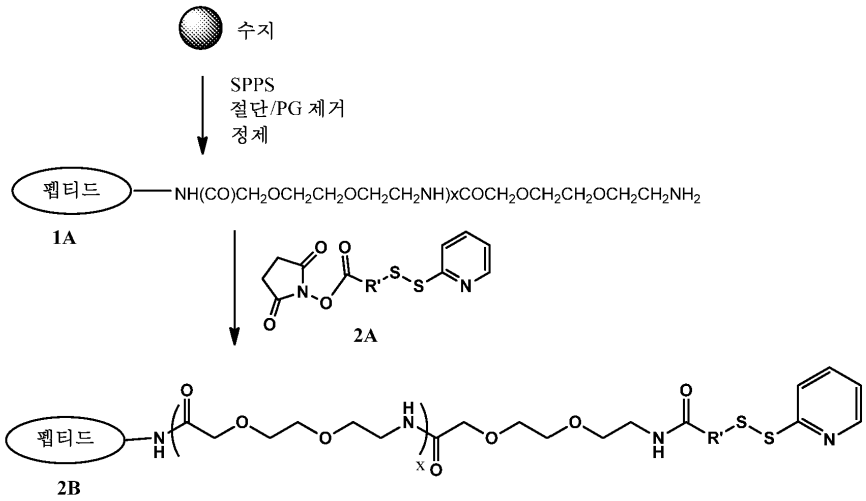


[0296]

[0297] 펩티드의 N-말단은 널리 확립된 아미드 커플링 화학에 따라 1개 이상의 O2Oc 아미노산 유닛 (x는 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 보다 바람직하게는 3 내지 6임)과 커플링되어 1A를 생성한다. 1A의 말단 아미노 관능기는 R이 선형 또는 분지형 알킬렌, 아릴, 헤테로아릴, 시클로알킬 또는 그의 조합인 활성화 산 1B와 반응하여, 펩티드-말레이미드 함유 링커 구축물 1C를 생성한다. 활성화 산 1B는 상업적으로 입수가능하거나 또는 통상의 기술자에게 공지된 기술에 따라 그의 상응하는 카르복실산으로부터 용이하게 이용가능하다. 바람직하게는, R은 선형 알킬렌이고, 보다 바람직하게는 R은 $-CH_2-CH_2-$이다. 대안적으로, 측쇄에 아미노 관능기를 함유하는 펩티드 (예를 들어, 리신을 함유하는 펩티드)의 경우에, 직교 보호기, 예컨대 Alloc이 커플링 반응 전에 필요하고, 추가의 탈보호 단계에 이어 1C를 수득한다.

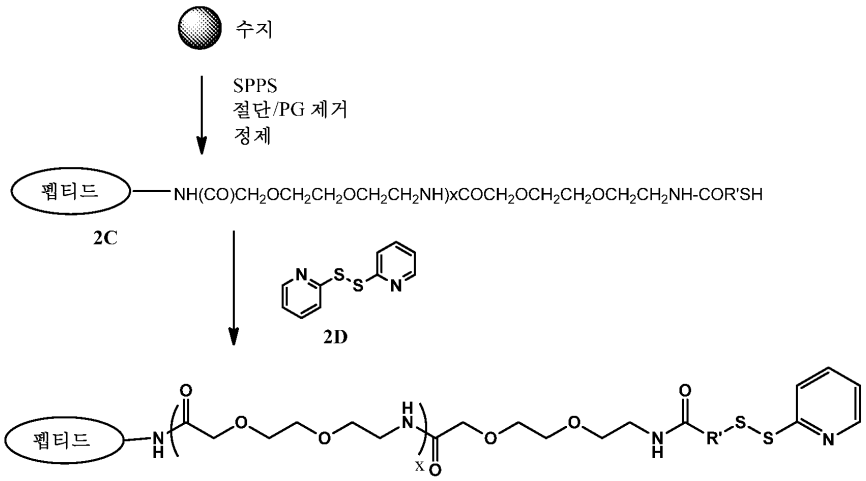
[0298] 반응식 2A 및 2B는 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드의 N-말단에 부착된 피리딘-2-일-디술파닐 함유 링커의 합성을 기재한다.

[0299] <반응식 2A>



[0300]

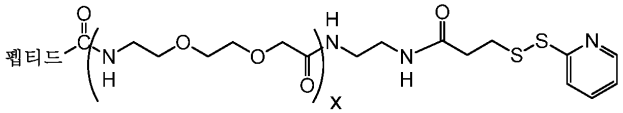
[0301] <반응식 2B>

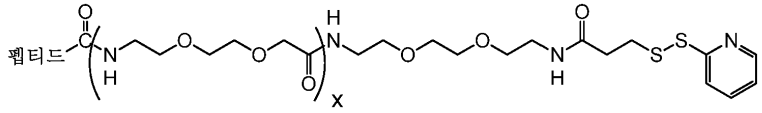


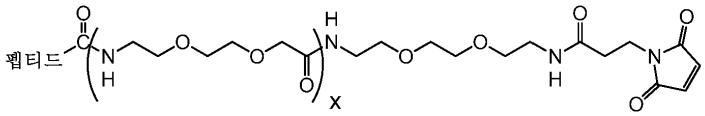
[0302]

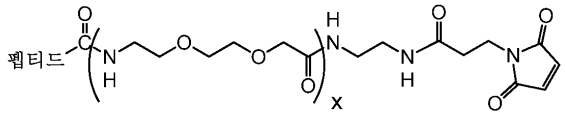
[0303] 펩티드-링커 구축물 1A는 반응식 1에 기재된 바와 같이 제조되고, 추가로 R'가 선형 또는 분지형 알킬렌인 화학식 2A의 활성화 산과 반응하여 펩티드-피리딘-2-일-디술파닐 함유 링커 구축물 2B를 생성한다. 활성화 산 2A는 상업적으로 입수가능하거나 또는 통상의 기술자에게 공지된 기술에 따라 그의 상응하는 카르복실산으로부터 용이하게 이용가능하다. 바람직하게는 R'는 $-CH_2-CH_2-$이다. 대안적으로, 펩티드-링커 구축물 2C는 $HO_2C-R'-SH$, 또는 그의 보호된 형태 (예를 들어, 트리틸 또는 Acm 기, 추가의 탈보호 단계를 필요로 함)를 사용하여 제조될 수 있고, 추가로 2D와 반응하여 펩티드-피리딘-2-일-디술파닐 함유 링커 구축물 2B를 생성할 수 있다.

[0304] 디아미노 유닛, 예컨대 예를 들어 $-NH-CH_2CH_2-NH-$ 또는 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-$를 사용하여 반응식 1, 2A 및 2B에 기재된 것과 유사한 방식으로 유사한 반응성 기를 펩티드의 C-말단에 부착시킨다. 이러한 펩티드-링커 구축물의 비제한적 예는 하기:







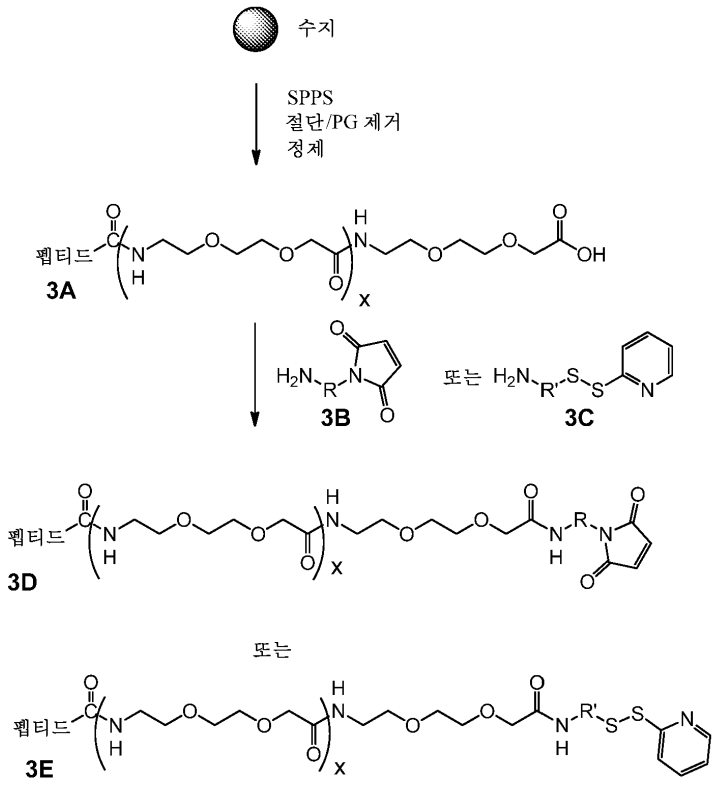


[0305]

[0306] 이다.

[0307] 대안적으로 말레이미드 또는 피리딘-2-일-디술파닐 반응성 기는 반응식 3A, 3B 및 3C에 따라 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드에 부착시킬 수 있다:

[0308] <반응식 3A>

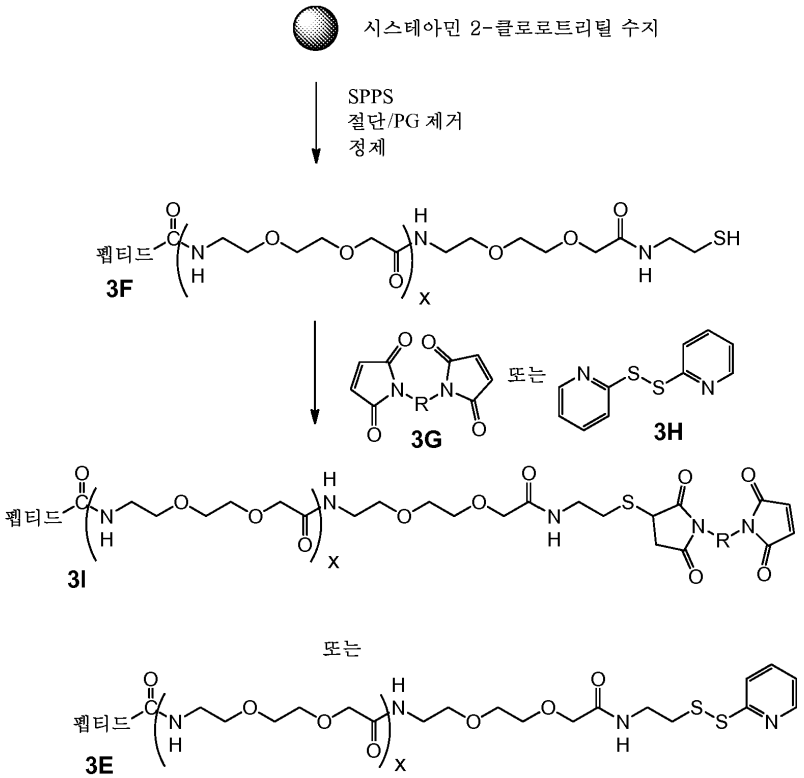


[0309]

[0310] 펩티드의 C-말단의 카르복실산 기는 표준 아미드 커플링 조건을 사용하여 1개 이상의 020c 아미노산 유닛과 커

플링되어 3A를 생성한다. 말단 카르복실산 관능기는 R 및 R'가 상기 정의된 바와 같은 3B 또는 3C의 아미노 기와 반응하여 활성화 펩티드-링커 구축물 3D 또는 3E를 생성한다. 추가로, 펩티드가 카르복시 관능기 측쇄 (예를 들어, Glu 또는 Asp)를 함유하는 경우에, 직교 보호기 (예를 들어, O-알릴) 및 추가의 탈보호 단계가 필요하다.

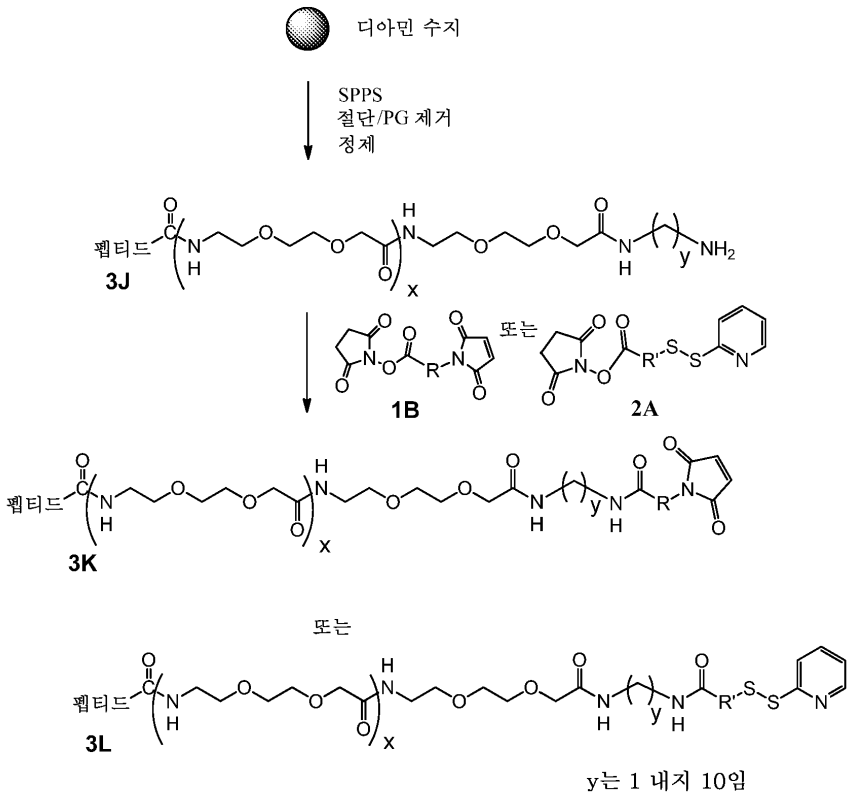
[0311] <반응식 3B>



[0312]

[0313] 펩티드-링커 구축물 3F는 시스테아민 2-클로로트리틸 수지를 사용하여 수득된 다음, 3G 또는 3H와 반응하여 각각 펩티드-링커 구축물 3I 또는 3E를 생성할 수 있다.

[0314] <반응식 3C>



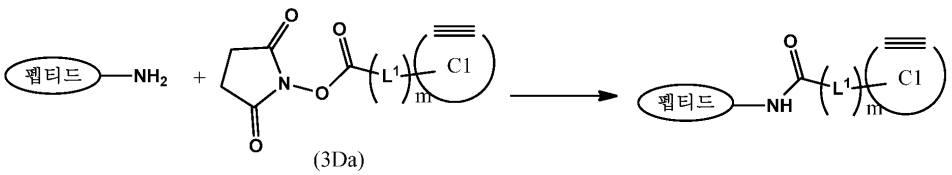
[0315]

[0316] 펩티드-링커 구축물 3J는 디아민 수지로부터 수득되고, 추가로 1B 또는 2A와 반응하여 각각 화학식 3K 또는 3L의 펩티드-링커 구축물을 생성할 수 있다.

[0317] 반응식 1 내지 3C는 보다 특히 알부민과의 생체접합체의 제조에 사용하기 위한 펩티드-링커 구축물을 기재한다. 말레이미드 반응성 기 및 피리딘-2-일-디술파닐 반응성 기는 알부민의 시스테인 34의 -SH 관능기와 반응한다.

[0318] 반응식 3D 및 3E는 보다 통상적으로 클릭 화학으로 공지되어 있는 아지드-알킨 휘스겐 고리화첨가에 사용하기 위한 펩티드-링커 구축물의 제조를 기재한다.

[0319] <반응식 3D>

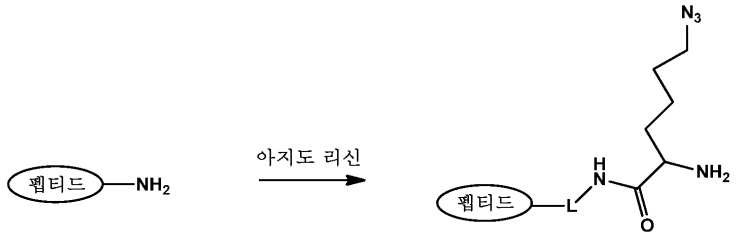


(3Da)

[0320]

[0321] 여기서 m은 0 또는 1이고, C1은 플루오린으로 임의로 치환된 모노, 디 또는 트리시클릭 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 고리계이고, L^1은 C1-C20 알킬렌 링커이며, 여기서 알킬렌 쇄는 옥소 (=O)로 임의로 치환되고, 여기서 1개 이상의 탄소는 O 또는 NH로 대체된다. 시클로알킨 모이어티 (3Da)는 상업적 공급원으로부터 용이하게 입수 가능하다. 추가로, 단백질 표지를 위한 클릭 화학에서 시클릭 알킨은 US 2009/0068738에 기재되어 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다. 구체적 예는 하기 (실시예 20)에 기재되어 있다. 클릭 핸들은 펩티드의 N-말단에 또는 측쇄의 리신 잔기 상에 도입될 수 있다.

[0322] <반응식 3E>



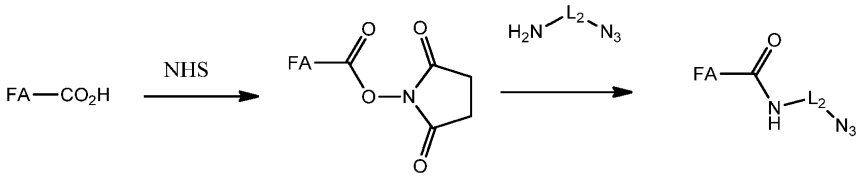
[0323]

[0324] 반응식 3E는 임의로 링커 L (예컨대 예를 들어 글리신 및 세린으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산)을 통한 아펠린 펩티드의 N-말단에의 아지도 리신 잔기의 도입을 기재한다. 아지드 관능기는 클릭 화학을 위한 핸들로서 작용한다. 구체적 예는 함께-출원된 출원 (대리인 문서 번호 PAT055418-US-PSP2)에 기재되어 있다.

[0325] 반감기 연장 모이어티-링커 구축물의 제조:

[0326] 반응식 3F 및 3G는 지방산-링커 구축물의 제조를 기재한다.

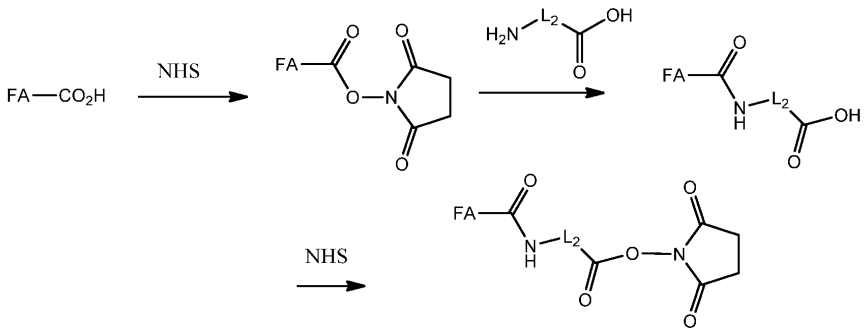
[0327] <반응식 3F>



[0328]

[0329] 여기서 FA는 지방산이고, L2는 연결 모이어티 (예를 들어, PEG)이고, NHS는 N-히드록시숙신이미드이다. 이러한 지방산-링커 구축물은 클릭 화학을 사용하는 접합에 사용된다. 지방산이 히드록실 또는 추가의 카르복실산과 같은 관능기를 함유하는 경우에, 이러한 관능기의 보호가 필요할 수 있다.

[0330] <반응식 3G>

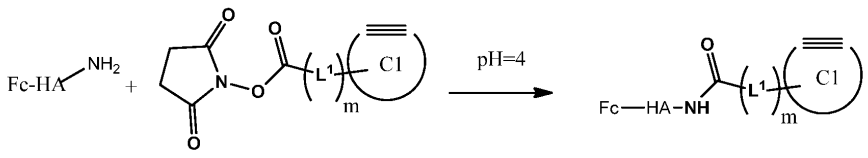


[0331]

[0332] 여기서 FA, NHS 및 L2는 상기 반응식 3F에서 정의된다. 이러한 지방산 구축물은 펩티드, 바람직하게는 N-말단 상의 아미노 관능기와의 접합을 위해 사용된다.

[0333] 반응식 3H는 Fc-링커 구축물의 제조를 기재한다.

[0334] <반응식 3H>



[0335]

[0336] AH-Fc는 Fc의 N-말단에서 서열 AH-를 함유하는 구축물이다. 구축물은 재조합 방법을 사용하여 제조된다. AH-서열은 낮은 pH에서 N-말단의 선택적 변형을 허용한다. 이러한 선택적 변형은 함께 출원된 출원 (미국 가출원 번호 62/015868: 대리인 문서 번호 PAT056275-US-PSP 및 미국 가출원 번호 62/015862: PAT056274-US-PSP)에 개시되어 있다. 클릭 핸들은 따라서 Fc 구축물의 N-말단에 도입된다.

[0337] 또 다른 실시양태에서, Fc 구축물은 소형 소르타제 인식 모티프 (LPXTG/A)를 도입하기 위해 C-말단에서 변형된다. 이러한 Fc-인식 모티프는 재조합 방법을 사용하여 제조된다. 이러한 구축물의 예는 Fc-[GGGG]n-LPETGGLEVLFQGP이며, 여기서 GGLEVLFQGP는 소르타제 처리 동안 클리핑된다.

[0338] Fc APJ 펩티드 융합 단백질의 제조

[0339] 생물학적으로 생성된 다량체화 분자, 예컨대 힌지로서 공지된 시스테인 함유 영역의 적어도 일부를 포함하는 항체 Fc는 재조합 발현된 단백질 생성물로부터 제조될 수 있고, 이는 다량체화 (예를 들어, 이량체) 형태로 분비된다. 본 발명은 또한 자연 발생 항체에서 발견되는 Fc- 또는 불변 영역의 아미노산 서열과 비교하여 Fc 영역의 아미노산 서열이 변경된 변형된 Fc 융합 단백질을 포함한다. 예를 들어, 목적하는 특성의 FcRn 결합 친화도/또는 혈청 반감기를 수득하기 위해 Fc-융합 단백질은 돌연변이에 의해 조작 (즉 변형)될 수 있다. 변형된 Fc-융합 단백질의 예는 미국 특허 번호 7,217,798에 개시되어 있으며, 이는 참조로 포함된다.

[0340] 본 발명의 Fc-융합 단백질은 또한 합성적으로, 예를 들어 링커 모이어티 및 펩티드 또는 폴리펩티드 모이어티의 부착에 의해 변경될 수 있다. 또한, 재조합 항체로부터 유래된 Fc 도메인에 의해 "변형된" Fc-융합 단백질은 원핵 및 진핵 발현 시스템 둘 다를 비롯한 임의의 발현 시스템에서 또는 파지 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0341] Fc-링커 구축물, 예컨대 Fc-[GGGGS], Fc-[GGGGS]2, Fc-[GGGGS]3, Fc-GG 및 Fc-GS는 하기 실험 부분에 기재되어 있다. [GGGGS], [GGGGS]2, [GGGGS]3, GS 및 GG 링커는 Fc 도메인의 C-말단 또는 Fc 도메인의 N-말단에 부착되며, 여기서 Fc는 천연 Fc 또는 그의 변이체이다. Fc 변이체의 예는 C-말단 리신이 결실되거나 알라닌으로 대체된 Fc를 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 함께-출원된 출원 (대리인 문서 번호 PAT055781-US-PSP02)에 기재되어 있다.

[0342] 생체접합체

[0343] 본 발명의 한 실시양태에서, 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드는 알부민의 시스테인 34의 티올 관능기에 접합된다 (화학적으로/공유적으로 부착됨). 이러한 실시양태의 한 측면에서, 알부민-펩티드는 알부민이 펩티드의 N-말단에 접합된 (화학적으로 연결된) 생체접합체를 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 알부민-펩티드는 알부민이 펩티드의 C-말단에 접합된 (화학적으로 연결된) 생체접합체를 지칭한다.

[0344] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드는 인간 IgG의 Fc 영역 중 1개 이상의 도메인에 융합된다. 항체는 2개의 기능상 독립적인 부분, 항원에 결합하는 "Fab"로서 공지된 가변 도메인, 및 보체 활성화 및 식세포에 의한 공격과 같은 이펙터 기능에 관여하는 "Fc"로서 공지된 불변 도메인을 포함한다. Fc는 긴 혈청 반감기를 갖는 반면에, Fab는 반감기가 짧다 (Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31). 치료 펩티드 또는 폴리펩티드와 함께 연결된 경우에, Fc 도메인은 더 긴 반감기를 제공할 수 있다 (C. Huang, Curr. Opin. Biotechnol., 2009, 20, 692-699).

[0345] 한 실시양태에서, Fc-펩티드는 Fc 서열이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드의 N-말단에 융합된 생체접합체를 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 펩티드-Fc는 Fc 서열이 펩티드의 C-말단에 융합된 생체접합체를 지칭한다.

[0346] Fc 영역은 자연 발생 Fc 영역일 수 있거나, 또는 특정 품질, 예컨대 치료 품질, 순환 시간, 또는 감소된 응집을 개선하기 위해 변경될 수 있다.

[0347] 항체의 "Fc" 도메인과의 융합에 의한 단백질 치료제의 유용한 변형은 PCT 공개 번호 WO 00/024782에 상세하게 논의되어 있다. 이 문헌에는 "비히클", 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 덱스트란 또는 Fc 영역에 대한 연결이 논의되어 있다.

[0348] 본 발명의 바람직한 실시양태는 상기 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드 및 반감기 연장 모이어티를 포함하며, 여기서 반감기 연장 모이어티는 링커를 통해 화학식 I, III, IV 또는 V의 폴리펩티드에 융합된 Fc 도메인인 생체접합체이다. 본 발명의 한 측면에서, 링커는 하기 화학식: -[GGGGS]n-을 갖고, n은 1, 2 또는 3이거나, 또는 링커는 GG 또는 GS이고, 화학식 I, II, III 또는 IV의 폴리펩티드는 자연 발생 아

미노산을 함유한다. Fc 도메인과의 융합에 적합한 화학식 I, II, III 또는 IV의 폴리펩티드의 예는: QRPC*LSC*KGPMPF, C*RPRLSC*KGPMPF 및 QRC*RLSC*KGPMPF이다. 이러한 실시양태의 한 바람직한 측면은 본원에 정의된 바와 같은 변형된 Fc 단편 (예를 들어, FcLALA) 및 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하는, 상기 정의된 바와 같은 Fc-펩티드 융합된 생체접합체이다.

[0349] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 반감기 연장 모이어티가 C-말단 리신이 결실되거나 알라닌으로 대체된 변형된 Fc 도메인인, 상기 실시양태 중 어느 한 실시양태에 따른 생체접합체에 관한 것이다.

[0350] Fc 영역에 융합된 펩티드는 비융합된 대응물보다 생체내에서 실질적으로 더 긴 반감기를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 또한, Fc 영역에의 융합은 폴리펩티드의 이량체화/다량체화를 허용한다.

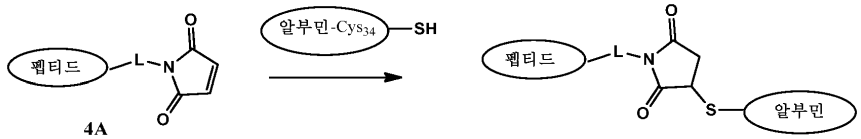
[0351] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I-IV 중 어느 하나에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드 및 반감기 연장 모이어티를 포함하며, 여기서 반감기 연장 모이어티는 폴리펩티드에 화학적으로 연결된 Fc 도메인인 생체접합체이다.

[0352] 접합체의 제조:

[0353] 반응식 4 및 5는 APJ 효능제 펩티드 또는 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드 및 반감기 연장 모이어티, 예컨대 Fc 도메인 또는 알부민의 접합을 위한 화학 반응을 예시한다.

[0354] 반응식 4는 화학식 4A의 펩티드-링커와 알부민의 시스테인 34의 접합을 예시한다.

[0355] <반응식 4>

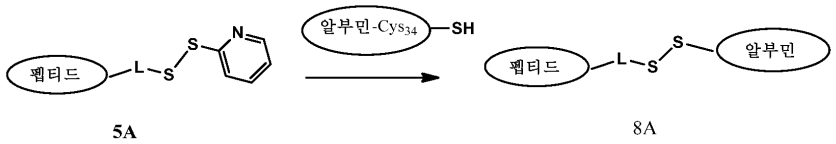


[0356]

[0357] 여기서 L은 펩티드와 말레이미드 관능기 사이의 연결 모이어티를 나타낸다. 특정한 실시양태에서, L은 반응식 1, 3A, 3B 또는 3C에 개시된 바와 같은 연결 모이어티이다.

[0358] 반응식 5는 화학식 8A의 펩티드-링커 구축물과 알부민의 시스테인 34의 접합을 예시한다.

[0359] <반응식 5>

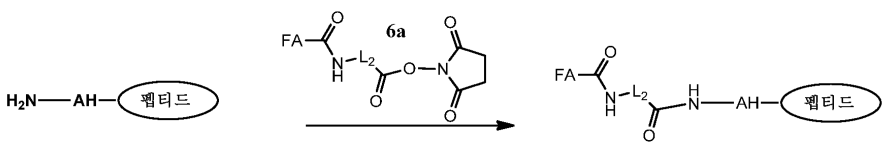


[0360]

[0361] 여기서 L은 펩티드와 -S-S-피리딘 관능기 사이의 연결 모이어티를 나타낸다. 특정한 실시양태에서, L은 반응식 2, 3A, 3B 또는 3C에 개시된 바와 같은 연결 모이어티이다.

[0362] 다른 접합 방법은 동시계류 및 함께-출원된 출원 (미국 가출원 번호 62/015862: 대리인 문서 번호 PAT056274-US-PSP, 미국 가출원 번호 62/015868:PAT056275-US-PSP 및 미국 가출원 번호 62/015848 PAT055781-US-PSP02)에 기재되어 있다. 이러한 방법은 펩티드의 선택적 N-아실화를 포함하고, 이는 반응식 6에 요약되어 있다.

[0363] <반응식 6>



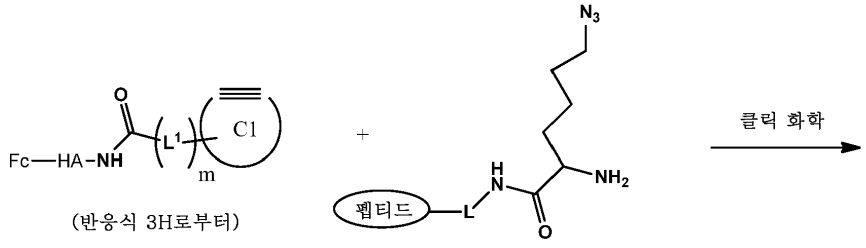
[0364]

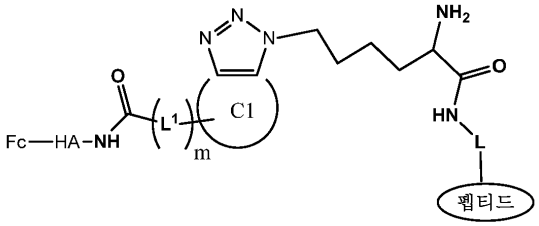
[0365] 여기서 AH-는 N-말단에서의 반응을 용이하게 하기 위해 펩티드의 N-말단에 도입된 링커이고, H는 히스티딘이고, A는 알라닌이고, FA는 상기 기재된 바와 같은 지방산, 예를 들어 화학식 A1 내지 A3의 지방산이고, L은 연결 모이어티 (예를 들어, PEG 연결 모이어티)이다. 지방산 링커 구축물 6a (반응식 3G에 제시된 바와 같이 제조됨)

는 낮은 pH 조건을 사용하는 경우에 펩티드 상의 N-말단에 선택적으로 도입된다. 이러한 방법은 함께 출원된 특허 출원 (미국 가출원 번호 62/015868: 대리인 문서 번호 PAT056275-US-PSP 및 미국 가출원 번호 62/015848 PAT055781-US-PSP02)에 기재되어 있다.

[0366] 반응식 7 및 8은 클릭 화학을 사용한 본 발명에 따른 접합체의 형성을 기재한다.

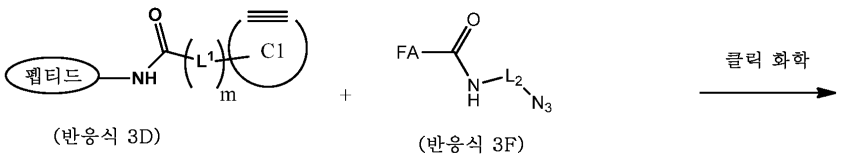
[0367] <반응식 7>

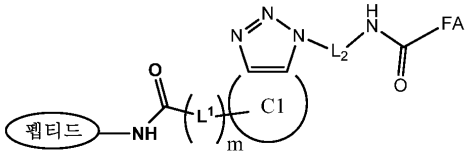




[0368]

[0369] <반응식 8>

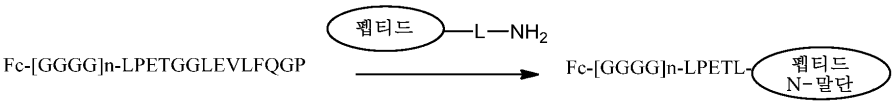




[0370]

[0371] 반응식 1-5에 기재된 바와 같은 접합체 및 펩티드-링커 구축물을 제조하는 방법은 또한 함께-출원된 미국 출원 (미국 가출원 번호 61/858 251: 대리인 문서 번호: PAT055326-US-PSP3 및 미국 가출원 번호 61/858303: PAT055781-US-PSP)에 기재 및 예시되어 있고, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0372] 반응식 9는 소르타제 효소를 사용한 APJ 펩티드의 Fc 구축물과의 접합을 기재한다.



[0373]

[0374] 여기서 n은 1, 2 또는 3이고, L은 임의의 링커 (예를 들어, 폴리글리신 링커)이다.

[0375] 제약 조성물

[0376] 본 발명의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체는 피하로, 근육내로, 정맥

내로, 복강내로, 비강내로, 흡입으로, 경구로 등을 비롯한 임의의 다양한 방식으로 투여될 수 있다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태는 본 발명의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르, 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 연속 정맥내 투여를 사용한다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 생체접합체는 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 이식형 펌프가 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 간헐적 또는 연속적 폴리펩티드 또는 생체접합체 투여는 1 내지 수일 (예를 들어, 2-3일 또는 그 초과) 동안, 또는 그보다 장기간, 예를 들어 수주, 수개월, 또는 수년 동안 계속된다. 일부 실시양태에서, 간헐적 또는 연속적 폴리펩티드 투여는 적어도 약 3일 동안 제공된다. 다른 실시양태에서, 간헐적 또는 연속적 폴리펩티드 또는 생체접합체 투여는 적어도 약 1주 동안 제공된다. 다른 실시양태에서, 간헐적 또는 연속적 폴리펩티드 또는 생체접합체 투여는 적어도 약 2주 동안 제공된다. 투여 동안 또는 다중 용량의 투여 사이에 평균 혈장 폴리펩티드 농도를 특정한 역치 값 초과로 유지하는 것이 바람직할 수 있다. 바람직한 농도는, 예를 들어 대상체의 생리학적 상태, 질환 중증도 등을 기준으로 하여 결정할 수 있다. 이러한 바람직한 값(들)은 표준 임상 시험을 수행함으로써 확인할 수 있다. 대안적으로, 펩티드 및 그의 접합체는 FcRn 메카니즘을 통해 경구로 전달될 수 있다. (Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262-G270, 2013).

[0377] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 제약 조성물은 특정한 투여 경로, 예컨대 경구 투여, 비경구 투여, 및 직장 투여 등을 위해 제제화될 수 있다. 또한, 본 발명의 제약 조성물은 고체 형태 (제한 없이 캡슐, 정제, 환제, 과립, 분말 또는 좌제 포함), 또는 액체 형태 (제한 없이 용액, 현탁액 또는 에멀젼 포함)로 제조될 수 있다. 제약 조성물은 멸균과 같은 통상의 제약 작업에 적용될 수 있고/거나 통상의 불활성 희석제, 윤활제 또는 완충제, 뿐만 아니라 아주반트, 예컨대 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제 및 완충제 등을 함유할 수 있다.

[0378] 주사가능한 용도에 적합한 제약 조성물은 전형적으로 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다.

[0379] 정맥내 투여의 경우에, 적합한 담체는 생리 염수, 정박테리아수, 크레모포르 ELTM (바스프(BASF), 뉴저지주 파시파니) 또는 포스페이트 완충 염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균이어야 하고, 용이한 시린지성이 존재하는 정도의 유체이어야 한다. 바람직한 제약 제제는 제조 및 저장 조건 하에 안정하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 일반적으로, 적절한 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅제, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물 중에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 지속 흡수는 조성물 중에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0380] 특정의 주사가능한 조성물은 수성 등장성 용액 또는 현탁액이고, 좌제는 지방 에멀젼 또는 현탁액으로부터 유리하게 제조된다. 상기 조성물은 멸균될 수 있고/거나, 아주반트, 예컨대 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용해 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 함유할 수 있다. 또한, 이들은 또한 다른 치료상 유익한 물질을 함유할 수 있다. 상기 조성물은 통상의 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 각각 제조되고, 활성 성분을 약 0.1-75% 함유하거나 또는 약 1-50% 함유한다.

[0381] 멸균 주사가능한 용액은 필요량의 활성 화합물을 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합과 함께 적절한 용매 중에 혼입시킨 후에, 필요에 따라 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 중에 혼입시킴으로써 제조한다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 활성 화합물 플러스 이전에 멸균-여과된 그의 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결-건조이다.

[0382] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료적 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 혼입될 수 있고, 정제, 트로키 또는 캡슐, 예를 들어 젤라틴 캡슐의 형태로 사용될 수 있다.

또한, 경구 조성물은 구강세정제로서의 사용을 위해 유동 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 제약상 상용성인 결합제 및/또는 아주반트 물질을 조성물의 일부로서 포함시킬 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키 등은 임의의 하기 성분, 또는 유사한 속성의 화합물: 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 트라가칸트 검 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 붕해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 스테아르산마그네슘 또는 스테로테스(Sterotes); 활택제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향미제를 함유할 수 있다. 경구 전달을 위한 제제는 유리하게는 위장관 내 안정성을 개선시키고/거나 흡수를 증진시키기 위한 작용제와 혼입시킬 수 있다.

[0383] 흡입에 의한 투여를 위해, 본 발명의 치료제는 바람직하게는 적합한 추진제, 예를 들어 기체, 예컨대 이산화탄소를 함유하는 가압 용기 또는 분배기, 또는 네뷸라이저로부터의 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다. 폐는 치료제의 전신 전달을 위한 넓은 표면적을 제공함에 주목한다.

[0384] 작용제는, 예를 들어 미국 공개 20040096403에 개시된 것과 같은 중합체성 마이크로입자 내에 캡슐화될 수 있거나, 또는 관련 기술분야에 공지되어 있는 임의의 폭넓게 다양한 다른 약물 전달 비히클과 회합될 수 있다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 작용제는 예를 들어 미국 공개 20040062718에 기재된 바와 같은 하전된 지질과 회합되어 전달된다. 후자의 시스템은 치료 폴리펩티드, 인슐린의 투여를 위해 사용되고 있고, 이는 펩티드 작용제의 투여를 위한 상기 시스템의 유용성을 입증함에 주목한다.

[0385] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있다.

[0386] 경피 적용에 적합한 조성물은 본 발명의 폴리펩티드의 유효량을 적합한 담체와 함께 포함한다. 경피 전달에 적합한 담체는 흡수가능한 약리학상 허용되는 용매를 포함하여 숙주의 피부를 통한 통과를 보조한다. 예를 들어, 경피 장치는 백킹 부재, 화합물을 임의로 담체와 함께 함유하는 저장소, 임의로 장기간에 걸쳐 제어되고 미리 결정된 속도로 숙주의 피부에 화합물을 전달하기 위한 속도 제어 장벽, 및 장치가 피부에 부착되도록 하는 수단을 포함하는 붕대 형태이다.

[0387] 예를 들어, 피부 및 눈에 대한 국소 적용에 적합한 조성물은 수용액, 현탁액, 연고, 크림, 겔, 또는 예를 들어 에어로졸 등에 의한 전달을 위한 분무가능한 제제를 포함한다. 이러한 국소 전달 시스템은 특히 피부 적용에 적합할 것이다. 이들은 따라서 관련 기술분야에 널리 공지된 화장품을 비롯한 국소 제제에 사용하기에 특히 적합하다. 이들은 가용화제, 안정화제, 장성 증진제, 완충제 및 보존제를 함유할 수 있다.

[0388] 본원에 사용된 국소 적용은 또한 흡입 또는 비강내 적용에 관한 것일 수 있다. 이들은 편리하게는 적합한 추진제를 사용하거나 또는 사용하지 않고, 건조 분말 흡입기로부터의 건조 분말의 형태로 (단독으로, 혼합물, 예를 들어 락토스와의 건조 블렌드, 또는 예를 들어 인지질과의 혼합 성분 입자로서), 또는 가압 용기, 펌프, 스프레이, 아토마이저 또는 네뷸라이저로부터의 에어로졸 스프레이 제공물 형태로 전달될 수 있다.

[0389] 본 발명은 활성 성분으로서의 본 발명의 화합물이 분해되는 속도를 감소시키는 1종 이상의 작용제를 포함하는 제약 조성물 및 투여 형태를 추가로 제공한다. 본원에 "안정화제"로서 지칭되는 이러한 작용제는 항산화제, 예컨대 아스코르브산, pH 완충제 또는 염 완충제 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0390] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 염"은 본 발명의 폴리펩티드의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하는 염을 지칭하며, 이는 전형적으로 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아니다. 많은 경우에, 본 발명의 폴리펩티드는 아미노 및/또는 카르복실 기 또는 그와 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다.

[0391] 제약상 허용되는 산 부가염은 무기 산 및 유기 산으로 형성될 수 있고, 예를 들어 아세테이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 브로마이드/히드로브로마이드, 비카르보네이트/카르보네이트, 비술페이트/술페이트, 캄포르술포네이트, 클로라이드/히드로클로라이드, 클로르테오필로네이트, 시트레이트, 에탄디술포네이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 히푸레이트, 히드로아이오다이드/아이오다이드, 이세티오네이트, 락테이트, 락토비오네이트, 라우릴술페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 만델레이트, 메실레이트, 메틸술페이트, 나프토에이트, 나프실레이트, 니코티네이트, 니트레이트, 옥타데카노에이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/히드로겐 포스페이트/디히드로겐 포스페이트, 폴리갈락투로네이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 술포살리실레이트, 타르트레이트, 토실레이트 및 트리플루오로아세테이트 염이다.

[0392] 염이 유도될 수 있는 무기 산은, 예를 들어 염산, 브로민화수소산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다. 염이 유

도될 수 있는 유기 산은, 예를 들어 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 옥살산, 말레산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 톨루엔술폰산, 술포살리실산 등을 포함한다. 제약상 허용되는 염기 부가염은 무기 및 유기 염기로 형성될 수 있다.

[0393] 염이 유도될 수 있는 무기 염기는, 예를 들어 암모늄 염 및 주기율표의 I 내지 XII족으로부터의 금속을 포함한다. 특정 실시양태에서, 염은 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 은, 아연 및 구리로부터 유도되고; 특히 적합한 염은 암모늄, 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘 염을 포함한다.

[0394] 염이 유도될 수 있는 유기 염기는, 예를 들어 1급, 2급, 및 3급 아민, 자연 발생 치환된 아민을 비롯한 치환된 아민, 시클릭 아민, 염기성 이온 교환 수지 등을 포함한다. 특정 유기 아민은 이소프로필아민, 벤자틴, 콜리네이트, 디에탄올아민, 디에틸아민, 리신, 메글루민, 피페라진 및 트로메타민을 포함한다.

[0395] 본 발명의 제약상 허용되는 염은 통상의 화학적 방법에 의해 모 화합물, 염기성 또는 산성 모이어티로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 유리 산 형태의 이들 화합물을 화학량론적 양의 적절한 염기 (예컨대 Na, Ca, Mg 또는 K 히드록시드, 카르보네이트, 비카르보네이트 등)와 반응시키거나, 유리 염기 형태의 이들 화합물을 화학량론적 양의 적절한 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 이러한 반응은 전형적으로 물 중에서 또는 유기 용매 중에서, 또는 상기 둘의 혼합물 중에서 수행된다. 일반적으로, 실행가능한 경우에 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올, 또는 아세토니트릴과 같은 비-수성 매질의 사용이 바람직하다. 추가의 적합한 염의 목록은, 예를 들어 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); 및 "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)]에서 찾아볼 수 있다.

[0396] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 담체"는 통상의 기술자에게 공지된 바와 같은 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 계면활성제, 항산화제, 보존제 (예를 들어, 항박테리아제, 항진균제), 등장화제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물, 약물 안정화제, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 향미제, 염료 등 및 그의 조합을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329] 참조). 임의의 통상의 담체가 활성 성분과 비상용성인 경우를 제외하고는, 치료 또는 제약 조성물에서의 그의 사용이 고려된다.

[0397] 본 발명의 방법:

[0398] 아펠린 펩티드 패밀리는 G 단백질 커플링된 APJ 수용체에 대한 유일하게 공지된 천연 리간드 패밀리이다. 아펠린 유전자는 77개 아미노산 폴리펩티드를 코딩하고, 이는 아펠린 펩티드의 생물학적 활성 형태, 예컨대 아펠린-36, 아펠린-17, 아펠린-16, 아펠린-13, 아펠린-12, 및 아펠린-13의 피로글루타메이트 변형된 형태 (Pyr^{1}-아펠린-13)로 프로세싱된다. 이들 아펠린 펩티드 중 어느 하나는 APJ 수용체에 결합 시, Gi 및 Gq 단백질을 통해 신호를 전달한다. 심근세포에서, Gi 또는 Gq 커플링은 세포내 pH, PLC 활성화 및 IP3 생성에서의 변화로 이어지고, 이는 근필라멘트 칼슘 감수성을 증진시켜 궁극적으로 증가된 심장 수축성을 생성한다. Gi 커플링은 활성화된 Gs, 아데닐릴 시클라제 및 cAMP 생성을 억제하고 pAkt 수준을 증가시키며, 이는 심장보호로 이어진다. 혈관내피 세포에서, Gi, pAKT를 통한 APJ 활성화는 증가된 산화질소 (NO) 생성으로 이어지고, 이는 평활근 완화를 증가시켜 전반적 혈관확장을 생성한다.

[0399] 만성 안정형 심부전을 갖는 환자는 이따금의 대상부전 급성 에피소드를 가지며, 이때 심장 수축성이 더 저하되고 증상이 악화된다. 이러한 악화는 급성 대상부전성 심부전 (ADHF)으로서 지칭된다. ADHF에 대한 현행 요법은 이뇨제, 혈관확장제 및 수축촉진제를 포함하며, 이는 직접적으로 심장 수축성을 증가시킨다. 현행 정맥내 수축촉진제 (도부타민, 도파민, 밀리논, 레보시멘단)는 그의 유해 사례, 예컨대 부정맥 및 증가된 장기 사망률에 대해 널리 공지되어 있다. 본 발명의 합성 아펠린 폴리펩티드 유사체 또는 그의 생체접합체는 부정맥유발 또는 사망률 부담 없이 심장 수축성을 증가시키고 만성 심부전에서 막대한 미충족 의료 필요를 다루는 ADHF에 대한 요법을 제공한다.

[0400] 실제로, 인간에서의 급성 아펠린 치료 (5분)는 관상동맥 혈관확장 및 개선된 심장 박출량을 생성한다. 그러나, 천연 아펠린은 생체내에서 매우 짧은 $t_{½}$ (수초) 및 작용 지속기간 (수분)을 나타낸다. 본 발명의 강력한 합성 아펠린 펩티드 효능제 또는 그의 생체접합체는 천연 아펠린과 비교하여 더 긴 반감기를 갖는다.

[0401] 심근세포에서의 APJ 수용체의 활성화는 a) Gi / Gq, PLC 및 Ca2+를 통해 심장 수축성을 개선시키고, b) (다른 수축촉진제에 의해 관찰되는 바와 같은) cAMP의 증가 없이, Gi, pAkt 활성화를 통해 심장보호를 제공한다. 또

한, 내피 세포에서의 APJ 효능작용은 동맥 혈관확장으로 이어지고, 이는 좌심실의 작업에 부하를 주지 않음으로써 심부전에 더 이익이 된다. 종합하면, 합성 아펠린 폴리펩티드 유사체는 전반적 심장 기능을 개선시키고, 부정맥발생을 감소시키고, 생존 이익을 제공할 수 있다.

[0402] 보다 최근에, 당뇨병 및 인슐린 저항성에서의 아펠린의 잠재적 관여에 초점을 맞춘 다수의 전임상 연구 간행물이 존재하였다. 아펠린은 1) 근육, 지방 및 심장에서 글루코스 흡수를 개선시킴으로써 혈액 글루코스 수준을 낮추고, 2) ER 스트레스 및 후속 아폽토시스로부터 췌장 베타 세포를 보호하고, 3) 베타 세포에서 인슐린 분비를 낮추고, 4) 지방 조직에서 카테콜아민 유도된 지방분해를 조절하는 것으로 밝혀졌다. pAKT 경로의 활성화가 이들 과정에 관련되었다.

[0403] 유리 형태 또는 제약상 허용되는 염 형태의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 그의 생체접합체는 유익한 약리학적 특성, 예를 들어 다음 섹션에 제공되는 바와 같은 시험관내 및 생체내 시험에서 나타난 바와 같은, 예를 들어 APJ 수용체 효능작용 특성을 나타내고, 따라서 치료를 위해 처방된다.

[0404] 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 그의 생체접합체는 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증으로부터 선택된 적응증의 치료에 유용할 수 있다.

[0405] 따라서, 추가 실시양태로서, 본 발명은 APJ 수용체 활성과 연관된 질환의 치료를 위한 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 용도를 제공한다. 추가 실시양태에서, 요법은 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 질환은 상기 언급된 목록, 적합하게는 급성 대상부전성 심부전으로부터 선택된다. 이러한 실시양태의 또 다른 하위세트에서, 본 발명은 APJ 수용체 활성과 연관된 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 용도를 제공한다.

[0406] 따라서, 추가 실시양태로서, 본 발명은 요법에서의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 용도를 제공한다. 추가 실시양태에서, 요법은 APJ 수용체의 활성화 (효능작용)에 의해 치료될 수 있는 질환으로부터 선택된다.

[0407] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 치료상 허용되는 양을 투여하는 것을 포함하는, APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 추가 실시양태에서, 질환은 상기 언급된 목록, 적합하게는 급성 대상부전성 심부전으로부터 선택된다.

[0408] 이러한 실시양태의 또 다른 하위세트에서, 본 발명은 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 치료상 허용되는 양을 투여하는 것을 포함하는, APJ 수용체의 활성과 연관된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0409] 치료적으로 사용되는 본 발명의 제약 조성물 또는 조합물의 유효량은, 예를 들어 치료 상황 및 목적에 따라 달라질 것이다. 따라서, 통상의 기술자는 치료에 적절한 투여량 수준이 부분적으로, 전달되는 분자, 융합 단백질 변이체가 사용되는 적응증, 투여 경로, 및 환자의 크기 (체중, 체표면 또는 기관 크기) 및 상태 (연령 및 전반적 건강)에 따라 달라질 것임을 인지할 것이다. 따라서, 임상의는 최적의 치료 효과를 수득하기 위해 투여량을 적정하고 투여 경로를 변형할 수 있다. 전형적인 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 0.1 μg/kg 내지 약 100 mg/kg 또는 그 초과의 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 투여량은 0.1 μg/kg 내지 약 100 mg/kg; 또는 1 μg/kg 내지 약 100 mg/kg의 범위일 수 있다.

[0410] 투여 빈도는 사용되는 제제에서의 이중 기능 단백질의 약동학적 파라미터에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 임상의는 목적하는 효과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 조성물을 투여할 것이다. 따라서, 조성물은 단일 용량으로서, 시간의 경과에 따라 2 이상의 용량 (동일한 양의 목적하는 분자를 함유할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있음)으로서, 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가 정밀화는 통상의 기술자에 의해 상용적으로 이루어지고, 그들이 상용적으로 수행하는 업무 영역 내에 있다. 적절한 투여량은 적절한 용량-반응 데이터의 사용을 통해 확인될 수 있다.

[0411] 용어 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체의 "치료 유효량"은 대상체의 생물학적 또는 의학적 반응, 예

를 들어 증상의 개선, 상태의 완화, 질환 진행의 둔화 또는 지연, 또는 질환의 예방 등을 도출할 본 발명의 폴리펩티드 (또는 생체접합체)의 양을 지칭한다. 한 비제한적 실시양태에서, 용어 "치료 유효량"은, 대상체에게 투여되는 경우에 (1) (i) APJ 수용체의 활성화에 의해 개선되거나 또는 (ii) APJ 수용체의 활성과 연관되거나 또는 (iii) APJ 수용체의 비정상적 활성을 특징으로 하는 상태, 장애 또는 질환 또는 그의 증상을 적어도 부분적으로 완화, 억제, 예방 및/또는 개선시키거나; 또는 (2) APJ 수용체를 활성화시키는데 유효한 본 발명의 폴리펩티드의 양을 지칭한다.

[0412] 또 다른 비제한적 실시양태에서, 용어 "치료 유효량"은 세포, 또는 조직, 또는 비-세포 생물학적 물질, 또는 배지에 투여되는 경우에 APJ 수용체를 적어도 부분적으로 활성화시키는데 유효한 본 발명의 폴리펩티드의 양을 지칭한다. 통상의 기술자에 의해 인지되는 바와 같이, 유효한 특정한 작용제의 절대량은 목적하는 생물학적 종점, 전달되는 작용제, 표적 조직 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 통상의 기술자는 "치료 유효량"이 단일 용량으로 투여될 수 있거나, 또는 다중 용량의 투여에 의해 달성될 수 있음을 이해한다. 예를 들어, 심부전을 치료하기 위한 작용제의 경우에, 유효량은 환자의 임상 개선, 예를 들어 증가된 운동 내성/능력, 증가된 혈압, 감소된 체액 저류, 및/또는 심장 기능, 예를 들어 박출 계수, 운동 능력 (탈진까지의 시간) 등의 정량적 시험에 대한 개선된 결과를 생성하기에 충분한 양일 수 있다.

[0413] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 동물을 지칭한다. 전형적으로 동물은 포유동물이다. 대상체는 또한, 예를 들어 영장류 (예를 들어, 인간), 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 래트, 마우스, 어류, 조류 등을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 영장류이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0414] 본원에 사용된 용어 "억제하다", "억제" 또는 "억제하는"은 주어진 상태, 증상, 또는 장애, 또는 질환의 감소 또는 억제, 또는 생물학적 활성 또는 과정의 기저 활성에서의 유의한 감소를 지칭한다.

[0415] 본원에 사용된 용어 임의의 질환 또는 장애를 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는, 한 실시양태에서 질환 또는 장애를 개선 (즉, 질환 또는 그의 임상 증상 중 적어도 하나의 발생을 둔화 또는 저지 또는 감소)시키는 것을 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 환자에 의해 식별가능하지 않을 수 있는 것을 비롯한 적어도 하나의 물리적 파라미터를 완화 또는 개선시키는 것을 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애를, 물리적으로 (예를 들어, 식별가능한 증상의 안정화), 생리학적으로 (예를 들어, 물리적 파라미터의 안정화), 또는 둘 다로 조절하는 것을 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애의 발병 또는 발생 또는 진행을 예방 또는 지연시키는 것을 지칭한다.

[0416] 본원에 사용된 용어 "예방하다", "예방하는" 및 "예방"은 요법 (예를 들어, 치료제)의 투여, 또는 요법의 조합 (예를 들어, 치료제의 조합)의 투여로부터 생성된 대상체에서의 장애의 하나 이상의 증상의 재발, 발병 또는 발생의 예방을 지칭한다.

[0417] 본원에 사용된 바와 같이, 대상체가 치료로부터 생물학적으로, 의학적으로 또는 삶의 질에 있어서 유익할 경우에, 이러한 대상체는 이러한 치료를 "필요로 한다".

[0418] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 문맥에서 (특히, 청구범위의 문맥에서) 사용된 단수 용어 및 유사한 용어는 본원에 달리 나타내거나 또는 문맥상 명확하게 모순되지 않는 한, 단수형 및 복수형 둘 다를 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0419] 본원에 기재된 모든 방법은 본원에 달리 나타내거나 또는 달리 문맥상 명확하게 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 모든 예, 또는 예시적인 어휘 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 예시하기 위해 의도된 것이고, 달리 청구된 본 발명의 범위에 대한 제한을 제시하는 것은 아니다.

[0420] 본 발명에 따른 폴리펩티드의 활성은 이하에 기재된 하기 시험관내 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0421] hAPJ 칼슘 유동 검정:

[0422] Chem-5 APJ 안정한 세포 (밀리포어(Millipore) # HTS068C)를 384-웰 포맷에 25 ul 성장 배지 중 10,000개 세포/웰로 플레이팅한 다음, 37℃ 조직 배양 인큐베이터에서 24시간 성장시켰다. 검정 1시간 전에, 2.5 mM 프로베네시드를 함유하는 25 ul/웰 FLIPR 칼슘 4 염료 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices) R8142)를 첨가하고, 세포를 37℃ 조직 배양 인큐베이터에서 1시간 인큐베이션하였다. 펩티드를 HBSS, HEPES & 0.1% BSA 완충제 중에 가용화시키고, 3중으로 50 uM에서 5 pM까지 10-배 연속 희석하였다. FLIPR 테트라를 사용하여 펩티드를 염

료와 함께 세포에 첨가하였다 (1:5, 10 uM 내지 1 pM 범위의 최종 펩티드 농도를 위함). 칼슘에의 결합 후 세포 내부의 FLIPR 염료는 형광을 방출한 반면에, 세포 외부로부터의 형광은 차폐되었다. FLIPR 테트라 상에서 470-495 여기 및 515-575 방출 파장을 사용하여 형광을 측정하였다. 판독을 펩티드 첨가 10초 전에 시작하여 총 3분 동안 수행하였다. 각각의 펩티드 농도에 대해 최대-최소 값을 계산하여 플롯팅하고, 그래프패드 (GraphPad) 프리즘 소프트웨어를 사용하여 펩티드에 의한 칼슘 유동 자극에 대한 곡선 변곡점에서 EC_{50} 값을 계산하였다.

[0423] 혈장 안정성 검정:

[0424] 물질:

[0425] 작업 용액: 1 mg/mL 시험 물품을 밀리-Q 워터(Milli-Q water) 중에 제조한다.

[0426] 추출 용액: 메탄올:아세토니트릴:0.1% 포름산 및 400 ng/mL 글리부리드 함유 물 (1:1:1).

[0427] 혈장: 바이오리클레메이션 엘엘씨(Bioreclamation LLC) (뉴욕주 리버풀)로부터 구입한 수컷 스프라그-돌리 래트 혈장 (나트륨 헤파린 함유).

[0428] 전혈: 바이오리클레메이션 엘엘씨 (뉴욕주 리버풀)로부터 구입한 수컷 스프라그 돌리 전혈 (나트륨 헤파린 함유).

[0429] 폐 균질물: 수컷 래트 스프라그 돌리 폐를 바이오리클레메이션 엘엘씨 (뉴욕주 리버풀)로부터 구입하였다. 폐를 5x 부피의 1X PBS 첨가 후에 폴리트론 균질화기를 사용하여 균질화하였다. 균질물을 4℃에서 10분 동안 9000 rpm으로 원심분리하였다. 상청액을 다시 30분 동안 3000 rpm으로 원심분리하여 투명한 상청액이 되게 하였다. 상업용 키트 (피어스, 써모 사이언티픽(Pierce, Thermo Scientific))를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다.

[0430] 샘플 제조 절차: (펩티드)

[0431] 시험 물품은 하기 생물학적 매트릭스: 헤파린화 래트 혈장, 헤파린화 래트 전혈 또는 폐 균질물 중 하나로 제조하였다. 혈장 및 전혈 샘플은 1 mg/mL 작업 용액 5 uL를 래트 혈장 또는 전혈 995 uL에 첨가함으로써 5000 ng/mL로 제조하였다. 폐 균질물 샘플은, 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 폐 균질물을 1 mg/ml 단백질 농도로 희석하고, 이어서 작업 용액 5 uL를 희석된 폐 균질물 995 uL에 첨가함으로써 제조하였다. 샘플을 수조 인큐베이터에서 완만하게 진탕시키면서 (65~75rpm) 37℃에서 인큐베이션하였다. 0분, 5분, 15분, 30분, 60분, 120분 및 240분 시점에, 인큐베이션 샘플의 25 uL 분취물을 96-웰 플레이트로 옮기고, 추출 용액 150 uL를 사용하여 단백질을 즉시 침전시켰다. 인큐베이션 실험의 완료 후에, 샘플 플레이트를 10분 동안 4℃에서 4000 rpm으로 원심분리하였다. 이후에, 피펫팅 장치 (테칸 테모(Tecan Temo))를 사용하여 상청액을 또 다른 플레이트로 옮기고, 물 50 uL를 모든 샘플에 첨가하였다. 플레이트를 볼텍싱한 후 LC-MS 분석하였다.

[0432] 샘플 제조 절차 (접합체)

[0433] 1 mg/mL 작업 용액 5 uL를 래트 혈장 495 uL에 첨가함으로써 시험 물품을 50,000 ng/mL로 제조하였다. 샘플을 수조 인큐베이터에서 완만하게 진탕시키면서 (65~75rpm) 37℃에서 인큐베이션하였다. 0시, 0.5시, 1시, 2시, 4시, 6 및 24시 시점에, 인큐베이션 샘플의 50 uL 분취물을 96-웰 플레이트로 옮기고, 100 uL 40 mM TCEP (트리스(2-카르복시에틸)포스핀)을 각각의 샘플에 첨가하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 반응의 완료 후에, 아세토니트릴 300uL를 사용하여 단백질 침전을 수행하였다. 샘플 플레이트를 10분 동안 4℃에서 4000 rpm으로 원심분리하였다. 이후에, 피펫팅 장치 (테칸 테모)를 사용하여 125 uL 상청액을 또 다른 플레이트로 옮기고, 물 50 uL를 모든 샘플에 첨가하였다. 플레이트를 볼텍싱한 후 LC-MS 분석하였다.

[0434] 안정성 샘플의 LC-MS 분석

[0435] HPLC: 오토샘플러가 구비된 애질런트(Agilent) 1290 HPLC

[0436] 칼럼: MAC-MOD ACE C18, 3 μm, 30mm x 2.1mm i.d.

[0437] 이동상 A: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산

[0438] 이동상 B: 물 중 0.1% 포름산

[0439] 구배 프로그램:

시간 (분)	유량 (mL)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	0.4	95	5
0.5	0.4	95	5
1.5	0.4	5	95
4.1	0.4	5	95
4.2	0.4	95	5
5	0.4	95	5

[0440]

[0441] 질량 분광계: 애질런트 Q-TOF 6530

[0442] 데이터 획득 모드: 100 - 1000 m/z의 질량 범위로의 전체 스캔

[0443] 데이터 획득 및 분석 소프트웨어: 매스헌터(MassHunter)

[0444] 데이터 분석:

[0445] 안정성 검정: 안정성 반감기 (t ½) 값은 각 시점에서의 피크 면적을 초기 (t=0) 피크 면적 대비 잔류 퍼센트로 전환함으로써 결정하였다.

[0446] 잔류 퍼센트 = 100 x (샘플 피크 면적) ÷ (t = 0 피크 면적)

[0447] 잔류 퍼센트 값의 자연 로그를 샘플 시간에 대해 계산하여 플롯팅하였다 (마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel)). 이 선의 기울기 k를 선형 회귀에 의해 결정하였다 (마이크로소프트 엑셀).

[0448] 이어서, 식 t ½ = 0.693 ÷ k에 의해 안정성 반감기를 계산하였다.

[0449] 대용물 활성-기반 혈장 안정성 검정:

[0450] 상기 기재된 칼슘 유동 프로토콜을 따르면서, 하기와 같이 변화시켰다. 펩티드를 또한 5% 래트 혈장 (바이오리클레메이션 # RATPLNAHP-M, Na 헤파린-처리됨)과 함께 인큐베이션하였다. 37℃ 조직 배양 인큐베이터에서 인큐베이션한 후에, 시점 t_0 및 t_{24} 시간에서 판독물을 취하였다. 하기를 계산함으로써 분 단위의 펩티드 혈장 반감기를 추정하였다:

[0451] 1) LN((t_0에서의 EC_{50})/($t_{24시간}$에서의 EC_{50})),

[0452] 2) 상기 값의 기울기 계산 및

[0453] 3) $t_{1/2}$ = 0.693/(기울기^2).

[0454] 시험 검정 (상기 기재된 바와 같음)을 사용하여, 본 발명의 폴리펩티드는 하기 제공된 표 2 및 3에 따른 효능 및 안정성을 나타내었다.

[0455] <표 2> 폴리펩티드의 활성 및 안정성

펩티드	hAPJ Ca^{2+} 유동 EC_{50} [nM]	대용물 활성-기반 혈장 안정성 t½ [분]
실시예 1	9.4	8
실시예 2	3.2	39
실시예 3	64.5	n.d.
실시예 4	74.6	506
실시예 5	1.6	5.0
실시예 6	21.4	5
실시예 7	11.8	9
실시예 8	13.1	662.5
실시예 9	23.4	109.2
실시예 10	46.9	57.4
실시예 11	32.2	32.8
실시예 12	21.4	10
실시예 13	12.2	10
실시예 14	48.7	7.5
실시예 15	193.5	17.7
실시예 16	14.1	7
실시예 17	410.3	11.4
실시예 18	174	50
실시예 19	79.3	50
실시예 20	1.0	11.9
실시예 21	2.9	>1000
실시예 22	3.3	>1000
실시예 23	72.2	3157
실시예 24	85.8	1699
실시예 25	227	>1000

[0456]

실시예 26	2292	52
실시예 27	86.5	82
실시예 28	3.1	13
실시예 29	4.2	705.0
실시예 30	0.4	660.7
실시예 31	0.5	43.1
실시예 32	3.0	>1000
실시예 33	1.9	>1000
실시예 34	0.6	>1000
실시예 35	2.0	155.0
실시예 35	66.7	8
실시예 36	4.2	34
실시예 37	937	47
실시예 38	175	41
실시예 40	2479	>1000
실시예 41	839	>1000
실시예 42	16.3	>1000
실시예 43	28.9	>1000
비교 실시예: Pyr1-아펠린-13	1.8	5.0

[0457]

[0458] <표 3> 혈장 안정성 검정 및 대용물 활성 기반 혈장 안정성 검정 사이의 상관관계:

펩티드	혈장 안정성 t½ [분]	대용물 활성 기반 혈장 안정성 t½ [분]
Pyr-1-아펠린 13	6.6	5.0
실시예 32	377	>1000

[0459]

[0460] 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 아펠린-13 또는 pyr-1-아펠린-13과 유사한 APJ 수용체 효력을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 100nM 미만의 EC_{50}을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 50nM 미만, 바람직하게는 25nM 미만, 보다 바람직하게는 15nM 미만의 EC_{50}을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 10nM 미만의 EC_{50}을 갖는다.

[0461] 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 아펠린-13 또는 pyr-1-아펠린-13보다 우수한 혈장 안정성을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 혈장 안정성 개선은 적어도 2배이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 적어도 30분의 혈장 안정성을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 적어도 60분 또는 적어도 80분, 바람직하게는 적어도 100분, 보다 바람직하게는 적어도 150분의 혈장 안정성을 갖는다.

[0462] 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체는 1종 이상의 다른 치료제와 동시에, 또는 그 전에 또는 후에 투여

될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 생체접합체는 동일하거나 또는 상이한 투여 경로에 의해 개별적으로 투여되거나, 또는 다른 작용제와 동일한 제약 조성물로 함께 투여될 수 있다.

[0463] 한 실시양태에서, 본 발명은 요법에서 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 조합 제제로서 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 적어도 1종의 다른 치료제를 포함하는 생성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 요법은 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 질환 또는 상태의 치료이다.

[0464] 조합 제제로서 제공되는 생성물은 동일한 제약 조성물 중에 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 다른 치료제(들)를 함께 포함하는 조성물, 또는 개별 형태로, 예를 들어 키트 형태로 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 다른 치료제(들)를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0465] 한 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 또 다른 치료제(들)를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 임의로, 제약 조성물은 상기 기재된 바와 같은 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다.

[0466] 한 실시양태에서, 본 발명은 2종 이상의 개별 제약 조성물을 포함하며 그 중 적어도 1종이 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체를 함유하는 것인 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 키트는 상기 조성물을 개별적으로 보유하기 위한 수단, 예컨대 용기, 분할된 병, 또는 분할된 호일 패킷을 포함한다. 이러한 키트의 예는 정제, 캡슐 등의 포장에 전형적으로 사용되는 바와 같은 블리스터 팩이다.

[0467] 본 발명의 키트는 상이한 투여 형태, 예를 들어 경구 및 비경구로 투여하기 위해, 개별 조성물을 상이한 투여 간격으로 투여하기 위해, 또는 개별 조성물을 서로에 대해 적정하기 위해 사용될 수 있다. 순응도를 보조하기 위해, 본 발명의 키트는 전형적으로 투여 지침서를 포함한다.

[0468] 본 발명의 조합 요법에서, 본 발명의 펩티드 또는 생체접합체 및 다른 치료제는 동일하거나 상이한 제조업체에 의해 제조되고/거나 제제화될 수 있다. 또한, 본 발명의 펩티드 또는 생체접합체 및 다른 치료제는 (i) 의사에게 조합 생성물로 배포되기 전에 (예를 들어, 본 발명의 화합물 및 다른 치료제를 포함하는 키트의 경우); (ii) 투여 직전에 의사 자신에 의해 (또는 의사의 지시 하에); (iii) 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드 또는 생체접합체 및 다른 치료제의 순차적 투여 동안에 환자 자신에서, 조합 요법으로 합해질 수 있다.

[0469] 따라서, 본 발명은 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하기 위한 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 용도를 제공하며, 여기서 의약은 또 다른 치료제와의 투여를 위해 제조된다. 본 발명은 또한 아펠린 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하기 위한 또 다른 치료제의 용도를 제공하며, 여기서 의약은 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체와 함께 투여된다.

[0470] 본 발명은 또한 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 그의 생체접합체를 제공하며, 여기서 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체는 또 다른 치료제와의 투여를 위해 제조된다. 본 발명은 또한 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 또 다른 치료제를 제공하며, 여기서 다른 치료제는 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체와의 투여를 위해 제조된다. 본 발명은 또한 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체를 제공하며, 여기서 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체는 또 다른 치료제와 함께 투여된다. 본 발명은 또한 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 또 다른 치료제를 제공하며, 여기서 다른 치료제는 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체와 함께 투여된다.

[0471] 본 발명은 또한 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하기 위한 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 용도를 제공하며, 여기서 환자는 이전에 (예를 들어, 24시간 내에) 또 다른 치료제로 치료받았던 환자이다. 본 발명은 또한 APJ 수용체의 효능작용에 반응성인 질환 또는 상태를 치료하기 위한 또 다른 치료제의 용도를 제공하며, 여기서 환자는 이전

에 (예를 들어, 24시간 내에) 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체로 치료받았던 환자이다.

[0472] 한 실시양태에서, 다른 치료제는 수축촉진제, 베타 아드레날린성 수용체 차단제, HMG-Co-A 리덕타제 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 억제제, 칼슘 채널 차단제 (CCB), 엔도텔린 길항제, 레닌 억제제, 이뇨제, ApoA-I 모방체, 항당뇨병제, 비만-감소제, 알도스테론 수용체 차단제, 엔도텔린 수용체 차단제, 알도스테론 신타제 억제제 (ASI), CETP 억제제, 항응고제, 렐락신, BNP (네시리티드) 및 NEP 억제제로부터 선택된다.

[0473] 용어 제2 작용제 또는 치료"와 조합되어"는 본 발명의 폴리펩티드 또는 생체접합체 (예를 들어, 화학식 I-IV 중 어느 하나에 따른 폴리펩티드, 또는 본원에 달리 기재된 폴리펩티드)와 제2 작용제 또는 치료의 공-투여, 먼저 본 발명의 화합물의 투여 후, 제2 작용제 또는 치료의 투여, 및 먼저 제2 작용제 또는 치료의 투여 후, 본 발명의 펩티드 또는 생체접합체의 투여를 포함한다.

[0474] 용어 "제2 작용제"는 본원에 기재된 질환 또는 장애, 예를 들어 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 장애 또는 질환, 예컨대 예를 들어 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증의 증상을 치료하거나, 예방하거나, 또는 감소시키는, 관련 기술분야에 공지된 임의의 작용제를 포함한다.

[0475] 제2 작용제의 예는 수축촉진제, 베타 아드레날린성 수용체 차단제, HMG-Co-A 리덕타제 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 억제제, 칼슘 채널 차단제 (CCB), 엔도텔린 길항제, 레닌 억제제, 이뇨제, ApoA-I 모방체, 항당뇨병제, 비만-감소제, 알도스테론 수용체 차단제, 엔도텔린 수용체 차단제, 알도스테론 신타제 억제제 (ASI), CETP 억제제, 항응고제, 렐락신, BNP (네시리티드) 및/또는 NEP 억제제를 포함한다.

[0476] 본원에 사용된 바와 같은 수축촉진제는, 예를 들어 도부타민, 이소프로테레놀, 밀리논, 아미리논, 레보시멘단, 에피네프린, 노르에피네프린, 이소프로테레놀 및 디곡신을 포함한다.

[0477] 본원에 사용된 바와 같은 베타 아드레날린성 수용체 차단제는, 예를 들어 아세부톨롤, 아테놀롤, 베탁솔롤, 비소프롤롤, 카르테올롤, 메토프롤롤, 나돌롤, 프로프라놀롤, 소탈롤 및 티몰롤을 포함한다.

[0478] 본원에 사용된 바와 같은 항응고제는 달테파린, 다나파로이드, 에녹사파린, 헤파린, 틴자파린, 와파린을 포함한다.

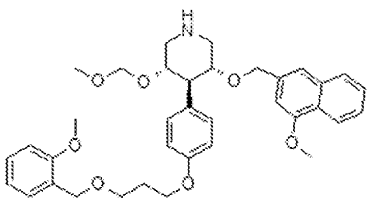
[0479] 용어 "HMG-Co-A 리덕타제 억제제" (베타-히드록시-베타-메틸글루타릴-조효소-A 리덕타제 억제제로 또한 불림)는 혈액 중 콜레스테롤을 비롯한 지질 수준을 낮추는데 사용될 수 있는 활성제를 포함한다. 예는 아토르바스타틴, 세리바스타틴, 콤팩틴, 달바스타틴, 디히드로콤팩틴, 플루인도스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 피타바스타틴, 메바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 리바스타틴, 심바스타틴 및 벨로스타틴, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0480] 용어 "ACE-억제제" (안지오텐신 전환 효소 억제제로 또한 불림)는 안지오텐신 I의 안지오텐신 II로의 효소적 분해를 방해하는 분자를 포함한다. 이러한 화합물은 혈압 조절 및 울혈성 심부전의 치료에 사용될 수 있다. 예는 알라세프릴, 베나제프릴, 베나제프릴라트, 캅토프릴, 세로나프릴, 실라자프릴, 델라프릴, 에날라프릴, 에나프릴라트, 포시노프릴, 이미다프릴, 리시노프릴, 모엑시프릴, 모벨토프릴, 페린도프릴, 퀴나프릴, 라미프릴, 스피라프릴, 테모카프릴 및 트란돌라프릴, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

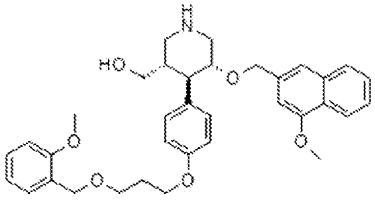
[0481] 용어 "엔도텔린 길항제"는 보센탄 (EP 526708 A 참조), 테조센탄 (WO 96/19459 참조), 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0482] 용어 "레닌 억제제"는 디테키렌 (화학 명칭: [1S-[1R*,2R*,4R*(1R*,2R*)]]-1-[(1,1-디메틸에톡시)카르보닐]-L-프롤릴-L-페닐알라닐-N-[2-히드록시-5-메틸-1-(2-메틸프로필)-4-[[[2-메틸-1-[[(2-피리디닐메틸)아미노]카르보닐]부틸]아미노]카르보닐]헥실]-N-알파-메틸-L-히스티딘아미드); 테를라키렌 (화학 명칭: [R-(R*,S*)]-N-(4-모르폴리닐카르보닐)-L-페닐알라닐-N-[1-(시클로헥실메틸)-2-히드록시-3-(1-메틸에톡시)-3-옥소프로필]-S-메틸-L-시스테인아미드); 알리스키렌 (화학 명칭: (2S,4S,5S,7S)-5-아미노-N-(2-카르바모일-2,2-디메틸에틸)-4-히드록시-7-{[4-메톡시-3-(3-메톡시프로폭시)페닐]메틸}-8-메틸-2-(프로판-2-일)노난아미드) 및 잔키렌 (화학 명칭: [1S-[1R*[R*(R*)],2S*,3R*]]-N-[1-(시클로헥실메틸)-2,3-디히드록시-5-메틸헥실]-알파-[[2-[[(4-메틸-1-피페

라지닐)술포닐]메틸]-1-옥소-3-페닐프로필]-아미노]-4-티아졸프로판아미드), 또는 그의 히드로클로라이드 염, 또는 스피델(Speedel)에 의해 개발된 SPP630, SPP635 및 SPP800, 또는 화학식 (A) 및 (B):



(A)



(B)

[0483] 및

[0484] 의 RO 66-1132 및 RO 66-1168 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0485] 용어 "알리스키렌"은, 구체적으로 정의되지 않는 경우에, 그의 유리 염기 및 염 둘 다, 특히 그의 제약상 허용되는 염, 가장 바람직하게는 그의 헤미-푸마레이트 염으로서 이해되어야 한다.

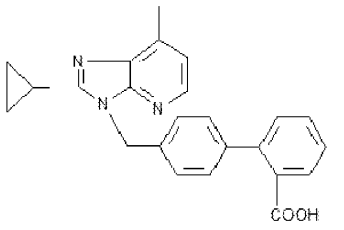
[0486] 용어 "칼슘 채널 차단제 (CCB)"는 디히드로피리딘 (DHP) 및 비-DHP (예를 들어, 딜티아젬-유형 및 베라파밀-유형 CCB)를 포함한다. 예는 암로디핀, 베프리딜, 딜티아젬, 펠로디핀, 리오시딘, 이스라디핀, 라시디핀, 니카르디핀, 니페디핀, 니굴디핀, 닐루디핀, 니모디핀, 니솔디핀, 니트렌디핀, 베라파밀 및 니발디핀을 포함하고, 바람직하게는 플루나리진, 프레닐아민, 딜티아젬, 펜딜린, 갈로파밀, 미베프라딜, 아니파밀, 티아파밀 및 베라파밀, 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 비-DHP 대표물이다. CCB는 항고혈압, 항협심증, 또는 항부정맥 약물로서 사용될 수 있다.

[0487] 용어 "이뇨제"는 티아지드 유도체 (예를 들어, 클로로티아지드, 히드로클로로티아지드, 메틸클로티아지드 및 클로로탈리돈)를 포함한다.

[0488] 용어 "ApoA-I 모방체"는 D4F 펩티드 (예를 들어, 화학식 D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F)를 포함한다.

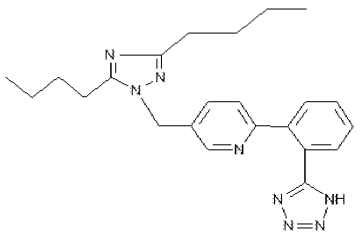
[0489] 안지오텐신 II 수용체 길항제 또는 그의 제약상 허용되는 염은 안지오텐신 II 수용체의 AT_1-수용체 하위유형에 결합하지만 상기 수용체의 활성화를 야기하지는 않는 활성 성분인 것으로 이해된다. AT_1 수용체 억제의 결과로서, 이들 길항제는, 예를 들어 항고혈압제로서 또는 울혈성 심부전을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0490] AT_1 수용체 길항제 부류는 상이한 구조적 특징을 갖는 화합물을 포함하고, 비-펩티드성인 것이 본질적으로 바람직하다. 예를 들어, 발사르탄, 로사르탄, 칸데사르탄, 에프로사르탄, 이르베사르탄, 사프리사르탄, 타소사르탄, 텔미사르탄, 하기 화학식의 명칭 E-1477을 갖는 화합물



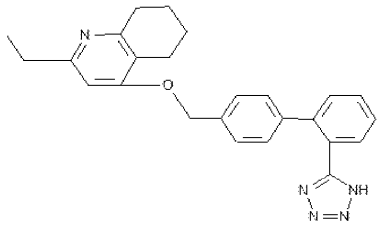
[0491] ,

[0492] 하기 화학식의 명칭 SC-52458을 갖는 화합물



[0493] ,

[0494] 및 하기 화학식의 명칭 ZD-8731을 갖는 화합물

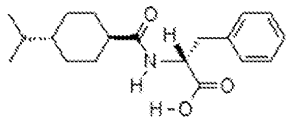


[0495]

[0496] 로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물, 또는 각 경우에, 그의 제약상 허용되는 염이 언급될 수 있다.

[0497] 바람직한 AT_1-수용체 길항제는 칸데사르탄, 에프로사르탄, 이르베사르탄, 로사르탄, 텔미사르탄, 발사르탄이다. 또한, 바람직한 것은 시판되고 있는 작용제이고, 가장 바람직한 것은 발사르탄 또는 그의 제약상 허용되는 염이다.

[0498] 용어 "항당뇨병제"는 췌장 β-세포로부터의 인슐린 분비를 촉진하는 인슐린 분비 증진제를 포함한다. 예는 비구아니드 유도체 (예를 들어, 메트포르민), 술포닐우레아 (SU) (예를 들어, 톨부타미드, 클로르프로파미드, 톨라자미드, 아세토헥사미드, 4-클로로-N-[(1-피롤리디닐아미노)카르보닐]-벤젠술폰아미드 (글리코피라미드), 글리벤클라미드 (글리부리드), 글리클라지드, 1-부틸-3-메타닐릴우레아, 카르부타미드, 글리보누리드, 글리피지드, 글리퀴돈, 글리속세피드, 글리부티아졸, 글리부졸, 글리헥사미드, 글리미딘, 글리피나미드, 펜부타미드, 및 톨릴시클라미드), 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다. 추가의 예는 페닐알라닌 유도체 (예를 들어, 하기 화학식의 나테글리니드 [N-(트랜스-4-이소프로필시클로헥실카르보닐)-D-페닐알라닌] (EP 196222 및 EP 526171 참조)



[0499] ;

[0500] 레파글리니드 [(S)-2-에톡시-4-{2-[[3-메틸-1-[2-(1-피페리디닐)페닐]부틸]아미노]-2-옥소에틸}벤조산] (EP 589874, EP 147850 A2, 특히 페이지 61의 실시예 11, 및 EP 207331 A1 참조); 칼슘 (2S)-2-벤질-3-(시스-헥사히드로-2-이소인돌리닐카르보닐)-프로피오네이트 2수화물 (예를 들어, 미티글리니드 (EP 507534 참조)); 및 글리메피리드 (EP 31058 참조)를 포함한다.

[0501] 본 발명의 펩티드 및 폴리펩티드와 조합되어 사용될 수 있는 제2 작용제의 추가의 예는 DPP-IV 억제제, GLP-1 및 GLP-1 효능제를 포함한다.

[0502] DPP-IV는 GLP-1의 불활성화를 담당한다. 보다 특히, DPP-IV는 GLP-1 수용체 길항제를 생성하고, 그에 의해 GLP-1에 대한 생리학적 반응을 단축시킨다. GLP-1은 췌장 인슐린 분비의 주요 자극제이고, 글루코스 처리에 직접적인 유익한 효과를 갖는다.

[0503] DPP-IV (디펩티딜 펩티다제 IV) 억제제는 펩티드성, 또는 바람직하게는 비-펩티드성일 수 있다. DPP-IV 억제제는 예를 들어 WO 98/19998, DE 196 16 486 A1, WO 00/34241 및 WO 95/15309, 각 경우에 특히 화합물 청구범위 및 작업 실시예의 최종 생성물, 최종 생성물의 대상-물질, 제약 제제, 및 이들 공보에 대한 참조로서 본원에 포함된 청구범위에서 각 경우에 포괄적이고 구체적으로 개시되어 있다. WO 98/19998의 실시예 3 및 WO 00/34241의 실시예 1에 각각 구체적으로 개시되어 있는 화합물이 바람직하다.

[0504] GLP-1 (글루카곤 유사 펩티드-1)은, 예를 들어 문헌 [W.E. Schmidt et al. in Diabetologia, 28, 1985, 704-707] 및 US 5,705,483에 기재되어 있는 인슐린분비자극 단백질이다.

[0505] 용어 "GLP-1 효능제"는 특히 US 5,120,712, US 5,118666, US 5,512,549, WO 91/11457 및 문헌 [C. Orskov et al. in J. Biol. Chem. 264 (1989) 12826]에 개시되어 있는 GLP-1(7-36)NH_2의 변이체 및 유사체를 포함한다. 추가의 예는 Arg^{36}의 카르복시-말단 아미드 관능기가 GLP-1(7-36)NH_2 분자의 37번째 위치에서 Gly로 대체된 화합물 GLP-1(7-37), 및 GLN^{9}-GLP-1(7-37), D-GLN^{9}-GLP-1(7-37), 아세틸 LYS^{9}-GLP-1(7-37), LYS^{18}-GLP-1(7-37) 및,

특히 GLP-1(7-37)OH, VAL^{8}-GLP-1(7-37), GLY^{8}-GLP-1(7-37), THR^{8}-GLP-1(7-37), MET^{8}-GLP-1(7-37) 및 4-이미다조프로피오닐-GLP-1을 비롯한 그의 변이체 및 유사체를 포함한다. 또한, 문헌 [Greig et al. in Diabetologia 1999, 42, 45-50]에 기재되어 있는 GLP 효능제 유사체 엑센딘-4가 특히 바람직하다.

[0506] 정의 "항당뇨병제"에는 손상된 인슐린 수용체 기능을 복구하여 인슐린 저항성을 감소시킴으로써 결과적으로 인슐린 감수성을 증진시키는 인슐린 감수성 증진제가 또한 포함된다. 예는 저혈당 티아졸리딘디온 유도체 (예를 들어, 글리타존, (S)-((3,4-디히드로-2-(페닐-메틸)-2H-1-벤조피란-6-일)메틸-티아졸리딘-2,4-디온 (엔글리타존), 5-{[4-(3-(5-메틸-2-페닐-4-옥사졸릴)-1-옥소프로필)-페닐]-메틸}-티아졸리딘-2,4-디온 (다르글리타존), 5-{[4-(1-메틸-시클로헥실)메톡시)-페닐]메틸}-티아졸리딘-2,4-디온 (시글리타존), 5-{[4-(2-(1-인돌릴)에톡시)페닐]메틸}-티아졸리딘-2,4-디온 (DRF2189), 5-{4-[2-(5-메틸-2-페닐-4-옥사졸릴)-에톡시)]벤질}-티아졸리딘-2,4-디온 (BM-13.1246), 5-(2-나프틸술포닐)-티아졸리딘-2,4-디온 (AY-31637), 비스{4-[(2,4-디옥소-5-티아졸리디닐)메틸]페닐}메탄 (YM268), 5-{4-[2-(5-메틸-2-페닐-4-옥사졸릴)-2-히드록시에톡시]벤질}-티아졸리딘-2,4-디온 (AD-5075), 5-[4-(1-페닐-1-시클로프로판카르보닐아미노)-벤질]-티아졸리딘-2,4-디온 (DN-108) 5-{[4-(2-(2,3-디히드로인돌-1-일)에톡시)페닐]메틸}-티아졸리딘-2,4-디온, 5-[3-(4-클로로-페닐])-2-프로피닐]-5-페닐술포닐)티아졸리딘-2,4-디온, 5-[3-(4-클로로페닐])-2-프로피닐]-5-(4-플루오로페닐-술포닐)티아졸리딘-2,4-디온, 5-{[4-(2-(메틸-2-피리디닐-아미노)-에톡시)페닐]메틸}-티아졸리딘-2,4-디온 (로시글리타존), 5-{[4-(2-(5-에틸-2-피리딜)에톡시)페닐]-메틸}티아졸리딘-2,4-디온 (피오글리타존), 5-{[4-((3,4-디히드로-6-히드록시-2,5,7,8-테트라메틸-2H-1-벤조피란-2-일)메톡시)-페닐]-메틸}-티아졸리딘-2,4-디온 (트로글리타존), 5-[6-(2-플루오로-벤질옥시)나프탈렌-2-일메틸]-티아졸리딘-2,4-디온 (MCC555), 5-{[2-(2-나프틸)-벤족사졸-5-일]-메틸}티아졸리딘-2,4-디온 (T-174) 및 5-(2,4-디옥소티아졸리딘-5-일메틸)-2-메톡시-N-(4-트리플루오로메틸-벤질)벤즈아미드 (KRP297))를 포함한다.

[0507] 추가의 항당뇨병제는 인슐린 신호전달 경로 조절제, 예컨대 단백질 티로신 포스파타제 (PTPase)의 억제제, 항당뇨병성 비-소분자 모방체 화합물 및 글루타민-프룩토스-6-포스페이트 아미도트랜스퍼라제 (GFAT)의 억제제; 조절이상 간 글루코스 생산에 영향을 미치는 화합물, 예컨대 글루코스-6-포스파타제 (G6Pase)의 억제제, 프룩토스-1,6-비스포스파타제 (F-1,6-Bpase)의 억제제, 글리코겐 포스포릴라제 (GP)의 억제제, 글루카곤 수용체 길항제 및 포스포엔올피루베이트 카르복시키나제 (PEPCK)의 억제제; 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK) 억제제; 위 배출 억제제; 인슐린; GSK-3의 억제제; 레티노이드 X 수용체 (RXR) 효능제; 베타-3 AR의 효능제; 탈커플링 단백질 (UCP)의 효능제; 비-글리타존 유형 PPARγ 효능제; 이중 PPARα/PPARγ 효능제; 항당뇨병성 바나듐 함유 화합물; 인크레틴 호르몬, 예컨대 글루카곤-유사 펩티드-1 (GLP-1) 및 GLP-1 효능제; 베타-세포 이미다졸린 수용체 길항제; 미글리톨; α_2-아드레날린성 길항제; 및 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0508] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 정의에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체, 및 β-아드레날린성 수용체 차단제, 예컨대 아세부톨롤, 아테놀롤, 베탁솔롤, 비소프롤롤, 메토프롤롤, 나돌롤, 프로프라놀롤, 소탈롤 및 티몰롤; 안지오텐신 II 수용체 길항제, 예컨대 AT1 차단제; 항당뇨병제, 예컨대 DPPIV 억제제 (예를 들어, 빌다글립틴) 및 GLP1 펩티드 효능제로부터 선택된 1종 이상의 치료 활성제를 포함하는 조합물, 특히 제약 조합물을 제공한다.

[0509] 용어 "비만-감소제"는 리파제 억제제 (예를 들어, 오를리스타트) 및 식욕 억제제 (예를 들어, 시부트라민 및 펜테르민)를 포함한다.

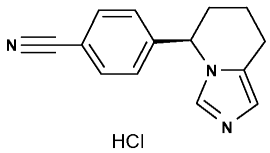
[0510] 알도스테론 신타제 억제제 또는 그의 제약상 허용되는 염은 알도스테론의 생산을 억제하는 특성을 갖는 활성 성분인 것으로 이해된다. 알도스테론 신타제 (CYP11B2)는 부신 피질에서 알도스테론 생산의 마지막 단계, 즉 11-데옥시코르티코스테론을 알도스테론으로 전환시키는 단계를 촉매작용하는 미토콘드리아 시토크롬 P450 효소이다. 소위 알도스테론 신타제 억제제에 의한 알도스테론 생산의 억제는 저칼륨혈증, 고혈압, 울혈성 심부전, 심방 세동 또는 신부전의 치료에 대한 성공적인 변형인 것으로 공지되어 있다. 이러한 알도스테론 신타제 억제 활성은 표준 검정에 따라 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정된다 (예를 들어, US 2007/0049616).

[0511] 알도스테론 신타제 억제제 부류는 스테로이드성 및 비-스테로이드성 알도스테론 신타제 억제제 둘 다를 포함하고, 후자가 가장 바람직하다.

[0512] 상업적으로 입수가능한 알도스테론 신타제 억제제 또는 보건 당국에 의해 승인된 알도스테론 신타제 억제제가 바람직하다.

[0513] 알도스테론 신타제 억제제 부류는 상이한 구조적 특징을 갖는 화합물을 포함한다. 비-스테로이드성 알도스테론

신타제 억제제의 예는 하기 화학식의 파드로졸의 히드로클로라이드의 (+)-거울상이성질체 (미국 특허 4617307 및 4889861)



[0514]

[0515] 또는 적절한 경우에 그의 제약상 허용되는 염이다.

[0516] 상기 조합물에 유용한 알도스테론 신타제 억제제는, 예를 들어 US2007/0049616, 특히 화합물 청구범위 및 작업 실시예의 최종 생성물, 최종 생성물의 대상-물질, 제약 제제, 및 이러한 공보에 대한 참조로서 본원에 포함된 청구범위에서 포괄적이고 구체적으로 개시되어 있는 화합물 및 유사체이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 바람직한 알도스테론 신타제 억제제는, 제한 없이 4-(6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-일)-3-메틸벤조니트릴; 5-(2-클로로-4-시아노페닐)-6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-카르복실산 (4-메톡시벤질)메틸아미드; 4'-플루오로-6-(6,7,8,9-테트라히드로-5H-이미다조[1,5-a]아제핀-5-일)비페닐-3-카르보니트릴; 5-(4-시아노-2-메톡시페닐)-6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-카르복실산 부틸 에스테르; 4-(6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-일)-2-메톡시벤조니트릴; 5-(2-클로로-4-시아노페닐)-6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-카르복실산 4-플루오로벤질 에스테르; 5-(4-시아노-2-트리플루오로메톡시페닐)-6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-카르복실산 메틸 에스테르; 5-(4-시아노-2-메톡시페닐)-6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-카르복실산 2-이소프로폭시에틸 에스테르; 4-(6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-일)-2-메틸벤조니트릴; 4-(6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-일)-3-플루오로벤조니트릴 ; 4-(6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-일)-2-메톡시벤조니트릴; 3-플루오로-4-(7-메틸렌-6,7-디히드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-5-일)벤조니트릴; 시스-3-플루오로-4-[7-(4-플루오로-벤질)-5,6,7,8-테트라히드로-이미다조[1,5-a]피리딘-5-일]벤조니트릴; 4'-플루오로-6-(9-메틸-6,7,8,9-테트라히드로-5H-이미다조[1,5-a]아제핀-5-일)비페닐-3-카르보니트릴; 4'-플루오로-6-(9-메틸-6,7,8,9-테트라히드로-5H-이미다조[1,5-a]아제핀-5-일)비페닐-3-카르보니트릴, 또는 각 경우에 그의 (R) 또는 (S) 거울상이성질체; 또는 적절한 경우에, 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0517] 용어 알도스테론 신타제 억제제는 또한 WO2008/076860, WO2008/076336, WO2008/076862, WO2008/027284, WO2004/046145, WO2004/014914, WO2001/076574에 개시되어 있는 화합물 및 유사체를 포함한다.

[0518] 또한, 알도스테론 신타제 억제제는 미국 특허 출원 US2007/0225232, US2007/0208035, US2008/0318978, US2008/0076794, US2009/0012068, US20090048241 및 PCT 출원 WO2006/005726, WO2006/128853, WO2006128851, WO2006/128852, WO2007065942, WO2007/116099, WO2007/116908, WO2008/119744 및 유럽 특허 출원 EP 1886695에 개시되어 있는 화합물 및 유사체를 또한 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 바람직한 알도스테론 신타제 억제제는, 제한 없이 8-(4-플루오로페닐)-5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진; 4-(5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)-2-플루오로벤조니트릴; 4-(5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)-2,6-디플루오로벤조니트릴; 4-(5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)-2-메톡시벤조니트릴; 3-(5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)벤조니트릴; 4-(5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)프탈로니트릴; 4-(8-(4-시아노페닐)-5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)벤조니트릴; 4-(5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)벤조니트릴; 4-(5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진-8-일)나프탈렌-1-카르보니트릴; 스피델에 의해 개발된 8-[4-(1H-테트라졸-5-일)페닐]-5,6-디히드로-8H-이미다조[5,1-c][1,4]옥사진, 또는 각 경우에 그의 (R) 또는 (S) 거울상이성질체; 또는 적절한 경우에, 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0519] 상기 조합물에 유용한 알도스테론 신타제 억제제는, 예를 들어 WO 2009/156462 및 WO 2010/130796, 특히 화합물 청구범위 및 작업 실시예의 최종 생성물, 최종 생성물의 대상-물질, 제약 제제 및 청구범위에서 포괄적이고 구체적으로 개시되어 있는 화합물 및 유사체이다. 본 발명에서 조합물에 적합한 바람직한 알도스테론 신타제 억제제는 3-(6-플루오로-3-메틸-2-피리딘-3-일-1H-인돌-1-일메틸)-벤조니트릴 히드로클로라이드, 1-(4-메탄술포닐-벤질)-3-메틸-2-피리딘-3-일-1H-인돌, 2-(5-벤질옥시-피리딘-3-일)-6-클로로-1-메틸-1H-인돌, 5-(3-시아노-1-메틸-1H-인돌-2-일)-니코틴산 에틸 에스테르, N-[5-(6-클로로-3-시아노-1-메틸-1H-인돌-2-일)-피리딘-3-일메틸]-에탄술폰아미드, 피롤리딘-1-술폰산 5-(6-클로로-3-시아노-1-메틸-1H-인돌-2-일)-피리딘-3-일 에스테르, N-메틸-N-[5-(1-메틸-1H-인돌-2-일)-피리딘-3-일메틸]-메탄술폰아미드, 6-클로로-1-메틸-2-{5-[(2-피롤리딘-1-일-

에틸아미노)-메틸]-피리딘-3-일}-1H-인돌-3-카르보니트릴, 6-클로로-2-[5-(4-메탄술포닐-피페라진-1-일메틸)-피리딘-3-일]-1-메틸-1H-인돌-3-카르보니트릴, 6-클로로-1-메틸-2-{5-[(1-메틸-피페리딘-4-일아미노)-메틸]-피리딘-3-일}-1H-인돌-3-카르보니트릴, 모르폴린-4-카르복실산 [5-(6-클로로-3-시아노-1-메틸-1H-인돌-2-일)-피리딘-3-일메틸]-아미드, N-[5-(6-클로로-1-메틸-1H-인돌-2-일)-피리딘-3-일메틸]-에탄술폰아미드, C,C,C-트리플루오로-N-[5-(1-메틸-1H-인돌-2-일)-피리딘-3-일메틸]-메탄술폰아미드,
N-[5-(3-클로로-4-시아노-페닐)-피리딘-3-일]-4-트리플루오로메틸-벤젠술폰아미드, N-[5-(3-클로로-4-시아노-페닐)-피리딘-3-일]-1-페닐-메탄술폰아미드, N-(5-(3-클로로-4-시아노페닐)피리딘-3-일)부탄-1-술폰아미드, N-(1-(5-(4-시아노-3-메톡시페닐)피리딘-3-일)에틸)에탄술폰아미드, N-((5-(3-클로로-4-시아노페닐)피리딘-3-일)(시클로프로필)메틸)에탄술폰아미드, N-(시클로프로필(5-(1H-인돌-5-일)피리딘-3-일)메틸)에탄술폰아미드, N-(시클로프로필(5-나프탈렌-1-일-피리딘-3-일)메틸)에탄술폰아미드, 에탄술폰산 [5-(6-클로로-1-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-2-일)-피리딘-3-일메틸]-아미드 및 에탄술폰산 {[5-(3-클로로-4-시아노-페닐)-피리딘-3-일]-시클로프로필-메틸}-에틸-아미드를 포함한다.

[0520] 용어 "엔도텔린 수용체 차단제"는 보센탄 및 암브리센탄을 포함한다.

[0521] 용어 "CETP 억제제"는, HDL로부터 LDL 및 VLDL로의 다양한 콜레스테릴 에스테르 및 트리글리세리드의 콜레스테릴 에스테르 전달 단백질 (CETP) 매개 수송을 억제하는 화합물을 지칭한다. 이러한 CETP 억제 활성은 표준 검정 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,140,343)에 따라 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정된다. 예는 미국 특허 번호 6,140,343 및 미국 특허 번호 6,197,786에 개시되어 있는 화합물 (예를 들어, [2R,4S]4-[(3,5-비스-트리플루오로메틸-벤질)-메톡시카르보닐-아미노]-2-에틸-6-트리플루오로메틸-3,4-디히드로-2H-퀴놀린-1-카르복실산 에틸 에스테르 (토르세트라피브); 미국 특허 번호 6,723,752에 개시되어 있는 화합물 (예를 들어, (2R)-3-{[3-(4-클로로-3-에틸-페녹시)-페닐]-[[3-(1,1,2,2-테트라플루오로-에톡시)-페닐]-메틸]-아미노}-1,1,1-트리플루오로-2-프로판올); 미국 특허 출원 일련 번호 10/807,838에 개시되어 있는 화합물; 미국 특허 번호 5,512,548에 개시되어 있는 폴리펩티드 유도체; 각각 문헌 [J. Antibiot., 49(8): 815- 816 (1996), 및 Bioorg. Med. Chem. Lett.; 6:1951-1954 (1996)]에 개시되어 있는 콜레스테릴 에스테르의 로세노노락톤 유도체 및 포스페이트-함유 유사체를 포함한다. 또한, CETP 억제제는 WO2000/017165, WO2005/095409, WO2005/097806, WO 2007/128568, WO2008/009435, WO 2009/059943 및 WO2009/071509에 개시되어 있는 것을 또한 포함한다.

[0522] 용어 "NEP 억제제"는 중성 엔도펩티다제 (NEP) EC 3.4.24.11을 억제하는 화합물을 지칭한다. 예는 칸독사트릴, 칸독사트릴라트, 덱세카도트릴, 에카도트릴, 라세카도트릴, 삼파트릴라트, 파시도트릴, 오마파트릴라트, 게모파트릴라트, 다글루트릴, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37 및 (2R,4S)-5-비페닐-4-일-4-(3-카르복시-프로피오닐아미노)-2-메틸-펜탄산 에틸 에스테르 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다. NEP 억제제는 또한 미국 특허 번호 5,155,100에 개시된 바와 같은 포스포노/비아릴 치환된 디펩티드 유도체를 포함한다. NEP 억제제는 또한 PCT 출원 번호 WO 2003/104200에 개시된 바와 같은 N-메르캅토아실 페닐알라닌 유도체를 포함한다. NEP 억제제는 또한 PCT 출원 번호 WO 2008/133896, WO 2009/035543 또는 WO 2009/134741에 개시된 바와 같은 이중-작용 항고혈압제를 포함한다. 다른 예는 미국 출원 번호 12/788,794; 12/788,766 및 12/947,029에 개시되어 있는 화합물을 포함한다. NEP 억제제는 또한 WO 2010/136474, WO 2010/136493, WO 2011/061271 및 미국 가출원 번호 61/414171 및 61/414163에 개시되어 있는 화합물을 포함한다.

[0523] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 정의에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 APJ 수용체를 활성화시키는 방법을 제공한다.

[0524] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 정의에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 장애 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0525] 한 실시양태에서, 본 발명은 APJ 수용체의 활성화 (효능작용)에 반응성인 장애 또는 질환이 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증으로부터 선택된 것인, 대상체에서 상기 장애 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0526] 한 실시양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 정의에 따른 폴리펩티드 또는 그의 생체접합체를 제공한다.

[0527] 한 실시양태에서, 본 발명은 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 장애 또는 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서의, 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 정의에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 용도를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 장애 또는 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서의, 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나의 정의에 따른 폴리펩티드, 또는 그의 아미드, 에스테르 또는 염, 또는 그의 생체접합체의 용도를 제공하며, 여기서 상기 장애 또는 질환은 특히 급성 대상부전성 심부전 (ADHF), 만성 심부전, 폐고혈압, 심방 세동, 브루가다 증후군, 심실성 빈맥, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 재협착, 허혈성 심혈관 질환, 심근병증, 심장 섬유증, 부정맥, 수분 저류, 당뇨병 (임신성 당뇨병 포함), 비만, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 화상 손상 (일광화상 포함) 및 전자간증으로부터 선택된다.

[0528] 본 발명의 예시: 펩티드 및 폴리펩티드 합성

약어	정의
AA	아미노산
Ac	아세틸
Acm	아세트아미도메틸
ACN	아세토니트릴
AcOH	아세트산
Ac_2O	아세트산 무수물
ε-Ahx	ε-아미노 헥산산
AM	아미노메틸
BAL	백본 아미드 링커
BSA	소 혈청 알부민
Boc	*tert*-부틸옥시카르보닐
Bzl	벤질
DCM	디클로르메탄
DIC	*N,N'*-디이소프로필카르보디이미드
DIPEA	*N,N'*-디이소프로필에틸아민
DMA	*N,N'*-디메틸아세트아미드
DMF	*N,N'*-디메틸포름아미드
DMSO	디메틸술폭시드
DTT	디티오트레이톨
DVB	디비닐벤젠
EDT	에탄디티올
FA	포름산
Fmoc	9-플루오레닐메틸옥시카르보닐
HATU	2-(1H-9-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트
HBSS	행크 완충 염 용액
HCTU	2-(6-클로로-1H-벤조트리아졸-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트

[0529]

HEPES	4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산
HFIP	헥사플루오로이소프로판올
HOAt	1-히드록시-7-아자벤조트리아졸
HSA	인간 혈청 알부민
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
HRMS	고해상도 질량 분광측정법
ivDde	(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥스-1-일리덴)-3-메틸부틸
LN	로가리트무스 나투랄리 (자연 로그)
MeOH	메탄올
MS	질량 분광측정법
Nal	2-나프틸알라닌
Nle	노르류신
NMP	N-메틸피롤리딘
옥시마 퓨어	에틸 2-시아노-2-(히드록시이미노)아세테이트
Pbf	2,2,4,6,7-펜타메틸디히드로벤조푸란-5-술포닐
*p*E	피로글루타메이트
PG	보호기
PBS	포스페이트 완충 염수
Ph	페닐
PhP	페닐프롤린
Pip	피페콜산
Pol	중합체성 지지체
PS	폴리스티렌
rt	실온
SEC	크기 배제 크로마토그래피
SPPS	고체 상 펩티드 합성
TBME	*tert*-부틸메틸에테르
TCEP	트리스(2-카르복시에틸)포스핀
*t*BuOH	*tert*-부탄올

[0530]

TFA	트리플루오로아세트산
THF	테트라히드로푸란
TIS, TIPS	트리이소프로필실란
t_R	체류 시간
Trt	트리틸
UPLC	초고성능 액체 크로마토그래피
UV	자외선

[0531]

[0532] 펩티드는 표준 고체 상 Fmoc 화학에 의해 합성하였다. 펩티드는 프렐류드(Prelude)™ 펩티드 합성기 (프로테인 테크놀로지스, 인크.(Protein Technologies, Inc.), 미국 투산) 및 리버티(Liberty) 마이크로웨이브 펩티드 합성기 (CEM 코포레이션(CEM Corporation), 미국 노스캐롤라이나) 상에서 어셈블리시켰다. C-말단 상에 유리 카르복실산 또는 C-말단 상에 N,N-이치환 카르복스아미드를 갖는 펩티드는 2-클로로트리틸 클로라이드-PS-수지 (ABCR, 독일 카를스루에 또는 아나스펙, 인크.(AnaSpec, Inc.), 미국 캘리포니아)로부터 합성하였다. C-말단 상에 비치환 카르복스아미드를 갖는 펩티드는 Fmoc 보호된 링크-아미드-AM-PS-수지 (머크(Merck), 독일 다름슈

타트)로부터 합성하였다. C-말단 상에 N-일치환 카르복스아미드를 갖는 펩티드는 아민이 로딩된 BAL-AM-PS-수지 (EMC 마이크로콜렉션스(EMC Microcollections), 독일 튀빙겐)로부터 합성하였다.

[0533] 펩티드를 정제용 역상 HPLC에 의해 정제하였다. 하기 칼럼을 사용하였다:

[0534] • 워터스 선파이어(Waters SunFire) 정제용 C18 OBD 칼럼, 5 μm, 30x100 mm, 파트 번호 186002572 (1개의 칼럼 또는 직렬형 2개의 칼럼)

[0535] • 워터스 아틀란티스(Waters Atlantis) 정제용 OBD T3 칼럼, 5 μm, 30x150 mm, 파트 번호 186003703

[0536] • 워터스 선파이어 정제용 C18 OBD 칼럼, 5 μm, 30x50 mm, 파트 번호 186002572

[0537] 이동상은 용리액 A (H_2O 중 0.1% TFA) 및 용리액 B (ACN)로 이루어졌다. 구배는 분리 문제의 특정 요건을 기반으로 하여 설계하였다. 순수한 생성물을 ACN/H_2O로부터 동결건조시켰다.

[0538] 생성물은 λ=214 nm에서 UV 검출을 사용하는 분석용 HPLC 및 전기분무 이온화를 사용하는 UPLC-MS에 의해 분석하였다.

[0539] 표 4에 예시된 펩티드를 하기 기재된 일반적 절차를 사용하여 합성하였다. 비치환 N- 또는 C-말단은 각각 이탤릭체 *H-* 또는 *-OH*로 나타낸다.

[0540] <표 4>

실시예	서열
실시예 1	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 2	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(페네틸)*
실시예 3	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
실시예 4	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
실시예 5	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
실시예 6	Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 7	Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 8	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
실시예 9	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(페네틸)*
실시예 10	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
실시예 11	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(페네틸)*
실시예 12	Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 13	Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 14	Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 15	Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 16	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 17	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 18	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
실시예 19	Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 20	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 21	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 22	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 23	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 24	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 25	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH_2*
실시예 26	*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
실시예 27	*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*

[0541]

실시예 28	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
실시예 29	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
실시예 30	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(*페네틸*)*
실시예 31	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(*페네틸*)*
실시예 32	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(*페네틸*)*
실시예 33	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 34	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*
실시예 35	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 35	*H*-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
실시예 36	*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
실시예 37	*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
실시예 38	*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

[0542]

[0543] 여기서 "*"로 표지된 2개의 아미노산은 그의 측쇄를 통해 디술피드 또는 아미드 결합을 형성하는 아미노산을 나타낸다.

[0544] 분석 방법

[0545] 1a) HPLC - 분석 방법 A

[0546] • 칼럼: 워터스 엑스브리지(Waters Xbridge)™ C18 (50x4.0 mm), 3.5 μm; 파트 번호: 186003031

[0547] • 용리액 A: 물 중 0.07% TFA / 용리액 B: ACN 중 0.1% TFA

[0548] • 유량: 1.5 ml/분

[0549] • 온도: 40℃

[0550] • 구배:

시간 [분]	A [%]	B [%]
0.0	95	5
10.0	0	100
12.0	0	100
12.2	95	5

[0551]

[0552] 1b) HPLC - 분석 방법 B

[0553] • 칼럼: 엑스브리지 BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 μm; 파트 번호: 186003612

[0554] • 용리액 A: 물 중 0.1% TFA / 용리액 B: ACN 중 0.1% TFA

[0555] • 유량: 1.0 ml/분

[0556] • 온도: 40℃

[0557] • 구배:

시간 [분]	A [%]	B [%]
0.0	98	2
18	2	98
20	2	98
22	98	2

[0558]

[0559] 2a) UPLC-MS - 분석 방법 C

[0560] • 칼럼: 액퀴티(Acquity) UPLC® BEH300 C18 (50x2.1 mm), 1.7 μm; 파트 번호: 186003685

[0561] • 용리액 A: 물 중 0.05% TFA / 용리액 B: ACN 중 0.04% TFA

[0562] • 유량: 1.0 ml/분

[0563] • 온도: 80℃

[0564] • 구배:

시간 [분]	A [%]	B [%]
0.0	100	0
0.2	100	0
4.4	2	98
4.8	2	98
4.9	100	0
5.0	100	0

[0565]

[0566] 2b) UPLC-HRMS - 분석 방법 D

[0567] • 워터스 액퀴티 UPLC® BEH C18, 1.7 μm, 2.1x50 mm; 파트 번호: 186002350

[0568] • 용리액 A: 물 중 0.05% FA +3.75 mM 아세트산암모늄; 용리액 B: ACN 중 0.04% FA

[0569] • 유량: 1.0 ml/분

[0570] • 온도: 50℃

[0571] • 구배: 4.4분 내에 2에서 98%

[0572] 3) 분석 방법 E:

[0573] • 엑스브리지 C18 칼럼, 3.5 μm, 3.0 x 30 mm

[0574] • 용리액: A: 물 (0.1% 포름산); B: CAN

[0575] • 유량: 2 mL/분

[0576] • 구배: 0분 40% B; 1.70분 내에 40%에서 95% B; 2.0분 95% B; 2.1분 40%B

[0577] • 질량 분광계: 단일 사중극자 ESI 스캔 범위 150-1600

[0578] • HPLC: 애질런트 1100 시리즈

[0579] • 온도: 40℃

[0580] 3) 분석 방법 F:

[0581] • 액퀴티 BEH 1.7μm 2.1x50mm

[0582] • 용리액: A: 물 (0.1% 포름산); B: ACN (0.1% 포름산)

[0583] • 유량: 1 mL/분

[0584] • 구배: 0분 2% B; 1.7분 내에 2%에서 98% B; 2.06분 98% B; 2.16분 2% B

[0585] • 질량 분광계: 단일 사중극자 ESI 스캔 범위 120-1600

[0586] • HPLC: 워터스 액퀴티

[0587] • 온도: 50℃

[0588] 3) 분석 방법 G:

[0589] • 액퀴티 BEH 1.7μm 2.1x50mm

[0590] • 용리액: A: 물 (0.1% 포름산); B: ACN (0.1% 포름산)

[0591] • 유량: 1 mL/분

[0592] • 구배: 0분 40% B; 1.40분 내에 40%에서 98% B; 2.05분 98% B; 2.1분 40%B

[0593] • 질량 분광계: 단일 사중극자 ESI 스캔 범위 120-1600

[0594] • HPLC: 워터스 액퀴티

[0595] • 온도: 50℃

[0596] 실시예 1 내지 38의 펩티드에 대한 분석 데이터를 표 5에 요약하였고, 이는 상기에 기재된 분석 방법을 사용하여 생성되었다.

[0597] <표 5>

	HPLC		질량 분광측정법				
펩티드	t_R [분]	방법	$[M+2H]^{2+}$ (측정치)	$[M+3H]^{3+}$ (측정치)	방법	$[M+2H]^{2+}$ (계산치)	$[M+3H]^{3+}$ (계산치)
실시예 1	3.48	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
실시예 2	3.66	A	735.4	490.6	C	735.4	490.6
실시예 3	3.60	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
실시예 4	2.65	A	683.4	455.9	C	683.4	455.9
실시예 5	3.95	A	782.4	521.9	C	782.4	521.9
실시예 6	3.49	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
실시예 7	3.55	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
실시예 8	2.85	A	719.3	479.9	C	719.4	479.9
실시예 9	3.75	A	742.4	495.3	C	742.4	495.3
실시예 10	3.55	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
실시예 11	3.57	A	686.9	458.3	C	686.9	458.2
실시예 12	3.51	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
실시예 13	3.54	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
실시예 14	3.46	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
실시예 15	3.44	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
실시예 16	3.59	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
실시예 17	3.61	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
실시예 18	7.60	B	775.391	517.263	D	775.385	517.256

[0598]

실시예 19	7.40	B	751.392	501.263	D	751.385	501.256
실시예 20	3.41	A	743.4	495.9	C	743.4	495.9
실시예 21	7.35	B	730.355	487.239	D	730.361	487.241
실시예 22	8.62	B	739.877	493.587	D	739.856	493.573
실시예 23	7.32	B	737.374	491.918	D	737.377	491.921
실시예 24	7.35	B	737.375	491.919	D	737.377	491.921
실시예 25	5.63	B	620.822	414.217	D	620.825	414.219
실시예 26	7.58	B	754.368	503.247	D	754.361	503.241
실시예 27	7.36	B	737.374	491.918	D	737.369	491.913
실시예 28	3.63	A	713.9	476.2	C	713.8	476.2
실시예 29	3.78	A	720.9	480.9	C	720.9	480.9
실시예 30	3.82	A	691.9	461.6	C	691.8	461.6
실시예 31	3.74	A	643.3	429.2	C	643.3	429.2
실시예 32	8.01	B	643.328	429.222	D	643.324	429.252
실시예 33	7.73	B	700.832	467.557	D	700.845	467.566
실시예 34	7.17	B	609.809	406.875	D	609.810	406.876

[0599]

실시예 35	8.99	B	710.351		D	710.332	473.890
실시예 35	6.89	B	568.289	379.196	D	568.292	379.197
실시예 36	7.69	B	724.843	483.564	D	724.837	483.558
실시예 37	6.62	B	715.848	477.568	D	715.843	477.562
실시예 38	8.28	B	728.873		D	728.869	

[0600]

[0601] 일반적 합성 절차

[0602] 1) 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 상 제1 아미노산의 로딩 및 Fmoc-제거

[0603] 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 (1 당량, 1.0-1. 6 mmol/g)를 DCM으로 완전히 세척하였다. 목적하는 아미노산 (수지에 대해 전형적으로 0.5-2 당량, 1.6 mmol/g 로딩을 고려함)을 DCM (수지 그램당 대략 10 mL) 및 DIPEA (수지에 대해 4 당량, 1.6 mmol/g 로딩을 고려함) 중에 용해시켰다. 용액을 수지에 첨가하고, 현탁액을 실온에서 3-16시간 동안 진탕시켰다. 수지를 배수시킨 다음, 순차적으로 DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), DCM, DMA, DCM으로 완전히 세척하였다.

[0604] Fmoc 제거 및 로딩의 결정을 위해, 수지를 피페리딘/DMA (1:4) 또는 4-메틸피페리딘/DMA (1:4) (초기 수지의 그램당 12 x 10 mL)와 함께 반복적으로 진탕시키고, DMA (초기 수지의 그램당 2 x 10 mL)로 세척하였다. 합한 용액을 MeOH로 초기 수지의 그램당 250 mL의 부피 V로 희석하였다. 이러한 용액의 2 mL 분취물 (V_a)을 MeOH로 추가로 250 mL (V_t)로 희석하였다. UV 흡수를 MeOH 참조에 대해 299.8 nm에서 측정하여 흡수 A를 제공하였다. 수지를 순차적으로 DMA, DCM, DMA, DCM으로 완전히 세척하고, 40℃에서 고진공 하에 건조시켜 수지 m g을 수득하였다.

[0605] 수지의 로딩을 하기 식에 따라 계산하였다:

[0606] 로딩 [mol/g] = (A x V_t x V)/(d x ε x V_a x m)

[0607] (d: 큐벳의 폭; ε = 7800 L mol^{-1} cm^{-1})

[0608] 2) 고체 상 펩티드 합성

[0609] 2a) 프렐류드™ 합성기 상에서의 합성 사이클 A

[0610] 수지를 DMA로 세척하였다. Fmoc를 피페리딘/DMA (1:4) 또는 4-메틸피페리딘/DMA (1:4)에 의한 반복 처리에 의해 제거하였다. 수지를 DMA로 세척하였다. Fmoc-아미노산 (3 당량; NMP 중 0.3 M 용액), HCTU (3 당량; NMP 중 0.3 M 용액), 및 DIPEA (4.5 당량; NMP 중 0.9 M 용액)의 첨가에 이어서 특정 요건에 따라 현탁액을 질소와 실온에서 전형적으로 15분 내지 4시간 동안 혼합하여 커플링을 수행하였다. DMA로 세척한 후에, 커플링 단계를 특정 요건에 따라 전형적으로 1 내지 3회 반복하였다. DMA로 세척한 후에, Ac_2O/피리딘/DMA (1:1:8)의 혼합물의 첨가에 이어서 현탁액을 실온에서 혼합하여 캡핑을 수행하였다. 수지를 DMA로 세척하였다.

[0611] 2a) 프렐류드™ 합성기 상에서의 합성 사이클 B

[0612] 수지를 DMA로 세척하였다. Fmoc를 4-메틸피페리딘/DMA (1:4)에 의한 반복 처리에 의해 제거하였다. 수지를 DMA로 세척하였다. Fmoc-아미노산 (3 당량; NMP 중 0.2 M 용액), HCTU (3 당량; NMP 중 0.3 M 용액), 및 DIPEA (3.3 당량; NMP 중 0.66 M 용액)의 첨가에 이어서 특정 요건에 따라 현탁액을 질소와 실온에서 전형적으로 15분 내지 4시간 동안 혼합하여 커플링을 수행하였다. DMA로 세척한 후에, 커플링 단계를 특정 요건에 따라 전형적으로 1 내지 3회 반복하였다. DMA로 세척한 후에, Ac_2O/피리딘/DMA (1:1:8)의 혼합물의 첨가에 이어서 현탁액을 실온에서 혼합하여 캡핑을 수행하였다. 수지를 DMA로 세척하였다.

[0613] 2b) 프렐류드™ 합성기 상에서의 합성 사이클 C

[0614] 수지를 DMA로 세척하였다. Fmoc를 피페리딘/DMA (1:4) 또는 4-메틸피페리딘/DMA (1:4)에 의한 반복 처리에 의해 제거하였다. 수지를 DMA로 세척하였다. Ac_2O/피리딘/DMA (1:1:8)의 혼합물의 첨가에 이어서 현탁액을 실온에서 혼합하여 캡핑을 수행하였다. 수지를 DMA로 세척하였다.

[0615] 2c) 리버티™ 합성기 상에서의 합성 사이클 D

[0616] 수지를 DMF 및 DCM으로 세척하였다. Fmoc를 20% 피페리딘/DMF에 의한 처리 (전형적으로 0.1 mmol당 7 ml 2회)에 의해 제거하였다. 수지를 DMF 및 DCM으로 세척하였다. Fmoc-아미노산 (5 당량; DMF 중 0.2 M 용액), HCTU (5 당량; DMF 중 0.5 M 용액), 및 DIPEA (10 당량; NMP 중 2 M 용액)의 첨가에 이어서 특정 요건에 따라 현탁액을 질소와 마이크로웨이브 전력 0 내지 20 와트 하에 75 또는 50℃에서 전형적으로 5 내지 50분 동안 혼합하여 커플링을 수행하였다. DMF로 세척한 후에, 특정 요건에 따라 커플링 단계를 1회 반복할 수 있다. 수지를 DMF로 세척하였다.

[0617] 3) 보호기 제거를 동반한 또는 동반하지 않은 수지로부터의 절단

[0618] 3a) 절단 방법 A

[0619] 수지 (0.1 mmol)를 95% 수성 TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (3 mL)와 실온에서 2시간 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하고, 새로운 용액을 첨가하였다 (3 mL). 현탁액을 실온에서 1시간 동안 진탕시킨 다음, 절단 용액을 여과하였다. 새로운 용액을 첨가하고 (3 mL), 현탁액을 실온에서 1시간 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하였다. 합한 절단 용액을 차가운 헵탄/디에틸 에테르 (1:1) (35 mL)의 혼합물에 천천히 부어 침전물을 제공하였다. 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 잔류물을 차가운 헵탄/디에틸 에테르 (1:1) (10-20 mL)로 세척하고, 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 이 단계를 1-2-회 수행하였다. 고체를 고 진공 하에 건조시켰다.

[0620] 3b) 절단 방법 B

[0621] 수지 (0.1 mmol)를 95% 수성 TFA//TIS/DTT (95:2.5:2.5) (3 mL)와 실온에서 3시간 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하였다. 수지를 95% 수성 TFA (1 mL)로 1회 헹구었다. 합한 절단 및 세척 용액을 차가운 헵탄/디에틸 에테르 (1:1) (10-15 mL)의 혼합물에 천천히 부어 침전물을 제공하였다. 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 디에틸 에테르 (10 mL)를 잔류물에 첨가하고, 현탁액을 3분 동안 볼텍싱하고, 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 세척 공정을 2회 반복하였다. 고체를 고 진공 하에 건조시켰다.

[0622] 3c) 절단 방법 C

[0623] HFIP/DCM (1:3) (3 mL)을 수지 (0.1 mmol)에 첨가하고, 현탁액을 실온에서 20분 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하고, 수집하였다. 이 절차를 2회 반복하였다. 마지막으로, 수지를 HFIP/DCM (1:3) (1 mL)으로 1회 세척하였다. 합한 절단 및 세척 용액을 진공 하에 농축 건조시켰다. 조 생성물을 ACN/H_2O로부터 동결건조시켰다.

[0624] 4) 디술피드 형성

[0625] 4a) 고리화 방법 A

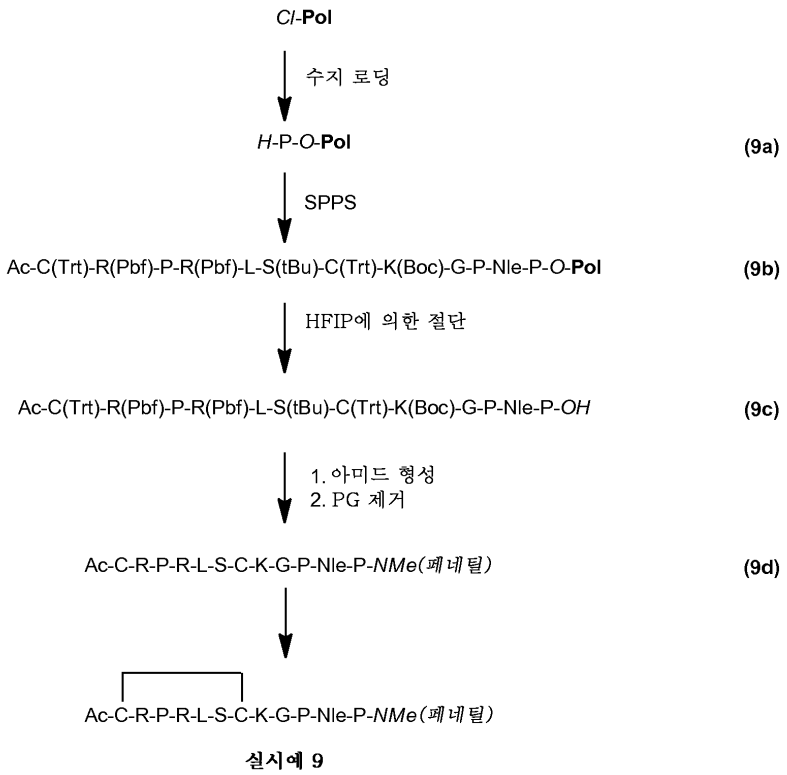
[0626] 완전히 탈보호된 선형 전구체 펩티드를 H_2O/DMSO (9:1) 또는 (4:1) 중에 용해시켜 전형적으로 0.5-7 mM의 농도를 제공하였다. 이어서, 반응 혼합물을 요건에 따라 실온에서 전형적으로 16-96시간 동안 교반한 다음, 고진공 하에 농축 건조시켰다.

[0627] 4b) 고리화 방법 B

[0628] 완전히 탈보호된 선형 전구체 펩티드 (1 당량)를 H_2O 중에 용해시켜 전형적으로 약 1-25 mM의 농도를 제공하였다. AcOH 중 50 mM I_2의 용액 (1-2 당량)을 첨가하고, 완전한 전환이 달성될 때까지 혼합물을 실온에서 교반하였다. H_2O 중 0.5 M 아스코르브산을 첨가하여 잉여량의 I_2를 켄칭시켰다.

[0629] 하기에 대표적인 예의 합성을 기재하였다.

[0630] 실시예 9 Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(페네틸) (디술피드 C^1-C^7)의 합성



실시예 9

[0631]

[0632] • 중간체 9a의 제조

[0633] (Fmoc-P-OH에 의한 2-클로로트리틸 클로라이드 수지의 로딩, Fmoc 제거 및 수지의 로딩의 결정)

[0634] 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 (2.00 g, 3.20 mmol)를 DCM (3x)으로 세척하였다. DCM (20 mL) 중 Fmoc-P-OH (1.08 g, 3.20 mmol)의 용액 및 DIPEA (2.24 mL, 12.8 mmol)를 첨가하고, 현탁액을 실온에서 3시간 동안 진탕시켰다. 수지를 DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x)으로 완전히 세척하였다.

[0635] 이어서 수지를 피페리딘/DMA (1:4)의 혼합물 (매회 12 mL)로 2분 동안 12회 처리하였다. 수지의 로딩의 결정을 위해 피페리딘/DMA 용액을 수집하였다 (일반적 절차 참조).

[0636] 수지를 DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x)으로 완전히 세척하고, 진공 하에 건조시켜 중간체 9a (2.25 g; 로딩 = 1.12 mmol/g)를 수득하였다.

[0637] • 중간체 9b의 제조

[0638] (선형 펩티드의 어셈블리)

[0639] 중간체 9a (89 mg, 0.10 mmol)를 프렐류드™ 펩티드 합성기 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 적용하였다. 커플링을 하기와 같이 수행하였다:

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간	합성 사이클
1	Nle	2 x 1 시간	B
2	P	2 x 30 분	B
3	G	2 x 1 시간	B
4	K(Boc)	2 x 30 분	B
5	C(Trt)	2 x 30 분	B
6	S(tBu)	2 x 30 분	B
7	L	2 x 30 분	B
8	R(Pbf)	4 x 1 시간	B
9	P	2 x 1 시간	B
10	R(Pbf)	4 x 1 시간	B
11	C(Trt)	2 x 1 시간	B
12	Ac	1 x 10 분	C

[0640]

[0641] • 중간체 9c의 제조

[0642] (수지로부터의 HFIP 절단)

[0643] HFIP/DCM (1:3) (3 mL)을 중간체 9b (0.100 mmol)에 첨가하고, 현탁액을 실온에서 20분 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하고, 수집하였다. 이 절차를 2회 반복하였다. 마지막으로 수지를 HFIP/DCM (1:3) (1 mL)으로 1회 세척하였다. 합한 절단 및 세척 용액을 진공 하에 농축 건조시켰다. 조 생성물을 ACN/H_2O로부터 동결건조시켜 중간체 9c (37.2 mg, 14.8 μmol)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0644] • 중간체 9d의 제조

[0645] (아미드 형성 및 보호기 제거)

[0646] 중간체 9c (37.0 mg, = 14.7 μmol) 및 TBTU (7.1 mg, 22.1 μmol)를 DCM (5 mL) 중에 용해시켰다. DIPEA (5.1 μl, 29.4 μmol)를 첨가하고, 용액을 실온에서 2분 동안 교반하였다. N-메틸-페네틸아민 (3.2 μl, 22.1 μmol)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 1시간 40분 동안 교반한 다음, EtOAc/n-부탄올 (9:1) (50 mL)과 5% 수성 $NaHCO_3$ (5 mL) 사이에 분배하였다. 유기 층을 5% 수성 $NaHCO_3$ (5 mL), 염수 (5 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축 건조시켰다.

[0647] 잔류물을 95% 수성 TFA/TIS/EDT (95:2.5:2.5) (5 mL) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반한 다음, 차가운 헵탄/에테르 (1:1) (35 mL)에 부었다. 현탁액을 원심분리하고, 용매를 가만히 따랐다. 잔류물을 차가운 디에틸에테르/헵탄 (1:1) (10 mL)으로 2회 세척한 다음 진공 하에 건조시켜 중간체 9d (27.0 mg, 14.7 μmol)를 베이지색 고체로서 수득하였다. 생성물을 정제 없이 후속 단계에 적용하였다.

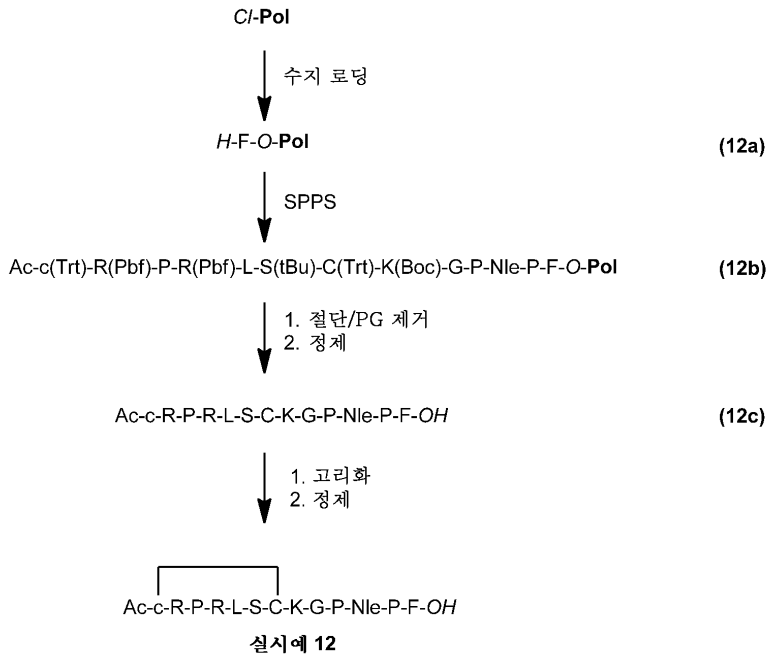
[0648] • 실시예 9의 제조

[0649] (디술피드 형성 및 정제)

[0650] 중간체 9d (26.9 mg, 14.7 μmol)를 H_2O (3.7 mL) 중에 용해시켰다 (용액은 약간 탁해졌음). AcOH 중 50 mM I_2의 용액 (0.353 mL, 17.6 μmol)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. H_2O 중 0.5 M 아스코르브산 (0.044 mL, 22.1 μmol)을 첨가하여 잉여량의 아이오딘을 켄칭시켰다. 용액을 약 3.5 mL로 농축시킨 다음, 정제용 역상 HPLC에 적용하였다. 분획을 동결건조시켜 실시예 9 (6.8 mg, 3.7 μmol)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0651] 순수한 생성물을 분석용 HPLC (분석 방법 A; t_R=3.75분) 및 UPLC-MS (분석 방법 C; 측정치: $[M+3]^{3+}$=495.3; 계산치: $[M+3]^{3+}$=495.3)에 의해 분석하였다.

[0652] 실시예 12 Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH* (디술피드 C^1-C^7)의 합성



실시예 12

[0653]

[0654] • 중간체 12a의 제조

[0655] (Fmoc-F-OH에 의한 2-클로로트리틸 클로라이드 수지의 로딩, Fmoc 제거 및 수지의 로딩의 결정)

[0656] 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 (10.0 g, 16.0 mmol)를 DCM (3x)으로 세척하였다. DCM (100 mL) 중 Fmoc-F-OH (12.4 g, 32.0 mmol)의 용액 및 DIPEA (11.2 mL, 64.0 mmol)를 첨가하고, 현탁액을 실온에서 5시간 동안 진탕시켰다. 수지를 DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x)으로 완전히 세척하였다.

[0657] 이어서, 수지를 피페리딘/DMA (1:4)의 혼합물 (매회 50 mL)로 2분 동안 12회 처리한 다음 DMA (2x)로 세척하였다. 수지의 로딩의 결정을 위해 피페리딘/DMA 용액 및 DMA 세척 용액을 수집하였다 (일반적 절차 참조).

[0658] 수지를 DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x)으로 완전히 세척하고, 진공 하에 건조시켜 중간체 12a (12.8 g; 로딩 = 0.79 mmol/g)를 수득하였다.

[0659] • 중간체 12b의 제조

[0660] (선형 펩티드의 어셈블리)

[0661] 중간체 12a (127 mg, 0.10 mmol)를 프렐류드™ 펩티드 합성기 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 적용하였다. 커플링을 하기와 같이 수행하였다:

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간	합성 사이클
1	P	2 x 1 시간	A
2	Nle	2 x 1 시간	A
3	P	2 x 1 시간	A
4	G	2 x 2 시간	A
5	K(Boc)	2 x 1 시간	A
6	C(Trt)	1 x 3 시간	A
7	S(tBu)	2 x 1 시간	A
8	L	2 x 1 시간	A
9	R(Pbf)	4 x 3 시간	A
10	P	2 x 2 시간	A
11	R(Pbf)	4 x 3 시간	A
12	c(Trt)	1 x 3 시간	A
13	Ac	1 x 20 분	C

[0662]

[0663] • 중간체 12c의 제조

[0664] (보호기 제거를 동반한 수지로부터의 절단 및 정제)

[0665] 중간체 12b (0.10 mmol)를 DCM (4x)으로 조심스럽게 세척하였다. 95% 수성 TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5)의 혼합물 (2 mL)을 첨가하고, 현탁액을 실온에서 2시간 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하고, 새로운 절단 용액 (2 mL)을 첨가하였다. 현탁액을 실온에서 1시간 동안 진탕시킨 다음, 절단 용액을 여과하였다. 새로운 용액 (2 mL)을 첨가하고, 현탁액을 실온에서 1시간 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하였다. 합한 절단 용액을 차가운 헵탄/디에틸 에테르 (1:1)의 혼합물 (30 mL)에 부어 침전물을 제공하였다. 혼합물을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 고체를 다시 차가운 헵탄/디에틸 에테르 (1:1) (10 mL)로 세척하고, 혼합물을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 고체를 진공 하에 건조시켰다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하고, 동결건조시켜 중간체 12c (53 mg, 0.029 mmol)를 수득하였다.

[0666] • 실시예 12의 제조

[0667] (고리화 및 정제)

[0668] 중간체 12c (53 mg, 0.029 mmol)를 H_2O/DMSO (9:1) (18 mL) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 40시간 동안 교반한 다음, 진공 하에 농축 건조시켰다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하고, 동결건조시켜 실시예 12를 백색 고체 (27.4 mg; 0.014 mmol)로서 수득하였다.

[0669] 순수한 생성물을 분석용 HPLC (분석 방법 A; t_R=3.51분) 및 UPLC-MS (분석 방법 C; 측정치: $[M+3]^{3+}$=505.3; 계산치: $[M+3]^{3+}$=505.3)에 의해 분석하였다.

[0670] 실시예 18 Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH* (디술피드 C^1-C^7)의 합성

[0671] 고체 지지체 상에서의 선형 펩티드 합성:

[0672] Fmoc-D-Phe-Wang 수지 (치환: 0.66mmol/g)를 표준 Fmoc 화학을 통한 수동 고체 상 펩티드 합성에 적용하였다. 0.3mmol 수지를 DMF 중에서 30분 동안 팽윤시키고; DMF를 배수시키고, 수지를 DMF 중 20% 피페리딘으로 30분 동안 처리하여 Fmoc 기를 제거하였다. 수지를 DMF로 3회 세척하고, 사전-활성화시킨 Fmoc 아미노산 용액 (Fmoc 아미노산/HBTU/HOBt/NMM=3:3:3:6당량)과 2시간 동안 커플링시켰다. 각각의 커플링 후에 커플링 효율을 체크하

기 위해 닌히드린 시험을 수행하였다.

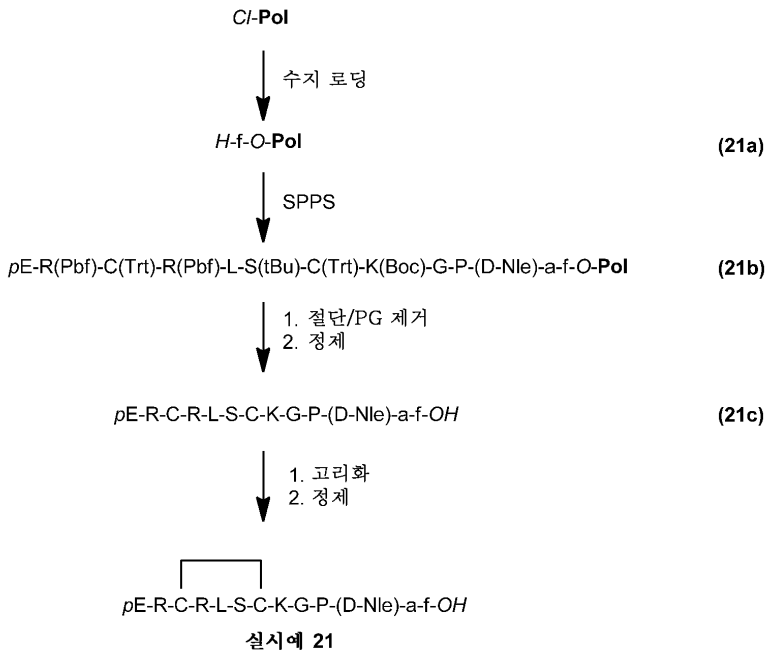
[0673] Fmoc 보호기의 반복적 제거 및 N-말단까지 보호된 아미노산의 커플링에 의해 펩티드 쇄를 수지 상에 어셈블리시켰다.

[0674] 마지막 아미노산의 커플링 후에, 펩티드 수지를 DMF 및 에틸 에테르로 세척하고, 진공 하에 건조시켰다. 측쇄 보호기의 절단 및 제거를 위해 건조된 펩티드 수지를 TFA 절단 칵테일 (TFA/티오아니솔/페놀/EDT/H_2O=87.5:5:2.5:2.5:2.5, v/v)로 처리하였다. 조 펩티드를 차가운 에테르로부터 침전시키고, 여과에 의해 수집하고, 고진공 하에 건조시켰다. 조 펩티드를 HPLC (칼럼: 2"-인치 델타 팩 C18, 파장: 215 nm) 상에서 정제하여 목적 생성물을 수득하였다.

[0675] 고리화:

[0676] 각각의 조 펩티드를 물-아세토니트릴 (A.C.S. 시약, 피셔(Fisher)) 중에 1mg/mL의 농도로 용해시키고 (약 80%:20%; 물: 아세토니트릴, V:V), 50% AcOH (A.C.S. 시약, 피셔)/H_2O 중 0.1 M I_2 (A.C.S. 시약, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich))를 상기 용액에 I_2 색이 지속될 때까지 격렬하게 교반하면서 적가하였다. 산화가 완료되면 (분석용 HPLC 및 질량 분광분석법에 의해 모니터링함), 1M L-아스코르브산 (A.C.S. 시약, 시그마 알드리치) 수용액을 계속 교반하면서 적가하여 수용액이 무색이 될 때까지 잉여량의 I_2를 환원시켰다. 여과한 후에, 상기 용액을 2-인치 C18 칼럼 (215nm에서 검출) 상에 로딩하고, TFA 완충제 (완충제 A, 물 중 0.1% TFA (A.C.S. 등급, 뉴제너레이션 테크놀로지, 엘엘씨(NuGeneration Technology, LLC)); 완충제 B, 100% 아세토니트릴)를 사용하여 정제하였고, >95%의 순도로 수집된 분획을 동결건조시켰다.

[0677] 실시예 21 pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH* (디술피드 C^3-C^7)의 합성



실시예 21

[0678]

[0679] • 중간체 21a의 제조

[0680] (Fmoc-f-OH에 의한 2-클로로트리틸 클로라이드 수지의 로딩, Fmoc 제거 및 수지의 로딩의 결정)

[0681] 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 (5.0 g, 8.01 mmol)를 상기 기재된 일반적 절차와 유사하게 DCM (50 mL) 중 Fmoc-f-OH (3.10 g, 8.01 mmol)의 용액 및 DIPEA (5.59 mL, 32.0 mmol)와 반응시켜 중간체 21a (5.87 g, 로딩 = 0.897 mmol/g)를 수득하였다.

[0682] • 중간체 21b의 제조

[0683] (선형 펩티드의 어셈블리)

[0684] 중간체 21a (0.100 mmol)를 리버티™ 마이크로웨이브 펩티드 합성기 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 적용하였다. 커플링을 하기와 같이 수행하였다:

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간	온도 ℃	마이크로웨이브 전력	합성 사이클
1	a	1 x 7.5 분	50	20	D
2	D-Nle	1 x 7.5 분	50	20	D
3	P	1 x 7.5 분	50	20	D
4	G	1 x 7.5 분	50	20	D
5	K(Boc)	1 x 7.5 분	50	20	D
6	C(Trt)	1 x 2 분	50	0	D
		1x 4 분	50	25	
7	S	1 X 7.5 분	50	25	D
8	L	1 x 7.5 분	50	25	D
9	R(Pbf)	2 x 42 분	50	0	D
		2 x 7.5 분	50	25	
10	C(Trt)	1 x 2 분	50	0	D
		1x 4 분	50	25	
11	R(Pbf)	2 x 42 분	50	0	D
		2 x 7.5 분	50	25	
12	*p*E	1 x 7.5 분	50	25	D

[0685]

[0686] • 중간체 21c의 제조

[0687] (보호기 제거를 동반한 수지로부터의 절단에 이은 정제)

[0688] 95% 수성 TFA/EDT/DTT (95:2.5:2.5)의 혼합물 (2 mL)을 중간체 21b (0.1 mmol)에 첨가하였다. 현탁액을 실온에서 2시간 동안 진탕시킨 다음, 절단 용액을 여과하였다. 이어서 수지를 95% 수성 TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (2 mL)로 다시 처리하고, 실온에서 1시간 동안 진탕시키고, 여과하였다. 합한 절단 및 세척 용액을 차가운 헵탄/디에틸 에테르 (1:1)의 혼합물 (11 mL)에 부어 침전물을 제공하였다. 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 디에틸 에테르 (10mL)를 잔류물에 첨가하고, 현탁액을 3분 동안 볼텍싱하고, 원심분리하고, 상청액을 따라내고, 세척 공정을 2회 반복하였다. 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 물질을 정제용 HPLC에 의해 정제하고, ACN/H_2O로부터 동결건조시켜 중간체 21c (55 mg, 0.030 mmol)를 수득하였다.

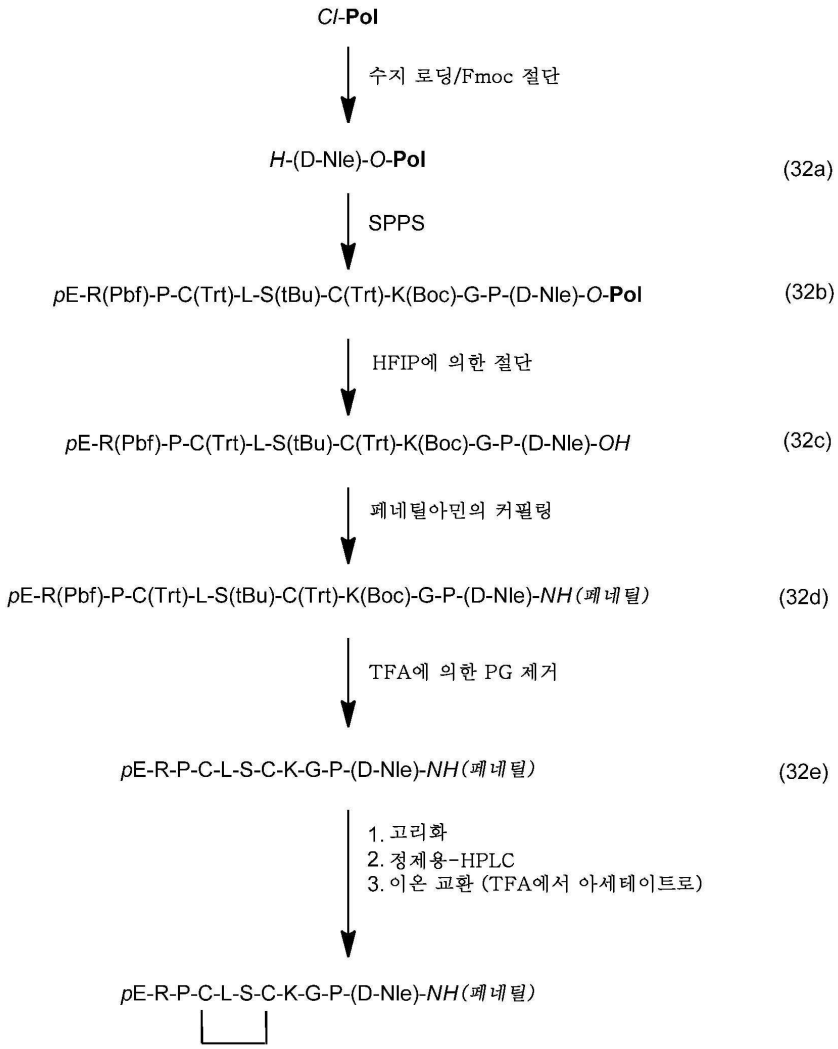
[0689] • 실시예 21의 제조

[0690] (고리화 및 정제)

[0691] 중간체 21c (18 mg, 9.97 μmol)를 H_2O (1.0 mL) 중에 용해시켰다. AcOH 중 50 mM I_2의 용액 (0.24 mL, 12 μmol)을 교반 용액에 1 부분으로 첨가하고, LCMS가 반응의 완결을 나타낼 때까지 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. H_2O 중 0.5 M 아스코르브산 (24 μmol, 12 μmol)을 첨가하여 잉여량의 I_2를 켄칭시켰다. 조 물질을 정제용 HPLC에 의해 정제하고, ACN/H_2O로부터 동결건조시켜 실시예 21을 백색 고체 (12 mg, 6.32 μmol)로서 수득하였다.

[0692] 순수한 생성물을 분석용 HPLC (분석 방법 B; t_R=7.35분) 및 UPLC-HRMS (분석 방법 D; 측정치: $[M+2H]^{2+}$=730.355; 계산치: $[M+2H]^{2+}$=730.361)에 의해 분석하였다.

[0693] 실시예 32 pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸) (디술피드 C^4-C^7) 아세테이트의 합성



실시예 32

[0694]

[0695] • 중간체 32a의 제조

[0696] (Fmoc-D-Nle-OH에 의한 2-클로로트리틸 클로라이드 수지의 로딩, Fmoc 제거 및 수지의 로딩의 결정)

[0697] 2-클로로트리틸 클로라이드 수지 (50.0 g, 85.0 mmol)를 DCM (400 mL) 중에 현탁시키고, 현탁액을 10분 동안 교반한 다음, 용매를 배수시키고, 수지를 DCM (3 x 200 mL)으로 세척하였다. 이어서, DCM (120.0 mL) 중 Fmoc-D-Nle-OH (24.0 g, 68.0 mmol) 및 DIPEA (96.5 ml, 552.5 mmol)의 용액을 수지에 첨가하고, 현탁액을 질소로 플러싱하고, 실온에서 5분 동안 교반하였다. DIPEA의 또 다른 부분 (22.7 ml, 127.5 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다.

[0698] 반응 혼합물을 배수시키고, 수지를 DCM (3 x 250 mL)으로 매회 2분 동안 세척하였다. 수지를 DCM/MeOH/DIPEA (70:15:15)의 혼합물 (2 x 250 mL)로 매회 10분 동안 켄칭시켰다.

[0699] 수지를 피페리딘/DMF (1:3) (1 x 300 mL)로 5분 동안 처리하여 Fmoc 기를 절단한 다음, 수지를 15분 동안 배수시키고 (1 x 300 mL), 이어서 세척 단계를 행하였다: DMF (6 x 250 mL, 매회 2분), 이소프로판올 (2 x 250 mL, 매회 2분) 및 TBME (6 x 250 mL, 매회 2분). 수지를 진공 하에 35℃에서 24시간 동안 건조시켜 중간체 32a (57.8 g, 로딩 = 1.08 mmol/g)를 수득하였다.

[0700] • 중간체 32b의 제조

[0701] (선형 펩티드의 어셈블리)

[0702] 중간체 32a (18.5 g, 20.0 mmol)를 자동 펩티드 합성기 (CSBIO536™) 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 적용하였다. 커플링 사이클을 다음과 같이 규정하였다:

[0703] • 아미노산 커플링: AA (3.0 당량), DIC (3.0 당량), HOBt (3.0 당량), DMF (하기 표 참조)

[0704] • 세척: DMF (4 x 150 mL, 매회 2분).

[0705] • Fmoc 탈보호: 피페리딘/DMF (1:3) (5분 동안 150 mL에 이어서 15분 동안 150 mL).

[0706] • 세척: DMF (6 x 150 mL, 매회 2분).

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간	커플링 방법
1	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1 x 120 분	DIC/HOBt

[0707]

[0708] 펩티드의 어셈블리 후에, 수지를 DMF (6 x 150 mL, 매회 2분), 이소프로판올 (6 x 150 mL, 매회 2분) 및 TBME (6 x 150 mL, 매회 2분)로 세척하였다. 펩티드 수지를 고진공 하에 35℃에서 밤새 건조시켜 중간체 32b (57.6 g, 20.0 mmol)를 수득하였다.

[0709] • 중간체 32c의 제조

[0710] (수지로부터의 HFIP 절단)

[0711] 중간체 32b의 일부 (27 g, 9.37 mmol)를 DCM (300 mL) 중에 현탁시키고, 15분 동안 교반하였다. 수지를 배수시킨 다음 HFIP/DCM (3:7) (3 x 270 mL, 매회 15분)으로 처리하였다. 절단 용액을 여과하고, 수집하였다. 수지를 DCM (3 x 300 mL)으로 세척하였다. 합한 절단 및 세척 용액을 진공 하에 농축 건조시켰다. 백색 분말을 진공 하에 35℃에서 밤새 건조시켜 중간체 32c-배치1 (23.5 g, 9.37 mmol)을 수득하였다.

[0712] 상기 언급된 절차를 또 다른 일부의 중간체 32b (28.0 g, 9.72 mmol)로 반복하여 중간체 32c-배치2 (26.1 g, 9.72 mmol)를 수득하였다.

[0713] • 중간체 32d의 제조

[0714] (페네틸아민의 용액 상 커플링)

[0715] 중간체 32c-배치2 (20.0 g, 7.44 mmol, 1.0 당량) 및 HATU (5.23 g, 13.8 mmol, 1.85 당량)를 DMF (400 mL) 중에 용해시켰다. DMF (60 mL) 중 페네틸아민 (1.67 g, 13.8 mmol, 1.85 당량) 및 DIPEA (3.56 g, 27.6 mmol, 3.71 당량)의 용액을 첨가하였다.

[0716] 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반한 다음, 0℃로 냉각시키고, 이어서 염수 (460 mL)를 첨가하였다. 현탁액을 10분 동안 교반한 다음, 생성물을 여과에 의해 단리시켰다. 필터 케이크를 H_2O (300 mL)로 세척하고, 이

어서 조심스럽게 제거하고, DCM (300 mL) 중에 용해시켰다. 용액을 $MgSO_4$ 상에서 건조시킨 다음, 진공 하에 농축 건조시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 상에서 플래쉬 크로마토그래피 (용리액: DCM 및 DCM/iPrOH (8:2))에 적용하여 중간체 32d-배치1 (14.4 g, 6.6 mmol)을 수득하였다.

[0717] 플래쉬 크로마토그래피는 제외하고 동일한 절차를 중간체 32c-배치1 (23.4 g, 9.37 mmol)로 반복하여, 중간체 32d-배치2 (28.0 g, 9.37 mmol)를 수득하였다.

[0718] • 중간체 32e의 제조

[0719] (보호기 제거)

[0720] 중간체 32d-배치2 (28.0 g, 9.37 mmol)를 TFA/DCM/EDT/TIS (90:5:2.5:2.5) (290mL) 중에 용해시키고, 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다.

[0721] 절단 용액을 여과하고, 차가운 TBME (3 L) (0-4℃)에 부었다. 혼탁한 현탁액을 빙수조에서 30분 동안 교반한 다음, 세공 4 유리 필터를 통해 여과하였다. 이와 같이 하여 수득한 백색 고체를 TBME (2 x 100 mL)로 세척한 다음, 진공 하에 35℃에서 밤새 건조시켜 중간체 32e-배치1 (8.9 g, 5.9 mmol)을 수득하였다.

[0722] 동일한 절차를 중간체 32d-배치1 (14.4 g, 6.6 mmol)로 반복하여 중간체 32e-배치2 (9.6 g, 6.3 mmol)를 수득하였다.

[0723] • 실시예 32)의 제조

[0724] 1) 고리화

[0725] 중간체 32e (5.0 g, 3.3 mmol)를 물 (500mL) 중에 용해시켰다. 아세트산 (93 mL) 중 아이오딘 (1.18 g, 4.66 mmol, 1.41 당량)의 용액을 1 부분으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 물 (5.8 mL) 중 아스코르브산 (1.03 g, 5.83 mmol, 1.77 당량)의 용액을 첨가하고, 반응 혼합물을 10분 동안 교반하고, 여과하고, 정제할 때까지 4℃에서 저장하였다.

[0726] 중간체 32e 18.3 g (12.1 mmol)이 가공될 때까지 동일한 고리화 절차를 반복하였다.

[0727] 2) 정제

[0728] 시클릭 펩티드의 용액을 주입당 0.5-5.0 g 펩티드의 부분으로 정제용 HPLC에 적용하였다. 95% 초과의 순도를 갖는 분획을 풀링하고 동결 건조시켜 총량 4.89 g (3.2 mmol)의 정제된 펩티드 (TFA 염)를 수득하였다.

[0729] 3) 이온 교환에 의한 아세테이트 형성

[0730] 강력한 음이온 교환체 수지 (이온 교환체 III, 머크) 75 g (100 mL)을 그의 OH^- 형태로 소결 유리 필터 (기공률 3)에 넣은 다음, 아세트산/물 (1:3)의 용액 (300 mL)을 첨가하고, 현탁액을 수동으로 2분 동안 교반한 다음, 수지를 배수시켰다. 과정을 아세트산/물 (1:3)의 또 다른 일부 (300 mL)와 함께 반복하였다. 중성 배수가 관찰될 때까지 수지를 탈이온수로 세척하였다. 이어서, 수지를 소결 유리 필터 (기공률 3)가 구비된 4 x 20 cm 칼럼으로 옮겼다.

[0731] 정제된 펩티드 4.8 g을 탈이온수 (50 mL) 중에 용해시키고, 칼럼에 첨가하였다. 생성물을 탈이온수 (200 mL)로 용리시켰다. TLC 스팟팅에 의해 생성물 용리의 제어를 수행하고, 풍부한 분획을 풀링하고, 동결 건조시켜 실시예 32 (4.1 g, 2.9 mmol)를 수득하였다.

[0732] 순수한 생성물을 분석용 HPLC (분석 방법 B; t_R=8.01분) 및 UPLC-HRMS (분석 방법 D; 측정치: $[M+2H]^{2+}$=643.328; 계산치: $[M+2H]^{2+}$=643.324)에 의해 분석하였다. 아세테이트 함량은 7.99-8.27%였고, 물 함량은 1.94-1.96%였다.

[0733] 다른 실시예를 유사하게 합성하였다:

[0734] • 실시예 1 내지 8, 10, 11, 13 내지 17, 20, 28 내지 31을 실시예 12와 유사하게 합성하였다.

[0735] • 실시예 19, 26, 27, 36-38을 실시예 18과 유사하게 합성하였다.

[0736] • 실시예 22-25, 33-35를 실시예 21과 유사하게 합성하였다.

[0737] 생체접합체 실시예:

[0738] 실시예 39: PPA가 3-(피리딘-2-일디술파닐)프로판산인 알부민-PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)페네틸아민

[0739] 단계 1: 알부민 탈캡핑

[0740] • TCEP에 의한 탈캡핑

[0741] 15 mL 튜브 내의 PBS 1x 완충제 10 mL 중 알부민 (500 mg, 알드리치, 동결건조 분말, 인간 혈청으로부터의 것)의 용액에 TCEP 히드로클로라이드 용액 (생물-등급 정제수 중 1.074 mg)을 1회 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 1시간 동안 진탕시킨 다음, 탈염시키고, 2개의 아미콘 울트라-4(Amicon Ultra-4) 원심분리 필터 (30K MWCO)로 세척하였다. 필터를 4K g에서 40분 동안 회전시키고, 여과물을 버렸다. 생물-등급 정제수 3 mL를 각각의 세척을 위해 각 필터에 첨가하고 (14K g에서 10분 동안 회전시킴) 세척 공정을 3회 반복하였다. 탈캡핑된 HSA를 물 (총 ~20 mL) 중에 용해시켰다. 용액을 50 mL 팔콘 튜브로 옮기고, 동결건조시켜 결정질 분말 (500mg)을 수득하였다.

[0742] 순수한 생성물을 UPLC-MS (분석 방법 F; 측정치: 66439.0; 예상치: 66437)에 의해 분석하였다.

[0743] • 탈캡핑된 HSA에서 유리 티올 기의 수의 결정

[0744] 2 mL 튜브 내의 PBS pH 7.4 400 μL 중 이러한 탈캡핑된 HSA (2 mg)의 용액에 물 중 6-말레이미도헥산산 (13 μg) 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 2시간 동안 진탕시켰다. UPLC-MS (분석 방법 G)는 오직 1-부가물 형성, 측정치: 66649.0; 예상치: 66648을 나타내었다.

[0745] • DTT에 의한 탈캡핑

[0746] 15 mL 튜브 내의 PBS 1x 완충제 5 mL 중 알부민 (400 mg, 알드리치, 동결건조 분말, 인간 혈청으로부터의 것)의 용액에 DTT 용액 (0.232 μl, 생물-등급 정제수 중 2mg/mL)을 1회 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 2시간 동안 진탕시킨 다음, 탈염시키고, 20개의 아미콘 울트라-0.5 원심분리 필터 (10K MWCO)로 세척하였다. 필터를 14K g에서 10분 동안 회전시키고, 여과물을 버렸다. 생물-등급 정제수를 각각의 세척을 위해 각 필터의 상부에 첨가하고 (14K g에서 10분 동안 회전시킴) 세척 공정을 6회 반복하였다. 탈캡핑된 HSA를 물 (총 ~20 mL) 중에 용해시켰다. 용액을 50 mL 팔콘 튜브로 옮기고, 동결건조시켜 결정질 분말 (376 mg)을 수득하였다.

[0747] 순수한 생성물을 UPLC-MS (분석 방법 G; 측정치: 66438.5; 예상치: 66437)에 의해 분석하였다.

[0748] • 탈캡핑된 HSA에서 유리 티올 기의 수의 결정

[0749] 2 mL 튜브 내의 PBS pH 7.4 400 μL 중 이러한 탈캡핑된 HSA (3 mg)의 용액에 물 중 3-말레이미도프로피온산 (25 μg) 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 밤새 진탕시켰다. UPLC-MS (분석 방법 G)는 오직 1-부가물 형성, 측정치: 66608.0; 예상치: 66606을 나타내었다.

[0750] • 시스테인에 의한 탈캡핑

[0751] 2 mL 튜브 내의 50 mM PBS 완충제 pH 8.0 1 mL 중 알부민 (120 mg, 알드리치, 동결건조 분말, 인간 혈청으로부터의 것)의 용액에 시스테인 (10.94 mg)을 1회 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 1시간 동안 진탕시킨 다음, 탈염시키고, 2개의 아미콘 울트라-0.5 원심분리 필터 (10K MWCO)로 세척하였다. 필터를 14K g에서 10분 동안 회전시키고, 여과물을 버렸다. 생물-등급 정제수를 각각의 세척을 위해 각 필터의 상부에 첨가하고 (14K g에서 10분 동안 회전시킴) 세척 공정을 5회 반복하였다. 탈캡핑된 HSA를 물 (총 4 mL) 중에 용해시켰다. 용액을 15 mL 팔콘 튜브로 옮기고, 동결건조시켜 결정질 분말 (108 mg)을 수득하였다.

[0752] 순수한 생성물을 UPLC-MS (분석 방법 G; 측정치: 66439; 예상치: 66437)에 의해 분석하였다.

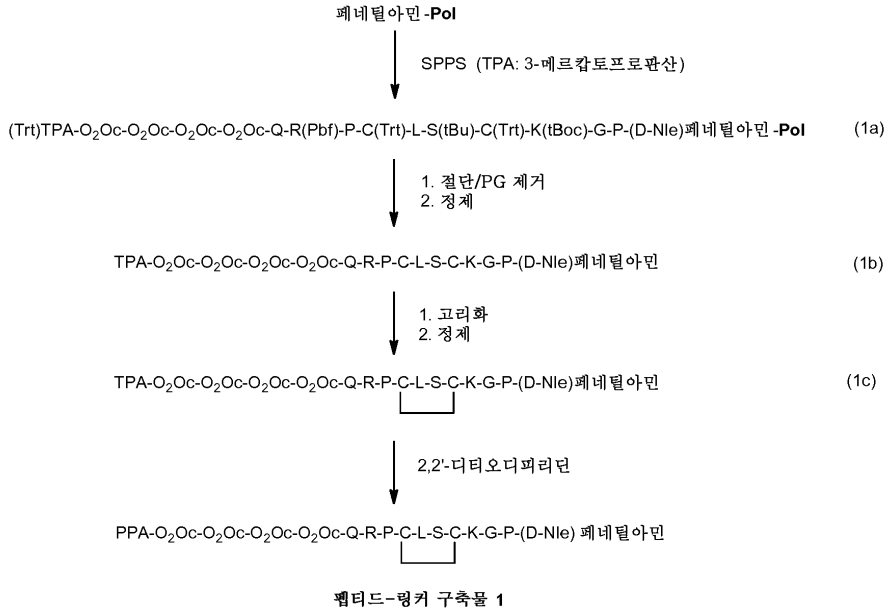
[0753] • 탈캡핑된 HSA에서 유리 티올 기의 수의 결정

[0754] 2 mL 튜브 내의 PBS pH 7.4 500 μL 중 이러한 탈캡핑된 HSA (3 mg)의 용액에 물 중 3-말레이미도프로피온산 (15 μg) 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 1시간 동안 진탕시켰다. UPLC-MS (분석 방법 G)는 오직

1-부가물 형성, 측정치: 66608.0; 예상치: 66606을 나타내었다.

[0755] 단계 2:

[0756] 펩티드-링커 구축물 1의 합성: PPA가 3-(피리딘-2-일디술파닐)프로판산인 PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)페네틸아민



펩티드-링커 구축물 1

[0757]

[0758] • 중간체 1a의 제조

[0759] (선형 펩티드의 어셈블리) O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)페네틸아민

[0760] • 페네틸아민-AMEBA 수지 (알드리치, 0.25 mmol)를 리버티™ 마이크로웨이브 펩티드 합성기 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 적용하였다. 커플링은 하기와 같이 수행하였다:

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간	온도 ℃	마이크로웨이브 전력
1	D-Nle	1 x 7.5 분	50	20
2	P	1 x 7.5 분	50	20
3	G	1 x 7.5 분	50	20
4	K(tBoc)	1 x 7.5 분	50	20
5	C(Trt)	1 x 2 분	50	0
		1x 4 분	50	25
6	S(tBu)	1 x 7.5 분	50	20
7	L	1 x 7.5 분	50	25
8	C(Trt)	1 x 2 분	50	0
		1x 4 분	50	25
9	P	1 x 7.5 분	50	25
10	R(Pbf)	2 x 42 분	50	0
		2 x 7.5 분	50	25
11	Q(Trt)	1 x 7.5 분	50	25
12	O2Oc	1 x 7.5 분	50	25
13	O2Oc	1 x 7.5 분	50	25
14	O2Oc	1 x 7.5 분	50	25
15	O2Oc	1 x 7.5 분	50	25
16	TPA(Trt)	1 x 7.5 분	50	25

[0761]

[0762] • 중간체 1b의 제조

[0763] (보호기 제거를 동반한 수지로부터의 절단에 이은 정제)

[0764] TFA/TIPS/물 (95:2.5:2.5) 6 mL 중 DTT 1.54 g 및 티오아니솔 0.75 mL로 제조된 용액을 중간체 1a (0.25 mmol)에 첨가하고, 현탁액을 실온에서 5시간 동안 진탕시켰다. 절단 용액을 여과하고, 수지를 95% 수성 TFA로 세척하였다. 합한 절단 및 세척 용액을 차가운 디에틸 에테르에 부어 침전물을 제공하였다. 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 디에틸 에테르를 잔류물에 첨가하고, 현탁액을 3분 동안 볼텍싱하고, 원심분리하고, 상청액을 따라내었다. 세척 공정을 3회 반복하였다. 고체를 고진공 하에 건조시켰다. 조 물질을 정제용 HPLC에 의해 정제하고, ACN/H_2O로부터 동결건조시켜 중간체 1b를 수득하였다.

[0765] • 중간체 1c의 제조

[0766] (고리화 및 정제)

[0767] 중간체 1b를 H_2O (2.0 mL) 중에 용해시켰다. AcOH 중 50 mM I_2의 용액 (1.3 당량)을 교반 용액에 1 부분으로 첨가하고, 용액을 실온에서 밤새 교반하였고, LC/MS는 반응의 완결을 나타내었다. H_2O 중 0.5 M 아스코르브산을 첨가하여 잉여량의 I_2를 켄칭시켰다. 조 물질을 정제용 HPLC에 의해 정제하고, ACN/H_2O로부터 동결건조시켜 중간체 1c를 수득하였다.

[0768] • 펩티드-링커 구축물 1 중간체 1c의 제조

[0769] ACN 중 중간체 1c, 2,2'-디티오디피리딘 (3당량)의 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 진탕시켰다. 반응 혼합물을 MeOH로 희석하고, 여과하였다. 용액을 정제용 HPLC에 의해 정제하고, ACN/H_2O로부터 동결건조시켜 펩티드-링커

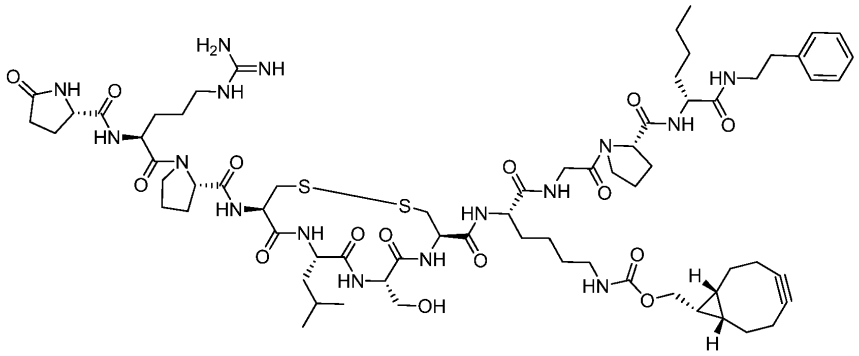
구축물 1을 수득하였다.

[0770] 단계 3: 펩티드-링커 구축물/ 알부민 접합

[0771] PBS 완충제 (6 mL) 중 탈캡핑된 HSA (100 mg)의 용액을 PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)페네틸아민의 용액 (물 중 2 당량)으로 처리하였다. 생성된 용액을 실온에서 1시간 동안 진탕시킨 다음, 탈염시키고, 4개의 아미콘 울트라-0.5 원심분리 필터 (10K MWCO)로 세척하였다. 필터를 13K g에서 10분 동안 회전시키고, 여과물을 버렸다. 생물-등급 정제수를 각각의 세척을 위해 각 필터의 상부에 첨가하고 (13K g에서 10분 동안 회전시킴) 세척 공정을 6회 반복하였다. 접합체를 물 (총 4 mL) 중에 용해시켰다. 용액을 15 mL 팔콘 튜브로 옮기고, 동결건조시켜 실시예 39를 수득하였다.

[0772] 실시예 40: BCN-PEG 링커를 통해 지방산에 접합된 아펠린 시클릭 펩티드:

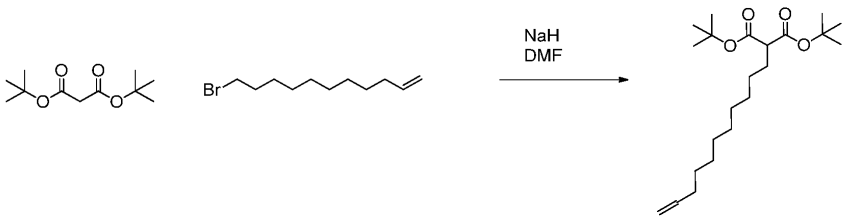
[0773] 단계 1: 아펠린 시클릭 펩티드-BCN 구축물의 제조: pE-R-P-C*-L-S-CP-N^6-[[(1α,8α,9α)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메톡시]카르보닐]-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸) [디술피드 C4-C7]의 제조



[0774]

[0775] DMF (1 mL) 중 pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸) 트리아세테이트 [디술피드 C4-C7] (실시예 32: 100 mg, 0.068 mmol), 중탄산나트륨 (38 mg, 0.452 mmol) 및 물 (83 uL)의 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반한 다음, (1R,8S)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메틸 숙신이미딜 카르보네이트 (베리 & 어소시에이츠(Berry & associates), 20 mg, 0.068 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 90분 동안 교반하였다. 물 1 mL를 혼합물에 첨가하고, 생성된 용액을 동결건조시켜 분말을 수득하였으며, 이를 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

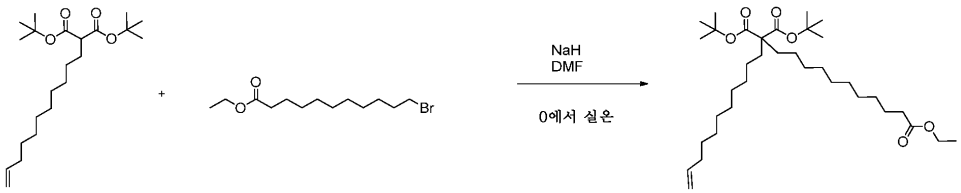
[0776] 단계 2: 디-tert-부틸 2-(운데스-10-인-1-일)말로네이트



[0777]

[0778] 디-tert-부틸 말로네이트 (800 mg, 3.70 mmol)를 0℃에서 N_2 하에 DMF (9 mL) 중에 용해시키고, NaH (148 mg, 3.70 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 0℃에서 30분 동안 교반하고, 11-브로모-데스-1-엔 (3.33 mmol)을 천천히 적가하여 황색 용액을 생성하였다. 반응물을 0℃에서 2시간 동안 교반한 다음, 실온으로 가온하고, 16시간 동안 교반하였다. 혼합물을 EtOAc (75 mL)에 녹이고, H_2O (25 mL)로 세척하였다. 수성 층을 EtOAc (75 mL)로 추출하고, 합한 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 혼합물을 플래쉬 칼럼 (12 g 실리카 카트리지, 0-20% EtOAc/헵탄)에 의해 정제하고, 분획을 농축시켜 목적 생성물을 수득하였다.

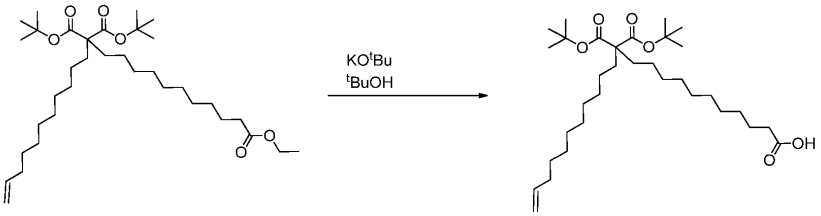
[0779] 단계 3: 11,11-디-tert-부틸 1-에틸 도코스-21-엔-1,11,11-트리카르복실레이트



[0780]

[0781] 단계 2로부터의 화합물 (0.442 mmol)을 0℃에서 DMF (2 mL) 중에 용해시키고, NaH (21.23 mg, 0.531 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 0℃에서 15분 동안 교반하고, 에틸 11-브로모운데카노에이트 (143 mg, 0.486 mmol)를 천천히 적가하였다. 반응물을 실온으로 가온하고, 16시간 동안 교반하였다. 혼합물을 EtOAc (40 mL)로 희석하고, H_2O (20 mL)로 1회 세척하였다. 수성 층을 EtOAc (40 mL)로 1회 추출하고, 유기 층을 합하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 샘플을 1 mL DCM 중에 용해시키고, 플래쉬 칼럼 (12 g 실리카 칼럼, 0-20% EtOAc/헵탄, 15분)에 의해 정제하였다. 분획을 합하고, 농축시켜 목적 생성물을 수득하였다.

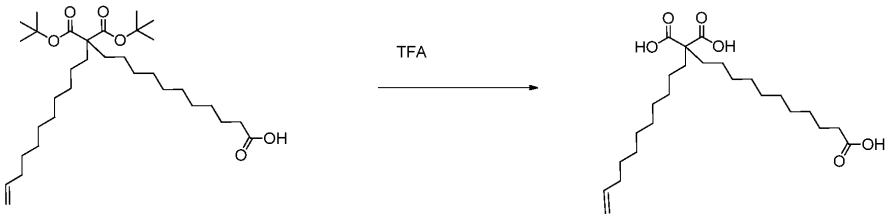
[0782] 단계 4: 12,12-비스(tert-부톡시카르보닐)트리코스-22-엔산



[0783]

[0784] ^{t}BuOH (1 mL) 중 단계 3으로부터의 화합물 (0.037 mmol)의 용액에 N_2 하에 30℃에서 ^{t}BuOH (2 mL) 중 KOtBu (114 mg, 1.012 mmol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 교반하고, TLC (1:1 EtOAc/헥산, $KMnO_4$, 환류)에 의해 모니터링하였다. 반응이 완결된 후에, 반응 혼합물을 1 M HCl (20 mL)로 켄칭하고, EtOAc (25 mL)로 2회 추출하였다. 유기 층을 합하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 물질을 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

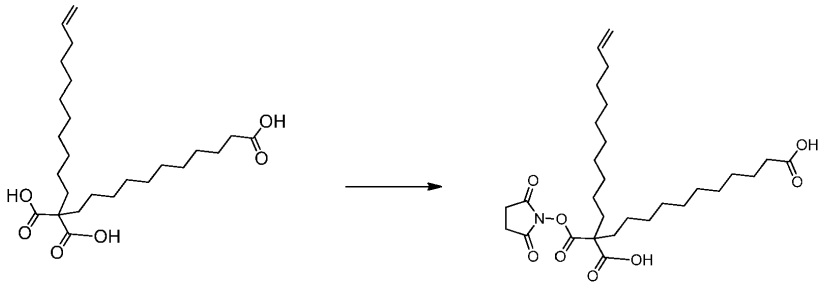
[0785] 단계 5: 도코스-21-엔-1,11,11-트리카르복실산



[0786]

[0787] TFA (2 mL)를 단계 4로부터의 화합물 (0.022 mmol)에 첨가하고, 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 DCM (10 mL)으로 희석하고, 농축시켰다. 물질을 EtOAc (10 mL)에 녹이고, H_2O (20 mL)로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 물질을 1 mL MeOH 중에 용해시키고, MS-유발된 HPLC (선파이어 30x50mm 5um 칼럼 ACN/H_2O w/ 0.1%TFA 75ml/분, 1.5ml 주입, 3.5분에 걸쳐 45-70% ACN)에 의해 정제하였다.

[0788] 단계 6: 2-(((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)카르보닐)-2-(운데스-10-엔-1-일)트리데칸디오산



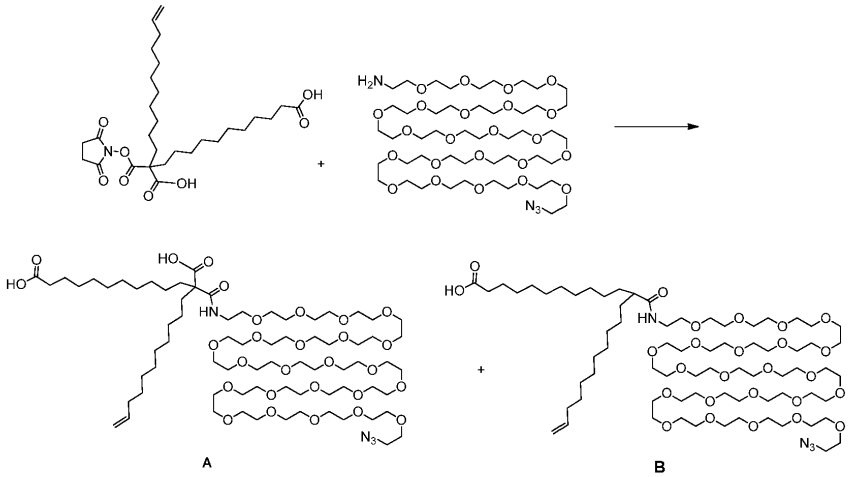
[0789]

[0790] DCM (2mL) 중 DCC (187mg, 0.908mmol)를 DCM (7mL) 및 THF (0.7mL) 중 N-히드록시숙신이미드 (99mg, 0.862mmol) 및 도코스-21-엔-1,11,11-트리카르복실산 (중간체 45: 400mg, 0.908mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응물을 밤새 교반한 후, 용매를 증발시켰다. 잔류물을 HPLC (선파이어 C18 30x50mm; 55-80% ACN / 물 +0.1% TFA)에 의해 정제하여 표제 화합물 (155mg, 0.288mmol, 32%)을 수득하였다:

LCMS 방법 E에 의해 Rt = 1.51min, M+H 538.3; ^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ ppm 1.16 - 1.46 (m, 28 H) 1.60 - 1.87 (m, 3 H) 1.91 - 2.17 (m, 5 H) 2.38 (t, *J*=7.03 Hz, 2 H) 2.86 (br. s., 4 H) 3.68 (dd, *J*=11.25, 7.34 Hz, 1 H) 3.78 (dd, *J*=11.31, 5.20 Hz, 1 H) 3.99 - 4.10 (m, 1 H).

[0791]

[0792] 단계 7: 지방산-PEG 링커



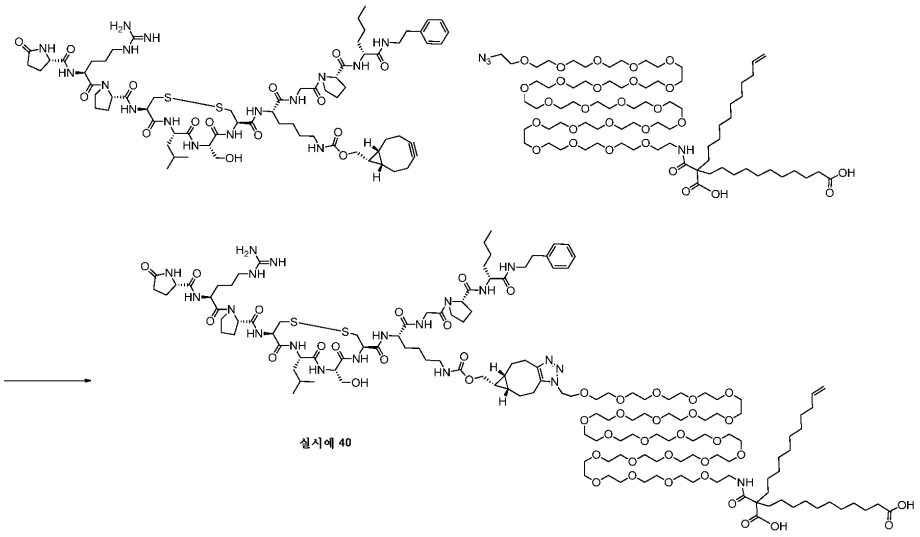
[0793]

[0794] 아지도-dPEG23-아민 (콴타 바이오디자인(Quanta Biodesign): 164mg, 0.149mmol) 및 단계 6으로부터의 화합물 (80mg, 0.149mmol)을 THF (2.5mL) 중에 용해시켰다. DIPEA (39μL, 0.233mmol)를 첨가하고, 반응물을 밤새 교반하였다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 HPLC (선파이어 C18 30x50mm; 45-70% ACN/물 +0.1% TFA)에 의해 정제하여 화합물 A (97mg, 0.061mmol, 41%) 및 B (32mg, 0.021mmol, 14%)를 수득하였다:

LCMS ZQ1 방법 E Rt = 1.35min, $[M+2H]^{+2}$ 761.9; ^{1}H NMR (400 MHz, 아세토니트릴-*d*3) δ ppm 1.05 - 1.18 (m, 3 H) 1.19 - 1.32 (m, 20 H) 1.36 (t, *J*=7.15 Hz, 1 H) 1.48 - 1.59 (m, 2 H) 1.65 - 1.75 (m, 2 H) 2.01 - 2.06 (m, 2 H) 2.25 (t, *J*=7.46 Hz, 2 H) 3.33 - 3.39 (m, 2 H) 3.39 - 3.44 (m, 2 H) 3.50 - 3.67 (m, 98 H) 4.84 - 4.95 (m, 1 H) 4.95 - 5.06 (m, 1 H) 5.83 (ddt, *J*=17.07, 10.29, 6.68, 6.68 Hz, 1 H) 7.31 (t, *J*=5.44 Hz, 1 H); LCMS 방법 E Rt = 1.50min, $[M+2H]^{+2}$ 739.9; ^{1}H NMR (400 MHz, 아세토니트릴-*d*3) ppm 1.16 - 1.42 (m, 30 H) 1.42 - 1.63 (m, 5 H) 2.00 - 2.07 (m, 2 H) 2.22 - 2.28 (m, 2 H) 2.40 - 2.52 (m, 2 H) 3.25 - 3.33 (m, 2 H) 3.33 - 3.42 (m, 2 H) 3.42 - 3.50 (m, 2 H) 3.50 - 3.68 (m, 88 H) 4.86 - 5.06 (m, 2 H) 5.83 (ddt, *J*=17.04, 10.26, 6.71, 6.71 Hz, 1 H) 6.40 - 6.74 (m, 1 H).

[0795]

[0796] 단계 8: 실시예 40의 제조:



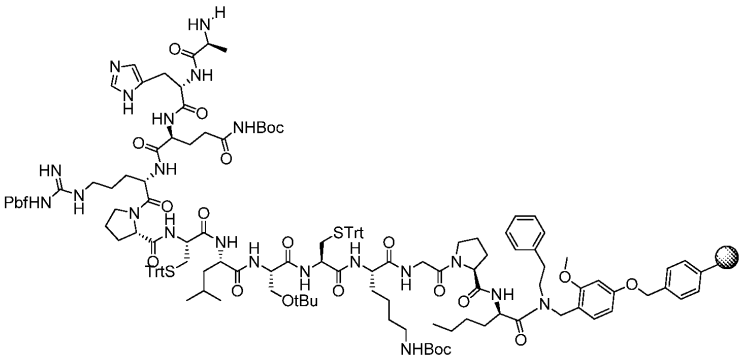
실시예 40

[0797]

[0798] pE-R-P-C*-L-S-C*-N^6-[[(1α,8α,9α)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메톡시]카르보닐]-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸) [디술피드 C4-C7] (물 1 mL 중 단계 1로부터의 생성물 50 mg, 0.034 mmol) 및 단계 7로부터의 화합물 A (물 268 uL 중 52 mg)의 혼합물을 실온에서 약 3시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 정제용 HPLC (선파이어 30x50mm 5um 칼럼 ACN/H_2O w/ 0.1% TFA 75ml/분, 15-40% ACN 5분 구배)에 의해 정제하였다. 생성물 분획을 동결건조시켜 표제 생성물을 TFA 염 (24 mg, 21%)으로서 수득하였다. LCMS (워터스 액퀴티 UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50℃, 용리액 A: 물 + 0.1% 포름산, 용리액 B: 아세토니트릴 + 0.1% 포름산, 구배 5.15분에 걸쳐 2%에서 98% B/A): 체류 시간: 2.77분; MS $[M+2]^{2+}$: 관찰치: 1491.8808, 계산치: 1491.8560.

[0799] 실시예 41: N-말단에서 지방산에 접합된 아펠린 시클릭 펩티드

[0800] 단계 1: A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-페네틸 아민 중간체 41a의 합성



[0801]

[0802] 페네틸아민-AMEBA 수지 (시그마 알드리치, 0.1 mmol, 1.0 mmol/g)를 자동 펩티드 합성기 (CEM 리버티 블루 마이크로웨이브) 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 Arg 잔기에 대한 표준 이중 Arg 및 DNle 커플링 배가 시간으로 적용하였다. 아미노산을 DMF 중 0.2 M 용액으로서 제조하였다. 표준 커플링 사이클은 다음과 같이 규정하였다:

[0803] • 아미노산 커플링: AA (5 당량), HATU (5 당량), DIEA (25 당량)

[0804] • 세척: DMF (3 X 7 mL)

[0805] • Fmoc 탈보호: 20% 피페리딘/0.1 M HOBt (2 x 7 mL)

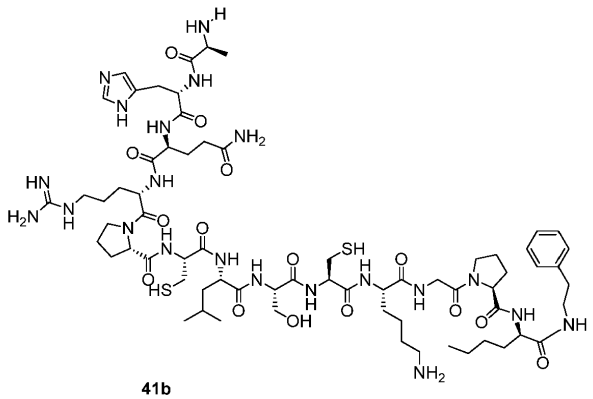
[0806] • 세척: DMF (4 x 7 mL에 이어서 1 x 5 mL)

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간 (온도)	커플링 방법
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 분 (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 분 (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU

[0807]

[0808] 펩티드의 어셈블리 후에, 수지를 DMF (2 x 50 mL) 및 DCM (2 x 50 mL)으로 세척한 다음 진공 하에 건조시켜 중간체 41a (276 mg, 0.1 mmol)를 수득하였다.

[0809] 단계 2: 중간체 41b의 제조 (수지로부터 펩티드의 절단)

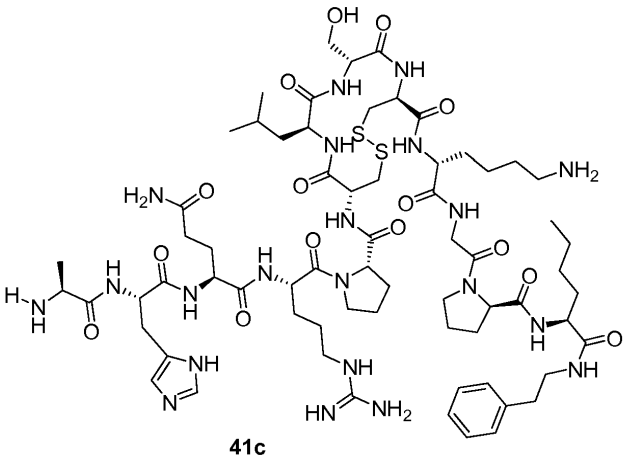


41b

[0810]

[0811] 중간체 41a (276 mg, 0.1 mmol)를 4 mL TFA 용액 (37 mL TFA, 1 mL H_2O, 1 mL TIPS, 3.06 g DTT)과 합하고, 실온에서 3시간 동안 진탕시켰다. 용액을 수지로부터 제거하고, 40 mL 차가운 Et_2O에 침전시켰다. 용액을 볼텍싱하고, 얼음 상에 10분 동안 정치시킨 후에 4000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 용매를 제거하고, 백색 고체를 차가운 Et_2O로 2회 더 세척하고 (매회 40 mL), 원심분리하고 (매회 5분), 가만히 따랐다. 고체를 진공하에 밤새 건조시켜 중간체 41b-배치 1 (17.4 mg, 0.012 mmol)을 수득하였다. LCMS (SQ2 생성물분석-산성-퀩티드-극성, 액퀴티 UPLC BEH C18 칼럼, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm, 50℃): R_t = 1.83분, MS [M+H] 1513.5.

[0812] 단계 3: 중간체 41c의 제조 (시스테인 잔기의 고리화)

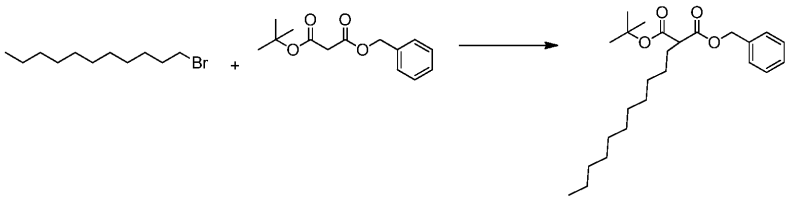


41c

[0813]

[0814] 중간체 41b-배치1 및 2 (29.6 mg, 0.020 mmol)를 물 (3 mL) 및 10 방울의 DMSO 중에 용해시켜 약간 탁한 용액을 수득하였다. 아이오딘 (HOAc 중 50 mM, 0.783 mL, 0.039 mmol)을 천천히 적가하고, 반응물을 밤새 실온에서 혼합하였다. 조 반응물의 LCMS 분석은 출발 물질의 완전한 전환을 나타내었다. 색이 사라질 때까지 0.5 M 아스코르브산을 적가하였다. 물질을 MS-유발된 HPLC에 의해 정제하였다. 풀링한 분획을 동결건조시켜 목적 생성물을 백색 분말로서 7 mg (4.63 μmol, 24%) 수득하였다. LCMS (SQ2 생성물분석-산성-퀩티드, 액퀴티 UPLC BEH C18 칼럼, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm, 50℃): R_t = 0.90분, MS [M+H] 1511.8.

[0815] 단계 4: 1-벤질 3-tert-부틸 2-운데실말로네이트



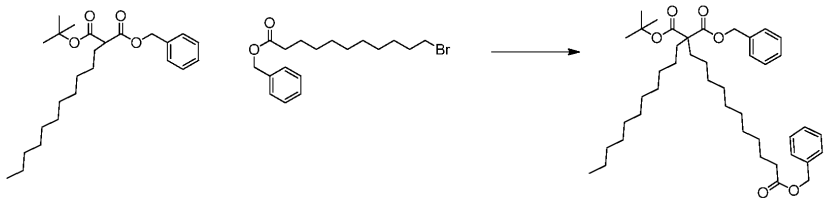
[0816]

[0817] DMF (8mL) 중 NaH (160mg, 4.0mmol)의 현탁액에 0℃에서 N_2 하에 DMF (2mL) 중 벤질 tert-부틸 말로네이트 (1.0g, 4.0mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 50분 동안 교반한 후, DMF 중 1-브로모운데칸 (2mL)을 첨가하였다. 추가로 1시간 동안 교반한 후, 반응물을 실온으로 가온되도록 하였다. 반응물을 밤새 유지시켰다. Et_2O (100mL) 및 물 (20mL)을 첨가하여 반응물을 분할하였다. 수성 상을 Et_2O (100mL)로 추출하고, 합한 유기부를 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 플래쉬 칼럼 (C18 12g, 40-100% ACN / 물 +0.1% TFA)에 의해 정제하여 표제 화합물을 무색 오일 (1.14g, 2.82mmol, 71%)로서 수득하였다:

LCMS 방법 F Rt = 1.58min, M+Na 427.4; ^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ ppm 0.84 - 0.96 (m, 3 H) 1.28 (br. s, 12 H) 1.31 (m, *J*=3.90 Hz, 6 H) 1.41 (s, 9 H) 1.88 (q, *J*=7.38 Hz, 2 H) 3.29 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 5.19 (q, *J*=12.27 Hz, 2 H) 7.30 - 7.42 (m, 5 H).

[0818]

[0819] 단계 5: 1,11-디벤질 11-tert-부틸 도코산-1,11,11-트리카르복실레이트



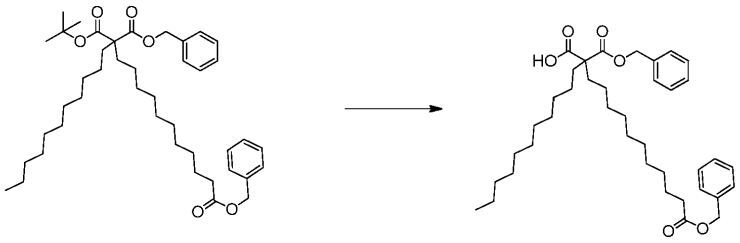
[0820]

[0821] 표제 화합물을 출발 물질로서 단계 4로부터의 화합물 (177mg, 0.284mmol)을 사용하여 실시예 40의 단계 3과 유사한 방식으로 합성하여 무색 오일 (153mg, 0.213mmol, 75%)을 수득하였다:

^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H).

[0822]

[0823] 단계 6: 13-(벤질옥시)-2-((벤질옥시)카르보닐)-13-옥소-2-운데실트리데칸산



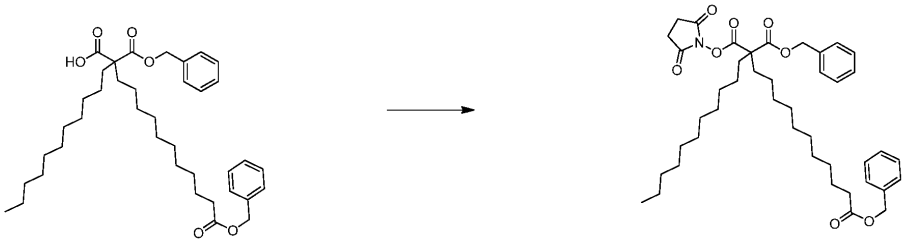
[0824]

[0825] DCM (3mL) 중 단계 5로부터의 화합물 (200mg, 0.295mmol)의 용액에 TFA (0.6mL)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 플래쉬 칼럼 (실리카 12g, 0-15% EtOAc / HEP)에 의해 정제하여 표제 화합물 (177mg, 0.284mmol, 96%)을 수득하였다:

^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ ppm 0.87 - 0.94 (m, 3 H) 0.94 - 1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23 - 1.37 (m, 16 H) 1.65 (오중선, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.78 - 1.91 (m, 2 H) 1.93 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31 - 7.44 (m, 10 H).

[0826]

[0827] 단계 7: 1,11-디벤질 11-(2,5-디옥소시클로펜틸) 도코산-1,11,11-트리카르복실레이트



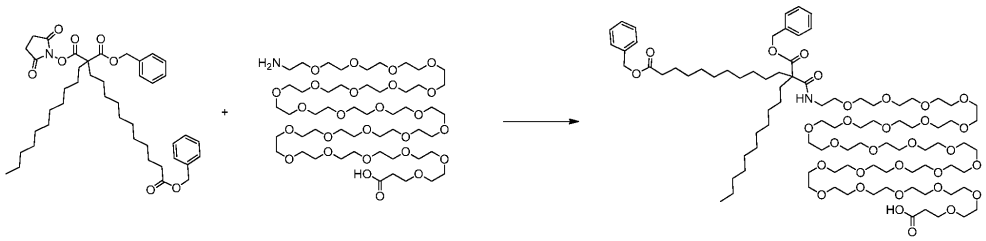
[0828]

[0829] 표제 화합물을 출발 물질로서 단계 6으로부터의 화합물 (177mg, 0.284mmol)을 사용하여 실시예 40의 단계 6과 유사한 방식으로 합성하여 무색 오일 (153mg, 0.213mmol, 75%)을 수득하였다:

^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (오중선, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H).

[0830]

[0831] 단계 8:



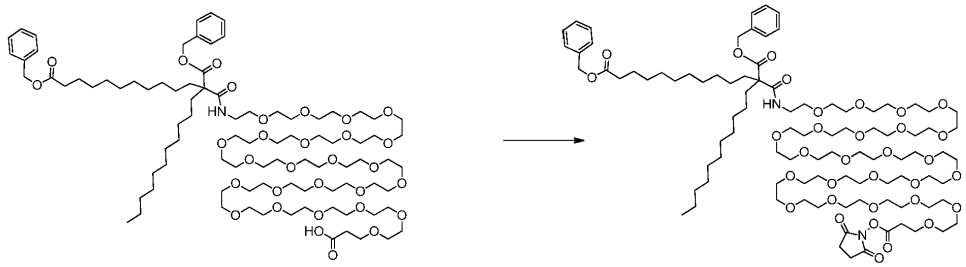
[0832]

[0833] THF (1.5mL) 및 DCM (1.5mL) 중 중간체 34 (145mg, 0.201mmol)의 용액을 아미노-PEG24-산으로 채워진 바이알에 첨가하였다. DIPEA (88μL, 0.504mmol)를 첨가하고, 반응물을 진탕기 플레이트 상에서 15시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 초임계 유체 크로마토그래피 (워터스 HILIC 20x150mm; 15-25% MeOH / CO_2)에 의해 정제하여 중간체 35 (151mg, 0.086mmol, 43%)를 수득하였다:

LCMS 방법 E Rt = 1.30min, [M+2H]+2 876.4; ^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 0.93 - 1.04 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23 - 1.37 (m, 15 H) 1.61 - 1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, *J*=12.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 3.49 (dd, *J*=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52 - 3.59 (m, 2 H) 3.59 - 3.73 (m, 92 H) 3.80 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31 - 7.42 (m, 10 H) 8.09 (t, *J*=5.26 Hz, 1 H).

[0834]

[0835] 단계 9:

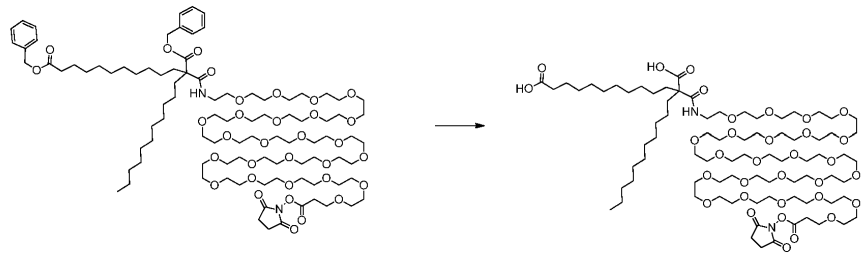


[0836]

[0837] DCM (0.265mL) 중 DCC (22mg, 0.103mmol)를 DCM (1.5mL) 중 중간체 35 (150mg, 0.086mmol) 및 N-히드록시숙신이미드의 용액에 첨가하였다. 반응물을 1.5시간 동안 교반하였다. THF (0.5mL) 중 추가의 N-히드록시숙신이미드 (10mg) 및 DCM (0.265mL) 중 및 DCC (22mg)를 첨가하고, 반응물을 밤새 교반하였다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 플래쉬 칼럼 (실리카 12, 0-5% MeOH / DCM)에 의해 정제하여 중간체 36 (159mg, 정량적)을 백색 고체로서 수득하였다:

[0838] LCMS 방법 G Rt = 1.55min, $[M+H_3O+H]^{+2}$ 933.9.

[0839] 단계 10:



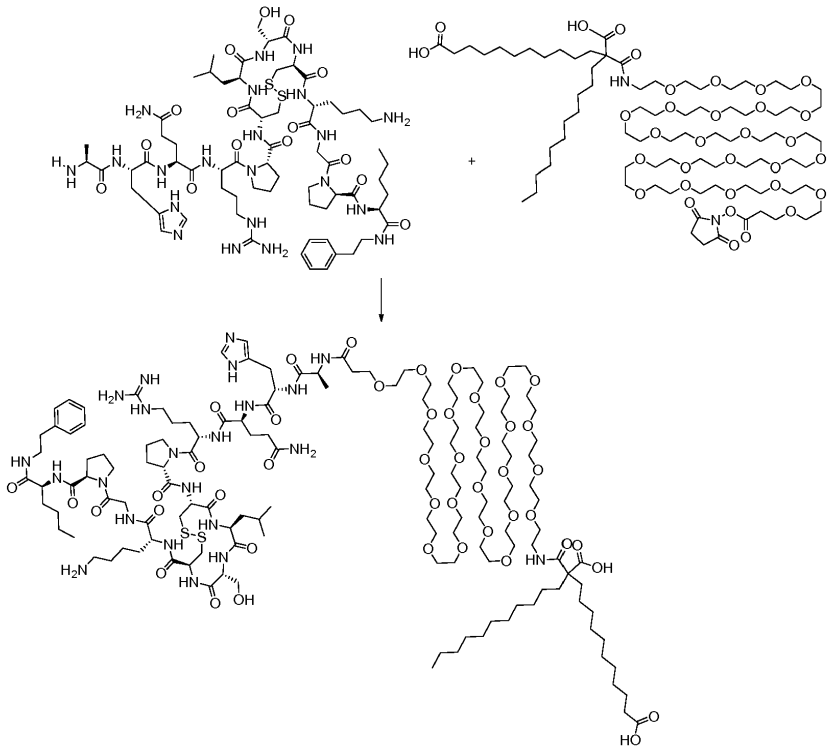
[0840]

[0841] THF (5mL) 중 단계 9로부터의 화합물 (159mg, 0.086mmol)의 용액에 THF (1mL) 중 탄소상 10% Pd (4.6mg, 4.3 μmol)의 현탁액을 첨가하였다. 반응물을 수소 하에 두고, 40분 동안 교반하였다. 추가의 탄소상 Pd (7mg, 6.5 μmol)를 첨가하고, 수소 하에 또 다른 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 막 필터를 통해 통과시키고, 여과물을 증발시켰다. 잔류물을 HPLC (선파이어 C18 30x50mm, 45-70% ACN / 물 + 0.1% TFA)에 의해 정제하여 표제 화합물 (83mg, 0.047mmol, 54%)을 수득하였다:

LCMS 방법 G Rt = 1.03min, [M+2H]+2 835.2; ^{1}H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) ppm 0.84 - 0.94 (m, 3 H) 1.17 (br. s., 2 H) 1.21 - 1.39 (m, 30 H) 1.57 - 1.68 (m, 2 H) 1.69 - 1.80 (m, 2 H) 1.97 - 2.10 (m, 2 H) 2.34 (t, *J*=7.21 Hz, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 2.92 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 3.51 - 3.73 (m, 96 H) 3.87 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 7.45 (t, *J*=4.46 Hz, 1 H)

[0842]

[0843] 단계 4: 아펠린 구축물 A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-페네틸 아민 및 지방산-PEG 구축물 (N-말단 접합)을 포함하는 접합체의 제조 - 실시예 41



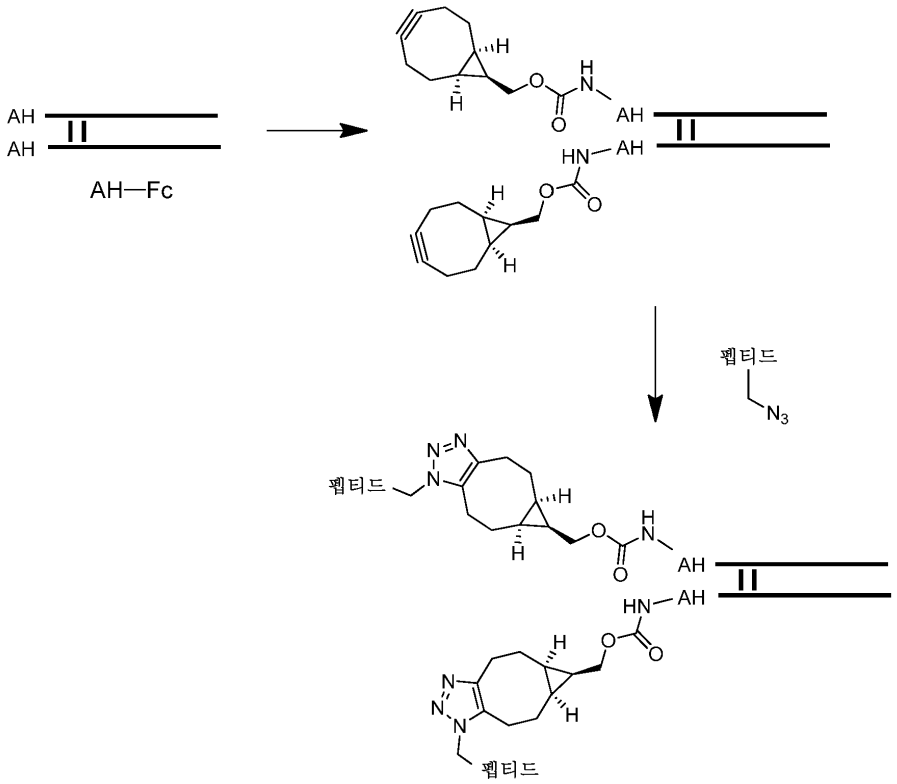
[0844]

[0845] NHS-지방산 (실시예 40의 단계 7로부터의 생성물 A)의 10 mg/mL 용액을 H_2O 중에서 제조하였다. 중간체 41c (1.5 mg, 0.993 μmol)를 30 mM pH4 NaOAc 완충제 (672 μL) 중에 용해시키고, NHS-지방산 (0.850 mL, 5.10 μmol)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 16시간 동안 혼합하고, 그 시점에 추가의 1.5 mg의 NHS-지방산 (H_2O 중 10 mg/mL)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 16시간 동안 혼합하였다. 8 mg의 NHS-지방산 (H_2O 중 10 mg/mL)을

첨가하고, 반응물을 실온에서 3일 동안 혼합하고, 1.7 mg의 NHS-지방산 (H_2O 중 10 mg/mL)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 진탕시키고, M-유발된 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 백색 분말로서 1.7 mg (0.510 μmol, 51%) 수득하였다. LCMS (SQ2 생성물분석-산성-펩티드-극성, 액퀴티 UPLC BEH C18 칼럼, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm, 50℃): R_t = 3.87분, MS [M+H+2/2] 1533.1; [M+H+3/3] 1022.9.

[0846] 실시예 42: AH-Fc와 아펠린 시클릭 펩티드의 접합

[0847] 일반 반응식



[0848]

[0849] 단계 1: AH-Fc 구축물의 제조:

[0850] 구축물 클로닝:

[0851] 마우스 Ig 카파 쇄 신호 펩티드에 이어 인간 Fc 및 짧은 비스-아미노산 서열 (AH)을 함유하는 DNA 단편을 5'-NheI 및 3'-EcoRI 제한 부위를 사용하는 유전자 합성 (진아트(GeneArt))에 의해 코돈 최적화하였다. 생성된 서열을 NheI 및 EcoRI 둘 다에 의해 제한 소화시키고, 벡터 pPL1146의 NheI 및 EcoRI 부위 (CMV 프로모터의 하류)에 라이게이션시켰다. 라이게이션으로 이. 콜라이 DH5α 세포를 형질전환시키고, 올바른 삽입물을 함유하는 콜로니를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. 제시된 서열은 센스 가닥에 대한 것으로 5' 및 3' 방향으로 이어진다.

[0852] AH-Fc

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCT
GGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGG
CAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATC
TCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAG
TCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGA
GAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGG
ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCA
ATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAACCCCAGGTGTACACTCT
GCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAG
GCTTCTACCCCTCCGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAAT
TACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCT
GACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGA
ATTC

[0853]

[0854] AH-Fc 구축물의 서열:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG **AH**DKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
51 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
101 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
151 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
201 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0855]

[0856] AH-Fc 단백질 발현 및 정제:

[0857] 표준 폴리에틸렌이민 방법을 사용하여 AH-Fc 발현 플라스미드 DNA로 HEK293T 세포를 ml당 1 x 10^6개의 세포 밀도로 형질감염시켰다. 이어서 500 ml 배양물을 3 L 플라스크 내의 프리스타일(FreeStyle) 293 배지 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))에서 37℃에서 4일 동안 성장시켰다.

[0858] AH-Fc 단백질을 정화시킨 조건화 배지로부터 정제하였다. 간략하게 500 ml의 조건화 배지를 5 ml 하이트랩 맙 셀렉트 슈어(HiTrap MabSelect SuRe) 칼럼 (GE 라이프 사이언시스(GE Life Sciences)) 상에 4 ml/분으로 유동시켰다. 칼럼을 0.1% 트리톤 X-114를 함유하는 20 칼럼 부피의 PBS로 세척한 다음, AH-Fc 단백질을 0.1M 글리신, pH 2.7로 용리시키고, 1 M 트리스-HCl, pH 9로 중화하고, PBS에 대해 투석하였다. 단백질 수율은 500 ml 조건화 배지당 10 내지 20 mg이었고, 내독소 수준은 찰스 리버(Charles River) ENDOSAFE PTS 시험에 의한 측정시 <1 EU/mg이었다.

[0859] AH-Fc 단백질의 품질 관리:

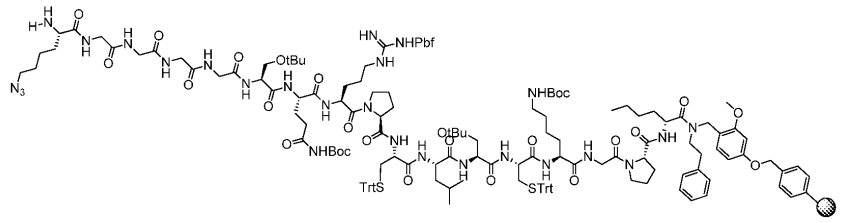
[0860] AH-Fc 단백질의 LC/MS: 피크는 불균질하였고, 이량체에 대해 예상되는 것보다 약 3 kDa 더 컸다. 이는 컨센서스 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 Fc에 대해 예상되는 N-연결된 글리코실화의 특징이다.

[0861] 환원된, N-탈글리코실화 AH-Fc 단백질의 LC/MS: 이는 예리한 피크를 제공하였다. AH-Fc에 대한 분자량은 예상과 같았다. C-말단의 시스테인은 단백질을 절단으로부터 보호하는 것으로 보인다.

[0862] 슈퍼덱스(Superdex) 200 상에서의 분석 크기 배제: Fc-아펠린 단백질은 89 내지 100% 이량체, 0 내지 10% 사량체, 및 0 내지 1% 응집체를 갖는다.

[0863] 환원 SDS/PAGE: 모든 단백질은 예상되는 크기의 우세한 단량체로서 이동하였다.

[0864] 단계 2: NH_2-아지도Lys-GGGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-페네틸아민의 합성



[0865]

[0866] 페네틸아민-AMEBA 수지 (시그마 알드리치, 0.25 mmol, 1.0 mmol/g)를 자동 펩티드 합성기 (CEM 리버티 블루 마이크로웨이브) 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 Arg 잔기에 대한 표준 이중 Arg 및 D-Nle 및 아지도리신 커플링 배가 시간으로 적용하였다. 아미노산을 DMF 중 0.2 M 용액으로서 제조하였다. 표준 커플링 사이클은 다음과 같이 규정하였다:

[0867] • 아미노산 커플링: AA (5 당량), HATU (5 당량), DIEA (25 당량)

[0868] • 세척: DMF (3 X 7 mL)

[0869] • Fmoc 탈보호: 20% 피페리딘/0.1 M HOBt (2 x 7 mL)

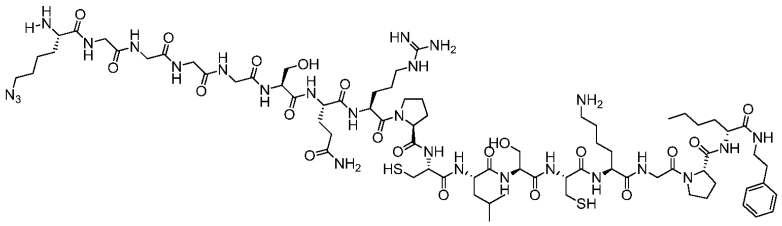
[0870] • 세척: DMF (4 x 7 mL에 이어서 1 x 5 mL)

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간 (온도)	커플링 방법
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 분 (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 분 (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 분 (70°C)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 10 분 (70°C)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-아지도Lys-OH	1 x 10 분 (70°C)	DIEA/HATU

[0871]

[0872] 펩티드의 어셈블리 후에, 수지를 DMF (2 x 50 mL) 및 DCM (2 x 50 mL)으로 세척한 다음 진공 하에 건조시켜 중간체 42a (770 mg, 0.250 mmol)를 수득하였다.

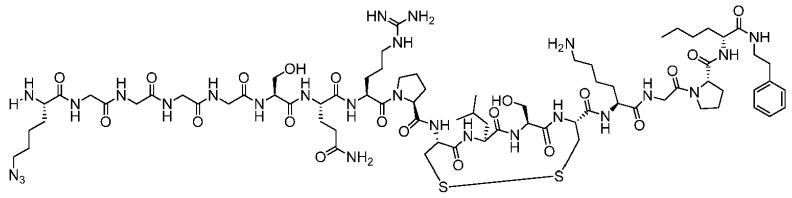
[0873] 단계 3: 중간체 42b의 제조 (수지로부터 펩티드의 절단)



[0874]

[0875] 중간체 42a (770 mg, 0.250 mmol)를 절반으로 나누고, 각각의 샘플을 6 mL TFA 용액 (37 mL TFA, 1 mL H_2O, 1 mL TIPS, 2.569 g (20당량) DTT)과 합하고, 실온에서 3시간 동안 진탕시켰다. 용액을 수지로부터 제거하고, 40 mL 차가운 Et_2O에 침전시켰다. 용액을 볼텍싱하고, 얼음 상에 10분 동안 정치시킨 후에 4000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 용매를 제거하고, 백색 고체를 차가운 Et_2O로 2회 더 세척하고 (매회 40 mL), 원심분리하고 (매회 5분), 가만히 따랐다. 고체를 진공 하에 밤새 건조시키고 M-유발된 HPLC에 의해 정제하여 중간체 43b를 백색 분말 (80 mg, 0.045 mmol, 80%)로서 수득하였다. LCMS (SQ2 생성물분석-산성-펩티드-극성, 액퀴티 UPLC BEH C18 칼럼, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm, 50℃): R_t = 2.32분, MS [M+H+2/2] 888.0.

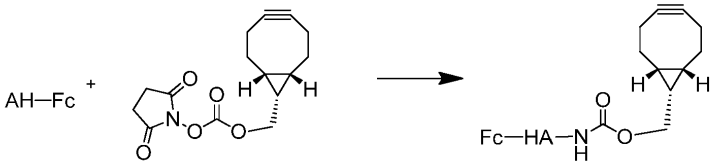
[0876] 단계 4: 중간체 42c의 제조 (시스테인 잔기의 고리화)



[0877]

[0878] 중간체 42b (80 mg, 0.045 mmol)를 물 (1.25 mL) 중에 용해시키고, 아이오딘 (HOAc 중 50 mM, 1.804 mL, 0.090 mmol)을 천천히 적가하고, 반응물을 실온에서 3시간 동안 혼합하였다. 조 반응물의 LCMS 분석은 출발 물질의 완전한 전환을 나타내었다. 색이 사라질 때까지 0.5 M 아스코르브산을 적가하였다. 물질을 MS-유발된 HPLC에 의해 정제하였다. 풀링한 분획을 동결건조시켜 목적 생성물을 백색 분말로서 20.1 mg (0.045 mmol, 25%) 수득하였다. LCMS (SQ2 생성물분석-산성-펩티드-극성, 액퀴티 UPLC BEH C18 칼럼, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm, 50℃): R_t = 2.17분, MS [M+H+2/2] 886.8.

[0879] 단계 5: Fc-AH BCN의 제조 (AH-Fc N-말단 상에 클릭 핸들의 설치)



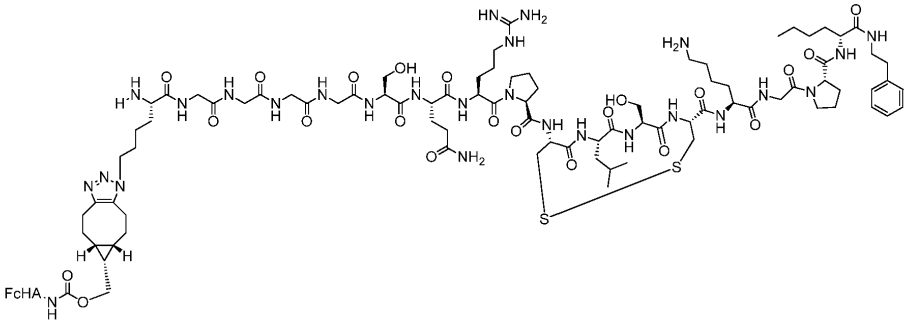
[0880]

[0881] Fc-AH (단계 1로부터의 것: 1 mL, 3 mg/mL, 0.117 μmol)를 30 mM NaOAc pH 4.0 (4.3 mL) 중에 용해시키고, DMSO (0.70 mL) 중 (1R,8S,9s)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메틸 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 카르보네이트 (BCN)의 10mg/mL 원액을 천천히 첨가하고, 반응물을 진탕기 플레이트 상에서 실온에서 3일 동안 두었다. BCN (0.25 mL)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 3일 동안 혼합하였다. BCN (0.70 mL)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 16시간 동안 혼합하였다. 반응물을 900 μL의 부피로 5회 희석 및 농축시킴으로써 10 kDa MWCO 아미콘 원심분리 필터를 사용하여 용액을 30 mM NaOAc pH 4.0으로 교환하였다. 용액을 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. A280에 의해 농도는 1.73 mg/mL (1.56 mg, 26%)인 것으로 측정되었다. LCMS (QT2, 단백질_20-70 kDa_3분, 프로스위프트 모노리스(Proswift Monolith) 4.6 x 50 mm, 50℃, 용리액 A: 물 + 0.1% 포름산, 용리액 B: CAN + 0.1% 포름산, 2분에 걸쳐 2-98%) R_t = 1.58 분.

표지 정도	계산치	관찰치	% TIC (MS+) 강도
AH-Fc	51141	51141.5	18
AH-Fc +1BCN	51318	51317	31
AH-Fc +2BCN	51495	51496	31
AH-Fc +3BCN	51672	51671	20

[0882]

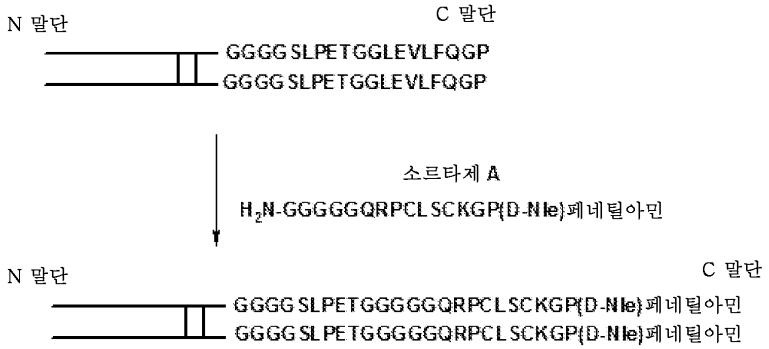
[0883] 단계 6: 실시예 42의 제조: 중간체 43c에 접합된 Fc-HA-BCN



[0884]

[0885] H_2O 중 중간체 42c의 50 mg/mL 원액을 제조하였다. 중간체 43c (53.7 μL, 1.515 μmol)를 30 mM NaOAc pH 4.0 (1.73 mg/mL, 1.56 mg, 0.030 μmol) 중 Fc-HA-BCN (단계 5로부터의 것)의 원액에 첨가하고, 반응물을 실온에서 16시간 동안 혼합하였다. 반응물을 250 μL의 부피로 5회 희석 및 농축시킴으로써 50 kDa MWCO 아미콘 원심분리 필터를 사용하여 용액을 30 mM NaOAc pH 4.0으로 교환하였다. A280에 의해 농도는 3.32 mg/mL (830 μg, 50%)인 것으로 측정되었다. LCMS (QT2, 단백질_35-70 kDa_3분, 프로스위프트 모노리스 4.6 x 50 mm, 50 ℃, 용리액 A: 물 + 0.1% 포름산, 용리액 B: CAN + 0.1% 포름산, 2분에 걸쳐 10-80%B) R_t = 1.43분, MS [M(글리코실화)+H] 54524.5.

[0886] 실시예 43: 소르타제를 사용한 Fc-아펠린 접합체:



[0887]

[0888] 단계 1: Fc-소르타제 구축물의 제조:

[0889] 구축물 클로닝:

[0890] 마우스 Ig 카파 쇄 신호 펩티드에 이어 인간 Fc 및 소르타제 인식 서열 (LPXTG)을 함유하는 DNA 단편을 5'-NheI 및 3'-EcoRI 제한 부위를 사용하는 유전자 합성 (진아트)에 의해 코돈 최적화하였다. 생성된 서열을 NheI 및 EcoRI 둘 다에 의해 제한 소화시키고, 벡터 pPL1146의 NheI 및 EcoRI 부위 (CMV 프로모터의 하류)에 라이게이션시켰다. 라이게이션으로 이. 콜라이 DH5α 세포를 형질전환시키고, 올바른 삽입물을 함유하는 콜로니를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다. 제시된 서열은 센스 가닥에 대한 것으로 5' 및 3' 방향으로 이어진다.

[0891] Fc-소르타제

GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCA
GGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTG
GCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG
GACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAA
GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG
GAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACT
GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAG
GGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA
ACTACAAGACCACCCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAA
GCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT
GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAA
GGCGGCGGAGGCTCTCTGCCTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCC
TAAGAATTC

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
251 *GSLPETGGLEVLFQGP*

[0892]

[0893] 단백질 발현 및 정제:

[0894] 표준 폴리에틸렌이민 방법을 사용하여 Fc-소르타제 발현 플라스미드 DNA로 HEK293T 세포를 ml당 1 x 10^6개의 세포 밀도로 형질감염시켰다. 이어서 500 ml 배양물을 3 L 플라스크 내의 프리스타일 293 배지 (라이프 테크놀로지스)에서 37℃에서 4일 동안 성장시켰다.

[0895] Fc-소르타제 단백질을 정화시킨 조건화 배지로부터 정제하였다. 간략하게 500 ml의 조건화 배지를 5 ml 하이트랩 맙셀렉트 슈어 칼럼 (GE 라이프 사이언시스) 상에 4 ml/분으로 유동시켰다. 칼럼을 0.1% 트리톤 X-114를 함유하는 20 칼럼 부피의 PBS로 세척한 다음, Fc-소르타제 단백질을 0.1M 글리신, pH 2.7로 용리시키고, 1 M 트리스-HCl, pH 9로 중화하고, PBS에 대해 투석하였다. 단백질 수율은 500 ml 조건화 배지당 10 내지 20 mg이었고, 내독소 수준은 찰스 리버 ENDOSAFE PTS 시험에 의한 측정 시 <1 EU/mg이었다.

[0896] Fc-소르타제 단백질의 품질 관리

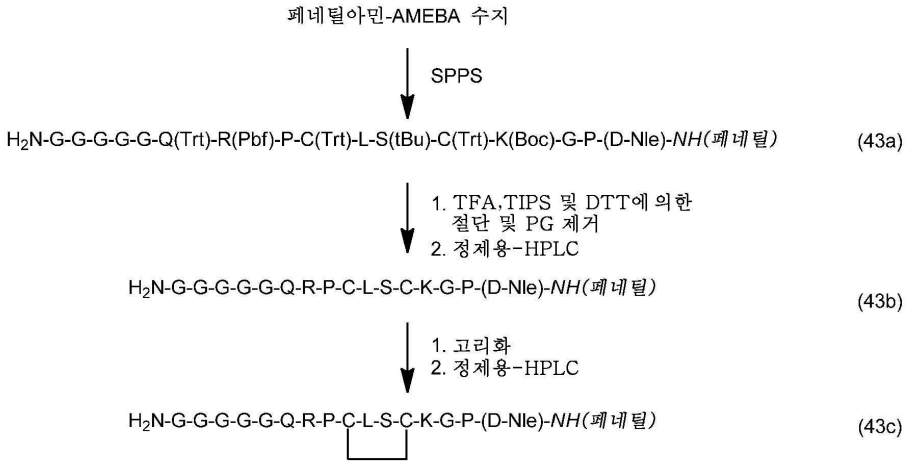
[0897] 천연 Fc -소르타제 단백질의 LC/MS: 피크는 불균질하였고, 이량체에 대해 예상되는 것보다 약 3 kDa 더 컸다. 이는 컨센서스 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 Fc에 대해 예상되는 N-연결된 글리코실화의 특징이다.

[0898] 환원된, N-탈글리코실화 Fc-소르타제 단백질의 LC/MS: 피크는 예리하였다. 분자량은 이론보다 2 달톤 더 작았고, 이는 시스테인 x2 환원으로 인한 것일 수 있다.

[0899] 슈퍼덱스 200 상에서의 분석 크기 배제: Fc-소르타제 단백질은 89 내지 100% 이량체, 0 내지 10% 사량체, 및 0 내지 1% 응집체를 가졌다.

[0900] 환원 SDS/PAGE: 단백질은 예상되는 크기의 단량체로서 우세하게 이동하였다.

[0901] 단계 2: 소르타제 접합을 위한 아펠린 펩티드 (H_2N-GGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)페네틸아민)의 제조



[0902]

[0903] 단계 2a: 중간체 43a의 제조

[0904] 페네틸아민-AMEBA 수지 (시그마 알드리치, 0.25 g, 0.25 mmol, 1.0 mmol/g)를 자동 펩티드 합성기 (CEM 리버티) 상에서의 고체 상 펩티드 합성에 Arg 잔기에 대한 표준 이중 Arg로 적용하였다. 아미노산을 DMF 중 0.2 M 용액으로서 제조하였다.

[0905] 커플링 사이클은 다음과 같이 규정하였다:

[0906] • 아미노산 커플링: AA (4.0 당량), HATU (4.0 당량), DIEA (25 당량)

[0907] • 세척: DMF (3 x 10 mL, 매회 1분)

[0908] • Fmoc 탈보호: 피페리딘/DMF (1:4) (1분 동안 10 mL, 75℃, 이어서 3분 동안 10 mL, 75℃)

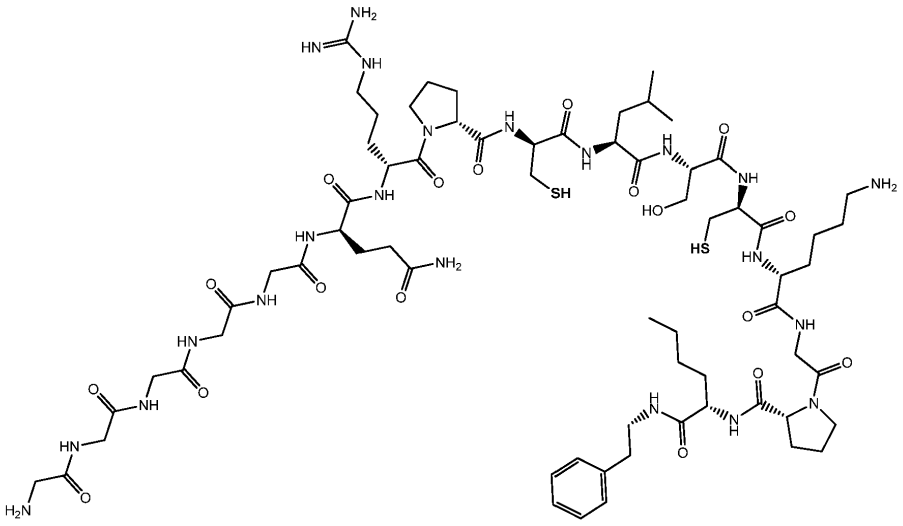
[0909] • 세척: DMF (4 x 10 mL, 매회 1분).

커플링	AA	커플링 수 x 반응 시간	반응 온도
1	Fmoc-D-Nle-OH	1x 5 분	75 °C
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 분	75 °C
3	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 분	75 °C
4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 5 분	75 °C
5	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 분	25 °C에서 2 분 50 °C에서 4 분
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 5 분	75 °C
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 분	75 °C
8	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 분	25 °C에서 2 분 50 °C에서 4 분
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 분	75
10	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 30 분	25 °C에서 25 분 75 °C에서 5 분
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1 x 5 분	75 °C
12	Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 5 분	75 °C
13	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 분	75 °C
14	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 분	75 °C

[0910]

[0911] 펩티드의 어셈블리 후에, 수지를 DMF (3 x 10 mL), DCM (3 x 10 mL)으로 세척하였다. 펩티드 수지를 실온에서 진공 하에 건조시켜 중간체 43a (0.622 g, 0.25 mmol)를 수득하였다.

[0912] 단계 2b: 중간체 42b, H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸)의 제조



[0913]

[0914] 1) 절단 및 보호기 제거

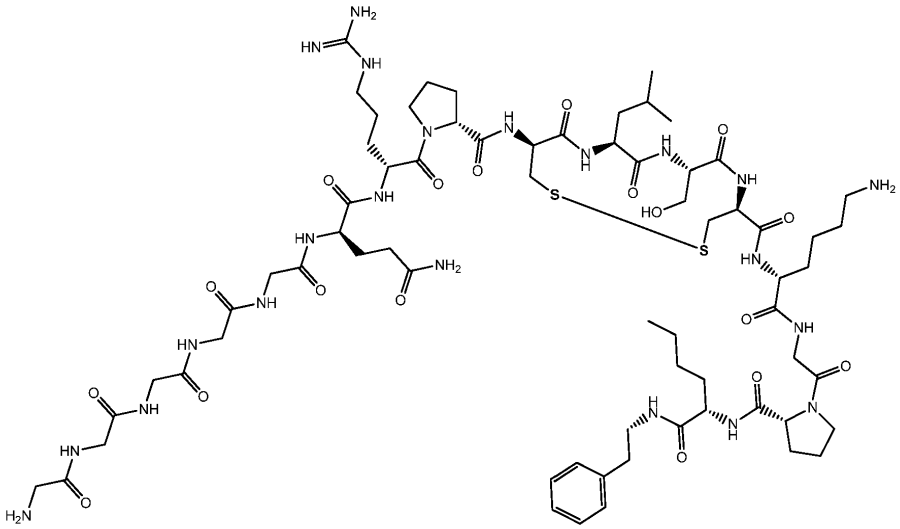
[0915] 중간체 43a (0.622 g, 0.25 mmol)에 95% TFA/2.5% H_2O/2.5% TIPS 및 DTT (771 mg, 5.00 mmol)의 3 mL 용액을

첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 3시간 동안 진탕시킨 다음, 여과하였다. 여과물을 차가운 에테르 40 mL에 적하한 다음, 4000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 용매를 제거하고, 백색 고체를 에테르 (3 x 40 mL)로 세척하고, 볼텍싱하고, 원심분리하였다. 고체를 25℃에서 고진공 하에 1시간 동안 건조시켰다.

[0916] 2) 정제

[0917] 이어서, 상기 백색 고체를 정제용 HPLC (선파이어™ 정제용 C18 OBD™ 30x50mm 5um 칼럼 ACN/H_2O w / 0.1% TFA 75ml/분, 10-30% ACN 8분 구배)에 의해 정제하였다. 생성물 분획을 동결건조시켜 중간체 43b를 TFA 염 (44 mg, 11%)으로서 수득하였다.

[0918] 단계 3: H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸) (디술피드 C^9-C^{12}), 중간체 43c의 제조



[0919]

[0920] H_2O 0.9 mL 중 중간체 43b (44 mg, 0.028 mmol)에 I_2 (AcOH 중 50 mM, 1.1 mL 0.055 mmol)를 적가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 진탕시켰다. LC/MS는 반응이 완결되었음을 나타내었다. 용액의 색이 사라질 때까지 반응 혼합물에 몇 방울의 0.5 M 아스코르브산 용액 (MeOH/H_2O = 1/1)을 첨가하였다. 혼합물을 HPLC 정제를 위해 MeOH로 희석하였다. 정제를 정제용 HPLC (선파이어™ 정제용 C18 OBD™ 30x50mm 5um 칼럼 ACN/H_2O w/ 0.1% TFA 75ml/분, 10-30% ACN 8분 구배)에 의해 수행하였다. 생성물 분획을 동결건조시켜 H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸) (디술피드 C^9-C^{12}), 중간체 43c를 TFA 염 (13 mg, 30%)으로서 수득하였다. LC/MS (QT2, 생성물분석-HRMS-산성, 워터스 액퀴티 UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50℃, 용리액 A: 물 + 0.1% 포름산, 용리액 B: 아세토니트릴 + 0.1% 포름산, 구배 5.15분에 걸쳐 2%에서 98% B/A): 체류 시간: 0.98분; MS $[M+2]^{2+}$: 관찰치: 1587.7993, 계산치: 1587.868.

[0921] 단계 3: Fc-소르타제 및 중간체 43c의 소르타제 접합

[0922] 1) 화학효소적 소르타제 접합

[0923] 빙조 상에서, PBS (pH7.4) 완충제 용액 중 Fc-소르타제 (698 μl, 0.040 μmol, 3.15 mg/mL)에 트리스-8.0 완충제 중 H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(페네틸) (디술피드 C^9-C^{12}) (64.1 μL, 2.018 μmoL, 50 mg/mL)의 용액을 첨가한 다음, 50 mM 트리스-Cl pH7.4, 150 mM NaCl 중 520 μM 소르타제 A (78 μL, 0.040 μmoL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 진탕시켰다. LC/MS는 반응이 완결되었음을 나타내었다.

[0924] 2) 정제 및 탈염

[0925] 상기 용액을 아타 익스프레스(ATTA XPRESS) 상에서 5 mL 하이트랩 맙 셀렉트 슈어 칼럼 (GE 라이프사이언시스 # 11-0034-95) 상에 4mL/분으로 유동시켰다. 실시예 43을 칼럼 상에서 20 칼럼 부피 (CV) PBS + 0.1% 트리톤 114로 세척하고, 0.1M 글리신, pH 2.7로 용리시키고, 1 M 트리스-HCl, pH 9로 중화하고, PBS에 대해

투석하였다. 정제된 용액을 제바 스핑(Zeba Sping) 탈염 칼럼, 5mL (89891)를 사용하여 탈염시켜 1.5mL 표적 용액을 수득하였고, 평균 농도는 0.598 mg/mL였고, 회수율은 90%였다. LCMS (QT2, 단백질_20-70 kDa_3분, 액퀴티 프로스위프트 RP-3U 4.6 x 50 mm, 1.0 mL/분, 용리액 A: 물 + 0.1% 포름산, 용리액 B: 아세토니트릴 + 0.1% 포름산, 구배 3분에 걸쳐 2%에서 98% B/A): R_t = 1.55분, MS [M+H] 58845.0000.

[0926] 실시예 43의 서열:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
[0927] 251 *GSLPETGGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)페네틸아민*

[0928] 여기서 LSLSPGK*GGG GSLPETGGGGG*는 링커를 나타내고, *QRPC*LSC*KGP(D-Nle)페네틸아민*은 폴리펩티드를 나타낸다.

[0929] 하기 실시예의 폴리펩티드는 APJ 수용체 효력에 대해 약 0.01 nM 내지 약 1100 nM 범위의 EC_{50} 값을 갖는 것으로 밝혀졌다. 하기 실시예의 폴리펩티드는 2분 초과, 5분 초과, 10분 초과, 20분 초과, 50분 초과, 및 60분 초과의 혈장 안정성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0930] 본 발명의 폴리펩티드는 APJ 수용체의 효능제로서 유용하고, 따라서 APJ 수용체의 활성화에 반응성인 질환 및 상태, 예컨대 본원에 개시되어 있는 질환의 치료에 유용하다는 것을 알 수 있다.

[0931] 또한, 이들 펩티드의 반감기는 반감기 연장 모이어티, 예컨대 인간 혈청 알부민 또는 Fc 도메인과 함께 화학식 I 내지 IV 중 어느 하나에 따른 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하는 생체접합체를 형성하는 것에 의해 추가로 연장될 수 있다.

[0932] 이에 따라, 본 발명의 예시적 실시양태를 기재하였지만, 그 안의 개시내용은 단지 예시적인 것이고, 본 발명의 범위 내에서 다양한 다른 변경, 응용 및 변형이 이루어질 수 있다는 것을 통상의 기술자는 주목해야 한다. 따라서, 본 발명은 그 안에 예시된 바와 같은 구체적 실시양태에 제한되지 않는다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

<120> CYCLIC POLYPEPTIDES FOR THE TREATMENT OF HEART FAILURE

<130> PAT055418-WO-PCT

<140> PCT/US2014/047377

<141> 2014-07-21

<150> 62/015,854

<151> 2014-06-23

<150> 61/858,263

<151> 2013-07-25

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Ala" or "pyroGlu" or "Cys" or "D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Cys" or "D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Cys" or "D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223

> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace=" "

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Nle" or "Met" or "D-Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"

or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"

or "Nal" or " "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments"

<400> 1

Gln Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Ala" or "pyroGlu" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>

<221

> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace=" "

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Met" or "Nle" or "D-Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"

or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"

or "Nal" or " "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments"

<400> 2

Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<

220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace=" "

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace=" "

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Nle" or "D-Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"

or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"

or "Nal" or " "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments"

<400> 3

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace=" "

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Nle" or "Met" or "D-Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"

or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"

or "Nal" or " "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 4

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Ala" or "pyroGlu" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace=" "

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Nle" or "Met" or "D-Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"

or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"

or "Nal" or " "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments"

<400> 5

Gln Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace=" "

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Phe"

<220>

<221

> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace=" "

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Nle" or "D-Phe"

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"
or " "

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"
or "Nal" or " "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments"

<400> 6

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(15)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> /note="This sequence may encompass 1-3 'Gly Gly Gly Gly Ser' repeating units wherein some positions may be absent"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 9

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 10

Gln Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(12)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> /note="This region may encompass 1-3 'Gly Gly Gly Gly'
repeating units wherein some positions may be absent"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Pro Glu Thr

1 5 10 15

Leu

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly

1 5 10 15

Pro

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5 10

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(12)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> /note="This region may encompass 1-3 'Gly Gly Gly Gly' repeating units wherein some positions may be absent"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(26)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
20 25

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 19

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 20

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro

1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> (N-Me)Phe

<400> 21

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 22

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Nal

<400> 23

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 24

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 25

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220

><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Ala

<400> 26

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 27

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 28

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 29

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 30

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 31

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 32

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 33

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 34

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> D-homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 35

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 36

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe

1 5 10

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 37

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 38

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 39

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 40

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Phe Gly Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 41

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Ala Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 42

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Ala Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu
<220><221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle
<400> 43
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10
<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<220><221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu
<220><221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-homoCys
<220><221> MOD_RES
<222> (11)..(11)

<223> D-Phe
<220><221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala
<220><221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe
<400> 44

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe

1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Any amino acid

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Abu

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 45

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Xaa Phe

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 46

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223

> (N-Me)Phe

<400> 47

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 48

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro

1 5 10

<

210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 49

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<400> 50

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 51

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Phe

<400

> 52

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Phe

1 5 10

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 53

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Phe Gly Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> D-Phe

<400> 54

Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 55

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe

1 5 10

<210> 56

<211> 13

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> D-Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> D-homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Tyr

<400> 56

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> D-homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> homoCys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Nva

<220><221> MOD_RES

<222>

(13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 57

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Val Phe

1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223

> Ser(tBu)

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys(Boc)

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 58

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro

1 5 10

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ser(tBu)

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys(Boc)

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 59

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ser(tBu)

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys(Boc)

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 60

Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ser(tBu)

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys(Boc)

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<400> 61

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> D-Nle

<400> 62

Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> O2Oc

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Ser(tBu)

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Lys(tBoc)

<220><221>

MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> D-Nle

<400> 63

Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10 15

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> N6-[[(1-alpha,8-alpha,9-alpha)-bicyclo[6.1.0] non-4-yn-9-ylmethoxy]carbonyl]-Lys

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<400> 64

Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Nle

<400> 65

Ala His Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10

<210> 66

<211> 766

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 66

gctagccacc atggaaactg acaccctgct gctgtgggtc ctgctgctgt gggtgcctgg 60

cagcactggc gctcatgata agacacacac atgccccct tgtccagcac cagaggcagc 120

tggaggacca agcgtgttcc tgtttccacc caagcctaaa gacacactga tgatctcaag 180

gaccccagaa gtcacatgcg tggtcgtgga cgtgtctcac gaggaccccg aagtcaagtt 240

caactggtac gtggatggcg tcgaggtgca taatgctaag accaaacccc gagaggaaca 300

gtacaacagc acctatcggg tcgtgtccgt cctgacagtg ctgcaccagg attggctgaa 360

cggcaaagag tataagtgca aagtgagtaa taaggctctg cctgcaccaa tcgagaaaac 420

aatttctaag gctaaagggc agccaagaga accccaggtg tacactctgc ctccatctag 480

ggaggaaatg acaaagaacc aggtcagtct gacttgtctg gtgaaaggct tctacccctc 540

cgacatcgca gtggagtggg aatctaatgg ccagcctgaa aacaattaca agaccacacc 600

ccctgtgctg gactccgatg ggtctttctt tctgtattct aagctgaccg tggataaaag 660

tcggtggcag cagggaaacg tcttctcatg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaatca 720

ttacacacag aagtccctgt ctctgagtcc aggcaaatga gaattc 766

<210> 67

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 67

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

Ala Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
35 40 45
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60
Asp Val Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
145 150 155 160

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225 230 235 240
Leu Ser Pro Gly Lys

245

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Azido-Lys

<220><221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> D-Nle

<400> 68

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro

1 5 10 15

Leu

<210> 69

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe

1 5 10 15

Gln Gly Pro

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> D-Nle

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10 15

<210> 71

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> D-Nle

<400> 71

Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg

1 5 10 15

Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

20 25

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 72

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

<210> 73

<211> 817

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 73

gctagccacc atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg 60

cagcaccggc gataagaccc acacctgtcc tccctgtcct gcccctgaag ctgctggcgg 120

ccctagcgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc 180

cgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg 240

gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa 300

cagcacctac cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa 360

agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaga aaaccatcag 420

caaggccaag ggccagcccc gcgaacccca ggtgtacaca ctgcccccta gccgggaaga 480

gatgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggcttctacc cctccgatat 540

cgccgtggaa tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt 600

gctggacagc gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg acagtggaca agagccggtg 660

gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac 720

ccagaagtcc ctgagcctga gccctggaaa aggcggcgga ggctctctgc ctgaaacagg 780

cggactggaa gtgctgttcc agggccccta agaattc 817

<210> 74

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 74

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Glu
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65 70 75 80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
85 90 95

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
100 105 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
115 120 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
130 135 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
145 150 155 160

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
165 170 175

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
180 185 190

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
195 200 205

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
210 215 220

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

225 230 235 240

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val
245 250 255

Leu Phe Gln Gly Pro
260

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Gln(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Arg(Pbf)

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Ser(tBu)

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Cys(Trt)

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Lys(Boc)

<220><221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> D-Nle

<400> 75

Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 76

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (267)..(267)

<223> D-Nle

<400> 76

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Glu
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65 70 75 80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
85 90 95

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
100 105 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
115 120 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
130 135 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
145 150 155 160
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
165 170 175
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

180 185 190
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
195 200 205
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
210 215 220
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
225 230 235 240
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly Gly Gly Gly Gly

245 250 255
Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
260 265

<210> 77
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 77
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly
20
<210> 78
<
211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<400> 78

Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu

1 5 10