(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0136014
(43) 공개일자 2021년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6811 (2017.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2021-7028457
(22) 출원일자(국제) 2020년02월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년09월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/018015
(87) 국제공개번호 WO 2020/168017
국제공개일자 2020년08월20일
(30) 우선권주장
62/804,742 2019년02월12일 미국(US)

(71) 출원인
암브룩스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 92037 라호야 노스 터레이 파인스 로드 10975 수트 100
(72) 발명자
문 승주
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10975 스위트 100 암브룩스, 인코포레이티드 내
레온 브라이언
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10975 스위트 100 암브룩스, 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 81 항

(54) 발명의 명칭 **항체-TLR 작용제 콘쥬게이트를 함유하는 조성물, 방법 및 이의 용도**

(57) 요 약

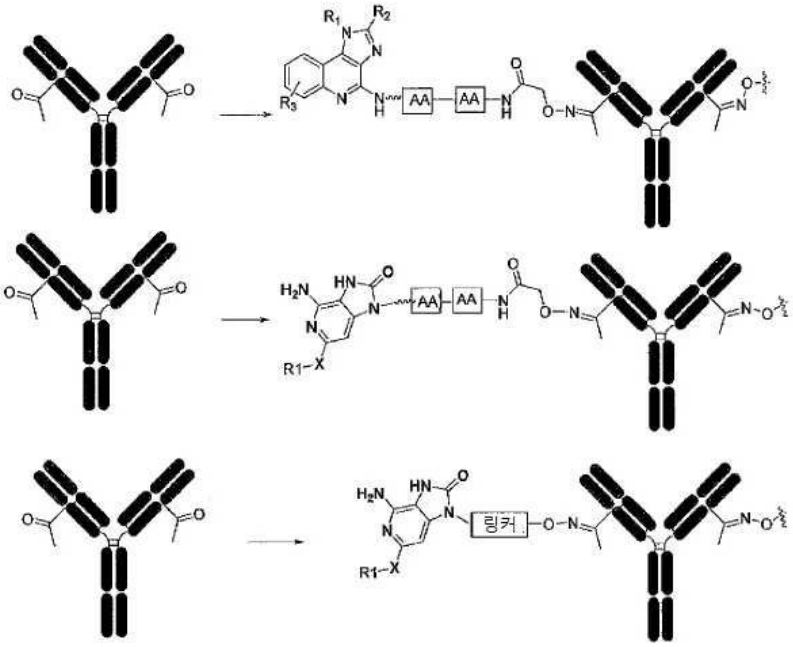
요약서

항체-TLR 작용제 콘쥬게이트를 함유하는 조성물, 방법 및 이의 용도

적어도 하나의 비-자연적 아미노산이 내포된 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 유사체, 그리고 이러한비-

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3



자연적 아미노산 및 폴리펩티드를 만드는 방법들이 본원에 기술된다. 상기 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 유사체는 광범위한 가능한 기능 그룹을 내포할 수 있지만, 전형적으로 적어도 하나의 옥심, 카르보닐, 디카르보닐, 및/또는 히드록실아민 그룹을 가질 수 있다. 본원에서는 해독-후 추가 변형된 비-자연적 아미노산 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 유사체를 또한 기술하며, 이러한 변형에 영향을 주는 방법, 그리고 이러한트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 유사체를 정제하는 방법들이 또한 기술된다. 전형적으로, 상기 변형된 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 유사체에는 적어도 하나의 옥심, 카르보닐, 디카르보닐, 및/또는 히드록실아민 그룹이 내포된다. 이러한 비-자연적 아미노산 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 유사체 및 변형된 비-자연적 아미노산 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 유사체를 치료요법, 진단요법, 그리고 다른 생명과학적 용도에 사용하기 위한 방법들이 추가로 기술된다.

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/32 (2013.01)

(72) 발명자
캉 밍차오
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10975 스위트 100 암브룩스, 인코포레이티드 내
크누드센 니콜라스
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10975 스위트 100 암브룩스, 인코포레이티드 내
왕 지안잉
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10975 스위트 100 암브룩스, 인코포레이티드 내
사카무리 수쿠마르
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10975 스위트 100 암브룩스, 인코포레이티드 내
티안 펑
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토레이 파인스 로드 10975 스위트 100 암브룩스, 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

본 발명은 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 갖는 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드를 포함하는 조성물에 있어서, 이때 전술한 폴리펩티드들중 적어도 하나는 상기 표적화 폴리펩티드의 비-자연적 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 TLR 작용제 분자에 연계되는, 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드는 동일한 또는 상이한 표적화 폴리펩티드인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드는 세포 표면 표적 또는 종양 세포 표적에 결합하는, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드는 단일-특이적, 이중-특이적, 또는 다중-특이적 표적화 폴리펩티드인, 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 이때 상기 단일-특이적, 이중-특이적, 또는 다중-특이적 표적화 폴리펩티드는 약물 콘쥬게이트 또는 체크포인트 억제제인, 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 항체 또는 항체 단편을 포함하는, 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 세포의 항원에 결합하는 항체 또는 항체 단편인, 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 HER2, HER3, PD-1, PDL-1, EGFR, TROP2, PSMA, VEGFR, CTLA-4, EpCAM, MUC1, MUC16, c-met, GPC3, ENPP3, TIM-1, FOLR1, STEAP1, 메소텔린, 5T4, CEA, CA9, 캐드헤린 6, ROR1, SLC34A2, SLC39A6, SLC44A4, LY6E, DLL3, ePhA2, GPNMB, SLITRK6, CD3, CD19, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD117, CD123, CD179, CD223, 그리고 CD276으로 구성된 군에서 선택된 표적에 결합하는 항체 또는 항체 단편인, 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 HER2에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 포함하는, 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 트라스투주맙인, 조성물.

청구항 11

청구항 6에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체 단편은 IgG, Fab, (Fab')2, Fv, 또는 단일 쇄 Fv (scFv)을 포함

하는, 조성물.

청구항 12

청구항 6에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체 단편은 하나 또는 그 이상의 Fab, (Fab')2, Fv, 또는 단일 쇄 Fv (scFv) 돌연변이들을 포함하는, 조성물.

청구항 13

청구항 6에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체 단편은 하나 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 포함하는, 조성물.

청구항 14

청구항 6에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체 단편은 1 ~ 6개 Fc 돌연변이를 포함하는, 조성물.

청구항 15

청구항 6에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는, 조성물.

청구항 16

청구항 6에 있어서, 이때 상기 항체 또는 항체 단편은 하나 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 더 포함하는, 조성물.

청구항 17

청구항 1에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드의 하나 또는 그 이상은 다음의 그룹에서 선택된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는, 조성물: 파라-아세틸 페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌, *p*-술포티로신, *p*-카르복시페닐알라닌, o-니트로페닐알라닌, m-니트로페닐알라닌, *p*-보로닐 페닐알라닌, o-보로닐페닐알라닌, m-보로닐페닐알라닌, *p*-아미노페닐알라닌, o-아미노페닐알라닌, m-아미노페닐알라닌, o-아실페닐알라닌, m-아실페닐알라닌, *p*-OMe 페닐알라닌, o-OMe 페닐알라닌, m-OMe 페닐알라닌, *p*-술포페닐알라닌, o-술포페닐알라닌, m-술포페닐알라닌, 5-니트로 His, 3-니트로 Tyr, 2-니트로 Tyr, 니트로 치환된 Leu, 니트로 치환된 His, 니트로 치환된 De, 니트로 치환된 Trp, 2-니트로 Trp, 4-니트로 Trp, 5-니트로 Trp, 6-니트로 Trp, 7-니트로 Trp, 3-아미노티로신, 2-아미노티로신, O-술포티로신, 2-술폭시페닐알라닌, 3-술폭시페닐알라닌, o-카르복시페닐알라닌, m-카르복시페닐알라닌, *p*-아세틸-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ세린, L-Dopa, 플로오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, *p*-요오드-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 그리고 파라-아지도메틸-페닐알라닌.

청구항 18

청구항 17에서, 이때 상기 비-자연적 아미노산은 파라-아세틸-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌 또는 파라-아지도메틸-페닐알라닌으로 구성된 그룹에서 선택되는, 조성물.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드에 부위-특이적으로 통합되는, 조성물.

청구항 20

청구항 1에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 TLR7 작용제, TLR8 작용제, 또는 TLR7/TLR8 듀얼 작용제인, 조성물.

청구항 21

청구항 1에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 1, 2, 3, 4 또는 5중 임의의 하나에 따른 분자 구조를

포함하는 TLR 작용제인, 조성물.

청구항 22

청구항 1에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 표 3, 4, 5, 6, 7에 따른 구조를 갖는 그룹에서 선택된 TLR 작용제 중 임의의 하나인, 조성물.

청구항 23

청구항 1에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 콘쥬게이트된, 조성물.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 절단가능한 또는 절단-불가능한 링커인, 조성물.

청구항 25

청구항 23에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 0.01kDa ~ 50kDa인, 조성물.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 0.01kDa ~ 10kDa인, 조성물.

청구항 27

청구항 23에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 링커 또는 중합체는 선형, 분기된, 다량체, 또는 덴드라이머인, 조성물.

청구항 28

청구항 23에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 링커 또는 중합체는 이중-기능성 또는 다중-기능성 링커 또는 이중-기능성 또는 다중-기능성 중합체인, 조성물.

청구항 29

청구항 23에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 중합체는 수용성 중합체인, 조성물.

청구항 30

청구항 23에 있어서, 이때 적어도 하나의 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자는 적어도 하나의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 연계된, 조성물.

청구항 31

청구항 29에 있어서, 이때 상기 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)인, 조성물.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 이때 상기 PEG는 0.1kDa ~ 100kDa의 분자량을 갖는, 조성물.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 이때 상기 PEG는 0.1kDa ~ 50kDa의 분자량을 갖는, 조성물.

청구항 34

구체예 23에 있어서, 이때 상기 링커는 0.1kDa ~ 50 kDa의 분자량을 갖는 PEG인, 조성물.

청구항 35

청구항 1에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 상기 조성물의 안정성 또는 용해도를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함하는, 조성물.

청구항 36

청구항 1에 있어서, 이때 상기 조성물은 재조합 숙주 세포에서 또는 시험관에서 합성된 상기 표적화 폴리펩티드의 발현을 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함하는, 조성물.

청구항 37

청구항 1에 있어서, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 상기 폴리펩티드 안의 20개의 일반 아미노산 중 임의의 것에 대해 비반응성인 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 대해 반응성이 있는, 조성물.

청구항 38

청구항 37에 잇어서, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 그룹, 아미노옥시 그룹, 하이드라진 그룹, 하이드라지드 그룹, 세미카르바자이드 그룹, 아지드 그룹, 또는 알킨 그룹을 포함하는, 조성물.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 그룹을 포함하는, 조성물.

청구항 40

청구항 1에 있어서, 이때 상기 표적화 폴리펩티드는 세포독성제 또는 면역자극제에 연계된, 조성물.

청구항 41

도 1의 임의의 구조에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트된, TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC).

청구항 42

청구항 41에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 TLR7 작용제, TLR8 작용제, 또는 TLR7/TLR8 듀얼 작용제인, TC.

청구항 43

청구항 41에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 도 1의 임의의 구조에 따른 구조를 포함하는, TC.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 이때 상기 구조 1에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 그룹에서 선택되는, TC: AXC-621, AXC-622, AXC-625, AXC-626, AXC-627, AXC-638, AXC-639, AXC-640, AXC-642, AXC-662, AXC-665, AXC-666, AXC-667, AXC-668, AXC-669, AXC-670, AXC-671, AXC-672, AXC-675, AXC-678, AXC-679, AXC-681, AXC-687, AXC-688, AXC-689, AXC-690, AXC-691, AXC-696, AXC-697, AXC-698, AXC-699, AXC-700, AXC-701, AXC-702, AXC-709, AXC-710, AXC-711, AXC-712, AXC-713, AXC-714, AXC-715, AXC-716, AXC-717, AXC-718, AXC-719, AXC-722, AXC-723, AXC-724, AXC-725, AXC-726, AXC-727, AXC-729, AXC-731, AXC-732, AXC-733, AXC-734, AXC-735, AXC-736, AXC-737, AXC-738, AXC-739, AXC-740, AXC-741, AXC-743, AXC-742, AXC-747, AXC-748, AXC-749, AXC-750, AXC-751, AXC-752, AXC-754, AXC-755, AXC-756, AXC-757, AXC-758, AXC-759, AXC-760, AXC-761, AXC-762, AXC-764, AXC-771, AXC-772, AXC-773, AXC-777, AXC-778, AXC-779, AXC-789, AXC-793, AXC-799, AXC-800, AXC-801, AXC-802, AXC-803, AXC-804, AXC-805, AXC-806, AXC-807, AXC-808, AXC-809, AXC-810, AXC-831 및 AXC-910 화합물.

청구항 45

청구항 41에 있어서, 이때 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는, TC.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 이때 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 Fc 영역에 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 더

포함하는, TC.

청구항 47

청구항 41에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 다음 그룹에서 선택된, TC: 파라-아세틸 페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌, *p*-술포티로신, *p*-카르복시페닐알라닌, o-니트로페닐알라닌, m-니트로페닐알라닌, *p*-보로닐 페닐알라닌, o-보로닐페닐알라닌, m-보로닐페닐알라닌, *p*-아미노페닐알라닌, o-아미노페닐알라닌, m-아미노페닐알라닌, o-아실페닐알라닌, m-아실페닐알라닌, *p*-OMe 페닐알라닌, o-OMe 페닐알라닌, m-OMe 페닐알라닌, *p*-술포페닐알라닌, o-술포페닐알라닌, m-술포페닐알라닌, 5-니트로 His, 3-니트로 Tyr, 2-니트로 Tyr, 니트로 치환된 Leu, 니트로 치환된 His, 니트로 치환된 De, 니트로 치환된 Trp, 2-니트로 Trp, 4-니트로 Trp, 5-니트로 Trp, 6-니트로 Trp, 7-니트로 Trp, 3-아미노티로신, 2-아미노티로신, O-술포티로신, 2-술폭시페닐알라닌, 3-술폭시페닐알라닌, o-카르복시페닐알라닌, m-카르복시페닐알라닌, *p*-아세틸-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ세린, L-Dopa, 플로오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, *p*-요오드-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 그리고 파라-아지도메틸-페닐알라닌.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 이때 상기 비-자연적 아미노산은 파라-아세틸-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도메틸-페닐알라닌, 또는 파라-아지도에톡시 페닐알라닌인, TC.

청구항 49

청구항 41에 있어서, 이때 상기 링커는 절단가능한 또는 절단-불가능한 링커인, TC.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 이때 상기 링커는 이중-기능성 링커인, TC.

청구항 51

청구항 41에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 2에 따른 구조를 포함하는, TC.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 이때 구조 2에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 AXC-745, AXC-746, 그리고 AXC-753 화합물의 그룹에서 선택되는, TC.

청구항 53

청구항 41에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 3에 따른 구조를 포함하는, TC.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 이때 구조 3에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 AXC-837 또는 AXC-847 화합물인, TC.

청구항 55

청구항 41에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 4에 따른 구조를 포함하는, TC.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 이때 구조 4에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 그룹에서 선택되는, TC: AXC-844, AXC-842, AXC-843, AXC-845, AXC-846, AXC-836, 또는 AXC-841 화합물.

청구항 57

청구항 41에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 5에 따른 구조를 포함하는, TC.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 이때 구조 5에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 그룹에서 선택되는, TC: AXC-862, AXC-863, AXC-867, AXC-868, AXC-869, AXC-872, AXC-873, AXC-876, AXC-877, AXC-878, AXC-879, AXC-880, AXC-881, AXC-882, AXC-883, AXC-884, AXC-885, AXC-886, AXC-887, AXC-888, AXC-889, AXC-890, AXC-891, AXC-892, AXC-893, AXC-895, AXC-896, AXC-897, AXC-898, AXC-901, AXC-903, AXC-904, AXC-905, AXC-906, AXC-907, AXC-908, AXC-909, AXC-911, AXC-912, AXC-913, AXC-914, AXC-915, 또는 AXC-916 화합물.

청구항 59

청구항 41-58중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호: 1-13중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는, TC.

청구항 60

청구항 41-59중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호: 1-13중 적어도 두 개의 아미노산 서열을 포함하는, TC.

청구항 61

청구항 41-60중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 a) 서열 식별 번호: 1 또는 2; 그리고 b) 서열 식별 번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 및 13중 임의의 하나를 포함하는, TC.

청구항 62

청구항 41에 있어서, 화학요법제 또는 면역요법제를 더 포함하는, TC.

청구항 63

청구항 41에 있어서, 항체 약물 콘쥬게이트를 더 포함하는, TC.

청구항 64

암 또는 질환 또는 병태를 갖는 대상체 또는 환자를 치료하는 방법에 있어서, 전술한 청구항들중 임의의 항에 따른 조성물 또는 TC의 치료요법적 유효량을 해당대상체 또는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 화학요법제 또는 면역요법제를 더 포함하는, 방법.

청구항 66

청구항64에 있어서, 항체 약물 콘쥬게이트, 세포독성제, 또는 체크포인트 억제제를 더 포함하는, 방법.

청구항 67

전술한 청구항들중 임의의 항에 따른 조성물 또는 TC의 치료요법적으로-유효량, 그리고 약제학적으로 수용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 68

약제의 제조를 위한 청구항 1-39중 임의의 하나에 따른 조성물의 용도.

청구항 69

청구항 44에 있어서, 이때 구조 1에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 그룹에서 선택되는, TC: AXC-625, AXC-626, AXC-638, AXC-639, AXC-640, AXC-642, AXC-662, AXC-667, AXC-668, AXC-669, AXC-670, AXC-671, AXC-672, AXC-675, AXC-681, AXC-687, AXC-688, AXC-689, AXC-690, AXC-691, AXC-697, AXC-699, AXC-700, AXC-701, AXC-702, AXC-709, AXC-710, AXC-711, AXC-713, AXC-714, AXC-717, AXC-719, AXC-722, AXC-723, AXC-724, AXC-725, AXC-726, AXC-727, AXC-731, AXC-732, AXC-733, AXC-734, AXC-735, AXC-736, AXC-737, AXC-738, AXC-739, AXC-740, AXC-741, AXC-743, AXC-742, AXC-747, AXC-748, AXC-750, AXC-751, AXC-

752, AXC-754, AXC-755, AXC-756, AXC-757, AXC-758, AXC-759, AXC-760, AXC-761, AXC-762, AXC-764, AXC-771, AXC-772, AXC-773, AXC-777, AXC-778, AXC-779, AXC-789, AXC-793, AXC-800, AXC-801, AXC-802, AXC-803, AXC-804, AXC-805, AXC-806, AXC-807, AXC-808, AXC-809, AXC-810, AXC-831 및 AXC-910 화합물들.

청구항 70

청구항 44에 있어서, 이때 구조 1에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 그룹에서 선택되는, TC: AXC-801, AXC-802, AXC-831 및 AXC-910 화합물들.

청구항 71

청구항 54에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 AXC-847 화합물의 구조를 포함하는, TC.

청구항 72

청구항 58에 있어서, 이때 구조 5에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 그룹에서 선택되는, TC: AXC-862, AXC-863, AXC-867, AXC-868, AXC-869, AXC-873, AXC-876, AXC-879, AXC-880, AXC-882, AXC-889, AXC-893, AXC-896, AXC-897, AXC-901, AXC-907, AXC-909, AXC-913, 그리고 AXC-914 화합물들.

청구항 73

청구항 43-44, 51-58, 또는 69-72중 임의의 한 항에 있어서, 링커를 더 포함하는, TC.

청구항 74

임의의 청구항 41-63중 임의의 한 항에 따른 면역 자극 항체 콘쥬게이트 (ISAC).

청구항 75

청구항 74에 있어서, 이때 상기 TLR 작용제는 다음의 군에서 선택된 화합물을 포함하는, ISAC. AXC-862, AXC-863, AXC-867, AXC-868, AXC-869, AXC-874, AXC-875, AXC-876, AXC-879, AXC-880, AXC-882, AXC-893, AXC-896, AXC-897, AXC-901, AXC-907, 그리고 AXC-910 화합물들.

청구항 76

도 1에 따른 구조를 갖는 화합물들중 임의의 하나의 염.

청구항 77

표 3, 4, 5, 6, 7의 화합물들중 임의의 하나의 염.

청구항 78

청구항 41에 따른 TC를 세포에 접촉시키는 것을 포함하는 세포를 사멸시키는 방법.

청구항 79

청구항 78에 있어서, 이때 상기 세포는 종양 또는 암 세포인, 방법.

청구항 80

청구항 41에 따른 약제학적 조성물 또는 이의 염.

청구항 81

청구항 80에 있어서, 약제학적으로 수용가능한 부형제를 더 포함하는, 약제학적 조성물 또는 이의 염.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 2월 12일자로 제출된 U.S. 가출원 번호 62/804,742의 "항체-TLR 작용제 콘쥬게이트를 함유하는 조성물, 방법 및 이의 용도" 제목에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통하여 ASCII 포멧으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이의 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입된다. ASCII 사본은 2020년 2월 7일자로 생성되었으며, AMBX_0230_PCT_SL.txt이름으로 불리며, 크기는 30,527바이트이다..

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 TLR-작용제 화합물들과 TLR-작용제 콘쥬게이트 (TCs)와 이의 용도에 관계한다. 본 발명은 치료 또는 예방용 (TCs)를 함유하는 약제학적 조성물에 더 관계한다.

배 경 기 술

[0007] **발명의 배경**

[0008] 항체 및 이의 단편과 같은 분자 또는 표적화 분자 또는 폴리펩티드, 그리고 TLR 작용제 화합물들을 부위-특이적 콘쥬게이션을 이용하여 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 사용하여 콘쥬게이트되어, 신규한 TLR-작용제 콘쥬게이트 (TC)를 만들 수 있다. 신규한 TCs는 전신 치료 동안, 순환하는 TC는 TLR 작용제를 종양 부위로 표적화하고, 유익한 면역 반응을 국소적으로 자극할 수 있고, 이로 인하여 전신 사이토킨 방출 증후군을 최소화시키는 방향으로 구축될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] **본 발명의 요약**

[0010] 본 발명은 TLR7 및/또는 TLR8을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는 TLRs의 작용제 화합물에 콘쥬게이트된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산를 갖는 폴리펩티드를 표적화하는 것에 관계한다. 이러한 콘쥬게이트는 본원에서 TLR-작용제 콘쥬게이트 (TCs)로 지칭된다. 본 발명의 TCs에는 신규한 생물학적 TLR-작용제 콘쥬게이트 (BTCs)를 만들기 위해 부위-특이적 콘쥬게이션에 의한 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 이용하여 함께 콘쥬게이트된 표적화 생물학적 분자 또는 폴리펩티드가 내포된다. 상기 표적화 생물학적 분자 또는 폴리펩티드는 종양 표적화 생물학적 분자 또는 폴리펩티드일 수 있다.

[0011] 추가 구체예들에서, 본 발명은 안정적인 이량체 또는 다량체를 형성하는 수용성 중합체에 추가 콘쥬게이트된 TCs에 더 관계한다.

[0012] 본 발명은 종양 또는 암의 성장을 억제 또는 감소시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은 환자 종양에 근접하여 환자의 면역계를 자극하기 위해 본 발명의 TC의 효과량을 종양에 접촉시키는 것을 포함한다. 본 발명은 종양 또는 암의 성장을 억제 또는 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명의 페길화된(PEGylated) TC, 또는 본 발명의 TC의 안정적인 이량체 또는 다량체의 효과량을 종양에 접촉시키는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 TC는 페길화-안되거나, 또는 단일-페길화된다. 한 구체예에서, 상기 TC는 이중페길화된다. 한 구체예에서, 상기 TC는 이에 부착된 하나이상의 및/또는 상이한 TLR 작용제 분자를 갖는다. 한 구체예에서, 상기 TC는 이에 부착된 하나이상의 및/또는 동일한 TLR 작용제 분자를 갖는다. 본 발명의 또다른 구체예는 종양 세포에 대한 면역 반응을 조정하기 위해 본 발명의 TCs를 이용하는 방법을 제공한다. 특정 구체예들에서, 상기 TC는 적어도 하나의 화학요법제 및/또는 적어도 하나의 면역요법제와 함께 공동-투여된다. 상기 화학요법제는 테모졸로미드, 제믹타빈, 독소루비신, 시클로포스파미드, 파클리탁셀, 시스플라틴, 플루오로피리미딘, 탁산, 안트라사이클린, 라파티닙, 카페시타빈, 레트로졸, 페르투주맙, 도세탁셀, IFN-α로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 본 발명의 또다른 구체예에서, TC는 적어도 하나의 화학요법제 및/또는 적어도 하나의 면역요법제와 함께 공동-투여된다.

[0013] 일부 구체예들에서, 상기 TC는 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 항원-결합 폴리펩티드(ABP)를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 표적화 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 완전한 항체 중쇄를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 완전한 항체 경쇄를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 항체 경쇄의 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 항체 중쇄의 가변 영

역을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 항체 경쇄의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 항체 중쇄의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 경쇄의 적어도 하나의 CDR과 중쇄의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 Fab를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 두 개 또는 그 이상의 Fabs를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 (Fab')2를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 두 개 또는 그 이상의 (Fab')2를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 scFv를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 두 개 또는 그 이상의 scFv를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 미니바디(minibody)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 두 개 또는 그 이상의 미니바디를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 디아바디(diabody)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 두 개 또는 그 이상의 디아바디를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 경쇄의 가변 영역과 중쇄의 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 완전한 경쇄와 완전한 중쇄를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 하나 또는 그 이상의 Fc 도메인 또는 이의 일부분을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 상기 구체예들중 임의의 조합을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 상기 구체예들중 임의의 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 또는 이종다량체를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 결합 파트너에 결합하는 폴리펩티드를 포함하는데, 이때 상기 결합 파트너는 항원, 폴리펩티드, 핵산 분자, 중합체, 또는 다른 분자 또는 물질을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 ABP는 비-항체 스캐폴드 분자 또는 물질과 연합된다. 일부 구체예들에서, 상기 항원은 종양 항원이다.

[0014] Toll-유사 수용체 (TLRs)는 광역의 보존된 병원체-연합된 분자 패턴 (PAMPs)을 탐지한다. 이들은 침입한 병원체를 감지하고, 선천적 면역 반응 개시에 중요한 역할을 한다. 인간에는 TLR 패밀리의 10가지 알려진 구성원이 있으며, 이는 세포외 류신-풍부한 도메인과 보존된 Toll/인터루킨 (IL)-1 수용체 (TIR) 도메인을 함유하는 세포질 꼬리를 특징으로 하는 유형 I 막경유 단백질들이다. 이 패밀리 안에, TLR3, TLR7, TLR8, 및 TLR9는 엔도좀 내에 위치한다. TLR7 및 TLR8은 특이적 소 분자 리간드 (즉, TLR7 작용제 또는 TLR8 작용제) 또는 이의 고유의 리간드 (즉, 단일-스트랜드 RNA, ssRNA)에 결합함으로써 활성화될 수 있다. TLR7 또는 TLR8에 작용제의 결합 후, 이량체화된 형태의 이 수용체는 구조적 변화를 겪고, 이 변화로 인하여 골수 분화 주요 (primary) 반응 유전자 88 (MyD88)을 비롯한, 이의 세포질 도메인에서 어댑터 단백질이 후속적으로 모집되는 것으로 보인다. 상기 MyD88 경로를 통한 수용체 신호전달 캐스케이드 개시 후, 세포질 전사 인자들 이를 테면, 인터페론 조절 인자 7 (IRF-7) 및 핵 인자 카파 B (NF-κB)가 활성화된다. 그 다음, 이들 전사 인자는 핵으로 전좌되고, 다양한 유전자들, 예로써, IFN-알파 및 다른 항바이러스 사이토킨 유전자들의 전사가 개시된다. TLR7은 형질 세포양 세포, 그리고 B 세포 상에서 주로 발현된다. 면역 세포의 변화된 반응성은 암 환자의 선천적 면역 반응 감소에 기여할 수 있다. 따라서, 표적화 모이어티 이를 테면, 항체 또는 이의 단편에 콘쥬게이트화된 TLR7 및/또는 TLR8의 작용제-유도된 활성화는 암 치료를 위한 신규한 접근 방법을 제시할 수 있다. TLR7 또는 TLR8 작용제를 포함하는 TC를 사용한 치료는 더 나은 내약성과 함께, 더 큰 효능을 제공하는 유망한 솔루션을 나타낸다. TCs를 만드는데 적합한, 본 발명에서 사용가능한 TLR7 및/또는 TLR8 작용제는 다음의 US 특허에서 찾아볼 수 있고, 이들 각각은 본원의 참고자료에 편입된다: U.S. 특허 번호 6,825,350; U.S. 특허 번호 6,656,389; U.S. 특허 번호 6,656,398; U.S. 특허 번호 6,683,088; U.S. 특허 번호 6,756,382; U.S. 특허 번호 6,825,350; U.S. 특허 번호 6,667,312; U.S. 특허 번호 6,677,347; U.S. 특허 번호 7,598,382; U.S. 특허 번호 8,673,932.

[0015] 일부 구체예들에서, 상기 TC는 표적화 폴리펩티드를 포함하며, 약제학적 보존제(예로써, *m*-크레졸, 페놀, 벤질 알코올)와 함께, 치환, 추가, 또는 결손이 없는, 대응하는 야생형 TC의 양립성(compatibility)과 비교하였을 때, 해당 TC 폴리펩티드의 양립성을 증가시키는 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 추가로 포함한다. 이러한 증가된 양립성은 저장 동안 해당 단백질의 물리화학적 특성 및 생물학적 활성을 유지하는 보존된 약제학적 제형의 제조를 가능하게 할 것이다.

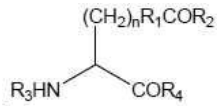
[0016] 일부 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 공작된 결합은 하나 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산으로 만들어진다. 상기 분자내 결합은 많은 방법에 의해 만들어질 수 있는데, 적합한 조건 하에서 단백질 내 두 개 아미노산의 반응 (하나 또는 두 아미노산은 비-자연적 아미노산일 수 있고); 적합한 조건 하에서 두 개 아미노산 (이들 각각은 자연적으로 인코드된 또는 비-자연적으로 인코드된)과 링커, 중합체, 또는 다른 분자와의 반응에 의해 만들어질 수 있지만, 이에 국한되지 않는다.

[0017] 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드 내 하나 또는 그 이상의 아미노산은 하나 또는 그 이상의 자연 발생적 또는 비-자연적으로 발생적 아미노산으로 치환될 수 있다. 일부 구체예들에서, 적어도 하나의 치환이 비-자연적으로 인코드된 아미노산으로 치환된다면, 상기 TC에서 아미노산 치환은 자연 발생적 또는 비-자연적으로 발생적 아미노산 치환일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드에서 하나 또는 그 이상의 아미노산은 하나

또는 그 이상의 자연 발생적 아미노산으로 치환되며, 그리고 추가적으로 적어도 하나의 치환은 비-자연적으로 인코드된 아미노산으로의 치환일 수 있다. 일부 구체예들에서 상기 TC 폴리펩티드는 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 일부 구체예들에서 상기 TC 폴리펩티드는 종양 표적화 폴리펩티드일 수 있다.

[0018] 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 그룹, 아세틸 그룹, 아미노옥시 그룹, 하이드라진 그룹, 하이드라지드 그룹, 세미카르바자이드 그룹, 아지드 그룹, 또는 알킨 그룹을 포함한다.

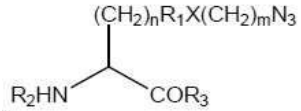
[0019] 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다:

[0020] 

[0021] 이때 n은 0-10이며; R_1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이며; R_2는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 및 치환된 아릴이며; 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹이고, 그리고 R_4는 H, 아미노산, 폴리펩티드; 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다.

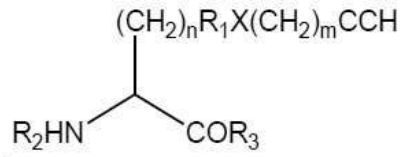
[0022] 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 아미노옥시 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 하이드라지드 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 하이드라진 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산 잔기는 세미카르바자이드 그룹을 포함한다.

[0023] 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산 잔기는 아지드 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다:

[0024] 

[0025] 이때 n은 0-10이며; R_1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 또는 존재하지 않고; X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않고; m은 0-10이며; R_2는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹, 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드; 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다.

[0026] 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 알킨 그그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다:

[0027] 

[0028] 이때 n은 0-10이며; R_1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않고; m은 0-10이며; R_2는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹, 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드; 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다.

[0029] 일부 구체예들에서, 상기 폴리펩티드는 수용성 중합체에 연계된 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC이다. 일부 구체예들에서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 비-자연적으로 인코드된 아미노산 및 하나 또는 그 이상의 해독-후 변형, 링커, 중합체; 또는 생물학적으로 활성 분자를 포함한다.

[0030] 본 발명은 상기 TC의 표적화 폴리펩티드를 인코드하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 또한 제공하고, 본 발명은 엄중한 조건 하에 해당 폴리뉴클레오티드에 혼성화되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 상기 표적화 폴리펩티드를 인코드하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산을 또한 제공하며, 이때 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 선발 코돈을 포함한다. 다수의 상이한 폴리뉴클레

오티드가 본 발명의 임의의 폴리펩티드를 인코드할 수 있다는 점은 당업자에게 자명하다.

[0031] 일부 구체예들에서, 상기 선발 코돈은 암버(amber) 코돈, 오크레(ochre) 코돈, 오팔(opal) 코돈, 유니크(unique) 코돈, 래어(rare) 코돈, 5-염기 코돈, 그리고 4-염기 코돈으로 구성된 군에서 선택된다.

[0032] 본 발명은 동종이량체 또는 동종다량체를 형성하도록, 수용성 중합체에 연계된 TC 폴리펩티드를 만드는 방법 또는 하나 또는 그 이상의 TC 폴리펩티드에 연계된 TC 폴리펩티드를 만드는 방법을 또한 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 단리된 TC 폴리펩티드를 해당 비-자연적으로 인코드된 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 수용성 중합체 또는 링커에 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드에 통합된 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 20개의 일반 아미노산중 임의의 것에 대해 비반응성인 수용성 중합체에 대해 반응성이 있다. 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드에 통합된 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 20개의 일반 아미노산중 임의의 것에 대해 비반응성인 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 대해 반응성이 있다.

[0033] 일부 구체예들에서, 상기 수용성 중합체 또는 링커에 연계된 TC 폴리펩티드는 카르보닐-함유하는 아미노산을 포함하는 TC 폴리펩티드를 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바자이드 그룹을 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커와 반응시켜 만든다. 일부 구체예들에서, 상기 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바자이드 그룹은 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커에 아미드 링키지(linkage)를 통하여 연계된다. 일부 구체예들에서, 상기 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바자이드 그룹은 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커에 카르바마이트 링키지를 통하여 연계된다.

[0034] 일부 구체예들에서, 상기 수용성 중합체에 연계된 TC 폴리펩티드는 카르보닐 그룹을 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커와 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바자이드 그룹을 포함하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드와 반응시켜 만든다.

[0035] 일부 구체예들에서, 상기 수용성 중합체 또는 링커에 연계된 TC 폴리펩티드는 알킨-함유하는 아미노산을 포함하는 TC에 아지드 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 반응시켜 만든다. 일부 구체예들에서, 상기 아지드 또는 알킨 그룹은 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커에 아미드 링키지를 통하여 연계된다.

[0036] 일부 구체예들에서, 상기 수용성 중합체 또는 링커에 연계된 TC 폴리펩티드는 아지드-함유하는 아미노산을 포함하는 TC 폴리펩티드에 알칸 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 반응시켜 만든다. 일부 구체예들에서, 상기 아지드 또는 알킨 그룹은 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커에 아미드 링키지를 통하여 연계된다.

[0037] 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커는 약 0.1 kDa ~ 약 100 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커는 0.1 kDa ~ 50 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자 또는 링커는 분기된 중합체 또는 링커이다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분기된 중합체 또는 링커의 각 분기는 1 kDa ~ 100 kDa; 또는 1 kDa ~ 50 kDa의 분자량을 갖는다.

[0038] 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드에 연계된 수용성 중합체는 폴리알킬렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC에 통합된 비-자연적으로 인코드된 아미노산 잔기는 카르보닐 그룹, 아미노옥시 그룹, 하이드라지드 그룹, 하이드라진, 세미카르바자이드 그룹, 아지드 그룹; 또는 알킨 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드에 통합된 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산 잔기는 카르보닐 모이어티를 포함하며, 상기 수용성 중합체는 아미노옥시, 하이드라지드, 하이드라진; 또는 세미카르바자이드 모이어티를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드에 통합된 비-자연적으로 인코드된 아미노산 잔기는 알킨 모이어티를 포함하고, 상기 수용성 중합체는 아지드 모이어티를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드에 통합된 비-자연적으로 인코드된 아미노산 잔기는 아지드 모이어티를 포함하고, 상기 수용성 중합체는 알킨 모이어티를 포함한다. 본 발명은 비-자연적으로 인코드된 아미노산 및 약제학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 TC 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 또한 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 수용성 중합체에 연계된다.

[0039] 본 발명은 선발 코돈을 포함하고, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드를 인코드하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 또한 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 세포는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 상기 TC의 표적화 폴리펩티드로 치환시키기 위한 정법(orthogonal) RNA 합성효소 및/또는 정법 tRNA을 포함한다.

[0040] 본 발명은 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 상기 TC의 표적화 폴리펩티드를 만드는 방법을 또

한 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 상기 TC의 표적화 폴리펩티드를 인코드하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드, 정법 RNA 합성효소 및/또는 정법 tRNA를 포함하는 세포를 해당 TC의 표적화 폴리펩티드 또는 이의 변이체의 발현이 허용되도록 하는 조건 하에서 배양하고; 그리고 상기 세포 및/또는 배양 배지로부터 해당 TC 폴리펩티드를 정제하는 것을 포함한다.

[0041] 본 발명은 TC의 치료요법적 반감기, 혈청 반감기 또는 순환 시간을 증가시키는 방법을 또한 제공한다. 본 발명은 TC의 면역원성을 조정하는 방법을 또한 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 상기 TC의 자연 발생적 표적화 폴리펩티드 내 임의의 하나 또는 그 이상의 아미노산을 비-자연적으로 인코드된 아미노산으로 대체하고, 및/또는 링커, 중합체, 수용성 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 해당 표적화 폴리펩티드를 연계시키는 것을 포함한다.

[0042] 본 발명은 본 발명의 TC 분자의 유효량으로 이러한 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법을 또한 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 방법은 해당 환자에게 비-자연적으로-인코드된 아미노산을 포함하는 TC 및 약제학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 치료요법적으로-유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 수용성 중합체에 연계된다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 당화된다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 당화되지 않는다.

[0043] 본 발명은 단일 아미노산에서 상기 TC에 공유 결합에 의해 연계된 수용성 중합체 또는 링커를 포함하는 TCs를 또한 제공한다. 일부 구체예들에서, 상기 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 수용성 중합체 또는 링커에 공유적으로 연계된 아미노산은 상기 TC의 표적화 폴리펩티드 안에 존재하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산이다.

[0044] 본 발명은 적어도 하나의 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자를 포함하는 TC 폴리펩티드를 제공하며, 이때 전술한 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자는 상기 TC의 표적화 폴리펩티드에 리보솜에 의해 통합된 비-자연적으로 인코드된 아미노산의 기능 그룹을 통하여 해당 폴리펩티드에 부착된다. TC 콘쥬게이트에서, PEG 또는 다른 수용성 중합체, 또다른 TC, 폴리펩티드, 또는 생물학적으로 활성 분자는 링커를 경유하여 해당 TC에 직접적으로 콘쥬게이트될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 링커의 길이는 유연성을 허용하고, 이량체 형성을 허용하기에 충분하다. 한 구체예에서 상기 링커는 이량체 형성을 허용하기 위해 길이가 적어도 3개 아미노산, 또는 18개 원자의 길이다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리펩티드는 링커에 연계되어 다량체 형성을 허용한다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 이중-기능성 링커다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물 및/또는 TCs는 다중 링커를 포함할 수 있다. 다른 구체예들에서, 각 링커에는 부착된 하나 또는 그 이상의 화합물이 내포될 수 있다. 링커는 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 폴리에테르, 폴리에스테르, 폴리아미드 그룹(들)을 또한 포함할 수 있고, 그리고 폴리아미노산, 폴리펩티드, 절단가능한 펩티드, 또는 아미노벤질카르바마이트를 또한 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 동일한 또는 상이한 링커일 수 있다. 적합한 링커에는 예를 들면, 절단가능한 링커와 절단-불가능한 링커가 내포된다. 적합한 절단가능한 링커에는 세포내 단백질분해효소, 이를테면, 리소좀 단백질분해효소 또는 엔도좀 단백질분해효소에 의해 절단가능한 예를 들면,펩티드 링커가 내포된다. 절단가능한 링커는 발린-시투룰린 링커 또는 발린-알라닌 펩티드를 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 이-펩티드 링커, 이를 테면, 발린-시투룰린 또는 페닐알라닌-리신 링커일 수 있다. 발린-시투룰린-또는 발린-알라닌-함유하는 링커는 말레이미드 또는 숙시니미드 그룹을 함유할 수 있다. 발린-시투룰린-또는 발린-알라닌-함유하는 링커는 파라 아미노벤질 알코올 (PABA) 그룹 또는 파라-아미노벤질 카르바마이트 (PABC)를 함유할 수 있다. 다른 적합한 링커에는 5.5 미만의 pH에서 가수분해가능한 링커, 이를 테면, 히드라존 링커가 내포된다. 추가적으로 적합한 절단가능한 링커에는 이황화물 링커가 내포된다. 일부 구체예들에서, 상기 절단가능한 링커에는 종양 미세환경 이를 테면, 종양 침윤성 T-세포에서 절단된 링커가 내포될 수 있다. 일부 구체예들에서, 절단-불가능한 링커에는 말레이미도카프로일 링커가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 상기 말레이미도카프로일 링커는 N-말레이미도메틸시클로헥산-1-카르복실레이트, 숙시니미드 그룹, 펜타플루오르페닐 그룹, 및/또는 하나 또는 그 이상의 PEG 분자를 포함할 수 있지만, 이러한 것들에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 조성물, 화합물 또는 이의 염중 임의의 하나는 링커를 통하여 폴리펩티드에 연계될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서, 표 3, 4, 5, 6, 및 7에 기재된 조성물, 화합물 또는 이의 염중 임의의 하나는 링커를 통하여 폴리펩티드에 연계될 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리펩티드는 표적화 폴리펩티드 또는 생물학적 표적화 폴리펩티드 또는 종양 표적화 폴리펩티드이다. 일부 구체예들에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 항체 또는 항체 단편이다.

[0045] 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드는 단일-페길화된다. 본 발명은 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 부착된 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자를 포함하는 TC를 또한 제공하며, 이때

전술한 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 상기 폴리펩티드의 사전-선택된 부위에서 해당 폴리펩티드로 리보솜에 의해 통합된다.

[0046] 일부 구체예들에서, 본 발명은 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 갖는 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 제공하며, 이때 상기 폴리펩티드들중 적어도 하나는 상기 폴리펩티드의 비-자연적 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 TLR 작용제 분자에 연계된다.

[0047] 또다른 구체예에서, 본 발명은 조성물을 제공하는데, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드는 동일한 또는 상이한 표적화 폴리펩티드이다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 조성물을 제공하는데, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드는 세포 표면 표적, 또는 종양 세포 표적, 또는 암 세포 표적에 결합한다. 또다른 구체예에서, 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드는 단일-특이적, 이중-특이적, 또는 다중-특이적 표적화 폴리펩티드이다.

[0048] 다른 구체예들에서, 상기 단일-특이적, 이중-특이적, 또는 다중-특이적 표적화 폴리펩티드는 약물 콘쥬게이트 또는 체크포인트 억제제를 포함한다. 임의의 적합한 면역 체크포인트 억제제는 본 발명의 조성물 또는 TCs와 함께 사용이 고려된다. 일부 구체예들에서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 단백질의 발현 또는 활성을 감소시킨다. 또다른 구체예에서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 하나 또는 그 이상의 면역 체크포인트 단백질과 이들 리간드 사이의 상호작용을 감소시킨다. 상기 면역 체크포인트 분자의 발현 및/또는 활성을 감소시키는 억제성 핵산이 또한 본 발명에 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 CTLA4, TIGIT, 글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련된 단백질 (GITR), 유도성 T 세포 공동자극 (ICOS), CD96, 폴리오바이러스 수용체-관련된 2 (PVRL2), PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, B7-H4, 킬러 면역글로불린 수용체 (KIR), OX40, OX40-L 인돌아민 2,3-디옥시게나제 1 (IDO-1), 인돌아민 2, 3-디옥시게나제 2 (IDO-2), CEACAM1, CD272, TEVI3, 아데노신 A2A 수용체, 그리고 VISTA 단백질이다. 일부 구체예들에서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 CTLA4, PD-1, 또는 PD-L1의 억제제다.

[0049] 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 세포의 항원에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 또다른 구체예에서 상기 표적화 폴리펩티드는 HER2, HER3, PD-1, PDL-1, EGFR, TROP2, PSMA, VEGFR, CTLA-4, EpCAM, MUC1, MUC16, c-met, GPC3, ENPP3, TIM-1, FOLR1, STEAP1, 메소텔린, 5T4, CEA, CA9, 캐드헤린 6, ROR1, SLC34A2, SLC39A6, SLC44A4, LY6E, DLL3, ePhA2, GPNMB, SLITRK6, CD3, CD19, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD117, CD123, CD179, CD223, 그리고 CD276으로 구성된 군에서 선택된 표적에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 일부 구체예들에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 HER2에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 트라스투주맙(trastuzumab)이다.

[0050] 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 IgG, Fab, (Fab')2, Fv, 또는 단일 쇄 Fv (scFv)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 하나 또는 그 이상의 Fab, (Fab')2, Fv, 또는 단일 쇄 Fv (scFv) 돌연변이를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 하나 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 1 ~ 6개 Fc 돌연변이를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 두 개 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 세 개 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 네 개 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 다섯 개 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 여섯 개 Fc 돌연변이를 포함한다.

[0051] 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄 및 경쇄에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 그리고 하나 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 이때 항체 또는 항체 단편은 하나 또는 그 이상의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 적어도 두 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산, 상기 항체 또는

항체 단편은적어도 두 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 적어도 세 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산, 상기 항체 또는 항체 단편은 적어도 세 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 그리고 적어도 네 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산, 상기 항체 또는 항체 단편은 적어도 네 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 그리고 적어도 다섯 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산, 상기 항체 또는 항체 단편은 적어도 다섯 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 그리고 적어도 여섯 개의 Fc 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항체 또는 항체 단편은 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산, 상기 항체 또는 항체 단편은 적어도 여섯 개 Fc 돌연변이를 더 포함한다.

[0052] 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 파라-아세틸 페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌, *p*-술포티로신, *p*-카르복시페닐알라닌, o-니트로페닐알라닌, m-니트로페닐알라닌, *p*-보로닐 페닐알라닌, o-보로닐페닐알라닌, m-보로닐페닐알라닌, *p*-아미노페닐알라닌, o-아미노페닐알라닌, m-아미노페닐알라닌, o-아실페닐알라닌, m-아실페닐알라닌, *p*-OMe 페닐알라닌, o-OMe 페닐알라닌, m-OMe 페닐알라닌, *p*-술포페닐알라닌, o-술포페닐알라닌, m-술포페닐알라닌, 5-니트로 His, 3-니트로 Tyr, 2-니트로 Tyr, 니트로 치환된 Leu, 니트로 치환된 His, 니트로 치환된 De, 니트로 치환된 Trp, 2-니트로 Trp, 4-니트로 Trp, 5-니트로 Trp, 6-니트로 Trp, 7-니트로 Trp, 3-아미노티로신, 2-아미노티로신, O-술포티로신, 2-술폭시페닐알라닌, 3-술폭시페닐알라닌, o-카르복시페닐알라닌, m-카르복시페닐알라닌, *p*-아세틸-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ세린, L-Dopa, 플로오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, *p*-요오드-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 그리고 파라-아지도메틸-페닐알라닌의 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 비-자연적 아미노산은 파라-아세틸-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌 또는 파라-아지도메틸-페닐알라닌로 구성된 선택된다. 다른 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 부위 특이적으로 상기 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드에 통합된다.

[0053] 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 TLR7 작용제, TLR8 작용제, 또는 TLR7/TLR8 듀얼 작용제다. 다른 구체예들에서, 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 1, 2, 3, 4 또는 5중 임의의 하나에 따른 분자 구조를 포함하는 TLR 작용제다. 또다른 구체예에서 상기 TLR 작용제는 본 발명의 표 3, 4, 5, 6, 7에 따른 구조로 선택된 TLR 작용제의 임의의 하나다.

[0054] 다른 구체예들에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 콘쥬게이트된다. 일부 구체예들에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 접 또는 간접적으로 콘쥬게이트된다. 일부 구체예들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 절단가능한 또는 절단-불가능한 링커다.

[0055] 일부 구체예들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 0.1kDa ~ 50kDa이다. 다른 구체예들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 0.1kDa ~ 10kDa이다. 다른 구체예들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 링커 또는 중합체는 선형, 분기된, 다량체, 또는 덴드라이머이다. 또다른 구체예에서, 상기 하나 또는 그 이상의 링커 또는 중합체는 이중-기능성 또는 다중-기능성 링커 또는 이중-기능성 또는 다중-기능성 중합체다.

[0056] 다른 구체예들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 중합체는 수용성 중합체다. 다른 구체예들에서, 상기 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 일부 구체예들에서, 상기 PEG는 0.1kDa ~ 100kDa의 분자량을 갖는다. 다른 구체예들에서, 상기 PEG는 0.1kDa ~ 50kDa의 분자량을 갖는다. 다른 구체예들에서, 상기 PEG는 0.1kDa ~ 40kDa의 분자량을 갖는다. 다른 구체예들에서, 상기 PEG는 0.1kDa ~ 30kDa의 분자량을 갖는다. 다른 구체예들에서, 상기 PEG는 0.1kDa ~ 20kDa의 분자량을 갖는다. 다른 구체예들에서, 상기 PEG는 0.1kDa ~ 10kDa의 분자량

을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 약 0.1 kDa ~ 약 100 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 0.1 kDa ~ 50 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)는 1 kDa ~ 25 kDa, 또는 2 ~ 22 kDa, 또는 5 kDa ~ 20 kDa의 분자량을 갖는다. 예를 들면, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 약 5 kDa, 또는 약 10 kDa, 또는 약 20 kDa, 또는 약 30 kDa일 수 있다. 예를 들면, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 5 kDa 또는 10 kDa 또는 20 kDa, 또는 30 kDa일 수 있다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분기된 PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분기된 5K PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분기된 10K PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분기된 20K PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 5K PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 10K PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 20K PEG이다. 일부 구체예들에서 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 30K PEG이다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량는 평균 분자량이다. 특정 구체예들에서, 상기 평균 분자량은 수 평균 분자량 (Mn)이다. 상기 평균 분자량은 GPC 또는 SEC, SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, 질량 분광분석법, 또는 모세관 전기영동을 이용하여 결정되거나 또는 측정될 수 있다.

[0057] 또다른 구체예에서, 적어도 하나의 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자는 적어도 하나의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 연계된다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 PEG이다. 다른 구체예들에서, 상기 링커는 0.1kDa ~ 50 kDa의 분자량을 갖는 PEG이다. 다른 구체예들에서, 상기 링커는 0.1kDa ~ 40 kDa의 분자량을 갖는 PEG이다. 다른 구체예들에서, 상기 링커는 0.1kDa ~ 30 kDa의 분자량을 갖는 PEG이다. 다른 구체예들에서, 상기 링커는 0.1kDa ~ 20 kDa의 분자량을 갖는 PEG이다. 다른 구체예들에서, 상기 링커는 0.1kDa ~ 10 kDa의 분자량을 갖는 PEG이다. 다른 구체예들에서, 상기 링커는 0.1kDa ~ 5 kDa의 분자량을 갖는 PEG이다.

[0058] 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 상기 조성물의 안정성 또는 용해도를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 ADCP 또는 ADCC 활성을 강화시키는/감소시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 상기 조성물의 약물동력학을 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 조성물은 재조합 숙주 세포에서 또는 시험관에서 합성된 표적화 폴리펩티드의 발현을 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함한다.

[0059] 또다른 구체예에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 상기 폴리펩티드 안의 20개의 일반 아미노산중 임의의 것에 대해 비반응성인 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 대해 반응성이 있다. 또다른 구체예에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 그룹, 아미노옥시 그룹, 하이드라진 그룹, 하이드라지드 그룹, 세미카르바자이드 그룹, 아지드 그룹, 또는 알킨 그룹을 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 룹을 포함한다.

[0060] 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 세포독성제 또는 면역자극제에 연계된다. 또다른 구체예에서, 본 발명의 TC 또는 BTC는 세포독성제 또는 면역자극제에 연계된다. 또다른 구체예에서, 상기 표적화 폴리펩티드는 세포독성제 또는 면역자극제를 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 발명의 TC 또는 BTC는 세포독성제 또는 면역자극제를 포함한다.

[0061] 또다른 구체예에서, 본 발명은 도 1의 임의의 구조에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)를 제공하며, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트된다. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 TLR7 작용제, TLR8 작용제, 또는 TLR7/TLR8 듀얼 작용제다. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 도 1의 임의의 구조 1에 따른 구조를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 구조 1에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 군에서 선택된다: AXC-621, AXC-622, AXC-625, AXC-626, AXC-627, AXC-638, AXC-639, AXC-640, AXC-642, AXC-662, AXC-665, AXC-666, AXC-667, AXC-668, AXC-669, AXC-670, AXC-671, AXC-672, AXC-675, AXC-678, AXC-679, AXC-681, AXC-687, AXC-688, AXC-689, AXC-690, AXC-691, AXC-696, AXC-697, AXC-698, AXC-699, AXC-700, AXC-701, AXC-702, AXC-709, AXC-710, AXC-711, AXC-712, AXC-713, AXC-714, AXC-715, AXC-716, AXC-717, AXC-718, AXC-719, AXC-722, AXC-723, AXC-724, AXC-725, AXC-726, AXC-727, AXC-729, AXC-731, AXC-732, AXC-733, AXC-734, AXC-735, AXC-736, AXC-737, AXC-738, AXC-739, AXC-740, AXC-741, AXC-743, AXC-742, AXC-747, AXC-748, AXC-749, AXC-750, AXC-751, AXC-752, AXC-754, AXC-755, AXC-756, AXC-757, AXC-758, AXC-759,

AXC-760, AXC-761, AXC-762, AXC-764, AXC-771, AXC-772, AXC-773, AXC-777, AXC-778, AXC-779, AXC-789, AXC-793, AXC-799, AXC-800, AXC-801, AXC-802, AXC-803, AXC-804, AXC-805, AXC-806, AXC-807, AXC-808, AXC-809, AXC-810, AXC-831 및 AXC-910 화합물. 또다른 구체예에서, 본 발명은 다음중 임의의 하나의 TLR 작용제를 제공한다: 링커를 추가로 포함하는 AXC-621, AXC-622, AXC-625, AXC-626, AXC-627, AXC-638, AXC-639, AXC-640, AXC-642, AXC-662, AXC-665, AXC-666, AXC-667, AXC-668, AXC-669, AXC-670, AXC-671, AXC-672, AXC-675, AXC-678, AXC-679, AXC-681, AXC-687, AXC-688, AXC-689, AXC-690, AXC-691, AXC-696, AXC-697, AXC-698, AXC-699, AXC-700, AXC-701, AXC-702, AXC-709, AXC-710, AXC-711, AXC-712, AXC-713, AXC-714, AXC-715, AXC-716, AXC-717, AXC-718, AXC-719, AXC-722, AXC-723, AXC-724, AXC-725, AXC-726, AXC-727, AXC-729, AXC-731, AXC-732, AXC-733, AXC-734, AXC-735, AXC-736, AXC-737, AXC-738, AXC-739, AXC-740, AXC-741, AXC-743, AXC-742, AXC-747, AXC-748, AXC-749, AXC-750, AXC-751, AXC-752, AXC-754, AXC-755, AXC-756, AXC-757, AXC-758, AXC-759, AXC-760, AXC-761, AXC-762, AXC-764, AXC-771, AXC-772, AXC-773, AXC-777, AXC-778, AXC-779, AXC-789, AXC-793, AXC-799, AXC-800, AXC-801, AXC-802, AXC-803, AXC-804, AXC-805, AXC-806, AXC-807, AXC-808, AXC-809, AXC-810, AXC-831, 또는 AXC-910 화합물. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 링커를 더 포함하는 구조 1에 따른 구조를 포함한다.

[0062] 다른 구체예들에서, 상기 구조 1에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음 군에서 선택된다: AXC-625, AXC-626, AXC-638, AXC-639, AXC-640, AXC-642, AXC-662, AXC-667, AXC-668, AXC-669, AXC-670, AXC-671, AXC-672, AXC-675, AXC-681, AXC-687, AXC-688, AXC-689, AXC-690, AXC-691, AXC-697, AXC-699, AXC-700, AXC-701, AXC-702, AXC-709, AXC-710, AXC-711, AXC-713, AXC-714, AXC-717, AXC-719, AXC-722, AXC-723, AXC-724, AXC-725, AXC-726, AXC-727, AXC-731, AXC-732, AXC-733, AXC-734, AXC-735, AXC-736, AXC-737, AXC-738, AXC-739, AXC-740, AXC-741, AXC-743, AXC-742, AXC-747, AXC-748, AXC-750, AXC-751, AXC-752, AXC-754, AXC-755, AXC-756, AXC-757, AXC-758, AXC-759, AXC-760, AXC-761, AXC-762, AXC-764, AXC-771, AXC-772, AXC-773, AXC-777, AXC-778, AXC-779, AXC-789, AXC-793, AXC-800, AXC-801, AXC-802, AXC-803, AXC-804, AXC-805, AXC-806, AXC-807, AXC-808, AXC-809, AXC-810, AXC-831 및 AXC-910 화합물들. 다른 구체예들에서, 상기 구조 1에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음 군에서 선택된다: AXC-801, AXC-802, AXC-831 및 AXC-910 화합물들. 다른 구체예들에서, 상기 구조 1에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음 군에서 선택된다: 링커를 더 포함하는 AXC-801, AXC-802, AXC-831 및 AXC-910 화합물들.

[0063] 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄와 경쇄 모두에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 파라-아세틸 페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌, *p*-술포티로신, *p*-카르복시페닐알라닌, o-니트로페닐알라닌, m-니트로페닐알라닌, *p*-보로닐 페닐알라닌, o-보로닐페닐알라닌, m-보로닐페닐알라닌, *p*-아미노페닐알라닌, o-아미노페닐알라닌, m-아미노페닐알라닌, o-아실페닐알라닌, m-아실페닐알라닌, *p*-OMe 페닐알라닌, o-OMe 페닐알라닌, m-OMe 페닐알라닌, *p*-술포페닐알라닌, o-술포페닐알라닌, m-술포페닐알라닌, 5-니트로 His, 3-니트로 Tyr, 2-니트로 Tyr, 니트로 치환된 Leu, 니트로 치환된 His, 니트로 치환된 De, 니트로 치환된 Trp, 2-니트로 Trp, 4-니트로 Trp, 5-니트로 Trp, 6-니트로 Trp, 7-니트로 Trp, 3-아미노티로신, 2-아미노티로신, O-술포티로신, 2-술폭시페닐알라닌, 3-술폭시페닐알라닌, o-카르복시페닐알라닌, m-카르복시페닐알라닌, *p*-아세틸-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ세린, L-Dopa, 플로오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, *p*-요오드-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 그리고 파라-아지도메틸-페닐알라닌의 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 비-자연적 아미노산은 파라-아세틸-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도메틸-페닐알라닌, 또는 파라-아지도에톡시 페닐알라닌이다.

[0064] 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 Fc 영역 안에 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 Fc 영역 안에 두 개 또는 그 이상의 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 Fc 영역 안에 세 개 또는 그 이상의 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 Fc 영역 안에 네 개 또는 그 이상의 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 Fc 영역 안에 다섯 개 또는 그 이상의 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 Fc 영역 안에 여섯 개 또는 그 이상의 돌연변이를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편

은 Fc 영역 안에 여섯 개의 돌연변이를 더 포함한다.

[0065] 또다른 구체예에서, 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 절단가능한 또는 절단-불가능한 링커다. 다른 구체예들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 링커는 이중-기능성 또는 다중-기능성 링커다.

[0066] 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 2에 따른 구조를 포함한다. 또다른 구체예에서, 구조 2에 따른 구조를 포함하는 상기 TLR 작용제는 AXC-745, AXC-746, 그리고 AXC-753 화합물의 군에서 선택된다. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 다음중 임의의 하나에 따른 구조를 포함한다: 링커를 더 포함하는 AXC-745, AXC-746, 그리고 AXC-753 화합물. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 링커를 더 포함하는 구조 2에 따른 구조를 포함한다.

[0067] 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 3에 따른 구조를 포함한다. 또다른 구체예에서, 구조 3에 따른 구조를 포함하는 상기 TLR 작용제는 AXC-837 또는 AXC-847 화합물이다. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 링커를 더 포함하는 구조의 AXC-837 또는 AXC-847 화합물을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 링커를 더 포함하는 구조의 AXC-847 화합물을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 링커를 더 포함하는 구조 3에 따른 구조를 포함한다.

[0068] 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 4에 따른 구조를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 구조 4에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 군에서 선택된다: AXC-844, AXC-842, AXC-843, AXC-845, AXC-846, AXC-836, 또는 AXC-841 화합물들. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 다음중 임의의 하나의 구조 4에 따른 구조를 포함한다: AXC-844, AXC-842, AXC-843, AXC-845, AXC-846, AXC-836, 또는 AXC-841 화합물들은 링커를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 링커를 더 포함하는 구조 4에 따른 구조를 포함한다.

[0069] 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 도 1의 구조 5에 따른 구조를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 구조 5에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음의 군에서 선택된다: AXC-862, AXC-863, AXC-867, AXC-868, AXC-869, AXC-872, AXC-873, AXC-876, AXC-877, AXC-878, AXC-879, AXC-880, AXC-881, AXC-882, AXC-883, AXC-884, AXC-885, AXC-886, AXC-887, AXC-888, AXC-889, AXC-890, AXC-891, AXC-892, AXC-893, AXC-895, AXC-896, AXC-897, AXC-898, AXC-901, AXC-903, AXC-904, AXC-905, AXC-906, AXC-907, AXC-908, AXC-909, AXC-911, AXC-912, AXC-913, AXC-914, AXC-915, 또는 AXC-916 화합물들. 다른 구체예들에서, 상기 구조 5에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제는 다음 군에서 선택된다: AXC-862, AXC-863, AXC-867, AXC-868, AXC-869, AXC-873, AXC-876, AXC-879, AXC-880, AXC-882, AXC-889, AXC-893, AXC-896, AXC-897, AXC-901, AXC-907, AXC-909, AXC-913, 그리고 AXC-914 화합물들. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 다음중 임의의 하나에 따른 구조를 포함한다: 링커를 더 포함하는 AXC-862, AXC-863, AXC-867, AXC-868, AXC-869, AXC-872, AXC-873, AXC-876, AXC-877, AXC-878, AXC-879, AXC-880, AXC-881, AXC-882, AXC-883, AXC-884, AXC-885, AXC-886, AXC-887, AXC-888, AXC-889, AXC-890, AXC-891, AXC-892, AXC-893, AXC-895, AXC-896, AXC-897, AXC-898, AXC-901, AXC-903, AXC-904, AXC-905, AXC-906, AXC-907, AXC-908, AXC-909, AXC-911, AXC-912, AXC-913, AXC-914, AXC-915, 또는 AXC-916 화합물들. 또다른 구체예에서, 상기 TLR 작용제는 링커를 더 포함하는 구조 5에 따른 구조를 포함한다.

[0070] 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:1-13중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:1-13중 적어도 두 개의 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 a) 서열 식별 번호: 1 또는 2; 그리고 b) 서열 식별 번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 및 13중 임의의 하나를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 a) 서열 식별 번호: 1 또는 2의 중쇄; 그리고 b) 서열 식별 번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 및 13중 임의의 하나의 경쇄를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 a) 서열 식별 번호:1; 그리고 b) 서열 식별 번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 및 13중 임의의 하나를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 a) 서열 식별 번호:2; 그리고 b) 서열 식별 번호: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 및 13중 임의의 하나를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:3을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:4를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:5를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:6을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:7을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:8을 포함한다.

또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:9를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:10을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:11을 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:12를 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 항-HER2 항체 또는 항체 단편은 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:13을 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 제공하며, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 Kabat 번호매김에 따라 위치 114에 부위 특이적으로 통합된다.

[0071] 또다른 구체예에서, 본 발명은 도 1의 임의의 구조에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)를 제공하며, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트되며, 상기 TC는 화학요법제 또는 면역요법제를 더 포함한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 표 3-7의 화합물들중 임의의 하나로부터 선택된 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)를 제공하며, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트된다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 표 3-7의 화합물들중 임의의 하나로부터 선택된 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)를 제공하며, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트되고, 상기 TC는 화학요법제 또는 면역요법제를 더 포함한다.

[0072] 또다른 구체예에서, 본 발명은 도 1의 임의의 구조에 따른 구조를 포함하는 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)를 제공하며, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트되고, 상기 TC는 약물 콘쥬게이트를 더 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 약물 콘쥬게이트는 항체 약물 콘쥬게이트다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 표 3-7의 화합물들중 임의의 하나로부터 선택된 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)를 제공하며, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트된다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 표 3-7의 화합물들중 임의의 하나로부터 선택된 TLR 작용제에 콘쥬게이트된 항-HER2 항체 또는 항체 단편을 포함하는 TLR 작용제 콘쥬게이트 (TC)를 제공하며, 이때 상기 TLR 작용제는 상기 항체 또는 항체 단편에 통합된 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 해당 항체 또는 항체 단편에 콘쥬게이트되고, 상기 TC는 약물 콘쥬게이트를 더 포함한다. 다른 구체예들에서, 상기 약물 콘쥬게이트는 항체 약물 콘쥬게이트다. 다른 구체예들에서 상기 TC는 사이토킨 또는 세포독소(cytotoxin)를 더 포함한다.

[0073] 또다른 구체예에서, 본 발명은 암 또는 질환 또는 병태 또는 조짐 또는 장애를 갖는 대상체 또는 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 해당 대상체 또는 환자에게 본 발명의 조성물 또는 TC의 치료요법적으로-유효량을 투여하는 것을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 종양 또는 암은 HER2 양성 종양 또는 암이다. 특정 구체예들에서, 상기 종양, 암, 조짐, 질환, 장애 또는 병태는 HER2 양성 종양, 암, 조짐, 질환, 장애 또는 병태다. 특정 구체예들에서, 상기 종양 또는 암은 결장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 교모세포종, 전립선암, 방광암, 자궁경부암, 췌장암, 신장암, 식도암, 질암, 위암, 그리고 백혈병으로 구성된 군에서 선택된다.

[0074] 또다른 구체예에서, 본 발명은 암 또는 질환 또는 병태 또는 조짐 또는 장애를 갖는 대상체 또는 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 해당 대상체 또는 환자에게 본 발명의 TC 또는 조성물의 치료요법적으로-유효량을 투여하는 것을 포함하고, 이 조성물은 화학요법제 또는 면역요법제를 더 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 TC는 적어도 하나의 화학요법제와 공동-투여된다. 상기 화학요법제는 테모졸로미드, 제믹타빈, 독소루비신, 시클로포스파미드, 파클리탁셀, 시스플라틴, 플루오로피리미딘, 탁산, 안트라사이클린, 라파티닙, 카페시타빈, 레트로졸, 페르투주맙, 도세탁셀, IFN-α로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 본 발명의 또다른 구체예에서, TC는 적어도 하나의 화학요법제와 공동-투여된다.

[0075] 또다른 구체예에서, 본 발명은 암 또는 질환 또는 병태 또는 조짐 또는 장애를 갖는 대상체 또는 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 해당 대상체 또는 환자에게 본 발명의 TC 또는 조성물의 치료요법적으로-유효량을 투여하는 것을 포함하고, 이 조성물은 항체 약물 콘쥬게이트, 세포독성제, 또는 체크포인트 억제제를 더

포함한다.

[0076] 또다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 TC에 세포를 접촉시키는 것을 포함하는 세포를 사멸 시키는 방법을 제공한다. 다른 구체예들에서, 상기 세포는 종양 또는 암 세포다. 특정 구체예들에서, 상기 종양 또는 암 세포는 결장, 난소, 유방, 흑색종, 폐, 교모세포종, 전립선, 방광, 자궁경부, 췌장, 신장, 식도, 질, 위 또는 백혈병 암 세포다. 특정 구체예들에서, 상기 종양 또는 암은 HER2 양성 종양 또는 암이다. 특정 구체예들에서, 치료될 종양, 암, 조짐, 질환, 장애 또는 병태는 HER2 양성 종양, 암, 조짐, 질환, 장애 또는 병태이다.

[0077] 본 발명은 종양 또는 암의 성장을 억제 또는 감소시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은 환자 종양에 근접하여 환자의 면역계를 자극하기 위해 본 발명의 TC의 효과량을 종양에 접촉시키는 것을 포함한다. 본 발명은 종양 또는 암의 성장을 억제 또는 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명의 페길화된(PEGylated) TC, 또는 본 발명의 TC의 안정적인 이량체 또는 다량체의 효과량을 종양에 접촉시키는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 TC는 페길화-안되거나, 또는 단일-페길화된다. 한 구체예에서, 상기 TC는 이중페길화된다. 한 구체예에서, 상기 TC는 이에 부착된 하나이상의 및/또는 상이한 TLR 작용제 분자를 갖는다. 본 발명의 또다른 구체예는 종양 세포에 대한 면역 반응을 조정하기 위해 본 발명의 TCs를 이용하는 방법을 제공한다.

[0078] 일부 구체예들에서, 본 발명은 암을 치료하기 위해 TC를 이용하는 방법을 제공한다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 TCs는 암, 예를 들면, 혈관신생 및 전-암성 병태 이를 테면, 이형성증과 직접 또는 간접적으로, 연합된 병태를 비롯한, 암-관련된 질환, 장애 및 병태를 치료 또는 예방하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 종양은 액상 또는 고형상 종양이다. 일부 구체예들에서, 치료될 병태는 암이다. 상기 암은 유방암, 뇌암, 췌장암, 피부암, 폐암, 간암, 담낭암, 결장암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 골암 및 혈액암(백혈병) 암 또는 암 또는 이들 암과 관련된 질환 또는 병태일 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. 암종은 신체 표면을 덮고 호르몬을 생성하고, 땀샘을 구성하는 세포인 상피 세포에서 시작되는 암이다. 비-제한적인 예로써, 암종에는 유방암, 췌장암, 폐암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 신장암, 방광암, 위암, 전립선암, 간암, 난소암, 뇌암, 질암, 외음부암, 자궁암, 구강암, 음경암, 고환암, 식도암, 피부암, 나팔관암, 두경부암, 위장관 기질암, 선암종, 피부 또는 안내 흑색종, 항문 부위암, 소장암, 암 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 요도암, 신우암, 요관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 암 뇌하수체, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 뇌간 신경교종 및 척수 축종양이 내포된다. 일부 경우들에서, 상기 암은 피부암, 이를 테면, 기저 세포 암종, 편평상피암, 흑색종, 비흑색종 또는 광선(태양) 각화증이다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 포유류에서 급성 백혈병을 치료하는 방법에 또한 관계하며, 이때 이 방법은 본 발명의 TC의 치료요법적으로 유효량을 전술한 포유류에게 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 급성 백혈병 아세포의 증식을 억제하는 방법을 또한 제공하는데, 이 방법은 본 발명의 TC의 치료요법적으로 유효한 투여분량을 급성 백혈병을 앓고 있는 포유류에게 투여하는 것을 포함한다.

[0079] 또다른 구체예에서, 본원에서 기술된 TCs는 면역 반응을 조절하는데 이용될 수 있다. 면역 반응의 조절은 면역 반응을 자극, 활성화, 증가, 강화 또는 상향-조절하는 것을 포함할 수 있다. 면역 반응의 조절은 면역 반응을 억제, 억제, 예방, 감소 또는 하향-조절하는 것을 포함할 수 있다.

[0080] 또다른 구체예에서, 본 발명은 치료요법적으로 유효량의 조성물 또는 본 발명의 TC 또는 조성물 및 약제학적으로 수용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다.

[0081] 또다른 구체예에서, 본 발명은 약제의 제조에 있어서 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다.

[0082] 또다른 구체예에서, 본 발명은 도 1의 구조들중 임의의 하나에 따른 TLR-작용제를 포함하는 면역 자극시키는 면역 자극 항체 콘쥬게이트 (ISAC)를 제공한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 표 3, 4, 5, 6, 7의 화합물들중 임의의 하나에 따른 TLR-작용제를 포함하는 면역 자극시키는 면역 자극 항체 콘쥬게이트 (ISAC)를 제공한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 ISACs를 제공하는데, 이때 상기 TLR 작용제는 다음의 군에서 선택된 화합물이다: AXC-862, AXC-863, AXC-867, AXC-868, AXC-869, AXC-874, AXC-875, AXC-876, AXC-879, AXC-880, AXC-882, AXC-893, AXC-896, AXC-897, AXC-901, AXC-907, 그리고 AXC-910 화합물들.

[0083] 또다른 구체예에서, 본 발명은 도 1에 따른 구조를 갖는 화합물들중 임의의 하나의 염을 제공한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 표 3, 4, 5, 6, 7의 화합물들중 임의의 하나의 염을 제공한다. 또다른 구체예에서, 본 발명은 본 명세서의 조성물, 화합물들 및 TC에 따른 약제학적 조성물 또는 이의 염을 제공한다. 다른 구체예들에서, 상기 약제학적 조성물 또는 염은 약제학적으로 수용가능한 부형제를 더 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0084] **도면의 간단한 설명**

도 1은 본 발명에서 사용에 적합한 TLR 작용제의 일반 구조를 도시한다.

도 2는 다양한 TC 콘쥬게이트의 구조를 도시한다.

도 3은 추가적으로 TC 콘쥬게이트의 구조를 도시한다.

도 4는 세포 증식 분석에서 선택된 TC 콘쥬게이트의 생물학적 활성을 도시한다.

도 5A 및 5B는 다양한 TLR7 작용제의 TLR7 활성을 도시한다.

도 6은 링커에 부착된 다양한 TLR7 작용제의 TLR7 활성을 도시한다.

도 7은 링커에 부착된 TLR7 작용제의 TLR7 활성 및 추가적으로 TLR7 작용제의 활성을 도시한다.

도 8은 추가 TLR7 작용제의 TLR7 활성 및 링커에 부착된 TLR7 작용제의 활성을 도시한다.

도 9는 비-자연적 아미노산, pAF, (DL-pAF)와 비교하였을 때, 링커 (약물 링커 또는 DL)에 부착된 상이한 TLR7 작용제의 TLR7 활성을 도시한다.

도 10A-10C는 아미노산 위치 HA114에서 비-자연적 아미노산으로 콘쥬게이트안된 항-HER2 항체 (도 10A), 그리고 아미노산 위치 HA114에서 TLR 작용제 AXC-875 (도 10B) 및 AXC-880 (도 10C)로 콘쥬게이트된 항-HER2 항체의 HPLC 히스토그램을 도시한다.

도 11A-11C는 SKOV3 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 11A); JIMT-1 HER2를 중등/낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 11B); 그리고 A431 HER2를 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 11C)에서 항-HER2 항체에 콘쥬게이트된 다양한 페이로드 링커의 종양 의존적 ISAC 활성을 비교한다.

도 12A 및 12B는 SKBR3 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 12A), 그리고 HCC1806 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 12B)에서 항-HER2 항체에 콘쥬게이트된 추가 페이로드 링커의 종양 의존적 ISAC 활성을 비교한다.

도 13A 및 13B는 SKBR3 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 13A), 그리고 HCC1806 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 13B)에서 항-HER2 항체에 콘쥬게이트된 추가 페이로드 링커의 종양 의존적 ISAC 활성을 비교한다.

도 14A 및 14B는 SKBR3 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 14A), 그리고 HCC1806 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 14B)에서 항-HER2 항체에 콘쥬게이트된 추가 페이로드 링커의 종양-의존적 ISAC 활성을 비교한다.

도 15A 및 15B는 SKBR3 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 15A), 그리고 HCC1806 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 15B)에서 항-HER2 항체에 콘쥬게이트된 세 개(3)의 페이로드 링커의 종양-의존적 ISAC 활성을 비교하는데, 여기에서 HER2-AXC-879가 최고의 ISAC 활성을 갖는다는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] **발명의 상세한 설명**

[0086] 표적화 모이어티 이를 테면, 항체 및 하나 또는 그 이상의 TLR 작용제를 포함하는 TCs를 본원에서 기술한다. 상기 TLR 작용제는 하나 또는 그 이상의 링커(들)을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 TCs는 상기 표적화 모이어티에서 비-자연적 아미노산에 연계된 TLR 작용제를 포함할 수 있다. 상기 표적화 모이어티 폴리펩티드에 통합된 비-자연적 아미노산을 포함하는 이러한 TCs를 만드는 방법이 또한 내포된다.

[0087] 특정 구체예들에서, 기술된 화합물들중 임의의 것과 약제학적으로 수용가능한 담체, 부형제, 또는 결합자를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0088] 추가 구체예 또는 대체 구체예들에서 환자에게서 폴리펩티드 존재를 탐지하는 방법들이 있으며, 상기 방법은 적어도 하나의 헤테로사이클-함유하는 비-자연적 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하고, 그리고 생성된 헤테로사이클-함유하는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 자연-발생적 동종성 아미노산 폴리펩티드와 비교하여 해당 폴리펩티드의 면역원성을 조정한다.

[0089] 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 본 명세서에 기재된 특정 방법, 프로토콜, 세포주, 구조체 및 시약에 국한되지 않으며, 그 자체가 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 명세서에서 설명된 용어는 특정 구체예들을 설명하기 위함이며, 본 명세서에서 설명된 방법 및 조성물의 범위를 제한하려는 의도는 아니며, 오직 본원 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한된다는 것 또한 인지해야 한다.

[0090] 본 명세서와 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수(“a", “an” 및 “the”)형은 다른 명시적인 언급이 없는 한, 복수 개념을 포함한다는 것으로 주지되어야 한다.

[0091] 명시적으로 다른 언급이 없는 한, 본 명세서에서 이용된 모든 기술적 그리고 과학적 용어는 본원에 기술된 발명이 속하는 당업계 숙련자들에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 또는 등가인 임의의 방법, 장치 및 재료가 본 명세서에 기재된 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 재료를 지금부터 설명한다.

[0092] 본 명세서에서 언급된 모든 공개 및 특허는 공개에서 설명된 예를 들면, 구조체들과 방법을 설명하고 공개하는 것을 목적으로 이들의 전문이 본 명세서의 참고자료에 편입되며, 이는 본 명세서에서 현재 기술하는 것과 관련하여 이용될 수 있다. 본 명세서에서 논의된 공개는 본 출원 출원일 이전에 이들의 공개만을 위하여 제공된다. 본 명세서에서 설명된 발명자들은 선행 발명에 의해 또는 임의의 다른 이유로 인하여 이러한 공개를 선행자격이 없는 것을 인정하는 것으로 간주되는 것은 없다.

[0093] 용어 “알돌-기반의 링키지” 또는 “혼합된 알돌-기반의 링키지”란 β-히드록시 카르보닐 화합물－알돌을 생성하기 위해, 하나의 카르보닐 화합물과 또다른 카르보닐 화합물(동일할 수도 있고, 동일하지 않을 수도 있다)의 에놀레이트/에놀의 산-또는 염기-촉매된 축합을 지칭한다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "친화성 라벨"은 또다른 분자에 가역적으로 또는 비가역적으로 결합하여, 이를 변형, 파괴 또는 이와 함께 화합물을 형성하는 라벨을 지칭한다. 예로써, 친화력 라벨에는 효소와 그 기질, 또는 항체와 이의 항원이 내포된다.

[0095] 용어 “알콕시", “알킬아미노” 및 “알킬티오” (또는 티오알콕시)는 상식적으로 차례로, 산소 원자, 아미노 그룹, 또는 황 원자를 통하여 각 분자에 연계된 알킬 그룹을 의미한다.

[0096] 용어 “알킬” 그자체, 또는 또다른 분자의 일부분으로, 다른 명시적 언급이 없는 한, 직쇄 또는 분기된 쇄, 또는 환형 탄화수소 라디칼, 또는 이의 조합을 의미하고, 이들은 이는 완전 포화된, 단일-불포화된 또는 다중-불포화될 수 있고, 지정된 수의 탄소 원자를 갖는 이가-라디칼 및 다가-라디칼이 내포될 수 있(즉, C_1-C_{10}은 1 내지 10개의 탄소를 의미함). 포화된 탄화수소 라디칼의 예로는 이를 테면, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 시클로헥실, (시클로헥실)메틸, 시클로프로필메틸, 동족체 및 예를 들면, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸, 그리고 이와 유사한 것들의 이성질체들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다 불포화된 알킬 그룹은 하나 또는 그 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 것이다. 불포화된 알킬 그룹의 예로는 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1-및 3-프로피닐, 3-부티닐, 그리고 고차 동족체 및 이성질체가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 “알킬"은 본원에서 더 자세히 정의된 알킬 유도체들, 이를 테면, “헤테로알킬”, “할로알킬” 및 “호모알킬”이 내포되는 것을 또한 의미한다.

[0097] 용어 “알킬렌”이란 자체로 또는 또다른 분자의 일부분으로 알칸으로부터 파생된 이가(divalent) 라디칼, 구체적으로, $(-CH_2-)_n$를 의미하며, 이때 n은 1 ~ 약 24일 수 있다. 오로지 예로써, 이러한 그룹에는 10개 또는 이보다 적은 수의 탄소 원자를 갖는 그룹 이를 테면, 구조-CH_2CH_2-및-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-이 내포되나, 이에 국하되지 않는다. “저가 알킬” 또는 “저가 알킬렌”은 일반적으로 8개 또는 이보다 적은 수의 탄소 원자를 갖는 더 짧은 쇄의 알킬 또는 알킬렌 그룹이다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 “알킬렌"이란 본원에서 “헤테로알킬렌”으로 언급된 그룹들이 내포된다는 것을 의미한다.

[0098] 용어 "아미노산"이란 자연적으로 생성되는 아미노산과 비-자연적으로 생성되는 아미노산, 뿐만 아니라 자연적으로 생성되는 아미노산과 유사한 방식으로 기능을 하는 아미노산 유사체들과 아미노산 모방체을 지칭한다. 자연적으로 인코드된 아미노산은 20개의 통상 아미노산 (알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린) 그리고 피롤리신과 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 갖는 화합물을 지칭하는데, 오로지 예로써, 수소, 카르복실기, 아미노기 및 R 그

룹에 결합된 예를 들면 α-탄소를 지칭한다. 이러한 유사체들은 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 여전히 유지하면서, 한편으로변형된 R 그룹 (예로써, 노르류신)을 가질 수 있거나, 또는 변형된 펩티드 백본을 가질 수 있다. 아미노산 유사체의 비-제한적 예에는 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포니움이 내포된다.

[0099] 아미노산은 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission에서 권장하는 통상적으로 알려진 이들의 이름, 3-문자 기호 또는 1-문자 기호에 의해 본 명세서에서 지칭될 수 있다. 추가적으로, 뉴클레오티드는 이들의 통상적으로 인정되는 단일-문자 코드로 언급될 수 있다.

[0100] "아미노 말단 변형 그룹"은 말단 아민 그룹에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 예로써, 이러한 말단 아민 그룹은 중합체 분자의 단부에 있을 수 있고, 이때 이러한 중합체 분자에는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 그리고 폴리사카라이드가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 말단 변형 그룹에는 다양한 수용성 중합체, 펩티드 또는 단백질이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 오로지 예로써, 말단 변형 그룹에는 폴리에틸렌 글리콜 또는 혈청 알부민이 내포된다. 말단 변형 그룹을 이용하여 펩티드의 혈청 반감기를 증가시키는 것을 비롯한 해당 중합체 분자의 치료요법적 특징을 변형시킬 수 있지만, 이에 국한되지 않는다.

[0101] 본원에서 "항체"란 항체 유전자들의 전부 또는 일부분에 의해 실질적으로 인코드된 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드로 구성된 단백질을 의미한다. 면역글로불린 유전자들에는 카파, 람다, 알파, 감마(IgG1, IgG2, IgG3, 그리고 IgG4), 델타, 입실론 및 뮤 불변 영역 유전자들, 뿐만 아니라 무수한 면역글로블린 가변 영역 유전자들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 본원에서 항체는 전장 항체 및 항체 단편이 내포되며, 임의의 유기체에 자연적으로 존재하거나 또는 공작된 항체(예를 들어, 변이체)들이 내포됨을 의미한다.

[0102] "항체 단편"이란 전장 형태이외의 임의의 형태의 항체를 의미한다. 본원에서 항체 단편이란 전장 항체 내에 존재하는 더 작은 성분인 항체, 및 공작된 항체들이 내포된다. 항체 단편에는 Fv, Fc, Fab, 및 (Fab')2, 단일쇄 Fv (scFv), 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies), 테트라바디(tetrabodies), 이중-기능성 하이브리드 항체, CDR1, CDR2, CDR3, CDRs의 조합, 가변 영역, 프레임워크 영역, 불변 영역, 중쇄, 경쇄, 그리고 가변 영역, 그리고 대체 스캐폴드 비-항체 분자, 이중-특이적 항체, 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다 (Maynard & Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:395-402). 또다른 기능을 하는 하위구조는 펩티드 링커에 의해 공유적으로 연결된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 영역으로 구성된 단일 쇄 Fv (scFv)이다 (S-z Hu et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). 이러한 작은(Mr 25,000) 단백질들은 일반적으로 단일 폴리펩티드에서 항원에 대한 특이성과 친화력을 유지하며, 더 큰 항원-특이적 분자에 대한 편리한 빌딩 블록을 제공할 수 있다. 명시적으로 다른 언급이 없는 한, "항체" 또는 "항체"라는 용어를 사용하는 명세서 및 청구범위에는 구체적으로 "항체 단편" 및 "항체 단편"이 내포된다.

[0103] "항체-약물 콘쥬게이트, 또는 "ADC"는 본원에 사용된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 생물학적으로 활성 분자(들)에 공유적으로 결합된 항체 분자, 또는 이의 단편을 지칭한다. 생물학적으로 활성 분자는 링커, 중합체, 또는 다른 공유 결합을 통하여 항체에 콘쥬게이트될 수 있다.

[0104] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "방향족" 또는 "아릴"은 콘쥬게이트된 pi 전자계를 갖는 적어도 하나의 고리를 갖고, 카르보사이클릭 아릴과 헤테로사이클릭 아릴 (또는 "헤테로아릴" 또는 "헤테로방향족") 그룹 모두 내포된, 닫힌 고리 구조를 지칭한다. 상기 카르보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 그룹은 5 ~ 20개의 고리 원자를 함유할 수 있다. 상기 용어에는 공유적으로 연계된 일-환형 또는 융합된-고리 폴리사이클릭 (즉, 탄소 원자의 인접쌍을 공유하는 고리) 그룹이 내포된다. 방향족 그룹은 치환안되거나, 또는 치환될 수 있다. "방향족" 또는 "아릴" 그룹의 비-제한적인 예로는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-바이페닐, 안트라세닐, 그리고 펜안트라세닐이 내포된다. 상기 명시된 아릴 및 헤테로아릴 고리 시스템 각각에 대한 치환기는 본원에 기재된 허용가능한 치환기의 그룹으로부터 선택된다.

[0105] 간결함을 위해, 용어 "방향족" 또는 "아릴"은 다른 용어(아릴옥시, 아릴티옥시, 아랄킬을 포함하나, 이에 국한되지 않음)와 조합하여 사용될 때, 상기 정의된 바와 같은 아릴 및 헤테로아릴 고리 둘 모두가 내포된다. 따라서, 용어 "아릴킬" 또는 "알카릴"이란 탄소 원자가 헤테로원자, 오로지 예로써 산소원자에 의해 대체된 알킬 그룹 (메틸렌 그룹이 내포되나, 이에 국한되지 않은)을 비롯하여, 아릴 그룹이 알킬 그룹에 부착된 라디칼(벤질, 펜에틸, 피리딜메틸 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않음)이 내포됨을 의미한다. 이러한 아릴 그룹의 예로는 펜옥시메틸, 2-피리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필, 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0106] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “아릴렌”은 이가-아릴 라디칼을 지칭한다. “아릴렌”의 비-제한적인 예로는 페닐렌, 피리디닐렌, 피리미디닐렌 및 티오페닐렌이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 아릴렌 그룹에 대한 치환기는 본원에 기재된 허용가능한 치환기의 그룹으로부터 선택된다.

[0107] “이중-기능성 중합체”는 또한 “이중-기능성 링커”로도 지칭하며, 이들은 공유 또는 비-공유 링키지를 만들기 위해 다른 모이어티와 특이적으로 반응할 수 있는 두 가지 기능성 그룹을 포함하는 중합체를 지칭한다. 이러한 모이어티에는 자연 또는 비-자연적 아미노산 또는 펩티드 상에 이러한 자연적 아미노산 또는 비-자연적 아미노산을 함유하는 측쇄 그룹이 내포될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 상기 이중-기능성 링커 또는 이중-기능성 중합체에 연계될 수 있는 다른 모이어티는 동일한 또는 상이한 모이어티일 수 있다. 오로지 예로써, 이중-기능성 링커는 제 1 펩티드 상에 있는 그룹과 반응하는 기능성 그룹, 그리고 제 2 펩티드 상에 있는 그룹과 반응하는 기능성 그룹을 가질 수 있고, 이로 인하여, 상기 제 1 펩티드, 이중-기능성 링커 및 상기 제 2 펩티드가 내포된 콘쥬게이트가 형성된다. 펩티드에 대한 다양한 화합물의 부착을 위한 많은 절차 및 링커 분자들이 공지되어 있다. 예로써, 유럽 특허 출원 번호 188,256; U.S. 특허 번호 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; 그리고 4,569,789 참고하며, 이들의 전문이 본원의 참고자료에 편입된다. “다중-기능성 중합체”는 또한 “다중-기능성 링커”로도 지칭하며, 다른 모이어티와 특이적으로 반응할 수 있는 두 가지 또는 그 이상의 기능성 그룹을 포함하는 중합체를 지칭한다. 공유 또는 비-공유 링키지를 형성하기 위한, 이러한 모이어티에는 자연 또는 비-자연적 아미노산 또는 펩티드 상에 이러한 자연적 아미노산 또는 비-자연적 아미노산(아미노산 측쇄 그룹들이 포함되나, 이에 국한되지 않음)을 함유하는 측쇄 그룹이 내포될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 이중-기능을 하는 중합체 또는 다중-기능을 하는 중합체는 임의의 원하는 길이 또는 분자량일 수 있고, 그리고 화합물에 연계된 하나 또는 그 이상의 분자와 이것에 결합하는 분자 또는 해당 화합물 사이의 원하는 특정 간격 또는 입체형태를 제공하도록 선택될 수 있다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “생체이용률"이란 물질 또는 그 활성 모이어티가 약제학적 투약형으로부터 전달되어 작용 부위 또는 전신 순환계에서 이용가능하게 되는 속도 및 정도를 의미한다. 생체이용률의 증가는 물질 또는 그 활성 모이어티가 약제학적 투약형으로부터 전달되어 작용 부위 또는 전신 순환계에서 이용가능하게 되는 속도 및 정도의 증가를 의미한다. 예로써, 생체이용률의 증가는 다른 물질 또는 활성 모이어티와 비교할 때, 혈액 내 물질 또는 이의 활성 모이어티의 농도 증가로 나타낼 수 있다. 생체이용률의 증가를 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 임의의 폴리펩티드의 생체이용률을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0109] 용어 “생물학적으로 활성 분자”, “생물학적으로 활성 모이어티” 또는 “생물학적으로 활성제”가 본원에서 사용될 때, 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포존, 프리온, 곤충, 곰팡이, 식물, 동물 및 인간이 내포되지만, 이에 국한되지 않는 유기체와 관련된 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호작용의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미칠 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 특히, 본원에 사용된 바와 같이, 생물학적으로 활성 분자에는 인간 또는 기타 동물의 질환의 진단, 치유(cure), 완화, 치료 또는 예방, 또는 인간 또는 동물의 신체적 또는 정신적 웰빙을 향상시키기 위한 물질들이 내포되지만, 이에 국한되지 않는다. 생물학적으로 활성 분자의 예는 펩티드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 경질 약물, 연질 약물, 전구약물, 탄수화물, 무기 원자 또는 분자, 염료, 지질, 뉴클레오시드, 방사성 핵종, 올리고뉴클레오티드, 독소, 세포, 바이러스, 리포솜, 마이크로입자 및 미셀(micelles)이 내포되지만, 이에 국한되지 않는다. 본원에 기재된 방법 및 조성물과 함께 사용하기에 적합한 생물학적 활성제의 부류에는 약물, 전구약물, 방사성핵종, 영상화제, 중합체, 항생제, 살진균제, 항-바이러스제, 항-염증제, 항-종양제, 심혈관제, 항-불안제, 호르몬, 성장인자, 스테로이드제, 미생물 유래 독소, 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0110] "생물학적 활성을 조절한다"는 것은 폴리펩티드의 반응성을 증가 또는 감소시키고, 폴리펩티드의 선택성을 변경하고, 폴리펩티드의 기질 선택성을 증가 또는 감소시키는 것을 의미한다. 변형된 생물학적 활성 분석은 상기 비-자연적 폴리펩티드의 생물학적 활성을 자연 폴리펩티드의 것과 비교하여 수행될 수 있다

[0111] 본원에 사용된 용어 "생물재료(biomaterial)"은 생물반응기 및/또는 재조합 방법 및 기술로부터 수득된 물질들이 내포되나, 이에 국한되지 않는 생물학적으로-유도된 물질을 지칭한다.

[0112] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "생물물리학적 프로브"는 분자의 구조적 변화를 감지하거나 또는 모니터링할 수 있는 프로브를 의미한다. 이러한 분자에는 단백질이 내포되지만, 이에 국한되지 않으며 "생물물리학적 프로브"는 단백질과 다른 거대분자의 상호작용을 검출하거나 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 생물물리학적 프로브의 예에는 스핀-라벨, 형광단 및 광활성 그룹이 내함되지만, 이에 국한되지 않는다.

[0113] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생합성적으로"란 폴리뉴클레오티드, 코돈, tRNA 및 리보솜 중 적어도 하나의

성분을 사용하는 것을 포함하여 번역 시스템(세포 또는 비-세포)을 이용하는 임의의 방법을 지칭한다. 예로써, 비-자연적 아미노산은 WO 2002/085923 (이는 본원에 이의 전문이 참고자료로 편입됨)에서 기재된 방법 및 기술을 이용하여 비-자연적 아미노산 폴리펩티드로 "생합성에 의해 통합될" 수 있다. 추가적으로, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드로 "생합성에 의해 통합될 수 있는" 유용한 비-자연적 아미노산의 선별 방법은 WO 2002/085923(이는 본원에 이의 전문이 참고자료로 편입됨)에 기재되어 있다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “바이오틴 유사체", 또는 “바이오틴 모방체”로도 불리는 이 용어는 아비딘 및/또는 스트렙트아비딘에 높은 친화력으로 결합하는, 바이오틴 이외의 임의의 분자다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “카르보닐”이란-C(O)-,-S(O)-,-S(O)2-, 그리고-C(S)-로 구성된 그룹에서 선택된 모이어티에서 적어도 하나의 케톤 그룹, 및/또는 적어도 하나의 알데히드 그룹, 및/또는 적어도 하나의 에스테르 그룹, 및/또는 적어도 하나의 카르복실산 그룹, 및/또는 적어도 하나의 티오에스테르 그룹을 함유하는 그룹으로 구성된 그룹을 지칭하나, 이에 국한되지 않는다. 이러한 카르보닐 그룹에는 케톤, 알데히드, 카르복실산, 에스테르, 그리고 티오에스테르가 내포된다. 추가로, 이러한 그룹은 선형, 분기된, 또는 환형 분자의 일부분일 수 있다.

[0116] 용어 “카르복시 말단 변형 그룹”이란 말단 카르복시 그룹에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 예로써, 이러한 말단 카르복시 그룹은 중합체 분자의 단부에 있을 수 있고, 이때 이러한 중합체 분자에는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 그리고 폴리사카라이드가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 말단 변형 그룹에는 다양한 수용성 중합체, 펩티드 또는 단백질이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 오로지 예로써, 말단 변형 그룹에는 폴리에틸렌 글리콜 또는 혈청 알부민이 내포된다. 말단 변형 그룹을 이용하여 펩티드의 혈청 반감기를 증가시키는 것을 비롯한 해당 중합체 분자의 치료요법적 특징을 변형시킬 수 있지만, 이에 국한되지 않는다.

[0117] 용어 “화학적으로 절단가능한 그룹"이라고도 하는 용어 "화학적으로 절단 가능한 그룹"은 산, 염기, 산화제, 환원제, 화학적 개시제 또는 라디칼 개시제에 노출될 때 파손되거나 절단되는 그룹을 지칭한다.

[0118] 본 명세서에 사용된 "코폴딩(cofolding)"이란 서로 상호작용하여 언폴딩되거나 또는 부적절하게 폴딩된 분자를 적절하게 폴딩된 분자로 변형시키는 적어도 2개의 분자를 사용하는 리폴딩 과정, 반응 또는 방법을 지칭한다. 오로지 예로써, "코폴딩(cofolding)"은 서로 상호작용하여 펼쳐진 또는 부적절하게 폴딩된 폴리펩티드를 고유의 적절하게 폴딩된 폴리펩티드로 변형시키는 적어도 2개의 폴리펩티드를 사용한다. 이러한 폴리펩티드는 자연 아미노산 및/또는 적어도 하나의 비-자연적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같이, "콘쥬게이트(conjugate)"는 본원에 기재된 화합물 또는 화합물-링커, 예를 들어, 도 1 또는 표 3-7의 구조 중 임의의 하나의구조의 화합물 또는 염에 직접적으로 또는 링커를 통해 연계된, 예를 들어, 공유 연계된 폴리펩티드를 지칭한다. "표적화 모이어티"는 다른 비-표적 분자에 비해 표적 분자에 대해 선택적 친화력을 갖는 구조를 의미한다. 본 발명의 표적화 모이어티는 표적 분자에 결합한다. 표적화 모이어티에는 예를 들면, 항체, 펩티드, 리간드, 수용체, 또는 이의 결합 부분이 내포된다. 표적 생물학적 분자는 세포의 생물학적 수용체 또는 다른 구조 이를 테면, 종양 항원일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "본 발명의 콘쥬게이트", “표적화 모이어티 콘쥬게이트”, “표적화 콘쥬게이트", “표적화 모이어티-활성 분자 콘쥬게이트" 또는 “TC”란 TLR7 및/또는 TLR8 작용제가 내포되나, 이에 국한되지 않는 생물학적 활성 분자, 이의 일부 또는 이의 유사체에 콘쥬게이트된 세포 또는 이의 하위단위에 존재하는 표적에 결합하는 표적화 폴리펩티드 또는 이의 일부, 유사체 또는 유도체를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “종양-표적화 모이어티 콘쥬게이트” "종양-표적화 모이어티-생물학적으로 활성 분자 콘쥬게이트" 또는 “BTC”란 TLR7 및/또는 TLR8 작용제가 내포되나, 이에 국한되지 않는 생물학적 활성 분자, 이의 일부 또는 이의 유사체에 콘쥬게이트된 종양 세포 또는 이의 하위단위에 존재하는 표적에 결합하는 표적화 폴리펩티드 또는 이의 일부, 유사체 또는 유도체를 지칭한다. 다른 언급이 없는 한, 용어 "본 발명의 화합물" 및 "본 발명의 조성물"은 용어 "본 발명의 콘쥬게이트"의 대체용어로 이용된다.

[0120] 용어 “보존적으로 변형된 변이체”는 자연 아미노산과 비-자연적 아미노산 및 자연 핵산 서열과 비-자연적 핵산 서열, 그리고 이의 조합 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열에 있어서, “보존적으로 변형된 변이체”는 필수적으로 동일한 서열에 대해 동일한 또는 필수적으로 동일한 자연 아미노산 서열과 비-자연적 아미노산 서열을 인코드하는 자연 핵산 및 비-자연적 핵산을 지칭하고, 이때 자연 핵산과 비-자연적 핵산은 자연 아미노산 서열과 비-자연적 아미노산 서열을 인코드하지 않는다. 예로써, 유전자 코드의 축중성(degeneracy)으로 인하여, 기능적으로 동일한 핵산의 다수는 임의의 주어진 단백질을 인코드한다. 예를 들면, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 인코드한다. 따라서, 알라닌이 코돈으로 특정화된 모든 위치에서 상기 코돈은 인코드된

폴리펩티드의 변형없이 표시된 대응하는 임의의 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 "침묵 변이(silent variations)"이며, 이는 보존적으로 변형된 변이중 한 종류이다. 따라서, 예로써, 본원에서 자연 또는 비-자연적 폴리펩티드를 인코드하는 모든 자연 또는 비-자연적 핵산 서열은 자연 또는 비-자연적 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 또한 기술한다. 당업자는 자연 또는 비-자연적 핵산에서 각 코돈 (오직 메티오닌에 대한 코돈인 AUG, 그리고 오직 트립토판에 대한 코돈인 TGG를 제외)은 기능적으로 동일한 분자를 만들기 위하여 변형될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 자연 및 비-자연적 리펩티드를 인코드하는 자연 및 비-자연적 핵산의 각 침묵 변이는 각 표시된 서열에 내포된다.

[0121] 아미노산 서열들에 있어서, 인코드된 서열에서 단일 자연 및 비-자연적 미노산 또는 작은 비율의 아미노산의 변경, 추가 또는 결손되는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 개별 치환, 결손 또는 추가는 "보존적으로 변형된 변이체"이며, 이때 상기 변형으로 아미노산의 결손, 아미노산의 추가, 또는 자연 및 비-자연적 아미노산이 화학적으로 유사한 자연 및 비-자연적 아미노산으로 치환되게 된다. 기능적으로 유사한 자연 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 이 기술 분야에 잘 알려져 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 본 발명의 방법 및 조성물의 다형 변이체, 종간 상동체 및 대립유전자에 추가되며, 이들이 배제되지 않는다.

[0122] 기능적으로 유사한 아미노산들을 제공하는 보존적 치환표는 당업자들에게 공지되어 있다. 다음의 8개 각 군은 서로에 대하여 보존적 치환이 되는 아미노산들을 포함한다: 1) 알라닌 (A), 글리신 (G); 2) 아스파트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르지닌 (R), 리신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 그리고 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M). (예로써, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993 참고).

[0123] 용어 “사이클로알킬” 및 “헤테로사이클로알킬”은 달리 언급되지 않는 한, 그 자체로 또는 다른 용어와 조합하여 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 환형 버전을 나타낸다. 따라서, 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬에는 포화된, 부분적으로 불포화된, 그리고 완전하게 불포화된 고리 링키지가 내포된다. 추가적으로, 헤테로사이클로알킬의 경우, 헤테로원자는 헤테로사이클이 해당 분자의 나머지 부분에 부착되는 위치를 차지할 수 있다. 상기 헤테로원자에는 산소, 질소 또는 황이 내포될 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다. 사이클로알킬의 예로는 사이클로펜틸, 시클로헥실, 1-사이클로헥세닐, 3-사이클로헥세닐, 사이클로헵틸, 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지는 않는다. 헤테로사이클로알킬의 예로는 1-(1,2,5,6-테트라히드로피리딜), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-몰포리닐, 3-몰포리닐, 테트라히드로퓨란-2-일, 테트라히드로퓨란-3-일, 테트라히드로티엔-2-일, 테트라히드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐, 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지는 않는다. 추가적으로, 용어에는 이-환형 고리 구조 및 삼-환형 고리 구조가 내포되나, 이에 국한되지 않은 다중-환형 구조를 포괄한다. 유사하게, 용어 “헤테로사이클로알킬렌”은 자체로 또는 또다른 분자의 일부분으로 헤테로사이클로알킬로부터 유도된 이가 라디칼을 의미하고, 그리고 용어 “사이클로알킬렌”은 자체로 또는 또다른 분자의 일부분으로 사이클로알킬로부터 유래된 이가 라디칼을 의미한다.

[0124] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “사이클로덱스트린"이란 고리 형태로 적어도 6~8개 이상의 글루코스 분자로 구성된 고리형 탄수화물을 의미한다. 해당 고리의 바깥 부분은 수용성 그룹을 함유하며; 해당 고리의 중심에는 작은 분자를 수용할 수 있는 상대적으로 비-극성인 공동(cavity)이 있다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “세포독성"은 세포에 유해한 화합물을 지칭한다.

[0126] “변성제제” 또는 “변성제"는 본원에 사용된 바와 같이, 중합체의 가역적 언폴딩(unfolding)을 야기할 임의의 화합물 또는 물질을 지칭한다. 오로지 예로써, “변성제제” 또는 “변성제"는 단백질의 가역적 언폴딩을 유발할 수 있다. 변성제제 또는 변성제의 강도는 특성 및 특정 변성제제 또는 변성제의 농도에 의해 결정될 것이다. 예로써, 변성제제 또는 변성제에는 카오트로프(chaotropes), 세제, 유기, 수-혼화성 용매, 인지질 또는 이들의 조합이 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다. 카오트로프의 비-제한적 예로는 우레아, 구아니딘, 그리고 티오시아네이트 나트륨이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 변성제의 비-제한적 예로는 강한 변성제 이를 테면, 도데실 술페이트 나트륨, 또는 폴리옥시에틸렌 에테르 (예로써, Tween 또는 Triton 변성제), Sarkosyl, 순한 비-이온성 변성제 (예로써, 디지토닌), 순한 양이온성 변성제 이를 테면, N-2,3-(디올레옥시)-프로필-N,N,N-트리메틸 암모니움, 순한 이온성 변성제 (예로써 콜레이트 나트륨 또는 데옥시콜레이트 나트륨), 또는 술포베타인(Zwittergent), 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-1-프로판 술페이트 (CHAPS), 그리고 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-2-히드록시-1-프로판 술포네이트 (CHAPSO)이 내포되나, 이에 국한되지 않은 쌍극이온성 변성제가 내포될 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. 유기, 수-혼화성 용매의 비-제한적 예로는 아세토니트릴, 저

가 알칸올 (특별히 C2-C4 알칸올 이를 테면, 에탄올 또는 이소프로판올), 또는 저가 알칸디올 (C2-C4 알칸디올 이를 테면, 에틸렌-글리콜)이 변성제로 이용될 수 있다. 인지질의 비-제한적 예로는 자연 발생적 인지질 이를 테면, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 그리고 포스파티딜이노시톨 또는 합성 인지질 유도체들 또는 변이체 이를 테면, 디헥사노일포스파티딜콜린 또는 디헵타노일포스파티딜콜린이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0127] 용어 “디아민"은 본원에 사용된 바와 같이, 적어도 두 개의 아민 기능성 그룹을 포함하는 그룹/분자, 예로써 하이드라진 그룹, 아미딘 그룹, 이민 그룹, 1,1-디아민 그룹, 1,2-디아민 그룹, 1,3-디아민 그룹, 그리고 1,4-디아민 그룹이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 추가로, 이러한 그룹은 선형, 분기된, 또는 환형 분자의 일부분일 수 있다.

[0128] 용어 “검출가능한 라벨"이란 본원에 사용된 바와 같이, 형광, 화학발광, 전자-스핀 공명, 자외선/가시광선 흡광도 분광법, 질량 분석법, 핵 자기 공명, 자기 공명 및 전기화학적 방법이 내포되지만, 이에 국한되지 않는 분석 기술을 사용하여 관찰할 수 있는 라벨을 지칭한다.

[0129] 용어 “디카르보닐” 이란 본원에 사용된 바와 같이,-C(O)-,-S(O)-,-$S(O)_2$-, 그리고-C(S)-으로 구성된 그룹에서 선택된 적어도 두 개의 모이어티를 함유하는 그룹, 예로써, 1,2-디카르보닐 그룹, 1,3-디카르보닐 그룹, 그리고 1,4-디카르보닐 그룹, 그리고 적어도 하나의 케톤 그룹, 및/또는 적어도 하나의 알데히드 그룹, 및/또는 적어도 하나의 에스테르 그룹, 및/또는 적어도 하나의 카르복실산 그룹, 및/또는 적어도 하나의 티오에스테르 그룹을 함유하는 그룹을 지칭한다. 이러한 디카르보닐 그룹에는 디케톤, 케토알데히드, 케토산, 케토에스테르, 그리고 케토티오에스테르가 내포된다. 추가로, 이러한 그룹은 선형, 분기된, 또는 환형 분자의 일부분일 수 있다. 상기 디카르보닐 그룹에서 두 개 모이어티는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 그리고 상기 두 모이어티중 하나에서 오로지 예로써, 에스테르, 케톤, 알데히드, 티오에스테르, 또는 아미드가 만들어지는 치환체를 내포할 수 있다.

[0130] 용어 “약물"이란 본원에 사용된 바와 같이, 질환 또는 병태의 예방, 진단, 완화, 치료, 또는 치유에 이용되는 임의의 물질을 지칭한다.

[0131] 용어 “유효량"이란 본원에 사용된 바와 같이, 제제 또는 투여되는 화합물이 치료되는 질환 또는 병태의 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 완화시킬 충분한 양을 지칭한다. 그 결과 질환의 징후, 증상 또는 원인의 감소 및/또는 완화, 또는 생물학적 시스템의 다른 원하는 변경이 있을 수 있다. 예로써, 투여되는 제제 또는 화합물에는 자연 아미노산 폴리펩티드, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 변형된 자연 아미노산 폴리펩티드, 또는 변형된 비-아미노산 폴리펩티드가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 이러한 자연 아미노산 폴리펩티드, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 변형된 자연 아미노산 폴리펩티드, 또는 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 예방, 및/또는 치료요법적 처치를 강화시키기 위해 투여될 수 있다. 개별 경우에, 적절한 "효과"량은 용량 증량 연구와 같은 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0132] "강화하다" 또는 "강화시키는"이라는 용어는 원하는 효과의 효능 또는 지속 시간을 증가시키거나 또는 연장하는 것을 의미한다. 예로써, 치료요법적 제제의 효과를 "강화시키는"이란 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 동안 치료요법적 제제의 효과를 효능 또는 기간으로 증가시키거나 연장시키는 능력을 지칭한다. “강화시키는-유효량"이란 본원에 사용된 바와 같이, 질환, 장애 또는 병태의 치료에서 치료요법적 제제의 효과를 향상시키기에 적절한 양을 의미한다. 환자에게 사용하는 경우, 이러한 사용에 효과적인 양은 질환, 장애 또는 병태의 중증도 및 경과, 이전 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 치료 의사의 판단에 따라 달라질 것이다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “진핵생물"은 동물 (포유류, 곤충, 파충류, 조류 등이 내포되나, 이에 국한되지 않음), 섬모류, 식물 (외떡잎, 쌍떡잎, 및 조류), 진균류, 효모, 편모류, 미세포자충, 및 원생생물에 속하는 유기체를 지칭한다.

[0134] 용어 “지방산"이란 본원에 사용된 바와 같이, 약 C6 또는 더 긴 탄화수소 측쇄를 갖는 카르복실산을 지칭한다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "형광단"은 여기(excitation) 시 광자를 방출하여 형광성을 띠는 분자를 의미한다.

[0136] 용어 “기능성 그룹”, “활성 모이어티”, “활성화 그룹”, “이탈 그룹”, “반응 부위”, “화학적으로 반응 그룹” 및 “화학적으로 반응 모이어티"란 본원에 사용된 바와 같이, 화학 반응이 일어나는 분자의 부분 또는 단위를 지칭한다. 이들 용어는 화학 분야에서 어느 정도 동의어이며, 일부 기능 또는 활성을 수행하고 다른 분자와 반응성인 분자 부분을 나타내기 위해 본원에서 사용된다.

[0137] 용어 “할로겐”에는 플루오린, 염소, 요오드, 및 브롬이 내포된다.

[0138] 용어 “할로아실"이란 본원에 사용된 바와 같이, 할로겐 모이어티를 함유하는 아실 그룹을 지칭하며, 예로써-$C(O)CH_3$,-$C(O)CF_3$,-$C(O)CH_2OCH_3$, 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0139] 용어 “할로알킬"이란 본원에 사용된 바와 같이, 할로겐 모이어티를 함유하는 아실 그룹을 지칭하며,-CF_3 및-CH_2CF_3 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0140] 용어 “헤테로알킬"이란, 본원에 사용된 바와 같이, O, N, Si 및 S로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 헤테로 원자로 구성된, 직쇄 또는 분기된 쇄, 또는 환형 탄화수소 라디칼, 또는 이의 조합을 지칭하며, 이때 질소 및 황 원자는 임의선택적으로 산화되거나, 그리고 질소 헤테로원자는 임의선택적으로 사중화(quaternized)될 수 있다. 헤테로원자(들) O, N 및 S와 Si는 헤테로알킬 그룹의 임의의 내부 위치, 또는 상기 알킬 그룹이 해당 분자의 나머지 부분에 부착된 위치에 위치할 수 있다. 예시로는-CH_2-CH_2-O-CH_3,-CH_2-CH_2-NH-CH_3,-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3,-CH_2-S-CH_2-CH_3,-CH_2-CH_2,-S(O)-CH_3,-CH_2-CH_2-S($O)_2$-CH_3,-CH=CH-O-CH_3,-Si(CH_3)$_3$,-CH_2-CH=N-OCH_3, 그리고-CH=CH-N(CH_3)-CH_3이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 추가로, 최대 두 개의 헤테로원자가 연속적일 수 있는데, 이를 테면, 예로써,-CH_2-NH-OCH_3 및-CH_2-O-Si(CH_3)$_3$이다.

[0141] 용어 “헤테로사이클릭-기반의 링키지” 또는 “헤테로사이클 링키지”란 디카르보닐 그룹과 디아민 그룹의 반응으로 형성된 모이어티를 지칭한다. 결과적으로 반응 산물은 헤테로아릴 그룹 또는 헤테로사이클로알킬 그룹이 내포된, 헤테로사이클이다. 결과적으로 헤테로사이클 그룹은 비-자연적 아미노산 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드와 또다른 기능성 그룹 간의 화학적 연계로 작용한다. 한 구체예에서, 상기 헤테로사이클 링키지에는 오로지 예로써, 피라졸 링키지, 피롤 링키지, 인돌 링키지, 벤조디아제핀 링키지, 그리고 피라잘론 링키지를 비롯한 질소-함유하는 헤테로사이클 링키지가 내포된다.

[0142] 유사하게, 용어 “헤테로알킬렌”이란-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-및-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-로 구체화될 수 있지만, 이에 국한되지 않는, 헤테로알킬로부터 유도된 이가 라디칼을 지칭한다. 헤테로알킬렌 그룹의 경우, 상기 동일한 또는 상이한 헤테로원자는 쇄의 한쪽 단부 또는 양단 (알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노, 아미노옥시알킬렌, 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는)을 점유할 수도 있다. 또한, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기의 경우, 연계 그룹의 화학식이 쓰여진 방향에 의해 연결기의 배향이 암시되지 않는다. 예로써, 화학식-C($O)_2$R'-은-C($O)_2$R'-및-R'C($O)_2$-를 모두 나타낸다.

[0143] 용어 “헤테로아릴” 또는 “헤테로방향족"이란 본원에 사용된 바와 같이, N, O, 및 S에서 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하는 아릴 그룹을 지칭하며; 이때 질소 및 황 원자는 임의선택적으로 산화될 수 있거나, 그리고 질소 원자(들)은 임의선택적으로 사중화될 수 있다. 헤테로아릴 그룹은 치환되거나 또는 치환안된 것일 수 있다. 헤테로아릴 그룹은 헤테로원자를 통하여 해당 분자의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 헤테로아릴 그룹의 비-제한적 예로는 1-피롤일, 2-피롤일, 3-피롤일, 3-피라졸일, 2-이미다졸일, 4-이미다졸일, 피라지닐, 2-옥사졸일, 4-옥사졸일, 2-페닐-4-옥사졸일, 5-옥사졸일, 3-이소옥사졸일, 4-이소옥사졸일, 5-이소옥사졸일, 2-티아졸일, 4-티아졸일, 5-티아졸일, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티엔yl, 3-티엔yl, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸일, 퓨리닐, 2-벤즈이미다졸일, 5-인돌일, 1-이소퀴놀일, 5-이소퀴놀일, 2-퀸옥살리닐, 5-퀸옥살리닐, 3-퀴놀일, 그리고 6-퀴놀일이 내포된다.

[0144] 용어 “호모-알킬"이란 본원에 사용된 바와 같이, 탄화수소 그룹인 알킬 그룹을 지칭한다.

[0145] 용어 “동일한"이란 본원에 사용된 바와 같이, 동일한 두 개 또는 그 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 추가로, 용어 “실질적으로 동일한"이란 본원에 사용된 바와 같이, 비교 창 또는 비교 알고리즘을 사용하여 측정되거나, 또는 수작업 정렬 및 육안 검사에 의해, 지정 영역 또는 비교 창에서 최대 일치되도록 비교 및 정렬될 때, 동일한 서열 단위의 백분율을 갖는 두 개 또는 그 이상의 서열을 지칭한다. 오로지 예로써, 두 개 또는 그 이상의 서열에서 이들 서열 단위가 특정 영역에 걸쳐 약 60% 동일한, 약 65% 동일한, 약 70% 동일한, 약 75% 동일한, 약 80% 동일한, 약 85% 동일한, 약 90% 동일한, 또는 약 95% 동일한 경우, “실질적으로 동일하다”라고 할 수 있다. 이러한 백분율은 두 개 또는 그 이상의 서열의 "동일 퍼센트"로 기술된다. 서열의 동일성은 길이가 적어도 약 75-100개의 서열 단위인 영역, 길이가 약 50개의 서열 단위 영역, 또는 지정되지 않은 경우 전체 서열에 걸쳐 존재할 수 있다. 이 정의는 테스트 서열의 보체에 또한 적용된다. 오로지 예로써, 두 개 또는 그 이상의 폴리펩티드 서열에서 아미노산 잔기들이 동일할 경우 이들은 동일하며, 한편 두 개 또는 그 이상의

폴리펩티드 서열에서 아미노산 잔기들이 명시된 영역에 걸쳐 약 60% 동일한, 약 65% 동일한, 약 70% 동일한, 약 75% 동일한, 약 80% 동일한, 약 85% 동일한, 약 90% 동일한, 또는 약 95% 동일한 경우, 이들은 "실질적으로 동일하다". 동일성은 길이가 적어도 약 75개 ~ 약 100개 아미노산인 영역, 길이가 약 50개 아미노산인 영역, 또는 지정되지 않은 경우 폴리펩티드 서열의 전체 서열에 걸쳐 존재할 수 있다. 추가로, 오로지 예로써, 두 개 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드 서열에서 핵산 잔기들이 동일할 경우 이들은 동일하며, 한편 두 개 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드 서열에서 핵산 잔기들이 명시된 영역에 걸쳐 약 60% 동일한, 약 65% 동일한, 약 70% 동일한, 약 75% 동일한, 약 80% 동일한, 약 85% 동일한, 약 90% 동일한, 또는 약 95% 동일한 경우, 이들은 "실질적으로 동일하다". 동일성은 길이가 적어도 약 75개 ~ 약 100개 핵산인 영역, 길이가 약 50개 핵산인 영역, 또는 지정되지 않은 경우 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 서열에 걸쳐 존재할 수 있다.

[0146] 서열 비교를 위해, 전형적으로 테스트 서열과 비교되는 하나의 서열은 기준 서열로 삼는다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 테스트 서열과 기준 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 하위 서열 좌표를 지정하고, 그리고 서열 알고리즘 프로그램 매개 변수를 지정한다. 디폴트 프로그램 매개 변수를 사용할 수 있거나, 대체 매개 변수를 지정할 수 있다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개 변수에 기초하여, 기준 서열에 대한 테스트 서열의 서열 동일성 백분율을 산출한다.

[0147] 용어 “면역원성"이란 본원에 사용된 바와 같이, 치료요법적 약물의 투여에 대한 항체 반응을 지칭한다. 치료요법적 비-자연적 아미노산 폴리펩티드를 향한 면역원성은 생물학적 유체내 항-비-자연적 아미노산 폴리펩티드 항체 검출용 정량적 분석과 정성적 분석을 이용하여 얻을 수 있다. 이러한 분석에는 방사선면역분석(RIA), 효소-연계된 면역흡착 분석(ELISA), 발광 면역분석(LIA) 및 형광 면역분석(FIA)이 내포되나, 이에 국한되지는 않는다. 치료요법적 비-자연적 아미노산 폴리펩티드를 향한 면역원성의 분석은 치료요법적 자연 아미노산 폴리펩티드의 투여시 해당 항체 반응과 치료요법적 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 투여시 해당 항체 반응의 비교가 관련된다.

[0148] 용어 “단리된"이란 본원에 사용된 바와 같이, 관심대상이 아닌 성분들로부터 관심대상 성분들을 빼내어 분리시키는 것을 말한다. 단리된 물질은 건조 또는 반-건조 상태, 또는 수용액을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 용액 상태일 수 있다. 상기 단리된 성분은 균질한 상태일 수 있거나, 또는 상기 단리된 성분은 추가적으로 약제학적으로 수용가능한 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 일부분이 될 수 있다. 순도 및 균질성(homogeneity)은 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석 화학 기술을 사용하여 결정할 수 있지만, 이에 국한되지 않는 기술을 사용하여 결정할 수 있다. 추가로, 관심 성분이 단리되고, 조제물에 존재하는 주요 종인 경우, 해당 성분은 본원에서 실질적으로 정제된 것으로 표현된다. 용어 “정제된"이란 본원에 사용된 바와 같이, 적어도 85% 순도, 적어도 90% 순도, 적어도 95% 순도, 적어도 99% 또는 더 큰 순도의 관심 성분을 지칭한다. 오로지 예로써, 핵산 또는 단백질은 이러한 핵산 또는 단백질이 자연 상태에서 이들과 연합된 세포 성분의 적어도 일부분이 없을 때, "단리된" 것이라고 하며, 또는 해당 핵산 또는 단백질이 생체내 또는 시험관내에서 만들어지는 농도 보다 더 높은 수준으로 농축될 때, 단리되었다고 한다. 또한, 예로써, 유전자는 해당 유전자 옆에 있고, 관심대상 유전자 이외의 단백질을 인코드하는 오픈 리딩 프레임으로부터 분리되면, 단리된 것이다.

[0149] 용어 “라벨"이란 본원에 사용된 바와 같이, 화합물에 혼입되고, 쉽게 검출되는 물질을 지칭하며, 이로써 그의 물리적 분포가 검출 및/또는 모니터링될 수 있다.

[0150] 용어 “링키지” 또는 “링커”란 본원에 사용된 바와 같이, 링커의 기능 그룹와 또다른 분자 간의 결합, 또는 이들 간의 화학적 반응으로 인하여 형성된 화학적 모이어티를 지칭한다. 이러한 결합에는 공유 링키지 및 비-공유 결합이 내포되나 이에 국한되지 않으며, 이러한 화학적 모이어티에는 에스테르, 카르보네이트, 이민 포스페이트 에스테르, 히드라존, 아세탈, 오르소에스테르, 펩티드 링키지, 그리고 올리고뉴클레오티드 링키지가 내포될 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. 가수분해적으로 안정한 링키지는 결합이 물에서 실질적으로 안정적이고, 장기간, 궁극적으로 무기한 생리학적 조건(이에 국한되지 않음) 하에서 유용한 pH 값에서 물과 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 가수분해적으로 불안정하거나 또는 분해가능한 링키지는 예를 들어, 물 또는 혈액을 비롯한 용액에서 분해될 수 있음을 의미한다. 효소적으로 불안정하거나 또는 분해가능한 링키지란 해당 링키지가 하나 또는 그 이상의 효소에 의해 분해될 수 있음을 의미한다. 오로지 예로써, PEG 및 관련된 중합체는 해당 중합체 백본에서 분해가능한 링키지를 내포할 수 있거나, 또는 해당 중합체와 이 중합체 분자의 하나 또는 그 이상의 말단 기능성 그룹 사이에 연결 그룹이 내포될 수 있다. 이러한 분해가능한 링키지에는 생물학적으로 활성제에서 PEG 카르복실산 또는 활성화된 PEG 카르복실산과 알코올 그룹의 반응에 의해 형성된 에스테르 링키지가 내포되나, 이에 국한되지 않으며, 이때 이러한 에스테르 그룹은 생물학적으로 활성제를 방출시키기 위해 생리학적 조

건 하에 일반적으로 가수분해된다. 다른 가수분해적으로 분해가능한 링키지에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다; 아민과 알데히드의 반응으로 생성된 이민 링키지; 알코올과 포스페이트 그룹의 반응에 의해 형성된 포스페이트 에스테르 링키지; 하이드라지드와 알데히드의 반응 산물인 히드라존 링키지; 알데히드와 알코올의 반응 산물인 아세탈 링키지; 포르메이트와 알코올의 반응 산물인 오르소에스테르 링키지;, 가령, 중합체 이를 테면, PEG의 단부에서, 그리고 펩티드의 카르복실 그룹이 포함되나 이에 국한되지 않은 아민 그룹에 의해 형성된 펩티드 링키지; 그리고 올리고뉴클레오티드의 5' 히드록실 그룹이 내포된, 그러나 이에 국한되지 않은 포스포라미디트 그룹에 의해 형성된 올리고뉴클레오티드 링키지. 링커에는 짧은 선형, 분기된, 다중-갈래로 된(armed), 또는 덴드라이머 분자 이를 테면, 중합체가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 일부 구체예들에서, 상기 링커는 분기된 것일 수 있다. 다른 구체예들에서, 상기 링커는 이중-기능성 링커일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 링커는 삼중-기능을 하는 링커일 수 있다. 다수의 상이한 절단가능한 링커는 당분야의 당업자에게 공지되어 있다. U.S. 특허 번호 4,618,492; 4,542,225, 및 4,625,014 참고. 이러한 링커 그룹으로부터 작용제의 방출을 위한 메카니즘은 예를 들어, 광-불안정성 결합의 조사(irradiation) 및 산 촉매 가수분해가 내포된다. 예를 들면, U.S. 특허 번호 4,671,958에는 환자의 보체 시스템의 단백질 분해 효소에 의해 생체내 표적 부위에서 절단되는 링커를 포함하는 면역접합체에 대한 설명이 내포되어 있다. 링커의 길이는 폴리펩티드와 이에 연결된 분자 사이의 원하는 공간 관계에 따라 미리 결정되거나, 또는 선택될 수 있다. 다양한 방사선 진단 화합물, 방사선 치료 화합물, 약물, 독소 및 기타 제제를 항체에 부착하기 위해 보고된 수많은 방법을 고려할 때, 당업자는 주어진 제제 또는 분자를 폴리펩티드로 부착시키는 적합한 방법을 결정할 수 있을 것이다.

[0151] 용어 “변형된"이란 본원에 사용된 바와 같이, 자연 아미노산, 비-자연적 아미노산, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 변화가 있음을 지칭한다. 이러한 변화, 또는 변형은 자연 아미노산, 비-자연적 아미노산, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 합성-후 변형에 의해, 또는 자연 아미노산, 비-자연적 아미노산, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 공동-해독, 또는 해독-후 변형에 의해 이루어질 수 있다. “변형된 또는 변형안된”이란 논의될 자연 아미노산, 비-자연적 아미노산, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드이 임의선택적으로 변형된다는 것을 의미하고, 즉, 논의 대상인 해당 자연 아미노산, 비-자연적 아미노산, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 변형될 수도 또는 변형안될 수도 있음을 의미한다.

[0152] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “조절된 혈청 반감기”란 비-변형된 형태의 분자와 비교하여, 변형된 생물학적으로 활성 분자의 순환 반감기에서 양의 변화 또는 음의 변화를 지칭한다. 예로써, 상기 변형된 생물학적으로 활성 분자에는 자연 아미노산, 비-자연적 아미노산, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 예로써, 혈청 반감기는 생물학적으로 활성 분자 또는 변형된 생물학적으로 활성 분자를 투여한 후 다양한 시점에서 채혈하고, 그리고 각 샘플 안에 있는 해당 분자의 농도를 결정함으로써, 측정된다. 혈청 농도와 시간의 상관관계를 통해, 혈청 반감기를 계산할 수 있다. 예로써, 조절된 혈청 반감기는 혈청 반감기의 증가일 수 있으며, 이는 개선된 투여 요법을 가능하게 하거나 또는 독성 효과를 피할 수 있다. 혈청에서의 이러한 증가는 약 2-배 이상, 약 3-배 이상, 약 5-배 이상, 또는 약 10-배 이상일 수 있다. 임의의 폴리펩티드의 혈청 반감기의 증가를 평가하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0153] 용어 “조절된 치료요법적 반감기"란 본원에 사용된 바와 같이, 비-변형된 형태의 분자와 비교하여, 변형된 생물학적으로 활성 분자의 치료요법적으로 유효량의 순환 반감기에서 양의 변화 또는 음의 변화를 지칭한다. 예로써, 상기 변형된 생물학적으로 활성 분자에는 자연 아미노산, 비-자연적 아미노산, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 예로써, 치료요법적 반감기는 투여 후 다양한 시점에서 분자의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 측정함으로써 측정된다. 증가된 치료요법적 반감기는 특정한 유익한 투여 요법, 특정한 유익한 총 용량을 가능하게 하거나, 또는바람직하지 않은 효과를 피할 수 있다. 예로써, 증가된 치료요법적 반감기는 변형된 분자가 이의 표적에 대해 증가된 효능, 증가된 또는 감소된 결합, 또는 해당 비-변형 분자의 또다른 매개변수에서 증가 또는 감소, 또는 효소 이를 테면, 오로지 예로써, 단백질분해효소에 의한 해당 분자의 분해의 증가 또는 감소로 인한 것일 수 있다. 임의의 폴리펩티드의 치료요법적 반감기의 증가를 평가하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0154] “비-자연적 아미노산”이란 20개의 일반 아미노산중 하나가 아닌 아미노산을 칭하거나, 또는 피로리신 또는 셀레노시스테인을 지칭한다. 용어 “비-자연적 아미노산”과 동의어로 이용될 수 있는 다른 용어는 “비-자연적으로 인코드된 아미노산", “비-자연적 아미노산", “비-자연-발생적 아미노산" 및 다양하게 하이픈(-)으로 연결된, 그리고 하이픈으로 연결되지 않은 이의 형태가 있다. 용어 “비-자연적 아미노산”에는 자연적으로 인코드된 아미노산의 변형에 의해 자연적으로 생성된 (20개의 일반 아미노산 또는 피로리신 및 셀레노시스테인이 있지

만, 이에 국한되지 않음), 그러나 자체적으로 해독 복합체에 의해 커지는 폴리펩티드 쇄에 자체적으로 통합되지 못하는 아미노산이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 이러한 아미노산의 예로는 N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌, 그리고 O-포스포티로신이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 추가적으로, 용어 "비-자연적 아미노산"에는 자연적으로 발생되지 않고, 합성에 의해 얻을 수 있거나, 비-자연적 아미노산의 변형에 의해 얻을 수 있는 아미노산이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 비-자연적 아미노산은 리신 유사체, 예를 들면, N6-아지도에톡시-L-리신 (AzK), N6-프로파르길에톡시-L-리신 (PraK), BCN-L-리신, 노르보르넨 리신, TCO-리신, 메틸테트라진 리신, 또는 알릴옥시카르보닐 리신을 포함한다. 일부 구체예들에서, 비-자연적 아미노산은 사카라이드 모이어티를 포함한다. 이러한 아미노산의 예로는 *N*-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, *N*-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, *N*-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, *N*-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 *O*-만노사미닐-L-세린이 내포된다. 이러한 아미노산의 예로는 해당 아미노산과 사카라이드 간의 자연-발생적 N- 또는 O-링키지가 자연계에서 흔히 볼 수 없는 링키지-알켄, 옥심, 티오에테르, 아미드 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는 공유 링키지로 대체되는 예시들이 또한 내포된다. 이러한 아미노산의 예로는 자연-발생적 단백질에서 흔히 볼 수 없는 사카라이드, 이를 테면, 2-데옥시-글루코스, 2-데옥시갈락토스 및 이와 유사한 것들이 또한 내포된다. 비-자연적 아미노산의 특정 예로는 *p*-아세틸-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길옥시페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ-세린, L-Dopa, 플로오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, *p*-요오드-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, *p*-프로파르길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 그리고 파라-아지도메틸-페닐알라닌, 그리고 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적 아미노산은 파라-아세틸-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌 또는 파라-아지도메틸-페닐알라닌로 구성된 선택된다.

[0155] 용어 "핵산"은 본원에 사용된 바와 같이, 데옥시리보뉴클레오오티드, 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오오티드 및 단일-또는 이중-스트랜드 형의 이의 중합체를 지칭한다. 오로지 예로써, 이러한 핵산 및 핵산 중합체에는 다음의 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: (i) 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 자연 발생적 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드 유사체; (ii) PNA (펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 올리고뉴클레오티드 유사체 (포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트, 그리고 이와 유사한 것들); (iii) 이의 보존적으로 변형된 변이체 (축중 코돈 치환들이 내포되나, 이에 국한되지 않음) 그리고 상보적 서열 및 명시적으로 나타낸 서열. 예로써, 축중 코돈 치환은 하나 또는 그 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 그리고 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0156] 용어 "산화 제제"는 본원에 사용된 바와 같이, 산화되는 화합물로부터 전자를 제거할 수 있는 화합물 또는 물질을 지칭한다. 예로써 산화 제제에는 산화된 글루타티온, 시스틴, 시스타민, 산화된 디티오트레톨, 산화된 에리트레톨, 그리고 산소가 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 광범위한 산화 제제가 있다.

[0157] 용어 "약제학적으로 수용가능한"이란 본원에 사용된 바와 같이, 염, 담체 또는 희석제가 내포되나, 이에 국한되지 않는 물질을 말하며, 이들은 화합물의 생물학적 활성 또는 특성을 저해하지 않고, 비교적 무독성이며, 즉, 해당 물질은 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키지 않거나, 또는 그것이 함유된 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용 없이, 개인에게 투여될 수 있는 물질이다.

[0158] 용어 "폴리알킬렌 글리콜", 또는 "폴리(알켄 글리콜)"이란 본원에 사용된 바와 같이, 선형 또는 분기된 중합체 폴리에테르 폴리올을 지칭한다. 이러한 폴리알킬렌 글리콜에는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜, 그리고 이의 유도체들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 다른 예시적인 구체예들은 예를 들면, 상업적인 공급업자의 카탈로그, 이를 테면, Shearwater Corporation's catalog "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001)에 열거된다. 오로지 예로써, 이러한 중합체 폴리에테르 폴리올은 약 0.1 kDa ~ 약 100 kDa의 평균 분자량을 갖는다. 예로써, 이러한중합체 폴리에테르 폴리올에는 약 100 Da ~ 약 100,000 Da 또는 그 이상이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 상기 중합체의 분자량은 약 100,000 Da, 약 95,000 Da, 약 90,000 Da, 약 85,000 Da, 약 80,000 Da, 약 75,000 Da, 약 70,000 Da, 약 65,000 Da, 약

60,000 Da, 약 55,000 Da, 약 50,000 Da, 약 45,000 Da, 약 40,000 Da, 약 35,000 Da, 약 30,000 Da, 약 25,000 Da, 약 20,000 Da, 약 15,000 Da, 약 10,000 Da, 약 9,000 Da, 약 8,000 Da, 약 7,000 Da, 약 6,000 Da, 약 5,000 Da, 약 4,000 Da, 약 3,000 Da, 약 2,000 Da, 약 1,000 Da, 약 900 Da, 약 800 Da, 약 700 Da, 약 600 Da, 약 500 Da, 400 Da, 약 300 Da, 약 200 Da, 그리고 약 100 Da이 내포되나, 이에 국한되지 않는 약 100 Da ~ 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 2,000 ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 10,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분기된 중합체다. 상기 분기된 쇄 PEG의 분자량은 약 100,000 Da, 약 95,000 Da, 약 90,000 Da, 약 85,000 Da, 약 80,000 Da, 약 75,000 Da, 약 70,000 Da, 약 65,000 Da, 약 60,000 Da, 약 55,000 Da, 약 50,000 Da, 약 45,000 Da, 약 40,000 Da, 약 35,000 Da, 약 30,000 Da, 약 25,000 Da, 약 20,000 Da, 약 15,000 Da, 약 10,000 Da, 약 9,000 Da, 약 8,000 Da, 약 7,000 Da, 약 6,000 Da, 약 5,000 Da, 약 4,000 Da, 약 3,000 Da, 약 2,000 Da, 및 약 1,000 Da이 내포되나, 이에 국한되지 않은, 약 1,000 Da ~ 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 20,000 Da이다. 다른 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 분자량은 약 2,000 ~ 약 50,000 Da이다.

[0159] 용어 “중합체"란 본원에 사용된 바와 같이, 반복되는 하위단위체로 구성된 분자를 말한다. 이러한 분자에는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 또는 폴리사카라이드 또는 폴리알킬렌 글리콜이 내포되나, 이에 국한되지 않은다.

[0160] 용어 “폴리펩티드", “펩티드” 및 “단백질”은 아미노산 잔기들의 중합체를 포함하는 것으로 본 명세서에서 호환된다. 즉, 폴리펩티드에 관한 설명은 펩티드의 설명과 단백질의 설명에 대등하게 적용되며, 이 역도 성립된다. 상기 용어들은 자연 발생적 아미노산 중합체, 뿐만 아니라 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 비-자연적으로 인코드된 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 추가적으로, 이러한 “폴리펩티드", “펩티드” 및 “단백질”에는 전장 단백질이 포함된, 임의의 길이의 아미노산 쇄가 포괄되며, 여기에서 아미노산 잔기는 공유 펩티드 결합에 의해 연계된다.

[0161] 용어 “해독-후 변형된”이란 이러한 아미노산이 폴리펩티드 쇄로 해독에 의해 통합된 후, 발생하는 자연 또는 비-자연적 아미노산의 임의의 변형을 지칭한다. 이러한 변형은 동시-해독적 생체내 변형, 동시-번역적 시험관내 변형(예를 들면, 무-세포 해독 시스템), 해독-후 생체내 변형 및 번역-후 시험관내 변형이 내포되지만, 이에 국한되지 않는다.

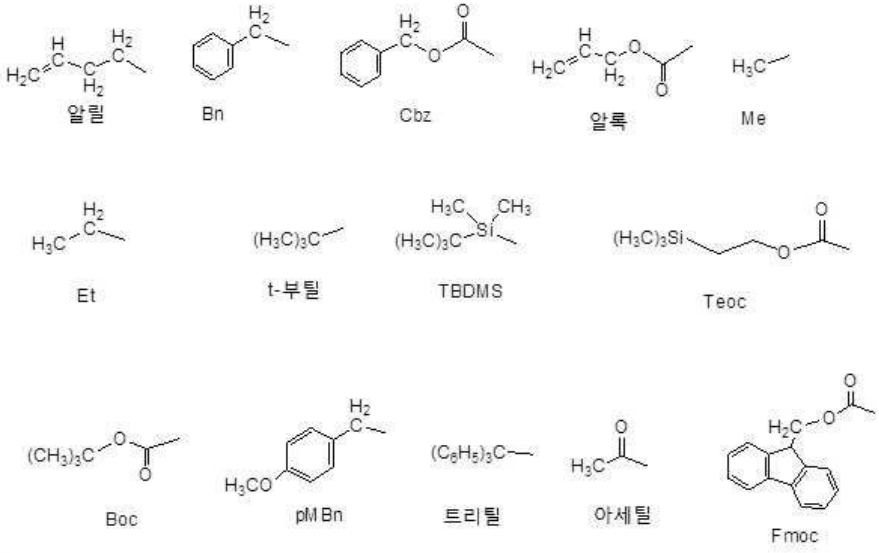
[0162] 용어 “프로드럭(prodrug)” 또는 “약제학적으로 수용가능한 프로드럭"이란 본원에 사용된 바와 같이, 생체 또는 시검관에서 이의 부모계 약물로 전환가능한 물질을 지칭하며, 이때 이들은 해당 약물의 생물학적 활성 또는 특성을 저해하지 않고, 비교적 무독성이며, 즉, 해당 물질은 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키지 않거나, 또는 그것이 함유된 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용 없이, 개인에게 투여될 수 있는 물질이다. 프로드럭은 일반적으로 대상체에 투여 및 후속적으로 흡수 후, 대사 경로에 의한 전환과 같은 일부 과정을 통해 활성 또는 보다 활성이 큰 종으로 전환되는 약물 전구체이다. 일부 프로드럭은 프로드럭에 화학 그룹이 존재하여, 활성을 낮추거나 및/또는 약물에 용해도 또는 기타 속성을 부여한다. 일단 화학 그룹이 프로드럭으로부터 절단 및/또는 변형되면 활성 약물이 생성된다. 프로드럭은 효소 또는 비-효소 반응을 통해 체내에서 활성 약물로 전환된다. 프로드럭은 더 나은 용해도와 같은 개선된 물리화학적 특성, 특정 세포, 조직, 기관 또는 리간드를 특이적으로 표적화하는 것과 같은 개선된 전달 특징, 및 약물의 개선된 치료적 가치를 제공할 수 있다. 이러한 프로드럭의 이점으로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: (i) 부모 약물에 비해 투여 용이성; (ii) 프로드럭은 경구 투여에 의해 생체이용 가능하지만, 모약물은 그렇지 않을 수 있다; 그리고 (iii) 프로드럭은 또한 부모 약물과 비교하여, 약제학적 조성물에서 개선된 용해도를 또한 가질 수 있다. 프로드럭에는 활성 약물의 약리학적으로 비활성 또는 감소된 활성 유도체가 내포된다. 프로드럭은 물리화학적, 생물약제학적 또는 약동학적 특성과 같은 약물의 특성을 조작하여 원하는 작용 부위에 도달하는 약물 또는 생물학적 활성 분자의 양을 조절하도록 설계될 수 있다. 프로드럭의 예로써 비-자연적 아미노산 폴리펩티드이 될 수 있는데, 이 폴리펩티드는 에스테르 (“프로드럭”)로 투여되어, 수용성이 이동성에 불리하게 작용하는 세포막의 통과를 용이하게 하고, 그러나 수용성이 유익한 속성이 되는 세포 안으로 진입하면 대사적으로 활성 물질인 카르복실산으

로 가수분해된다. 프로드럭은 부위-특이적 조직으로의 약물 수송을 향상시키기 위한 변형자로 사용하기 위해, 가역적 약물 유도체로 설계될 수 있다.

[0163] 용어 "예방학적으로 유효량"이란 본원에 사용된 바와 같이, 치료될 질환, 병태 또는 장애의 증상중 하나 또는 그 이상을 어느 정도 완화시킬 수 있도록 환자에게 예방적으로 적용되는 적어도 하나의 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 또는 적어도 하나의 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물의 양을 지칭한다. 이러한 예방학적 적용에서, 이러한 양은 해당 환자의 건강 상태, 체중, 및 이와 유사한 것들에 따라 달라질 수 있다. 용량 증량 임상 시도가 내포되나, 이에 국한되지 않는 일상적인 실험에 의해, 이러한 예방학적 유효량을 결정하는 것은 당업계의 기술 범위 내에 있는 것으로 간주된다.

[0164] 용어 "보호된"이란 본원에 사용된 바와 같이, 특정 반응 조건 하에서 화학적으로 반응 기능성 그룹의 반응을 막아주는 "보호 그룹" 또는 모이어티가 존재함을 지칭한다. 상기 보호 그룹은 보호될 화학적으로 반응 그룹의 유형에 따라 가변적일 것이다. 오로지 예로써, (i) 만약 화학적으로 반응 그룹이 아민 또는 하이드라지드라면, 보호 그룹은 tert-부틸옥시카르보닐 (t-Boc)과 9-플루오레닐메톡시카르보닐 (Fmoc)에서 선택될 것이며; (ii) 만약 화학적으로 반응 그룹이 티올이라면, 보호 그룹은 오르소피리딜이황화물일 수 있고; 그리고 (iii) 만약 화학적으로 반응 그룹이 카르복실산, 이를 테면, 부탄산 또는 프로피온산, 또는 히드록실 그룹이라면, 보호 그룹은 벤질 또는 알킬 그룹 이를 테면, 메틸, 에틸, 또는 tert-부틸일 수 있다.

[0165] 오로지 예로써, 차단/보호 그룹은 다음에서 선택될 수 있다:



[0166]

[0167] 추가적으로, 보호 그룹에는 Nvoc 및 MeNvoc와 같은 광-불안정성 그룹 및 당업계에 공지된 기타 보호 그룹이 내포되나, 이에 국한되지는 않는다. 다른 보호 그룹들은 Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999에서 기재되어 있으며, 이는 전문이 본원의 참고 자료에 편입된다.

[0168] 용어 "재조합 숙주 세포", 또는 "숙주 세포"라고도 하는 용어는 외생성 폴리뉴클레오티드가 내포되어 있는 세포를 지칭하며, 이때 이러한 외생성 폴리뉴클레오티드를 세포 안으로 삽입하는데 이용되는 방법에는 직접 취입, 형질도입, f-교배, 또는 재조합 숙주 세포를 생성하기 위한 당업계에 공지된 기타 방법들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 오로지 예로써, 이러한 외생성 폴리뉴클레오티드는 플라스미드를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 비-통합 벡터일 수 있거나 또는 숙주 게놈에 통합될 수 있다.

[0169] 용어 "산화환원-활성제"는 본원에 사용된 바와 같이, 또다른 분자를 산화 또는 환원시키고, 이로 인하여 해당 산화환원 활성제는 환원 또는 산화되는 분자를 지칭한다. 산화환원 활성제의 예로는 페로센, 퀴논, $Ru^{2+/3+}$ 복합체, $Co^{2+/3+}$ 복합체, 그리고 $Os^{2+/3+}$ 복합체들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0170] 용어 "환원 제제", 본원에 사용된 바와 같이, 환원되는 화합물에 전자를 부가할 수 있는 화합물 또는 물질을 말한다. 예로써 환원 제제에는 디티오트레톨 (DTT), 2-멀캅토에탄올, 디티오트레톨, 시스테인, 시스테아민 (2-아미노에탄티올), 그리고 환원된 글루타티온이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 이러한 환원 제제는 단지 예를

들면, 술프히드릴기를 환원된 상태로 유지시키고, 분자-내 또는 분자-간 이황화 결합을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0171] “재-폴딩"이란 본원에 사용된 바와 같이, 부적절하게 폴딩된 상태 또는 폴딩되지 않은 상태를 본래의 또는 적절하게 폴딩된 형태로 변형시키는 임의의 과정, 반응 또는 방법을 설명한다. 오로지 예로써, 재-폴딩은 이황화 결합을 함유하고 있는 폴리펩티드에서 이황화 결합에 대해 부적절하게 폴딩되거나 또는 폴딩되지 않은 상태에서 고유의 또는 적절하게 폴딩된 형태로 변형시킨다. 이러한 이황화물 결합을 함유하는 폴리펩티드는 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드일 수 있다.

[0172] 용어 “안전성” 또는 “안전성 프로파일"은 본원에 사용된 바와 같이, 약물이 투여된 횟수에 비교하여 약물의 투여와 관련될 수 있는 부작용을 지칭한다. 예로써, 여러 번 투여되어 부작용이 거의 없거나 또는 전혀 없는 약물은 우수한 안전성 프로파일을 가지고 있다고 말한다. 임의의 폴리펩티드의 안전성 프로파일을 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0173] 구절 “선택적으로 ~에 혼성화되다” 또는 “특이적으로 ~에 혼성화되다"란 본원에 사용된 바와 같이, 전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 복합체 혼합물에 서열이 존재할 때, 엄격한 혼성화 조건 하에서 특정 뉴클레오티드 서열에 분자의 결합, 이중화 또는 혼성화를 지칭한다.

[0174] 구절 “엄격한 혼성화 조건”이란 낮은 이온성 강도 및 높은 온도 조건 하에서 DNA, RNA, PNA 또는 다른 핵산 모방체, 또는 이의 조합 서열의 혼성화를 지칭한다. 예로써, 엄중한 조건 하에 프로브는 핵산의 복합체 혼합물(전체 세포성 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)에서 이 혼합물 안에 다른 서열에는 혼성화되지 않지만, 이의 표적 하위서열에는 혼성화될 것이다. 엄격한 조건은 서열-의존적이며, 상이한 환경에서 상이할 것이다. 예로써, 더 긴 서열은 더 높은 온도에서 특이적으로 혼성화된다. 엄격한 혼성화 조건에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: (i) 특정 이온성 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대한 열 용융점(Tm)보다 약 5-10 °C 더 낮은; (ii) 염 농도는 약 pH 7.0 ~ 약 pH 8.3에서 약 0.01 M ~ 약 1.0 M이며, 온도는 짧은 프로브 (약 10 ~ 약 50개 뉴클레오티드, 그러나 이에 국한되지 않음)의 경우 적어도 약 30 ℃이며, 그리고 더 긴 프로브 (약 50개 이상의 뉴클레오티드, 그러나 이에 국한되지 않음)의 경우 적어도 약 60 ℃이며; (iii) 포름아미드를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 탈안정화 제제의 추가, (iv) 50% 포름아미드, 5X SSC, 그리고 1% SDS, 42 ℃에서 항온처리, 또는 5X SSC, 약 1% SDS, 65 ℃에서 항온처리, 65 ℃에서 약 5 분 ~ 약 120 분 동안 0.2X SSC에서 세척, 그리고 약 0.1% SDS에서 세척. 오로지 예로써, 선택적 또는 특이적 혼성화의 탐지에는 배경의 적어도 2-배의 양성 신호가 내포되지만, 이에 국한되지 않는다. 핵산의 혼성화에 대한 광범위한 가이드는 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)에서 찾을 수 있다.

[0175] 용어 “대상체”란 본원에 사용된 바와 같이, 치료, 관찰 또는 실험의 대상이 되는 동물을 지칭한다. 오로지 예로써, 대상체는 인간을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 포유동물일 수 있지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0176] 용어 “실질적으로 정제된"이란 본원에 사용된 바와 같이, 정제 전, 관심 성분을 정상적으로 동반하거나 또는 상호작용하는 다른 성분이 실질적으로 또는 기본적으로 없는, 관심 성분을 지칭한다. 오로지 예로써, 관심대상의 성분의 조제물에서 오염 성분이 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% (건중량의) 미만을 함유할 때, 관심대상 성분은 "실질적으로 정제된"것일 수 있다. 따라서, “실질적으로 정제된” 관심대상의 성분은 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 더 큰 수준의 순도를 가질 수 있다. 오로지 예로써, 재조합적으로 생산된 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 경우, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 고유 세포 또는 숙주 세포로부터 정제될 수 있다. 예로써, 해당 조제물 안에 오염 물질이 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만 (건중량의)으로 함유할 때, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 조제물은 "실질적으로 정제된"것일 수 있다. 예로써, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 재조합적으로 만들어질 때, 해당 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 이 세포의 건중량의 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1% 또는 그 미만으로 존재할 수 있다. 예로써, 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 재조합적으로 만들어질 때, 해당 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 배양 배지 안에 이 세포의 건중량의 약 5g/L,

약 4g/L, 약 3g/L, 약 2g/L, 약 1g/L, 약 750mg/L, 약 500mg/L, 약 250mg/L, 약 100mg/L, 약 50mg/L, 약 10mg/L, 또는 약 1mg/L 또는 그 미만으로 존재할 수 있다. 예로써, "실질적으로 정제된" 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC, 그리고 모세관 전기영동이 내포된, 그러나 이에 국한되지 않은 적절한 방법에 의해 결정될 때, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 더 큰 수준의 순도를 가질 수 있다.

[0177] 용어 "치환체"는 또한 "비-간섭 치환체"라고도 하는데, 이는 분자에서 또다른 그룹을 대체하는데 이용될 수 있는 그룹을 지칭한다. 이러한 그룹에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 할로, C_1-C_{10} 알킬, C_2-C_{10} 알케닐, C_2-C_{10} 알키닐, C_1-C_{10} 알콕시, C_5-C_{12} 아릴킬, C_3-C_{12} 사이클로알킬, C_4-C_{12} 사이클로알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 톨루올릴, 크실레닐, 바이페닐, C_2-C_{12} 알콕시알킬, C_5-C_{12} 알콕시아릴, C_5-C_{12} 아릴옥시알킬, C_7-C_{12} 옥시아릴, C_1-C_6 알킬설피닐, C_1-C_{10} 알킬술포닐,-$(CH_2)_m$-O-(C_1-C_{10} 알킬) (이때 m은 1 ~ 8이며), 아릴, 치환된 아릴, 치환된 알콕시, 플루오르알킬, 헤테로사이클릭 라디칼, 치환된 헤테로사이클릭 라디칼, 니트로알킬,-NO_2,-CN,-NRC(O)-(C_1-C_{10} 알킬),-C(O)-(C_1-C_{10} 알킬), C_2-C_{10} 알크티오알킬,-C(O)O-(C_1-C_{10} 알킬),-OH,-SO_2, =S,-COOH,-NR_2, 카르보닐,-C(O)-(C_1-C_{10} 알킬)-CF_3,-C(O)-CF_3,-C(O)NR_2,-(C_1-C_{10} 아릴)-S-(C_6-C_{10} 아릴),-C(O)-(C_6-C_{10} 아릴),-$(CH_2)_m$-O-$(CH_2)_m$-O-(C_1-C_{10} 알킬) (이때 각 m은 1 ~ 8이며),-C(O)NR_2,-C(S)NR_2,-SO_2NR_2,-NRC(O)NR_2,-NRC(S)NR_2, 이의 염, 그리고 이와 유사한 것들. 상기 목록에서 각 R 그룹에는 H, 알킬 또는 치환된 알킬, 아릴 또는 치환된 아릴, 또는 알카릴이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 치환기가 왼쪽에서 오른쪽으로 쓰여진 그들의 통상적인 화학식에 의해 지정되는 경우, 그들은 오른쪽에서 왼쪽으로 구조를 쓸 경우 화학적으로 동일한 치환기를 대등하게 포괄하는데, 예를 들어-CH2O-는-OCH2-와 등가이다.

[0178] 오로지 예로써, 알킬 및 헤테로알킬 라디칼 (알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 이종알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 사이클로알케닐, 그리고 헤테로사이클로알케닐로 지칭되는 그룹들을 비롯한)의 치환체에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다:-OR, =O, =NR, =N-OR,-NR_2,-SR,-할로겐,-SiR_3,-OC(O)R,-C(O)R,-CO_2R,-$CONR_2$,-OC(O)NR_2,-NRC(O)R,-NRC(O)NR_2,-$NR(O)_2$R,-NR-C(NR_2)=NR,-S(O)R,-$S(O)_2$R,-$S(O)_2NR_2$,-$NRSO_2$R,-CN 및-NO_2. 상기 목록에서 각 R 그룹에는 수소, 치환된 또는 치환안된 헤테로알킬, 치환된 또는 치환안된 아릴 (1-3개 할로겐으로 치환된 아릴을 비롯한 그러나 이에 국한되지 않는), 치환된 또는 치환안된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 그룹, 또는 아릴킬 그룹이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 두 개 R 그룹이 동일한 질소 원자에 부착될 때, 이들은 질소 원자와 조합되어, 5-, 6-, 또는 7-구성원의 고리를 형성한다. 예를 들면,-NR_2는 1-피롤리디닐 및 4-몰포리닐이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0179] 예로써, 아릴 및 헤테로아릴 그룹의 치환체에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 0에서 방향족 고리 시스템의 열린 원자가의 전체 수까지 범위의 숫자에서, -OR, =O, =NR, =N-OR,-NR_2,-SR,-할로겐,-SiR_3,-OC(O)R,-C(O)R,-CO_2R,-$CONR_2$,-OC(O)NR_2,-NRC(O)R,-NRC(O)NR_2,-$NR(O)_2$R,-NR-C(NR_2)=NR,-S(O)R,-$S(O)_2$R,-$S(O)_2NR_2$,-$NRSO_2$R,-CN,-NO_2,-R,-N_3,-$CH(Ph)_2$, 플루오르(C_1-C_4)알콕시, 그리고 플루오르(C_1-C_4)알킬; 그리고 상기 목록에서 각 R 그룹에는 수소, 알킬, 헤테로알킬, 아릴 및 헤테로아릴이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0180] 용어 "치료요법적으로 유효량"이란 본원에 사용된 바와 같이, 질환, 병태 또는 장애로 이미 앓고 있는 환자에게 투여되는 적어도 하나의 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및/또는 적어도 하나의 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드를 함유하는 조성물이 치료될 질환, 장애 또는 병태의 증상중 하나 또는 그 이상을 치유 또는 적어도 부분적으로 억제시키거나, 또는 완화시키는데 충분한 양을 지칭한다. 이러한 조성물의 효과는 질환, 장애 또는 병태의 중증도 및 경과, 이전 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 치료 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 오로지 예로써, 치료요법적으로 유효량은 용량 증량 임상 시도가 내포되나, 이에 국한되지 않는 일상적인 실험에 의해 결정될 수 있다.

[0181] 용어 "티오알콕시"란 본원에 사용된 바와 같이, 산소 원자를 경유하여 분자에 연계된, 황을 함유하는 알킬 그룹을 지칭한다.

[0182] 용어 "독성 모이어티" 또는 "독성 그룹" 본원에 사용된 바와 같이, 위해, 소란 또는 사멸을 일으킬 수 있는 화합물을 말한다. 독성 모이어티 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 아우리스타틴, DNA 마이너 그루브 결

합제, DNA 마이너 그루브 알킬화제, 엔디인, 렉시트로프신, 듀오카르마이신, 탁산, 퓨로마이신, TLR-작용제, 메이탄시노이드, 빈카 알칼로이드, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, 아우리스타틴 E, 파클리탁셀, 도세탁셀, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신, 시아노모르폴리노-독소루비신, TLR-작용제-10, 에키노마이신, 콤브레타스타틴, 칼리케아미신, 메이탄신, DM-1, 네트롭신, 포도필로톡신 (예로써 에토포사이드, 테니포사이드 등), 바카틴 및 이의 유도체들, 항-튜불린제, 크립토피신, 콤브레타스타틴, 아우리스타틴 E, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈, VP-16, 캄프토테신, 에포틸론 A, 에포틸론 B, 노코다졸, 콜히친, 콜시미드, 에스트라무스틴, 세마도틴, 디스코더몰리드, 메이탄신, 엘류테로빈, 메클로에타민, 사이클로포스파미드, 멜팔란, 카무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 스트렙토조신, 클로로조토신, 우라실 머스타드, 클로르메틴, 이포스파, 클로람부실, 피포브로만, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌티오포스포라민, 부설판, 다카바진, 그리고 테모졸로미드, 이타라빈, 시토신 아라비노사이드, 플루오르우라실, 플록수리딘, 6-티오구아닌, 6-멀캅토퓨린, 펜토스타틴, 5-플루오르우라실, 메토트렉세이트, 10-프로파르길-5,8-디데아자폴레이트, 5,8-디데아자테트라히드로폴산, 류코보린, 플루다라빈 포스페이트, 펜토스타틴, 젬시타빈, Ara-C, 파클리탁셀, 도세탁셀, 데옥시코포르마이신, 미토마이신-C, L-아스파라기나제, 아자티오프린, 브레퀴나르, 항생제 (예로써, 안트라사이클린, 겐타마이신, 세팔로틴, 반코마이신, 텔라반신, 답토마이신, 아지트로마이신, 에리트로마이신, 로시트로마이신, 푸라졸리돈, 아목시실린, 암피실린, 카르베니실린, 플루클록사실린, 메티실린, 페니실린, 시프로플록사신, 목시플록사신, 오플록사신, 데옥시사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 스트렙토마이신, 리파부틴, 에탐부톨, 리팍시민 등.), 항바이러스 약물 (예로써, 아바카비르, 아사이클로비르, 앰플리젠, 시도포비르, 델라비르딘, 디다노신, 에파비렌즈, 엔테카비르, 포스포넷, 간시클로비르, 이바시타빈, 이무노비르, 이독수리딘, 이노신, 로피나비르, 메티사존, 넥사비르, 네비라핀, 오셀타미비르, 펜시클로비르, 스타부딘, 트리플루리딘, 트루바다, 발라시클로비르, 자나미비르 등), 다우노루비신 히드로클로라이드, 다우노마이신, 루비도마이신, 세루비딘, 이다루비신, 독소루비신, 에피루비신 및 모르폴리노 유도체들, 페녹시존 비스사이클로펩티드 (예로써, 닥티노마이신), 염기성 글리코펩티드 (예로써, 블레오마이신), 안트라퀴논 글리코시드 (예로써, 플리카마이신, 미트라마이신), 안트라세네디온 (예로써, 미톡산트론), 아지리노피롤로 인돌디온 (예로써, 미토마이신), 거대환형 면역억제제 (예로써, 사이클로스포린, FK-506, 타크로리무스, 프로그라프, 라파마이신 등), 나벨벤, CPT-11, 아나스트라졸, 레트로졸, 카페시타빈, 랄록시펜, 사이클로포스파미드, 이포사미드, 드롤록사핀, 알로콜히친, 할리콘드린 B, 콜히친, 콜히친 유도체들, 메이탄신, 리족신, 파클리탁셀, 파클리탁셀 유도체들, 도세탁셀, 티오콜히친, 트리틸 시스테린, 빈블라스틴 술페이트, 빈크리스틴 술페이트, 시스플라틴, 카보플라틴, 히드록시우레아, N-메틸하이드라진, 에피도필로톡신, 프로카바진, 미톡산트론, 류코보린, 그리고 테가푸르. "탁산"에는 파클리탁셀 및 활성 탁산 유도체 또는 프로드럭이 내포된다.

[0183] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 병태 증상의 경감, 약화 또는 개선, 추가 증상 예방, 증상의 기저 대사적 원인 개선 또는 예방, 질환 또는 병태의 억제가 내포되는데, 예로써, 질환 또는 병태의 발병 억제, 질환 또는 병태의 완화, 질환 또는 병태의 퇴행 유발, 질환 또는 병태에 의해 유발된 상태 완화, 또는 질환 또는 병의 증상 중단이다. 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 예방적 및/또는 치료요법적 처치가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0184] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “수용성 중합체”란 수용 용매에 용해가능한 임의의 중합체를 지칭한다. 이러한수용성 중합체 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드, 단일 C_1-C_{10} 알콕시 또는 아릴옥시 이의 유도체들 (U.S. 특허 번호 5,252,714에서 기재됨, 이는 본원의 참고자료에 편입됨), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리아미노산, 디비닐 에테르 말레산 무수물, N-(2-히드록시프로필)-메트아크릴아미드, 덱스트란, 덱스트란 술페이트를 비롯한 덱스트란 유도체들, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편들, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 글리칸, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 유도체들 (메틸 셀룰로오스 및 카르복시메틸 셀룰로오스를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 혈청 알부민, 전분 및 전분 유도체들, 폴리펩티드, 폴리알킬렌 글리콜 및 이의 유도체들, 폴리알킬렌 글리콜의 공중합체 및 이의 유도체들, 폴리비닐 에틸 에테르, 그리고 알파-베타-폴리[(2-히드록시에틸)-DL-아스파르타미드, 그리고 이와 유사한 것들, 또는 이의 혼합물들. 오로지 예로써, 이러한 수용성 중합체가 자연 아미노산 폴리펩티드 또는 비-자연적 폴리펩티드에 커플링되면 다음을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 변화를 초래할 수 있다: 변형안된 형태와 비교하여 증가된 수용성, 증가된 또는 조절된 혈청 반감기, 증가된 또는 조절된 치료요법적 반감기, 증가된 생체이용률, 조절된 생물학적 활성, 연장된 순환 시간, 조절된 면역원성, 조절된 물리적 연합 특징, 응집 및 다량체 형성, 변경된 수용체 결합, 활성 조절자, 또는 다른 표적화 폴리펩티드 결합, 하나 또는 그 이상의 결합 파트너에 결합의 변경, 그리고 변경된 표적화 폴리펩티드 수용체 이량체화 또는 다량체화. 추가로, 이러한수용성 중합체

는 이들 고유의 생물학적 활성을 가질 수도 있고, 가지지 않을 수 있으며, 그리고 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드, 또는 하나 또는 그 이상의 생물학적으로 활성 분자를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 다른 물질에 표적화 폴리펩티드를 부착시키는 링커로 이용될 수 있다.

[0185] 다른 언급이 없는 한, 당해 분야의 기술 내에서 질량 분광법, NMR, HPLC, 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약리학의 통상적인 방법이 사용된다.

[0186] 본원에서 제시도니 화합물들 (비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)에는 본원에서 제시된 다양한 화학식 및 구조에 언급된 것과 동일한 동위원소로-라벨된 화합물이 내포되나, 하나 또는 그 이상의 원자가 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량 수와는 상이한 원자 질량 또는 질량 수를 갖는 원자로 대체된다. 본 화합물에 통합될 수 있는 동위원소의 예로는 수소, 탄소, 질소, 산소, 플루오린 및 염소의 동위원소, 이를 테면, 차례로 ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{18}O, ^{17}O, ^{35}S, ^{18}F, ^{36}Cl이다. 본원에 기재된 특정 동위원소 표지된 화합물, 예를 들어 ^{3}H 및 ^{14}C와 같은 방사성 동위원소가 혼입된 화합물은 약물 및/또는 기질 조직 분포 분석에 유용하다. 또한, 중수소, 즉 ^{2}H와 같은 동위원소로의 치환은 더 큰 대사 안정성, 예를 들어, 생체 내 반감기 증가 또는 투여 요구량 감소로 인한 특정 치료 이점을 제공할 수 있다.

[0187] 본원의 화합물들중 일부 (비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)은 비대칭 탄소 원자를 가지고, 따라서 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체로 존재할 수 있다. 부분입체이성질체 혼합물은 예를 들어, 크로마토그래피 및/또는 분별 결정화에 의해 공지된 방법에 의해 물리적 화학적 차이에 기초하여 개별 부분입체이성질체로 분리될 수 있다. 거울상이성질체는 거울상이성질체 혼합물을 적절한 광학 활성 화합물(예를 들면, 알코올)과의 반응에 의해 부분입체이성질체 혼합물로 전환하고, 부분입체이성질체를 분리하고, 개별 부분입체이성질체를 상응하는 순수한 거울상이성질체로 전환(예를 들면, 가수분해)함으로써 분리될 수 있다. 부분입체 이성질체, 거울상 이성질체, 및 이들의 혼합물을 포함하는 이러한 모든 이성질체는 본원에 기재된 조성물의 일부로 간주된다.

[0188] 추가로적으로 또는 추가 구체예들에서, 본원에서 기술된 화합물 (비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)은 프로드럭 형태로 이용된다. 추가로적으로 또는 추가 구체예들에서, 본원에서 기술된 화합물 (비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)은 대사산물을 생성할 필요가 있는 유기체에 투여할 때 대사되며, 이는 원하는 치료 효과를 포함하여 원하는 효과 생성에 사용된다. 추가 또는 추가적 구체예들에서, 비-자연적 아미노산 및 “변형된 또는 변형안된” 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 활성 대사산물이 있다.

[0189] 본원에 기재된 방법 및 제형에는 N-옥시드, 결정형 (또는 다형체), 또는 비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 약제학적으로 수용가능한 염의 사용이 내포된다. 특정 구체예들에서, 비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 호변체(tautomers)로 존재할 수 있다. 본 발명에서 제시되는 상기 비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 범위 내에 모든 호변체들이 내포된다. 추가로, 본원에서 기재된 비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 용매화되지 않은 상태 뿐만 아니라, 약제학적으로 수용가능한 용매 이를 테면, 물, 에탄올, 그리고 이와 유사한 것들에 의해 용해화된 형태로 존재할 수 있다. 본원에서 기재된 비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 용해화된 형태 또한 본원에서 기재된 것으로 간주된다.

[0190] 본원의 화합물들중 일부(비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)는 몇 가지 호변체 형태로 존재할 수 있다. 이러한 모든 호변이성질체 형태는 본원에 기재된 조성물의 일부로 간주된다. 예를 들면, 본원의 임의의 화합물들(비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)의 에놀-케토 형 모두는 본원에 기재된 조성물의 일부로 간주된다.

[0191] 본원의 임의의 화합물들(비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴

리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)은 산이며, 약제학적으로 수용가능한 양이온과 함께 염을 형성할 수 있다. 본원의 임의의 화합물들(비-자연적 아미노산, 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 및 변형된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 그리고 전술한 화합물들을 만들기 위한 시약들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)은 염기일 수 있고, 따라서, 약제학적으로 수용가능한 음이온과 함께 염을 형성할 수 있다. 이-염을 포함하는 이러한 모든 염은 본 명세서에 기재된 조성물의 범위 내에 있고, 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 염은 수성, 비-수성 또는 부분적으로 수성-매질에서 산성 및 염기성 물질을 접촉시켜 제조할 수 있다. 염은 여과, 비-용매를 사용한 침전 후 여과, 용매 증발 또는 수용액의 경우 동결건조 기술 중 적어도 하나 이상을 사용하여 회수한다.

[0192] 본 명세서에 개시된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 약제학적으로 허용되는 염은 부모계 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어, 알칼리 금속 이온, 알칼리토류 이온, 또는 알루미늄 이온; 또는 유기 염기와 배위체(coordinates)로 대체될 때 형성될 수 있다. 추가로, 개시된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 염 형태는 출발 물질 또는 중간체의 염을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에 기재된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 유리 염기 형태를 약학적으로 허용되는 무기산 또는 유기산과 반응시켜 약학적으로 허용되는 산-부가염(약학적으로 허용되는 염의 일종)으로 제조한다. 대안으로, 본원에 기재된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 유리 산 형태를 약학적으로 허용되는 무기 염기 또는 유기 염기와 반응시켜 약학적으로 허용되는 염기-부가염(약학적으로 허용되는 염의 일종)으로 제조한다.

[0193] 약제학적 수용가능한 염의 유형에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: (1) 무기 산 이를 테면, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 및 이와 유사한 것들에 의해 형성된, 또는 유기산 이를 테면, 아세트산, 프로피온산, 헥사논산, 사이클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 젖산, 말론산, 숙신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 주석산, 구연산, 벤조산, 3-(4-히드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 1,2-에탄디술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 벤젠술폰산, 2-나프탈렌술폰산, 4-메틸비사이클로-[2.2.2]옥트-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 4,4'-메틸렌비스-(3-히드록시-2-엔-1-카르복실산), 3-페닐프로피온산, 트리메틸아세트산, 3차 부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 히드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 뮤콘산, 그리고 이와 유사한 것들에 의해 형성된 산 추가 염; (2) 부모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어, 알칼리 금속 이온, 알칼리 토류 이온 또는 알루미늄 이온, 또는 유기 염기와의 으로 대체될 때 형성된 염; 또는 유기 염기와 배위체로 대체될 때 형성된 염. 수용가능한 유기 염기에는 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, N-메틸글루카민, 그리고 이와 유사한 것들이 내포된다. 수용가능한 무기 염기에는 수산화알루미늄, 수산화칼슘, 수산화칼륨, 탄산나트륨, 수산화나트륨 및 이와 유사한 것들이 내포된다.

[0194] 상기 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 약제학적 수용가능한 염의 대응하는 반대이온은 이온 교환 크로마토그래피, 이온 크로마토그래피, 모세관 전기영동, 유도 결합 플라즈마, 원자 흡수 분광법, 질량 분석법 또는 이들의 조합이 내포되나, 이에 국한되지 않는 다양한 방법을 사용하여 분석 및 식별할 수 있다. 추가로, 이러한비-자연적 아미노산 폴리펩티드 약제학적 수용가능한 염의 치료요법적 활성은 실시예에 설명된 기술과 방법을 사용하여 테스트할 수 있다.

[0195] 염에 대한 언급은 용매 첨가 형태 또는 이의 결정 형태, 특히 용매화물 또는 다형체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 용매화물은 화학량론적 또는 비화학량론적 양의 용매를 함유하고, 종종 물, 에탄올 및 이와 유사한 것들과 같은 약제학적으로 허용되는 용매로 결정화 과정 동안 형성된다. 용매가 물일 때 수화물이 형성되고, 용매가 알코올일 때 알코올산염이 형성된다. 다형체에는 화합물의 동일한 원소 조성의 서로 상이한 결정 패킹 배열을 내포된다. 다형체는 일반적으로 X-선 회절 패턴, 적외선 스펙트럼, 융점, 밀도, 경도, 결정 모양, 광학 및 전기적 특성, 안정성 및 용해도가 상이하다. 다양한 인자들 이를 테면, 재결정화 용매, 결정화 속도 및 보관 온도로 인해 단일 결정 형태가 우세할 수 있다.

[0196] 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 약제학적 수용가능한 염 다형체 및/또는 용매화물의 스크리닝 및 특성화는 열분석, x-선 회절, 분광학, 증기 흡착 및 현미경이 내포되나, 이에 국되지 않는 다양한 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 열 분석 방법은 다형 전이를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 열화학적 분해 또는 열 물리적 프로세스를 다루며, 이러한 방법은 다형 형태 간의 관계를 분석하고, 중량 손실을 결정하고, 유리 전이 온도를 찾기 위해 또는 부형제 호환성 연구에 사용된다. 이러한 방법에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 시차 주사 열량계(DSC), 변조 시차 주사 열량계(MDCS), 열중량 분석(TGA), 열중량 및 적외선 분석(TG/IR). X-선 회절 방법에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 단일 결정 및 분말 회절계 및 싱크로트론 소스. 사용되는 다

양한 분광 기술에는 Raman, FTIR, UVIS 및 NMR(액체 및 고체 상태)이 내포되지만, 이에 국한되지는 않는다. 다양한 현기경 기술에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 편광 현미경, 에너지 분산 X-선 분석(EDX)이 있는 주사 전자 현미경(SEM), EDX를 사용한 환경 주사 전자 현미경(기체 또는 수증기 대기에서), IR 현미경 및 라만 현미경.

[0197] 본 발명의 바람직한 구체예들을 본 출원에 나타내고 설명하였으나, 해당 분야의 숙련된 기술자들에게 이러한 구체예들이 단지 예로서 제공되는 것임은 자명할 것이다. 본 발명에서 벗어나지 않고 수많은 변형들, 변화들, 및 치환들이 해당 분야의 숙련된 기술자들에 의해 이루어질 것이다. 본 발명을 실시함에 있어 본 명세서에 기재된 발명의 구체예들에 대한 다양한 대체예들이 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 하기 청구범위는 본 발명의 범위를 정의하며 이러한 청구범위에 속하는 방법들 및 구성들 및 이들의 균등예들은 청구범위에 의해 뒷받침되는 것으로 본다.

[0198] ***TLR-작용제 링커 유도체들***

[0199] 한 가지 수준에서 TCs의 표적화 폴리펩티드 또는 카르보닐, 디카르보닐, 옥심 또는 히드록실아민 그룹을 갖는 적어도 하나의 비-자연적 아미노산 또는 변형된 비-자연적 아미노산을 포함하는 유사체를 만들고, 이용하는 도구(방법, 조성물, 기술)이 본원에서 기술된다. 비-자연적 아미노산을 포함하는 TCs의 이러한 표적화 폴리펩티드는 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 제 2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 그리고 임의의 이의 조합을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 추가 기능성을 함유할 수 있다. 앞서 언급한 다양한 기능은 한 가지 기능의 구성원이 다른 기능의 구성원으로 분류될 수 없음을 의미하지 않는다. 실제로 특정 상황에 따라 겹치는 부분이 있을 것이다. 오로지 예로써, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜의 유도체와 범위가 중첩되지만, 그러나 이러한 중첩은 완벽하지 않고, 따라서 두 가지 기능성 모두 상기에서 언급된다.

[0200] 한 측면에서, TLR-작용제 링커 유도체를 선별 및 기획하는 방법, 그리고 본원에서 기재된 방법, 조성물 및 기술을 이용하여 변형될 표적화 폴리펩티드가 있다. 새로운 TLR-작용제 링커 유도체 및 표적화 폴리펩티드는 고-처리량 스크리닝 프로세스 (이 경우 다수의 폴리펩티드가 설계, 합성, 특성화 및/또는 테스트될 수 있음)의 일부로, 또는 연구원의 관심을 기반으로 하는 것을 포함하여 신규로 설계될 수 있다. 새로운 TLR-작용제 링커 유도체 및 표적화 폴리펩티드는 공지된 또는 부분적으로 특징화된 폴리펩티드 구조를 기반으로 또한 기획될 수 있다. 오로지 예로써, TLR-작용제는 과학계에서 집중적인 연구의 대상이었고; 새로운 화합물은 TLR-작용제의 구조를 기반으로 설계될 수 있다. 치환 및/또는 변형할 아미노산(들)을 선택하는 원리는 본원에 별도로 설명된다. 적용할 변형의 선택 또한 본원에 설명되어 있으며, 실험자 또는 최종 사용자의 요구를 충족하는 데 사용할 수 있다. 이러한 요구에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 폴리펩티드의 치료 효과 조작, 폴리펩티드의 안전성 프로파일 개선, 폴리펩티드의 약동학, 약리학 및/또는 약력학 조정, 예를 들어, 수용성, 생체이용률 증가, 혈청 반감기 증가, 치료 반감기 증가, 면역원성 조절, 생물학적 활성 조절 또는 순환 시간 연장. 추가로, 이러한 변형에는 오로지 예로써, 해당 폴리펩티드에 추가의 기능을 제공하는 것, 항체를 통합하는 것, 그리고 전술한 변형의 임의의 조합이 내포된다.

[0201] 옥심, 카르보닐, 디카르보닐, 또는 히드록실아민 그룹을 함유하는, 또는 함유하도록 변형될 TLR-작용제 링커 유도체들 및 표적화 폴리펩티드가 또한 본원에서 기술된다. 이러한 측면에는 이러한 TLR-작용제 링커 유도체 및 표적화 폴리펩티드를 생산, 정제, 특성화 및 사용하는 방법이 내포된다.

[0202] 상기 TLR-작용제 링커 유도체 또는 상기 표적화 폴리펩티드는 적어도 하나의, 적어도 두 개의, 적어도 세 개의, 적어도 네 개의, 적어도 다섯 개의, 적어도 여섯 개의, 적어도 일곱 개의, 적어도 여덟 개의, 적어도 아홉 개의, 또는 열 개 또는 그 이상의 카르보닐 또는 디카르보닐 그룹, 옥심 그룹, 히드록실아민 그룹, 또는 이의 보호된 형태를 함유할 수 있다. 상기 TLR-작용제 링커 유도체 또는 상기 표적화 폴리펩티드는 동일하거나 또는 상이할 수 있으며, 예를 들면, 이 유도체에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 또는 그 이상의 상이한 반응 그룹을 포함하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 또는 그 이상의 상이한 부위가 있을 수 있다.

[0203] 본원에서 기술된 바와 같이, 본 명세서는 화학식 “표적화 폴리펩티드-L-M”을 갖는 또다른 분자에 결합된 표적화 폴리펩티드를 제공하며, 이때 L은 연계 그룹 또는 화학 결합이며, M은 또다른 표적화 폴리펩티드를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 임의의 다른 분자다. 일부 구체예들에서, L은 생체내에서 안정적이다. 일부 구체예들에서, L은 생체내에서 가수분해가능하다. 일부 구체예들에서, L은 생체내에서 대사가능하다.

[0204] 표적화 폴리펩티드 및 M은 당업자에게 공지된 표준 연결제 및 절차를 사용하여 L을 통해 함께 연계될 수 있다. 일부 측면들에서, 표적화 폴리펩티드와 M은 직접 융합되며, L은 결합이다. 다른 측면들에서, 표적화 폴리펩티드와 M은 연계 그룹 L을 통하여 융합된다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드와 M은 펩티드 결합, 임의선택적으로 펩티드 또는 아미노산 스페이서(spacer)를 통하여 함께 연계된다. 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드와 M은 화학 콘쥬게이션, 임의선택적으로 연계 그룹 (L)을 통하여 함께 연계된다. 일부 구체예들에서, L은 표적화 폴리펩티드와 M 각각에 직접적으로 콘쥬게이트된다.

[0205] 화학 콘쥬게이션은 하나의 화합물의 친핵성 반응기를 다른 화합물의 친전자성 반응기와 반응시켜 발생할 수 있다. 일부 구체예들에서, L이 결합일 때, 표적화 폴리펩티드는 표적화 폴리펩티드에서 친핵성 반응 모이어티를 Y에서 친전자성 반응 모이어티와 반응시키거나, 또는 표적화 폴리펩티드의 친전자성 반응 모이어티를 M의 친핵성 반응 모이어티와 반응시킴으로써, M에 콘쥬게이트된다. L이 표적화 폴리펩티드와 M을 함께 연계시키는 그룹인 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드 및/또는 M은 표적화 폴리펩티드에서 친핵성 반응 모이어티 및/또는 M을 L의 친전자성 반응 모이어티와 반응시키거나, 또는 표적화 폴리펩티드의 친전자성 반응 모이어티 및/또는 M과 L의 친핵성 반응 모이어티를 반응시킴으로써 L에 콘쥬게이트된다. 친핵성 반응 그룹의 비-제한적 예로는 아미노, 티올, 그리고 히드록실이 내포된다. 친전자성 반응 그룹의 비-제한적 예로는 카르복실, 아실 클로라이드, 무수물, 에스테르, 숙시니미드 에스테르, 알킬 할로겐화물, 술포네이트 에스테르, 말레이미도, 할로아세틸, 그리고 이소시아네이트가 내포된다. 표적화 폴리펩티드와 M이 카르복실산을 아민과 반응시킴으로써 함께 콘쥬게이트되는 구체예들에서, 활성화 제제를 이용하여 카르복실산의 활성화된 에스테르를 만들 수 있다.

[0206] 카르복실산의 활성화된 에스테르는 예를 들면, N-히드록시숙시니미드 (NHS), 토실레이트 (Tos), 메실레이트, 트리플레이트, 카르보디이미드, 또는 헥사플루오르포스페이트일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 카르보디이미드는 1,3-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), 1,1'-카르보닐디이미다졸 (CDI), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC), 또는 1,3-디이소프로필카르보디이미드 (DICD)이다. 일부 구체예들에서, 헥사플루오르포스페이트는 헥사플루오르포스페이트 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(디메틸아미노)포스포니움 헥사플루오르포스페이트 (BOP), 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포니움 헥사플루오르포스페이트 (PyBOP), 2-(1H-7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸 우로늄 헥사플루오르포스페이트 (HATU), 그리고 o-벤조트리아졸-N,N,N',N'-테트라메틸-우로늄-헥사플루오르-포스페이트 (HBTU)로 구성된 그룹에서 선택된다.

[0207] 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드는 M 또는 L 상에 있는 친전자성 반응 그룹에 콘쥬게이트할 수 있는 친핵성 반응 그룹 (예로써, 아미노 그룹, 티올 그룹, 또는 리신, 시스테인 또는 세린 측쇄의 리드록실 그룹)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드는 M 또는 L 상의 친핵성 반응 그룹에 콘쥬게이트할 수 있는 친전자성 반응 그룹 (예로써, Asp 또는 Glu 측쇄의 카르복실레이트 그룹)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드는 M 또는 L에 직접 콘쥬게이트할 수 이는 반응 그룹을 포함하도록 화학적으로 변형된다. 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드는 친핵성 측쇄를 갖는 자연 또는 비-자연적 아미노산을 포함하도록, N-말단 또는 C-말단이 변형된다. 예시적인 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 아미노산은 리신, 오르니틴, 세린, 시스테인, 그리고 동종시스테인으로 구성된 그룹에서 선택된다. 예를 들면, 표적화 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 아미노산은 리신 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드는 친전자성 측쇄를 갖는 자연 또는 비-자연적 아미노산, 이를 테면, 예를 들면, Asp 및 Glu을 포함하도록 N-말단 또는 C-말단 아미노산에서 변형된다. 일부 구체예들에서, 본원에서 앞서 기술된 바와 같이, 표적화 폴리펩티드의 내부 아미노산은 친핵성 측쇄를 갖는 자연 또는 비-자연적 아미노산으로 치환된다. 예시적인 구체예들에서, 상기 표적화 폴리펩티드에서 치환되는 내부 아미노산은 리신, 오르니틴, 세린, 시스테인, 그리고 동종시스테인으로 구성된 그룹에서 선택된다. 예를 들면, 표적화 폴리펩티드의 내부 아미노산은 리신 잔기로 치환될 수 있다. 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드의 내부 아미노산은 친전자측쇄를 갖는 자연 또는 비-자연적 아미노산, 이를 테면, 예를 들면, Asp 및 Glu로 치환된다.

[0208] 일부 구체예들에서, M은 표적화 폴리펩티드 또는 L에 직접적으로 콘쥬게이트될 수 있는 반응 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, M은 표적화 폴리펩티드 또는 L 상의 친전자성 반응 그룹에 콘쥬게이트될 수 있는 친핵성 반응 그룹 (예로써 아민, 티올, 히드록실)을 포함한다. 일부 구체예들에서, M은 표적화 폴리펩티드 또는 L 상의 친핵성 반응 그룹에 콘쥬게이트될 수 있는 친전자성 반응 그룹 (예로써 카르복실 그룹, 카르복실 그룹의 활성화된 형태, 이탈 그룹을 갖는 화합물)을 포함한다. 일부 구체예들에서, M은 표적화 폴리펩티드 또는 L 상의 친전자성 반응 그룹에 콘쥬게이트될 수 있는 친핵성 반응 그룹을 포함하도록 화학적으로 변형된다. 일부 구체예들에서, M은 표적화 폴리펩티드 또는 L 상의 친핵성 반응 그룹에 콘쥬게이트될 수 있는 친전자성 반응 그룹을 포함

하도록 화학적으로 변형된다.

[0209] 일부 구체예들에서, 콘쥬게이션은 유기실란, 예를 들면, 글루타알데이드로 처리된 아미노실란을 이용하여; 실라놀 그룹의 카르보닐디이미다졸 (CDI) 활성화, 또는 덴드리머의 이용을 통하여 실행될 수 있다. 다양한 덴드리머가 당분야에 공지되어 있으며, 여기에는 폴리 (아미도아민) (PAMAM) 덴드리머-이는 암모니아 또는 에틸렌디아민 개시제 핵심 시약으로부터 출발하는 발산 방법에 의해 합성되며; 트리스-아미노에틸렌-이민 코어를 기반으로 한 PAMAM 덴드리머의 서브-클래스; 방사상으로 적층된 폴리(아미도아민-유기실리콘) 덴드리머 (PAMAMOS)-이는 친수성, 친핵성 폴리아미도아민(PAMAM) 내부와 소수성 유기실리콘 (OS) 외부로 구성된 역 단분자 미셀이며; 폴리 (프로필렌 이민) (PPI) 덴드리머-이는 단부 그룹으로 주요 아민을 갖는 일반적으로 폴리-알킬 아민이며, 한편 덴드리머 내부는 수많은 3차 트리스-프로필렌 아민으로 구성되고; 폴리 (프로필렌 아민) (POPAM) 덴드리머; 디아미노부탄 (DAB) 덴드리머; 양쪽친매성 덴드리머; 미셀 덴드리머-이는 수용성 과다-분기형 폴리페닐렌의 단분자 미셀; 폴리리신 덴드리머; 그리고 폴리-벤질 에테르 과다-분기형 골격 기반으로 한 덴드리머가 내포된다.

[0210] 일부 구체예들에서, 콘쥬게이션은 올레핀 복분해(metathesis)을 통하여 실행될 수 있다. 일부 구체예들에서, M 및 표적화 폴리펩티드, M 및 L, 또는 표적화 폴리펩티드 및 L 모두 복분해을 겪을 수 있는 알켄 또는 알킨 모이어티를 포함한다. 일부 구체예들에서, 복분해 반응의 가속화에 적합한 촉매 (예로써 구리, 루테늄)가 이용된다. 올레핀 복분해 반응을 실행하는 적합한 방법들이 당분야에 기재되어 있다. 예를 들면, Schafmeister et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891-5892 (2000), Walensky et al., *Science* 305: 1466-1470 (2004), 그리고 Blackwell et al., Angew, *Chem., Int. Ed.* 37: 3281-3284 (1998) 참고.

[0211] 일부 구체예들에서, 콘쥬게이션은 클릭 화학을 사용하여 수행할 수 있다. "클릭 반응(click reaction)"은 범위가 넓고, 수행하기 쉽고 쉽게 구할 수 있는 시약만 사용하며, 산소와 물에 민감하지 않다. 일부 구체예들에서, 상기 클릭 반응은 알키닐 그룹과 아지도 그룹 간의 사이클로추가 반응이며, 이로 인하여 트리아졸일 그룹이 형성된다. 일부 구체예들에서, 상기 클릭 반응은 구리 또는 루테늄 촉매를 이용한다. 클릭 반응을 실행하는 적합한 방법들이 당분야에 기재되어 있다. 예를 들면, Kolb et al., *Drug Discovery Today* 8: 1128 (2003); Kolb et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 40:2004 (2001); Rostovtsev et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 :2596 (2002); Tornoe et al., *J. Org. Chem.* 67:3057 (2002); Manetsch et al., *J. Am. Chem. Soc.* 126: 12809 (2004); Lewis et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 1053 (2002); Speers, *J. Am. Chem. Soc.* 125:4686 (2003); Chan et al. Org. Lett. 6:2853 (2004); Zhang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 127: 15998 (2005); 그리고 Waser et al., *J. Am. Chem. Soc.* 127:8294 (2005) 참고.

[0212] 고-친화력 특이적 결합 파트너, 예로써 스트렙트아비딘/바이오틴 또는 아비딘/바이오틴 또는 렉틴/탄수화물을 통한 간접 콘쥬게이션이 또한 고려된다.

[0213] 일부 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드 및/또는 M은 친핵성 반응 그룹 또는 친전자성 반응 그룹을 포함하도록, 유기 유도체화 제제를 사용하여 기능화된다. 이러한 유도체화 제제는 표적화 폴리펩티드 상의 표적화된 아미노산의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 M 상의 기능성 그룹과 반응할 수 있다. 표적화 폴리펩티드 및/또는 M에 있는 반응 그룹에는 예로써, 알데히드, 아미노, 에스테르, 티올, a-할로아세틸, 말레이미도 또는 히드라지노 그룹이 내포된다. 유도체화 제제에는 예를 들면, 말레이미도벤조일 술포숙시니미드 에스테르 (시스테인 잔기들을 통한 콘쥬게이션), N-히드록시숙시니미드 (리신 잔기들을 통한), 글루타알데이드, 숙신 무수물 또는 당분야에 공지된 다른 제제가 내포된다. 대안으로, 표적화 폴리펩티드 및/또는 M은 중간물 담체, 이를 테면, 폴리사카라이드 또는 폴리펩티드 담체를 통하여 서로에 대해 간접적으로 연계될 수 있다. 폴리사카라이드 담체의 예로는 아미노덱스트란이 내포된다. 생성된 로딩된 담체 상에 바람직한 용해도 속성을 부여하기 위해, 적합한 폴리펩티드 담체의 예로는 폴리리신, 폴리글루타민산, 폴리아스파르트산, 이의 공-중합체, 그리고 이들 아미노산 및 다른 것, 예로써, 세린과의생성된 혼합된 중합체가 내포된다.

[0214] 시스테인일 잔기들은 가장 일반적으로, 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 같은 a-할로아세테이트 (및 대응하는 아민)와 반응하여 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테인일 잔기들은 브로모트리플루오르아세톤, 알파-브로모-β-(5-이미도졸일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 이황화물, 메틸 2-피리딜 이황화물, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 또한 유도체화된다.

[0215] 히스티딜 잔기들은 pH 5.5-7.0에서 디에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 유도체화되는데, 그 이유는 해당 제제가 히스티딜 측쇄에 대해 상대적으로 특이적이기 때문이다. 파라-브로모펜아실 브롬화물이 또한 유용하며; 이 반응은 0.1 M 카코딜레이트 나트륨, pH 6.0에서 실행되는 것이 바람직하다.

[0216] 리신일과 아미노-말단 잔기들은 숙신 또는 다른 카르복실산 무수물과 반응한다. 이러한 제제를 사용한 유도체화는 리신일 잔기의 전하를 역전시키는 효과가 있다. 알파-아미노-함유하는 잔기들을 유도체화하는데 적합한 다른 시약에는 이미도에스테르 이를 테면, 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드리드, 트리니트로벤젠술폰산, O-메틸이소우레아, 2,4-펜탄디온, 그리고 글리옥실레이트에 의한 트란스아미나제-촉매된 반응이 내포된다.

[0217] 아르기닐 잔기들은 그 중에서도 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온, 그리고 닌히드린과 같은 하나 또는 몇 가지 통상적인 시약과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 기능 그룹의 높은 pKa 때문에 반응이 알칼리성 조건에서 수행될 것을 요구한다. 더욱이, 이러한 시약들은 아르기닌 엡실론-아미노 그룹, 뿐만 아니라 리신 그룹과도 반응할 수 있다.

[0218] 티로실일 잔기들에 특이적 변형이 만들어질 수 있는데, 특히, 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해, 티로실 잔기에 스펙트럼 라벨 도입에 특히 관심을 둔다. 가장 일반적으로, N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄을 이용하여, 차례로 O-아세틸 티로실일 종 및 3-니트로 유도체들이 형성된다.

[0219] 카르복실 측면 그룹 (아스파르틸 또는 글루타밀)은 카르보디이미드(R-N=C=N-R')와의 반응에 의해 선택적으로 변형되며, 여기에서 R 및 R'은 상이한 알킬 그룹, 이를 테면, 1-시클로헥실-3-(2-몰포리닐-4-에틸) 카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸) 카르보디이미드이다. 더욱이, 아스파르틸 및 글루타밀 잔기들은 암모니움 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기들로 전환된다.

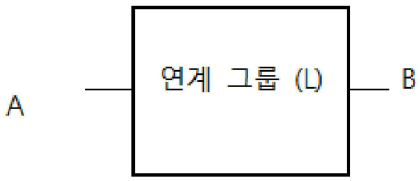
[0220] 다른 변형에는 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기들의 히드록실 그룹의 인산화, 리신, 아르기닌, 그리고 히스티딘 측쇄의 알파-아미노 그룹의 메틸화(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), 아스파라긴 또는 글루타민의 탈아미드화, N-말단 아민의 아세틸화, 및/또는 C-말단 카르복실산 그룹의 아미드화 또는 에스테르화가 내포된다.

[0221] 또다른 유형의 공유 변형에는 글리코시드를 펩티드에 화학적으로 또는 효소적으로 커플링시키는 것이 연루된다. 이들 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘; (b) 자유 카르복실 그룹; (c) 자유 술포히드릴 그룹, 이를 테면 시스테인의 그룹; (d) 자유 히드록실 그룹, 이를 테면 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린; (e) 방향족 잔기, 이를 테면, 티로신, 또는 트립토판의 그룹; 또는 (f) 글루타민의 아미드 기에 부착될 수 있다. 이러한 방법들은 WO1987/05330, 그리고 Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)에 기재되어 있다.

[0222] 일부 구체예들에서, L은 결합이다. 이들 구체예에서, 표적화 폴리펩티드와 M은 표적화 폴리펩티드에서 친핵성 반응 모이어티와 M 상에 있는 친전자성 반응 모이어티와의 반응에 의해 함께 콘쥬게이트된다. 대체 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드와 M은 표적화 폴리펩티드 상의 친전자성 반응 모이어티와 M 상에 있는 친핵성 모이어티와의 반응에 의해 함께 콘쥬게이트된다. 예시적인 구체예들에서, L은 표적화 폴리펩티드 상의 아민 (예로써, 리신 잔기의 ε-아민)과 M 상에 있는 카르복실 그룹과 반응할 때 형성되는 아미드 결합이다. 대체 구체예들에서, 표적화 폴리펩티드 및/또는 M은 콘쥬게이션 전, 유도체화 제제에 의해 유도체화된다.

[0223] 일부 구체예들에서, L은 연계 그룹이다. 일부 구체예들에서, L은 이중-기능성 링커이며, 표적화 폴리펩티드와 M에 콘쥬게이션되기 전, 오로지 두 개 반응 그룹만을 포함한다. 표적화 폴리펩티드와 M 모두 친전자성 반응 그룹을 갖는 구체예들에서, L은 표적화 폴리펩티드와 M에 콘쥬게이션되기 전, 동일한 또는 상이한 두 개 친핵성 그룹 (예로써 아민, 히드록실, 티올)중 두 개를 포함한다. 표적화 폴리펩티드와 M 모두 친핵성 반응 그룹을 포함하는 구체예들에서, L은 표적화 폴리펩티드와 M에 콘쥬게이션되기 전, 동일한 또는 상이한 두 개의 친전자성 그룹 (예로써, 카르복실 그룹, 카르복실 그룹의 활성화된 형태, 이탈 그룹을 갖는 화합물)중 두 개를 포함한다. 표적화 폴리펩티드 또는 M중 하나는 친핵성 반응 그룹을 갖고, 표적화 폴리펩티드 또는 M중 다른 하나는 친전자성 반응 그룹을 갖는 구체예들에서, L은 표적화 폴리펩티드와 M에 콘쥬게이션되기 전, 한 개의 친핵성 반응 그룹과 한 개의 친전자성 그룹을 포함한다.

[0224] L은 표적화 폴리펩티드와 M 각각과 반응할 수 있는 적어도 두 개의 반응 그룹 (표적화 폴리펩티드와 M에 콘쥬게이션되기 전)을 갖는 임의의 분자일 수 있다. 일부 구체예들에서, L은 오로지 두 개의 반응 그룹을 갖고, 이중-기능성이다. L은 (해당 펩티드에 콘쥬게이션하기 전) 화학식 VI으로 나타낼 수 있다:



[0225]

[0226] 이때 A와 B는 독립적으로 친핵성 또는 친전자성 반응 그룹이다. 일부 구체예들에서, A와 B는 모두 친핵성 그룹이거나, 또는 모두 친전자성 그룹이다. 일부 구체예들에서,또는 A 또는 B중 하나는 친핵성 그룹이며,또는 A 또는 B중 다른 하나는 친전자성 그룹이다. A 및 B의 비-제한적인 조합이 하기 표 1에 제시되어 있다.

[0227] 표 1: 핵성 그룹과 친전자성 그룹의 비-제한적인 조합

모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
A	B	A	B	A	B
아미노	아미노	카르복실	카르복실	아미노	카르복실
아미노	티올	카르복실	아실 클로라이드	아미노	아실 클로라이드
아미노	히드록실	카르복실	무수물	아미노	무수물
티올	아미노	카르복실	에스테르	아미노	에스테르
티올	티올	카르복실	NHS	아미노	NHS
티올	히드록실	카르복실	할로겐	아미노	할로겐
히드록실	아미노	카르복실	술포네이트 에스테르	아미노	술포네이트 에스테르
히드록실	티올	카르복실	말레이미도	아미노	말레이미도
히드록실	히드록실	카르복실	할로아세틸	아미노	할로아세틸
		카르복실	이소시아네이트	아미노	이소시아네이트
		아실 클로라이드	카르복실	티올	카르복실
		아실 클로라이드	아실 클로라이드	티올	아실 클로라이드

[0228]

[0229]

모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
		아실 클로라이드	무수물	티올	무수물
		아실 클로라이드	에스테르	티올	에스테르
		아실 클로라이드	NHS	티올	NHS
		아실 클로라이드	할로겐	티올	할로겐
		아실 클로라이드	술포네이트 에스테르	티올	술포네이트 에스테르
		아실 클로라이드	말레이미도	티올	말레이미도
		아실 클로라이드	할로아세틸	티올	할로아세틸
		아실 클로라이드	이소시아네이트	티올	이소시아네이트
		무수물	카르복실	히드록실	카르복실
		무수물	아실 클로라이드	히드록실	아실 클로라이드

[0230]

모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
		무수물	무수물	히드록실	무수물
		무수물	에스테르	히드록실	에스테르
		무수물	NHS	히드록실	NHS
		무수물	할로겐	히드록실	할로겐
		무수물	술포네이트 에스테르	히드록실	술포네이트 에스테르
		무수물	말레이미도	히드록실	말레이미도
		무수물	할로아세틸	히드록실	할로아세틸
		무수물	이소시아네이트	히드록실	이소시아네이트
		에스테르	카르복실		
		에스테르	아실 클로라이드		
		에스테르	무수물		
		에스테르	에스테르		
		에스테르	NHS		

[0231]

모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
		에스테르	할로겐		
		에스테르	술포네이트 에스테르		
		에스테르	말레이미도		
		에스테르	할로아세틸		
		에스테르	이소시아네이트		
		NHS	카르복실		
		NHS	아실 클로라이드		
		NHS	무수물		
		NHS	에스테르		
		NHS	NHS		
		NHS	할로겐		
		NHS	술포네이트 에스테르		
		NHS	말레이미도		
		NHS	할로아세틸		
		NHS	이소시아네이트		

[0232]

모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
		할로겐	카르복실		
		할로겐	아실 클로라이드		
		할로겐	무수물		
		할로겐	에스테르		
		할로겐	NHS		
		할로겐	할로겐		
		할로겐	술포네이트 에스테르		
		할로겐	말레이미도		
		할로겐	할로아세틸		
		할로겐	이소시아네이트		
		술포네이트 에스테르	카르복실		
		술포네이트 에스테르	아실 클로라이드		
		술포네이트 에스테르	무수물		

[0233]

모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
		숙포네이트 에스테르	에스테르		
		숙포네이트 에스테르	NHS		
		숙포네이트 에스테르	할로겐		
		숙포네이트 에스테르	숙포네이트 에스테르		
		숙포네이트 에스테르	말레이미도		
		숙포네이트 에스테르	할로아세틸		
		숙포네이트 에스테르	이소시아네이트		
		말레이미도	카르복실		
		말레이미도	아실 클로라이드		
		말레이미도	무수물		
		말레이미도	에스테르		
		말레이미도	NHS		

[0234]

모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
		말레이미도	할로겐		
		말레이미도	숙포네이트 에스테르		
		말레이미도	말레이미도		
		말레이미도	할로아세틸		
		말레이미도	이소시아네이트		
		할로아세틸	카르복실		
		할로아세틸	아실 클로라이드		
		할로아세틸	무수물		
		할로아세틸	에스테르		
		할로아세틸	NHS		
		할로아세틸	할로겐		
		할로아세틸	숙포네이트 에스테르		
		할로아세틸	말레이미도		
		할로아세틸	할로아세틸		
		할로아세틸	이소시아네이트		

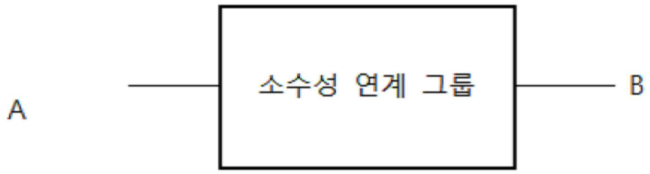
모두 친핵성		모두 친전자성		친핵성/친전자성	
		이소시아네이트	카르복실		
		이소시아네이트	아실 클로라이드		
		이소시아네이트	무수물		
		이소시아네이트	에스테르		
		이소시아네이트	NHS		
		이소시아네이트	할로겐		
		이소시아네이트	술포네이트 에스테르		
		이소시아네이트	말레이미도		
		이소시아네이트	할로아세틸		
		이소시아네이트	이소시아네이트		

[0235]

[0236] 일부 구체예들에서, A와 B에는 올레핀 복분해 반응에 적합한 알켄 및/또는 알킨 기능성 그룹이 내포될 수 있다. 일부 구체예들에서, A와 B에는 클릭 화학 (예로써 알켄, 알킨, 니트릴, 아지드)에 적합한 모이어티를 내포한다. 반응 그룹 (A 및 B)의 다른 비-제한적인 예로는 피리딜디티올, 아릴 아지드, 디아지린, 카르보디이미드, 그리고 하이드라지드이 내포된다.

[0237] 일부 구체예들에서, L은 소수성이다. 소수성 링커는 당분야에 공지되어 있다.

[0238] 예로써, *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996) 참고, 이는 이의 전문이 본원 참고자료에 편입됨. 당분야에 공지된 적합한 소수성 연계 그룹에는 예를 들면, 8-히드록시 옥탄산 및 8-멀캅토옥탄산이 내포된다. 해당 펩티드에 조성물을 콘쥬게이션하기 전, 해당 소수성 연계 그룹은 본원에서 기술된 바와 같이, 그리고 하기에 나타낸 바와 같이, 적어도 두 개의 반응 그룹 (A 및 B)을 포함한다:



[0239]

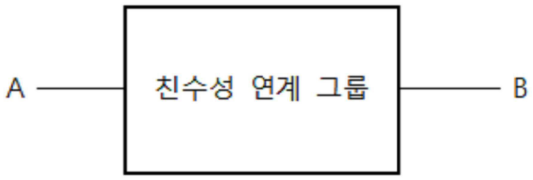
[0240] 일부 구체예들에서, 상기 소수성 연계 그룹은 말레이미도 또는 요오드아세틸 그룹과 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산 (예로써, NHS 에스테르)을 반응 그룹으로 포함한다. 이들 구체예에서, 상기 말레이미도 또는 요오드

아세틸 그룹은 표적화 폴리펩티드 또는 M 상에 있는 티올 모이어티에 커플링될 수 있고, 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산은 커플링 시약의 사용 또는 사용하지 않고, 표적화 폴리펩티드 또는 M 상의 아민에 커플링될 수 있다. 당분야의 당업자에게 공지된 임의의 커플링 제제를 이용하여 카르복실산에 유리 아민, 이를 테면, 예를 들면, DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU, 그리고 본원에 기재된 다른 활성화 제제를 커플링시킬 수 있다. 특이적 구체예들에서, 친수성 연계 그룹은 2 ~ 100개 메틸렌 그룹의 지방족 쇄를 포함하고, 이때 A 및 B는 카르복실 그룹 또는 이의 유도체들 (예로써, 숙신산)이다. 다른 특이적 구체예들에서, L은 요오드아세트산이다.

[0241]

[0242] 숙신산 요오드아세트산

[0243] 일부 구체예들에서, 연계 그룹은 친수성 이를 테면, 예를 들면, 폴리알킬렌 글리콜이다. 해당 펩티드에 조성물을 콘쥬게이션하기 전, 해당 친수성 연계 그룹은 본원에서 기술된 바와 같이, 그리고 하기에 나타낸 바와 같이, 적어도 두 개의 반응 그룹 (A 및 B)을 포함한다:

[0244] 

[0245] 특이적 구체예들에서, 연계 그룹은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 특정 구체예들에서, 상기 PEG는 약 100 달톤 ~ 약 10,000 달톤, 예로써 약 500 달톤 ~ 약 5000 달톤의 분자량을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 PEG는 약 10,000 달톤 ~ 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는다.

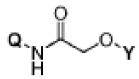
[0246] 일부 구체예들에서, 상기 친수성 연계 그룹은 말레이미도 또는 요오드아세틸 그룹과 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산 (예로써, NHS 에스테르)을 반응 그룹으로 포함한다. 이들 구체예에서, 상기 말레이미도 또는 요오드아세틸 그룹은 표적화 폴리펩티드 또는 M 상에 있는 티올 모이어티에 커플링될 수 있고, 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산은 커플링 시약의 사용 또는 사용하지 않고, 표적화 폴리펩티드 또는 M 상의 아민에 커플링될 수 있다. 당분야의 당업자에게 공지된 임의의 적절한 커플링 제제를 이용하여 카르복실산에 아민, 이를 테면, 예를 들면, DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU, 그리고 본원에 기재된 다른 활성화 제제를 커플링시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 연계 그룹은 말레이미도-중합체(20-40 kDa)-COOH, 요오드아세틸-중합체 (20-40 kDa)-COOH, 말레이미도-중합체 (20-40 kDa)-NHS, 또는 요오드아세틸-중합체 (20-40 kDa)-NHS이다.

[0247] 일부 구체예들에서, 상기 연계 그룹은 본원에서 기술된 바와 같이, 아미노산, 이-펩티드, 트리-펩티드, 또는 폴리펩티드로 구성되며, 이때 상기 아미노산, 이-펩티드, 트리-펩티드, 또는 폴리펩티드는 적어도 두 개의 활성화 그룹을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 연계 그룹 (L)은 다음으로 구성된 그룹에서 선택된 모이어티를 포함한다: 아미노, 에테르, 티오에테르, 말레이미도, 이황화물, 아미드, 에스테르, 티오에스테르, 알켄, 사이클로알켄, 알킨, 트리졸일, 카르바마이트, 카르보네이트, 카텝신 B-절단가능한, 그리고 히드라존.

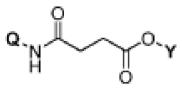
[0248] 일부 구체예들에서, L은 1 ~ 약 60개, 또는 1 ~ 30개 원자 또는 더 긴, 2 ~ 5개 원자, 2 ~ 10개 원자, 5 ~ 10개 원자, 또는 10 ~ 20개 원자 길이를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 쇄 원자는 모두 탄소 원자다. 일부 구체예들에서, 상기 링커의 백본에서 쇄 원자는 C, O, N, 및 S로 구성된 군에서 선택된다. 쇄 원자 및 링커는 용성이 더 큰 콘쥬게이트를 제공하기 위해, 예상되는 용해도 (친수성)에 따라 선택될 수 있다. 일부 구체예들에서, L은 표적 조직 또는 장기 또는 세포에서 나타나는 효소 또는 다른 촉매 또는 가수분해에 의해 절단되는 기능성 그룹을 제공한다. 일부 구체예들에서, L의 길이는 입체 장애의 가능성을 줄일 수 있을 만큼 충분히 길다.

[0249] 일부 구체예들에서, L은 생물학적 유체, 이를 테면, 혈액 또는 혈액 분액에서 안정적이다. 일부 구체예들에서, L은 혈액 혈청에서 적어도 5 분 안정적인데, 예로써 5 분 동안 혈청에서 항온처리될 때, 해당 콘쥬게이트의 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만이 절단된다. 다른 구체예들에서, L은 적어도 10, 또는 20, 또는 25, 또는 30, 또는 60, 또는 90, 또는 120 분, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 또는 24 시간 동안 혈액 혈청에서 안정적이다. 이들 구체예에서, L은 생체내에서 가수분해를 겪을 수 있는 기능성 그룹을 포함하지 않는다. 일부 예시적인 구체예들에서, L은 적어도 약 72 시간 동안 혈액 혈청에서 안정적이다. 생체내에서 상당한 가수분해를 겪을 수 없는 기능 그룹의 비제한적인 예로는 아미드, 에테르 및 티오에테르가 내포된다. 예를 들면, 다

음 화합물은 생체내에서 유의적인 가수분해를 겪지 않는다:

[0250] 

[0251] 일부 구체예들에서, L은 생체내에서 가수분해가능하다. 이들 구체예에서, L은 생체내에서 가수분해를 겪을 수 있는 기능성 그룹을 포함한다. 생체내에서 상당한 가수분해를 겪는 기능 그룹의 비제한적인 예로는 에스테르, 무수물, 및 티오에스테르가 내포된다. 예를 들면, 다음 화합물은 에스테르 그룹을 포함하기 때문에 생체내에서 가수분해를 겪을 수 있다:

[0252] 

[0253] 일부 예시적인 구체예들에서, L은 불안정하고, 37℃의 혈장에서 3시간 이내에 상당한 가수분해를 겪으며, 6시간 이내에 완전히 가수분해된다. 일부 예시적인 구체예들에서, L은 불안정하지 않다.

[0254] 일부 구체예들에서, L은 생체내에서 대사가능하다. 이들 구체예에서, L은 임의선택적으로 일정 시간에 걸쳐 생체내에서 화학적으로 또는 효소적으로 절단될 수 있는 (예로써, 산-불안정한, 환원-불안정한, 또는 효소-불안정한 기능성 그룹) 기능성 그룹을 포함한다. 이들 구체예에서, L은 예를 들면, 히드라존 모이어티, 이황화물 모이어티, 또는 카텝신-절단가능한 모이어티를 포함할 수 있다. L이 준안정적일 때, 특정 이론에 구속되지 않고 표적화 폴리펩티드-L-M 콘쥬게이트는 세포외 환경에서 안정하며, 예로써, 위에서 설명한 기간 동안 혈청에서는 안정하지만 세포 내 환경이나 또는 세포 내 환경을 모방하는 조건에서는 불안정하여, 세포로 진입될 때 절단된다. 일부 구체예들에서, L이 준안정적일 때, L은 적어도 약 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 42, 또는 48 시간, 예를 들면, 적어도 약 48, 54, 60, 66, 또는 72 시간, 또는 약 24-48, 48-72, 24-60, 36-48, 36-72, 또는 48-72 시간 동안 혈액 혈청에서 안정적이다.

[0255] 또다른 구체예에서, 본 발명의 중합체 유도체들은 다음 구조를 갖는 중합체 백본을 포함한다:

[0256] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-W-N=N=N$,

[0257] 이때:

[0258] W는 1-10개 탄소 원자를 포함하는 지방족 또는 방향족 링커 모이어티이며;

[0259] n은 1 ~ 약 4000이며; 그리고 X는 상기에서 기재된 바와 같이 기능성 그룹이며; m은 1 ~ 10이다.

[0260] 본 발명의 아지드-함유하는 중합체 유도체들은 당업계에 공지된 및/또는 본원에 개시된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 아래에 제시된 한 가지 방법으로, 수용성 중합체 백본 (평균 분자량 약 800 Da ~ 약 100,000 Da을 갖는), 제 1 기능성 그룹에 결합된 제 1 말단과 적합한 이탈 그룹에 결합된 제 2 말단을 갖는 중합체 백본은 아지드 음이온과 반응한다 (이는 나트륨, 칼륨, tert-부틸암모늄 등을 포함하는 다수의 적합한 반대 이온과 쌍을 이룰 수 있다). 상기 이탈 그룹은 친핵성 변위(displacement)를 겪고, 상기 아지드 모이어티로 대체되어, 원하는 아지드-함유하는 중합체 중합체가 제공된다;

[0261] $X\text{-중합체-LY} + N_3^- \rightarrow X\text{-중합체-L } N_3$

[0262] 도시된 바와 같이, 본 발명에 사용을 위한 적합한 중합체 백본은 화학식 X-중합체-LY를 갖고, 이때 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)이며, X는 아지드 그룹과 반응하지 않는 기능 그룹이며, Y는 적합한 이탈 그룹이다. 적합한 기능성 그룹의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 히드록실, 보호된 히드록실, 아세탈, 알케닐, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복실산, 보호된 카르복실산, 말레이미드, 디티오피리딘, 그리고 비닐피리딘, 그리고 케톤. 적합한 이탈 그룹의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 클로라이드, 브롬화물, 요오드화물, 메실레이트, 트레실레이트, 그리고 토실레이트.

[0263] 본 발명의 아지드-함유하는 중합체 유도체들의 준비를 위한 또다른 방법에서, 아지드 기능 그룹을 품고 있는 연계 제제를 평균 분자량 약 800 Da ~ 약 100,000 Da을 갖는 수용성 중합체 백본에 접촉시키고, 이때 이 연계 제제는 아지드-함유하는 중합체 유도체 산물을 형성하도록 해당 중합체 상에 화학 기능 그룹와 선택적으로 반응을 하는 화학 기능 그룹을 품고 있으며, 이때 상기 아지드는 연계 그룹에 의해 해당 중합체 백본으로부터

분리된다.

[0264] 예시적인 반응 도식은 아래와 같다:

[0265] X-중합체-Y + N-링커-N=N=N → PG-X-중합체-링커-N=N=N, 이때:

[0266] 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)이며, X는 캡핑 그룹 이를 테면, 상기에서 기재된 바와 같은 알콕시 또는 기능성 그룹이며; 그리고 Y는 아지드 기능 그룹와는 반응을 하지 않지만, N 기능성 그룹과는 효과적으로, 그리고 선택적으로 반응을 하는 기능 그룹다.

[0267] 적합한 기능성 그룹의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: N이 아민인 경우 Y는 카르복실산, 카르보네이트 또는 활성 에스테르이며; N이 하이드라지드 또는 아미노옥시 모이어티인 경우 Y는 케톤이며; N이 친핵체라면, Y는 이탈 그룹이다. 미정제(crude) 산물의 정제는 해당 산물의 침전에 이어, 필요한 경우 크로마토그래피를 포함하나 이에 제한되지 않는 공지된 방법에 의해 실시될 수 있다.

[0268] 좀더 구체적 예는 중합체 디아민의 경우에서 나타내는데, 이때 아민중 하느는 보호 그룹 모이어티, 이를 테면, tert-부틸-Boc에 의해 보호되고, 결과적으로 단일-보호된 중합체 디아민은 아지드 기능 그룹을 품고 있는 연계 모이어티와 반응한다: BocHN-중합체-NH_2 + HO_2C-$(CH_2)_3$-N=N=N

[0269] 이 경우, 상기 아민 그룹은 다양한 활성화 제제, 이를 테면, 티오닐 클로라이드 또는 카르보디이미드 시약 및 N-히드록시숙시니미드 또는 N-히드록시벤조트리아졸를 이용하여 카르복실산 그룹에 커플링되어, 상기 단일아민 중합체 유도체와 아지드-품고 있는 링커 모이어티 사이에 아미드 결합이 생성될 수 있다 아미드 결합이 성공적으로 형성된 후, 결과적으로 생성된 N-tert-부틸-Boc-보호된 아지드-함유하는 유도체를 직접 이용하여 생활성 분자를 변형시키거나, 또는 다른 유용한 기능성 그룹을 설치하도록 더 손볼 수 있다. 예를 들면, N-t-Boc 그룹을 강산으로 처리하여 가수분해시켜, 오메가-아미노-중합체-아지드를 만들 수 있다. 결과적으로 생성된 아민은 다른 유용한 기능 그룹 이를 테면, 말레이미드 그룹, 활성화된 이황화물, 활성화된 에스테르를 취입시키고, 가치가 있는 이종이중-기능성 시약을 만드는 등을 위한 합성 핸들로 이용할 수 있다.

[0270] 이종이중-기능성 유도체들은 중합체의 각 말단에 상이한 분자를 부착시킬 필요하 있을 때 특히 유용한다. 예를 들면, 오메가-N-아미노-N-아지도 중합체는 활성화된 친전자성 그룹, 이를 테면, 알데히드, 케톤, 활성화된 에스테르, 활성화된 카르보네이트 및 기타 등등을 갖는 분자를 중합체의 한 쪽 말단에 부착시키고, 해당 중합체의 다른 말단에는 아세틸렌 그룹을 부착시킬 수 있다.

[0271] 본 발명의 또다른 구체예에서, A는 1-10개 탄소 원자의 지방족 링커이거나, 또는 6-14개 탄소 원자의 치환된 아릴 고리다. X는 아지드 그룹과는 반응을 하지 않는 기능 그룹이며, Y는 적합한 이탈 그룹이다.

[0272] 다중 표적화 폴리펩티드는 링커 폴리펩티드에 의해 연결될 수 있으며, 이때 상기 링커 폴리펩티드의 길이는 임의선택적으로 6-14, 7-13, 8-12, 7-11, 9-11, 또는 9개 아미노산 길이다. 다른 링커에는 작은 중합체, 이를 테면, PEG가 내포되나 이에 국한되지 않으며, 이들은 다중-부문으로 되어, 다중 표적화 폴리펩티드 분자를 서로 연계시킬 수 있다. 다중 표적화 폴리펩티드와 변형된 표적화 폴리펩티드는 이러한링커의 사용을 통하여 머리-에서-머리 배치 구조로 이들 N-말단을 통하여 서로 연계되거나, 또는 각 폴리펩티드의 각 N-말단 간에 직접적인 화학 결합에 의해 연계될 수 있다. 예를 들면, 두 개 표적화 폴리펩티드는 이들의 N-말단 아미노 그룹 또는 변형된 N-말단 아미노 그룹 사이에 화학 결합에 의해 이량체가 형성되도록 연계될 수 있다. 또한, 각 표적화 폴리펩티드의 N-말단과 결합을 위한 다중 화학 기능 그룹을 포함하도록 기획된 연계 분자를 이용하여 다중 표적화 폴리펩티드 각각이 이들의 N-말단에서 연결될 수 있다. 추가로, 다중 표적화 폴리펩티드는 N-말단 아미노산 또는 C-말단 아미노산이외의 아미노산 간의 결합을 통하여 연계될 수 있다. 본원에서 기재하고 있는 표적화 폴리펩티드의 이량체 및 다량체를 형성하는데 이용될 수 있는 공유 결합의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 이황화물 또는 설프히드릴 결합 또는 티올 결합. 추가로, 특정 효소, 이를 테면, 소르타제(sortase)를 이용하여, 표적화 폴리펩티드와 링커 간에 해당 표적화 폴리펩티드의 N-말단에서 공유 결합을 만들 수 있다.

[0273] 상기 링커는 광역의 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. 더 큰 또는 더 작은 분자량의 링커를 이용하여 표적화 폴리펩티드와 연계된 엔티티 간의, 또는 연계된 엔티티와 이의 결합 파트너 (있다면) 간의 원하는 공간적 상관관계 또는 입체 구조를 제공할 수 있다. 더 긴 또는 더 짧은 분자 길이를 갖는 링커를 또한 이용하여 표적화 폴리펩티드와 연계된 엔티티 간의, 또는 연계된 엔티티와 이의 결합 파트너 간의 원하는 공간 또는 유연성을 또한 제공할 수 있다.

[0274] 일부 구체예들에서, 본 발명은 덤벨 구조를 갖는 수용성 이중-기능성 링커를 제공하는데, 여기에는 다음이 내포

된다: a) 중합체 백본의 적어도 제 1 단부 상에 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 히드록실아민, 또는 카르보닐-함유하는 모이어티; 그리고 b) 중합체 백본의 제 2 단부 상에 적어도 제 2 기능성 그룹. 제 2 기능성 그룹은 상기 제 1 기능성 그룹과 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 구체예들에서 제 2 기능성 그룹은 상기 제 1 기능성 그룹과 반응하지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 분기된 분자 구조의 적어도 하나의 갈래(arm)를 포함하는 수용성 화합물들을 제공한다. 예를 들면, 상기 분기된 분자 구조는 가지모양(dendritic)일 수 있다.

[0275] 예시적인 구체예들에서, 상기 중합체는 상기 표적화 폴리펩티드 또는 변형된 표적화 폴리펩티드에 링커를 통하여 연계된다. 예를 들면, 상기 링커는 하나 또는 두 개 아미노산을 포함하며, 이때 한 단부는 중합체-이를테면, 알부민 결합 모이어티-에 결합하고, 다른 단부는 상기 폴리펩티드 백본 상의 임의의 이용가능한 위치에 결합한다. 추가적으로 예시적인 링커에는 친수성 링커 이를 테면, 적어도 5개 비-수소 원자를 포함하는 화학 모이어티가 내포되며, 여기에서 이들중 30-50%는 N 또는 O이다. 표적화 폴리펩티드 또는 변형된 표적화 폴리펩티드에 중합체를 연계시킬 수 있는 추가 예시적인 링커는 U.S. 2012/0295847 및 WO/2012/168430 (이들 각각은 이의 전문이 본원 참고자료에 편입된다)에 기재되어 있다.

[0276] 임의선택적으로, 다중 표적화 폴리펩티드 또는 변형된 표적화 폴리펩티드 분자는 링커 폴리펩티드에 의해 연결되며, 이때 전술한 링커 폴리펩티드의 길이는 임의선택적으로 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12개 아미노산 길이, 그리고 더 길고, 이때 임의선택적으로 하나의 표적화 폴리펩티드의 N-말단은 상기 링커 폴리펩티드의 C-말단에 융합되며, 이 링커 폴리펩티드의 N-말단은 또다른 표적화 폴리펩티드의N-말단에 융합된다. 이용될 수 있는 추가 예시적인 링커 폴리펩티드들은 WO/2013/004607 (이는 전문이 본원 참고자료에 편입된다)에 기재되어 있다.

[0277] 용어 "친전자성 그룹", "친전자체(electrophile)" 및 본원에 사용된 바와 같은 이와 유사한 것들은 공유 결합을 형성하기 위해 전자 쌍을 수용하는 원자 또는 원자 그룹을 지칭한다. 본원에 이용된 "친전자성 그룹"에는 할로겐화물, 카르보닐 및 에폭시드 함유하는 화합물들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 일반적인 친전자체는 할로겐화물, 이를 테면, 티오포스겐, 글리세린 디클로로히드린, 프탈로일 클로라이드, 숙시닐 클로라이드, 클로로아세틸 클로라이드, 클로로숙시리일 클로라이드, 등등; 케톤 이를 테면, 클로로악톤, 브로모아세톤, 등등; 알데히드 이를 테면, 글리옥살, 등등; 이소시아네이트 이를 테면, 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 톨릴렌 디이소시아네이트, 메타-크실릴렌 디이소시아네이트, 시클로헥실메탄-4,4-디이소시아네이트, 등등 그리고 이들 화합물들의 유도체들일 수 있다.

[0278] 용어 "친핵성 그룹", "친핵체" 및 본원에 사용된 바와 같은 이와 유사한 것들은 공유 결합을 형성하기 위해 전자 쌍을 가지고 있는 원자 또는 원자 그룹을 지칭한다. 이러한 유형의 그룹들은 음이온성 그룹으로 반응하는 이완화가능한 그룹일 수 있다. 본원에서 이용된 "친핵성 그룹"에는 히드록실, 주요 아민, 2차 아민, 3차 아민 및 티올이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0279] 표 2는 원하는 기능 그룹을 생성하기 위해 조합될 수 있는 다양한 출발 친전자체 및 친핵체를 제공한다. 제공된 정보는 예시를 위한 것이며, 여기에 설명된 합성 기술에 국한되지 않는다.

[0280] 표 2: 공유 링키지 및 이의 전구체들의 예시

공유 링키지 산물	친전자성	친핵체
카르복사미드	활성화된 에스테르	아민/아닐린
카르복사미드	아실 아지드	아민/아닐린
카르복사미드	아실 할로겐화물	아민/아닐린
에스테르	아실 할로겐화물	알코올/페놀
에스테르	아실 니트릴	알코올/페놀
카르복사미드	아실 니트릴	아민/아닐린
이민	알데히드	아민/아닐린
히드라존	알데히드 또는 케톤	하이드라진
옥심	알데히드 또는 케톤	히드록실아민
알킬 아민	알킬 할로겐화물	아민/아닐린
에스테르	알킬 할로겐화물	카르복실산
티오에테르	알킬 할로겐화물	티올
에테르	알킬 할로겐화물	알코올/페놀
티오에테르	알킬 술포네이트	티올
에스테르	알킬 술포네이트	카르복실산
에테르	알킬 술포네이트	알코올/페놀
에스테르	무수물	알코올/페놀
카르복사미드	무수물	아민/아닐린
티오페놀	아릴 할로겐화물	티올
아릴 아민	아릴 할로겐화물	아민
티오에테르	아지딘	티올
보로네이트 에스테르	보로네이트	글리콜
카르복사미드	카르복실산	아민/아닐린
에스테르	카르복실산	알코올
하이드라진	하이드라지드	카르복실산
N-아실우레아 또는 무수물	카르보디이미드	카르복실산
에스테르	디아조알칸	카르복실산
티오에테르	에폭시드	티올
티오에테르	할로아세타미드	티올
암모트리아진	할로트리아진	아민/아닐린

[0281]

트리아지닐 에테르	할로트리아진	알코올/페놀
아미딘	이미도 에스테르	아민/아닐린
우레아	이소시아네이트	아민/아닐린
우레탄	이소시아네이트	알코올/페놀
티오우레아	이소티오시아네이트	아민/아닐린
티오에테르	말레이미드	티올
아인산염 에스테르	포스포라미디트	알코올
실릴 에테르	실릴 할로겐화물	알코올
알킬 아민	술포네이트 에스테르	아민/아닐린
티오에테르	술포네이트 에스테르	티올
에스테르	술포네이트 에스테르	카르복실산
에테르	술포네이트 에스테르	알코올
술폰아미드	술포닐 할로겐화물	아민/아닐린
술포네이트 에스테르	술포닐 할로겐화물	페놀/알코올

[0282]

[0283] 일반적으로, 탄소 친전자체는 탄소 친핵체를 비롯한 상보적 친핵체의 공격을 받기 쉽고, 이때 공격하는 친핵체는 해당 친핵체와 탄소 친전자체 사이에 새로운 결합을 형성하기 위해 탄소 친전자체로 전자쌍을 가져온다.

[0284] 탄소 친핵체의 비-제한적 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 알킬, 알케닐, 아릴 및 알키닐 Grignard, 유기리튬, 유기아연, 알킬-, 알케닐, 아릴-및 알키닐-주석 시약 (오르가노스타난), 알킬-, 알케닐-, 아릴-및 알키닐-보란 시약 (오르가노보란 및 오르가노보로네이트); 이러한 탄소 친핵체는 물 또는 극성 유기 용매에서 동역학적으로 안정하다는 장점을 갖는다. 탄소 친핵체의 다른 비-제한적 예로는 포스포러스 일리드 (ylids), 에놀 및 에놀레이트 시약이 내포되며; 이러한 탄소 친핵체는 합성 유기 화학 분야의 당업자에게 잘 알려진 전구체로부터 비교적 생성하기 쉽다는 이점이 있다. 탄소 친핵체는 탄소 친전자체와 함께 사용될 때, 탄소 친핵체와 탄소 친전자체 사이에 새로운 탄소-탄소 결합을 생성된다.

[0285] 탄소 친전자체에 커플링시키는데 적합한 비-탄소 친핵체의 비-제한적 예로는 일차 및 2차 아민, 티올, 티올레이트, 그리고 티오에테르, 알코올, 알콕시드, 아지드, 세미카르바자이드, 그리고 이와 유사한 것들이 내포된다. 이들 비-탄소 친핵체가 탄소 친전자체와 함께 사용될 때, 전형적으로 헤테로원자 링키지 (C-X-C)가 생성되며, 이때 X는 헤테로원자이며, 여기에는 산소, 황, 또는 질소가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0286] 일부 경우들에서, 본 발명에 이용된 중합체는 이의 한 단부에서 히드록시 또는 메톡시로 종료되며, 즉, X는 H 또는 CH_3 ("메톡시 PEG")이다. 대안으로, 상기 중합체는 반응 그룹으로 종료되고, 이로 인하여 이중-기능성 중합체가 형성된다. 전형적인 반응 그룹에는 20개의 일반적인 아미노산에서 볼 수 있는 기능 그룹와 반응시키기 위해 흔히 이용되는 반응 그룹 (말레이미드 그룹, 활성화된 카르보네이트 (p-니트로페닐 에스테르를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 활성화된 에스테르 (N-히드록시숙시니미드, p-니트로페닐 에스테르를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는) 및 알데히드를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 뿐만 아니라 20개의 일반적인 아미노산에 대해 비활성이지만, 상보적인 기능성 그룹 (아지드 그룹, 알킨 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)과는 특이적으로 반응을 하는 기능성 그룹이 내포될 수 있다. 해당 중합체의 다른 단부(상기 화학식에서 Y로 나타냄)는 자연-발생적 또는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 통하여 직접 또는 간접적으로 표적화 폴리펩티드에 부착된다. 예를 들면, Y는 아미드, 폴리펩티드에 대해 아민 그룹에 대한 카르바마이트 또는 우레아 링키지 (리신의 입실론 아민 또는 *N*-말단을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)일 수 있다. 대안으로, Y는 티올 그룹에 대해 말레이미드 링키지 (시스테인의 티올 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)일 수 있다. 대안으로, Y는 20개의 일반적인 아미노산을 통해 일반적으로 접근할 수 없는 잔기에 대한 링키지일 수 있다. 예를 들면, 중합체 상에 아지드 그룹은 상기 표적화 폴리펩티드 상의 알킨 그룹과 반응하여 Huisgen [3+2] 사이클로추가 산물을 만들 수 있다. 대안으로, 상기 중합체 상의 알킨 그룹은 표적화 폴리펩티드에 존재하는 아지드 그룹과 반응하여 유사한 산물을 형성할 수 있다. 일부 구체예들에서, 강한 친핵체 (하이드라진, 하이드라지드, 히드록실아민, 세미카르바자이드를 비롯한 그러나 이에 국한되지 않는)는 표적화 폴리펩티드에 존재하는 알데히드 또는 케톤 그룹과 반응하여 히드라존, 옥심 또는 세미카르바존을 형성할 수 있고, 이용가능한 어떤 경우에는 적절한 환원제로 처리하면 추가 환원될 수 있다. 대안으로, 강한 친핵체는 상기 표적화 폴리펩티드에 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 통하여 통합될 수 있고, 이를 이용하여 상기 수용성 중합체에 존재하는 케톤 또는 알데히드 그룹과 선호적으로 반응시킬 수 있다.

[0287] 중합체에 대한 임의의 분자 질량은 원하는 대로, 약 100달톤(Da) ~ 100,000Da 또는 그 이상(일부 경우 0.1-50 kDa 또는 10-40 kDa, 그러나, 이에 국한되지 않음)을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 실질적으로 원하는 대로 사용될 수 있다. 중합체의 분자량은 광범위하여, 약 100 Da ~ 약 100,000 Da 또는 그 이상일 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. 중합체는 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 그리고 100 Da를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 약 100 Da ~ 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 구체예들에서, 중합체는 약 100 Da ~ 약 50,000 Da이다. 1 ~ 100 kDa(1 ~ 50 kDa 또는 5 ~ 20 kDa를 포함하나, 그러나 이에 국한되지 않음) 범위의 분자량을 갖는 각 쇄를 갖는 중합체 분자를 포함하나, 이에 국한되지 않는 분기된 중합체가 또한 사용될 수 있다. 분기된 쇄 중합체의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 100,000 Da 또는 그 이상일 수 있지만, 그러나 이에 국한되지 않는다. 분기된 쇄 중합체의 각 쇄의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 그리고 1,000 Da를 포함하나, 그러나 이에 국한되지 않는 약

1,000 Da ~ 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 구체예들에서, 분기된 쇄 중합체의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 분기된 쇄 중합체의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 분기된 쇄 중합체의 각 쇄의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 분기된 쇄 중합체의 각 쇄의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 20,000 Da이다. 광범위한 중합체 분자가 본원에 참고로 편입된 Shearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog를 포함하나, 이에 국한되지 않는 문헌에 기재되어 있다.

[0288] 일부 구체예들에서, 본 발명은 평균 분자량 약 800 Da ~ 약 100,000 Da의 수용성 중합체 백본을 포함하는, 아지드-및 아세틸렌-함유하는 중합체 유도체들을 제공한다. 상기 수용성 중합체의 중합체 백본은 폴리(에틸렌 글리콜)일 수 있다. 그러나, 폴리(에틸렌)글리콜 및 폴리(덱스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜)을 비롯한 그러나 이에 국한되지 않는 다른 관련된 중합체가 내포된, 그러나 이에 국한되지 않는 광범위한 각종 수용성 중합체가 본 발명의 실행에 또한 적합하며, PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)의 용어는 이러한 모든 분자를 포괄하는 의도로 이용됨을 인지해야 한다. 용어 PEG에는 임의의 형태의 폴리(에틸렌 글리콜), 가령, 이중-기능성 PEG, 다중부문으로 된 PEG, 유도체화된 PEG, 포크형(forked) PEG, 분기된 PEG, 펜던트 PEG (즉, 해당 중합체 백본에 대해 하나 또는 그 이상의 기능성 그룹 펜던트를 갖는 PEG 또는 관련된 중합체), 또는 분해가능한 링키지를 갖는 PEG가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0289] 이들 형태의 중합체에 추가적으로, 해당 중합체는 백본에서 약한 또는 분해가능한 링키지를 갖도록 만들 수도 있다. 예를 들면, 중합체는 가수분해되는 에스테르 링키지가 중합체 백본에 있도록 만들 수도 있따. 아래 나타낸 바와 같이, 가수분해로 해당 중합체가 저가 분자량의 단편들로 절단된다:-중합체-CO_2-중합체-+H_2O →중합체-CO_2H+HO-중합체-

[0290] 많은 중합체들이 또한 본 발명의 사용에 적합하다. 일부 구체예들에서, 2 ~ 약 300개의 말단을 갖는, 수용성 중합체 백본이 본 발명에 특히 유용하다. 적합한 중합체의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 다른 폴리(알킬렌 글리콜), 이를 테면, 폴리(프로필렌 글리콜) (“PPG”), 이의 공중합체 (에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체를 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는), 이의 삼원중합체(terpolymers), 이의 혼합물들, 그리고 이와 유사한 것들. 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 다를 수 있지만, 일반적으로 약 800 Da ~ 약 100,000 Da, 흔히 약 6,000 Da ~ 약 80,000 Da가 된다. 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 그리고 100 Da을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는, 약 100 Da ~ 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 100 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 100 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 10,000 Da ~ 약 40,000 Da이다.

[0291] 본 발명의 이러한 구체예의 한 특징에서, 가수분해 전, 온전한 중합체-콘쥬게이트는 투여시 최소한으로 분해되고, 절단가능한 결합의 가수분해는 전신 순환계으로의 방출 전, 표적화 폴리펩티드의 효소적 분해와 대조적으로, 활성 표적화 폴리펩티드의 혈류로의 방출 속도를 느리게 제어하는 데 효과적이다.

[0292] 적절한 생리학적으로 절단가능한 링키지에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 에스테르, 카르보네이트 에스테르, 카르바마이트, 술페이트, 포스페이트, 아실옥시알킬 에테르, 아세탈, 그리고 케탈. 이러한 콘쥬게이트는 저장 및 투여시 안정한 생리학적으로 절단가능한 결합을 가져야 한다. 예를 들면, 중합체에 연계된 표적화 폴리펩티드 또는 변형된 표적화 폴리펩티드는 최종 약제학적 조성물의 제조시, 적절한 전달 비히클(사용되는 경우)에 용해될 때 그리고 투여 경로에 관계없이 투여 시 이의 온전성(integrity)을 유지해야 한다.

[0293] 본 발명에는 US 2017/0182181 (본원의 참고자료에 편입됨)에 개시된 약물 콘쥬게이트의 세포내 전달을 위한 조정가능한 안정성을 갖는 포스페이트-기반의 링커가 또한 내포된다. 상기 포스페이트-기반의 링커는 원위로부터 근위 방향으로 튜닝 요소, 임의선택적으로 스페이서 요소, 그리고 반응 기능성 그룹을 포함하는 링커 부분의 원위 단부에 공유적으로 연계된 단일포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 또는 테트라포스페이트 그룹 (포스페이트 그룹)을 포함한다. 상기 포스페이트-기반의 링커의 포스페이트 그룹은 페이로드에 콘쥬게이트될 수 있고, 상기 반응기는 세포-특이적 표적화 리간드 이를 테면, 항체에 콘쥬게이트될 수 있다. 상기 포스페이트-기반

의 링커의 일반적 구조는 다음과 같다: 포스페이트 그룹-튜닝 요소-임의선택적 스페이서 요소-페이로드에 콘쥬게이트되는 기능성 반응 그룹 A 포스페이트-기반의 링커는 다음의 일분 구조를 갖는다: 페이로드-포스페이트 그룹-튜닝 요소-임의선택적 스페이서 요소-기능을 하는 반응 그룹, 그리고 표적화 리간드에 콘쥬게이트될 때 다음 일반 구조를 갖는다: 페이로드-포스페이트 그룹-튜닝 요소-임의선택적 스페이서 요소-표적화 리간드. 이들 포스페이트-기반의 링커는 혈액 대. 세포내 환경(예로써, 리소좀 격실)에서 차등적 그리고 조정가능한 안정성을 갖는다 포스페이트 그룹이 세포 내 환경에서 절단되어 본래의 또는 활성 형태로 페이로드를 방출하는 속도는 튜닝 요소의 구조에 의해 영향을 받을 수 있고, 이러한 효과는 포스페이트 그룹의 치환에 의해, 뿐만 아니라, 해당 포스페이트 그룹은 단일포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 또는 테트라포스페이트인지에 따라 조정될 수 있다. 더욱이, 이들 포스페이트-기반의 링커는 콘쥬게이트 이를 테면, 항체-약물 콘쥬게이트를 구축하는 능력을 제공하며, 이때 응집체를 형성하는 콘쥬게이트의 경향은 동일한 페이로드가 본원에 개시된 포스페이트계 링커가 아닌 링커를 사용하여 항체 또는 표적화 리간드에 접합된 콘쥬게이트와 비교하여 감소된다.

[0294] **TLR-작용제 링커 유도체들의 구조 및 합성: 친전자성 그룹과 친핵성 그룹**

[0295] 히드록실아민 그룹 (아미노옥시라고 또한 지칭됨)을 함유하는 링커를 갖는 TLR-작용제 유도체들은 다양한 친전자성 그룹과 반응하여, 콘쥬게이트 (PEG 또는 다른 수용성 중합체를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)를 형성한다. 하이드라진, 하이드라지드 및 세미카르바자이드와 마찬가지로, 상기 아미노옥시 그룹의 강화된 친핵성은 카르보닐-또는 디카르보닐-그룹 (케톤, 알데히드 또는 유사한 화학 반응을 하는 다른 기능성 그룹이 내포되나, 이에 국한되지 않음)을 함유하는 다양한 분자와 효과적으로, 그리고 선택적으로 반응할 수 있도록 한다. 예로써, Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34(9): 727-736 (2001) 참고. 반면 하이드라진 그룹과의 반응 결과는 대응하는 히드라존이 존재하지만, 그러나, 옥심은 일반적으로 아미노옥시 그룹과 카르보닐-또는 디카르보닐-함유하는 그룹 이를 테면, 예로써, 케톤, 알데히드 또는 유사한 화학 반응을 하는 다른 기능 그룹과의 반응으로 생성된다. 일부 구체예들에서, 아지드, 알킨 또는 사이클로알킨를 포함하는 링커를 갖는 TLR-작용제 유도체들은 사이클로추가 반응 (예로써, 1,3-이극성 사이클로추가, 아지드-알킨 Huisgen 사이클로추가, 등등)를 통하여 분자에 연계를 허용한다. (U.S. 특허 번호 7,807,619에서 기재됨-해당 반응에 대한 범위로 본원의 참고자료에 편입됨).

[0296] 따라서, 본원에 기재된 특정 구체예들에서, 히드록실아민, 알데히드, 보호된 알데히드, 케톤, 보호된 케톤, 티오에스테르, 에스테르, 디카르보닐, 하이드라진, 아미딘, 이민, 디아민, 케토-아민, 케토-알킨, 그리고 엔-디온 히드록실아민 그룹, 히드록실아민-유사 그룹 (히드록실아민 그룹과 유사한 반응을 하고, 히드록실아민 그룹과 구조적으로 유사한), 차폐된 히드록실아민 그룹 (히드록실아민 그룹으로 용이하게 전환될 수 있는), 또는 호된 히드록실아민 그룹 (탈보호시 히드록실아민기와 유사한 반응성을 갖는 것)을 포함하는 링커를 갖는 TLR-작용제 유도체들이 있다. 일부 구체예들에서, 링커를 갖는 상기 TLR-작용제 유도체들은 아지드, 알킨 또는 사이클로알킨을 포함한다.

[0297] 이러한 TLR-작용제 링커 유도체들 또는 상기 표적화 폴리펩티드는 염의 형태일 수도 있거나, 또는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드, 중합체, 폴리사카라이드, 또는 폴리뉴클레오티드 및 임의선택적으로 해독-후 변형된 형태에 통합될 수 있다.

[0298] 특정 구체예들에서, 화학식 (I)-(VII)의 화합물들은 약산성 조건 하에서 화합물은 수성 용액에서 적어도 1 개월 동안 안정적이다. 특정 구체예들에서, 화학식 (I)-(VII)의 화합물들은 약산성 조건 하에서 화합물은 적어도 2 주 동안 안정적이다. 특정 구체예들에서, 화학식 (I)-(VII)의 화합물들은 약산성 조건 하에서 화합물은 적어도 5 일 동안 안정적이다. 특정 구체예들에서, 이러한 산성 조건은 pH 2 ~ 8이다.

[0299] 본원에서 제공되고, 기재된 방법 및 조성물에는 적어도 하나의 카르보닐 또는 디카르보닐 그룹, 옥심 그룹, 히드록실아민 그룹, 또는 이의 보호된 형태 또는 차폐된 형태를 갖는 비-자연적 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 내포된다. 적어도 하나의 반응 그룹이 TLR-작용제 링커 유도체 또는 상기 표적화 폴리펩티드로 도입됨으로써 통상적인 발생 아미노산과는 반응을 하지 않으면서, 하나 또는 그 이상의 표적화 폴리펩티드(들)을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 특이적 화학 반응에 연루되는 콘쥬게이션 화학에 적용할 수 있게 된다. 일단 통합되면, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드 측쇄는 본원에 기재된 화학 방법을 이용하여 또한 변형될 수 있고, 또는 상기 TLR-작용제 링커 유도체 또는 상기 표적화 폴리펩티드에 존재하는 특정 기능성 그룹 또는 치환체에 적합할 수 있다.

[0300] 본원에서 기재된 TLR-작용제 링커 유도체 및 상기 표적화 폴리펩티드 방법 및 조성물은 다양한 기능 그룹을 갖는 물질을 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 제 2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드

유사체; 항체 또는 항체 단편; 그리고 임의의 이의 조합들이 내포되나, 이에 국한되지 않는 다른 물질과 콘쥬게이트를 제공한다.

[0301] 특정 구체예들에서, 화학식 (I)-(VII)의 화합물을 비롯한,본원에 기재된 TLR-작용제 링커 유도체들, 상기 표적화 폴리펩티드, TCs, 링커 및 시약은 약산 조건 (pH 2 ~ 8을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는) 하에서 수성 용액에 안정적이다. 다른 구체예들에서, 이러한 화합물들은 약산성 조건 하에서 화합물은 적어도 1 개월 동안 안정적이다. 다른 구체예들에서, 이러한 화합물들은 약산성 조건 하에서 화합물은 적어도 2 주 동안 안정적이다. 다른 구체예들에서, 이러한 화합물들은 약산성 조건 하에서 화합물은 적어도 5 일 동안 안정적이다.

[0302] 본원에서 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략의 또다른 측면에서, 임의의 전술한 "변형된 또는 변형안된" 비-자연적 아미노산 표적화 폴리펩티드를 연구하거나 또는 이용하는 방법들이 있다. 이러한 측면에는, 오로지 예로써, "변형된 또는 변형안된" 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 또는 단백질를 포함하는 표적화 폴리펩티드로부터 이익을 얻을 치료, 진단, 분석 기반, 산업, 화장품, 식물 생물학, 환경, 에너지 생산, 소비재 및/또는 군사 용도가 내포된다.

[0303] 적어도 하나의 비-자연적 아미노산을 포함하는 TC 분자가 본 발명에서 제공된다. 본 발명의 특정 구체예들에서, 적어도 하나의 비-자연적 아미노산을 갖는 TC 분자에는 적어도 하나의 해독-후 변형이 내포된다. 한 구체예에서, 상기 적어도 하나의 해독-후 변형에는 특정 반응 그룹에 적합한 것으로 당업자에게 공지된 화학 방법론을 이용하여 제1 반응기를 포함하는 적어도 하나의 비-자연적 아미노산에 대해 다음이 내포된, 그러나 이에 국한되지 않는 분자를 부착시키는 것을 포함한다: 라벨, 염료, 링커, 또다른 TC 폴리펩티드, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광교차링커, 방사성핵종, 세포독성 화합물, 약물, 친화력 라벨, 광친화력 라벨, 반응 화합물, 지수, 제 2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이트, 공-인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오티드, 사카라이드, 사이클로덱스트린, 억제성 리보핵산, 생물재료, 나노입자, 스핀 라벨, 형광단, 금속-함유하는 모이어티, 방사능활성 모이어티, 신규한 기능성 그룹, 다른 분자와 공유적으로 또는 비-공유적으로 상호작용하는 그룹, 광-감금된 모이어티, 화학-방사선 여기가능한 모이어티, 광-이성체화가능한 모이어티, 바이오틴, 바이오틴의 유도체, 바이오틴 유사체, 무거운 원자를 통합한 모이어티, 화학적으로 절단가능한 그룹, 광절단가능한 그룹, 신장된 측쇄, 탄소-연계된 당(sugar), 산화환원-활성제,아미노 티오산, 독성 모이어티, 동위원소적으로 라벨된 모이어티, 생물물리학적 프로브, 인광성 그룹, 화학발광성 그룹, 고-밀도 전자 그룹, 자성 그룹, 개재성(intercalating) 그룹, 발색단, 에너지 전달제, 생물학적으로 활성제, 검출가능한 라벨, 작은 분자, 양자점, 나노전달자, 방사성 뉴클레오티드, 방사성전달자, 중성자-포획자, 또는 상기의 임의의 조합 또는 제 2 반응 그룹을 포함하는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질. 예를 들면, 상기 제 1 반응 그룹은 알키닐 모이어티 (상기 비-자연적 아미노산에서 *p*-프로파르길옥시페닐알라닌을 비롯한 그러나 이에 국한되지 않고, 여기에서 프로파르길 그룹은 때로 아세틸렌 모이어티로 지칭되며)이며, 상기 제 2 반응 그룹은 아지도 모이어티이며, 그리고 [3+2] 사이클로추가 화학 방법론이 이용된다. 또다른 예시에서, 상기 제 1 반응 그룹은 아지도 모이어티 (상기 비-자연적 아미노산에서 *p*-아지도-L-페닐알라닌 또는 pAZ(본 명세서에서 때로 이렇게 지칭됨), 그러나 이에 국한되지 않음)이며, 상기 제 2 반응 그룹은 알키닐 모이어티이다. 본 발명의 변형된 TC의 특정 구체예들에서, 적어도 하나의 해독-후 변형을 포함하는 적어도 하나의 비-자연적 아미노산 (케토 기능성 그룹을 함유하는 비-자연적 아미노산, 그러나 이에 국한되지 않음)이 이용되며, 여기에서 상기 적어도 하나의 해독-후 변형은 사카라이드 모이어티를 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 해독-후 변형은 진핵 세포 또는 비-진핵 세포의 생체내에서 만들어진다. 링커, 중합체, 수용성 중합체, 또는 다른 분자는 해당 분자를 상기 폴리펩티드에 부착시킬 수 있다. 추가 구체예에서, 상기 TC에 부착된 링커는 이량체 형성을 허용할 정도의 충분한 길이를 갖는다. 상기 분자는 폴리펩티드에 직접적으로 또한 연계될 수 있다.

[0304] 특정 구체예들에서, 상기 TC 단백질에는 하나의 숙주 세포에 의해 생체내에서 만들어지는 적어도 하나의 해독-후 변형을 내포하며, 여기에서 이러한 해독-후 변형은 또다른 유형의 숙주 세포에 의해 정상적으로 만들어지는 것이 아니다. 특정 구체예들에서, 상기 단백질에는 진핵 세포에 의해 생체내에서 만들어지는 적어도 하나의 해독-후 변형을 내포하며, 여기에서 이러한 해독-후 변형은 비-진핵 세포에 의해 정상적으로 만들어지는 것이 아니다. 해독-후 변형의 예시로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 당화, 아세틸화, 아실화, 지질-변형, 팔미토일화, 팔미테이트 추가, 포스포릴화, 당지질-링키지 변형, 그리고 이와 유사한 것들.

[0305] 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 당화, 아세틸화, 아실화, 지질-변형, 팔미토일화, 팔미테이트 추가, 포스포릴화, 또는 당지질-링키지 변형을 위한 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을

포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 당화를 위해 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 당화, 아세틸화, 아실화, 지질-변형, 팔미토일화, 팔미테이트 추가, 포스포릴화, 또는 당지질-링키지 변형을 위해 하나 또는 그 이상의 자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 당화를 위해 하나 또는 그 이상의 자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다.

[0306] 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산 추가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 결손을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 상이한 아미노산에서 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산 추가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 상이한 아미노산에서 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 결손을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에서 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산 추가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에서 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 자연적으로 인코드된 아미노산 추가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 상이한 아미노산에서 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 자연적으로 인코드된 아미노산 추가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에서 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 자연적으로 인코드된 아미노산 추가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 TC는 이 폴리펩티드의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에서 당화를 강화시키는 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산 추가 및/또는 치환을 포함한다.

[0307] 한 구체예에서, 상기 해독-후 변형은 올리고사카라이드를 아스파라긴에 GlcNAc-아스파라긴 링키지 (여기에서 올리고사카라이드는 $(GlcNAc\text{-}Man)_2\text{-}Man\text{-}GlcNAc\text{-}GlcNAc$, 그리고 이와 유사한 것들을 포함하나, 이에 국한되지 않음)에 의해 부착시키는 것 포함한다. 또다른 구체예에서, 상기 해독-후 변형은 올리고사카라이드 (Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, 등등을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)를 세린 또는 트레오닌에 GalNAc-세린, GalNAc-트레오닌, GlcNAc-세린, 또는 GlcNAc-트레오닌 링키지를 통하여 부착시키는 것 포함한다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드는 분비 또는 국소화 서열, 에피토프 테그, FLAG 테그, 폴리히스티딘 테그, GST 융합, 및/또는 이와 유사한 것들을 포함할 수 있다. 분비 신호 서열에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 원핵 분비 신호 서열, 진핵 분비 신호 서열, 박테리아 발현을 위해 5'-최적화된 진핵 분비 신호 서열, 신규한 분비 신호 서열, 펙테이트 리아제(lyase) 분비 신호 서열, Omp A 분비 신호 서열, 그리고 파아지 분비 신호 서열. 분비 신호 서열의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: STII (원핵), Fd GIII 및 M13 (파아지), Bgl2 (효모), 그리고 프랜스포존으로부터 유래된 신호 서열 bla. 임의의 이러한 서열은 상기 폴리펩티드에 원하는 결과를 제공하기 위해 변형될 수 있는데, 하나의 신호 서열을 상이한 신호 서열로 치환하거나, 리더 서열을 상이한 리더 서열로 치환하는 것, 등등이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0308] 관심대상 단백질 또는 폴리펩티드는 적어도 하나의, 적어도 두 개의, 적어도 세 개의, 적어도 네 개의, 적어도 다섯 개의, 적어도 여섯 개의, 적어도 일곱 개의, 적어도 여덟 개의, 적어도 아홉 개의, 또는 열 개 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산을 함유할 수 있다. 상기 비-자연적 아미노산은 동일하거나 또는 상이할 수 있으며, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 상이한 비-자연적 아미노산을 포함하는 단백질에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 상이한 부위가 있을 수 있다. 특정 구체예들에서, 해당 단백질의 자연 발생적 형태에 존재하는 적어도 하나의, 그러나 전부보다는 적은 수의 특정 아미노산은 비-자연적 아미노산으로 치환된다.

[0309] 본 발명은 적어도 하나의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC 가반의 조성물 및 방법을 제공한다. 적어도 하나의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 TC로 도입됨으로써 통상적으로 발생되는 20개 아미노산과는 반응하지 않으면서, 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 특이적 화학 반응에 연루되는 콘쥬게이션 화학에 적용할 수 있게 된다. 일부 구체예들에서, 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC는 수용성 중합체, 이를 테면, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 또는 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산의 측쇄를 경유한 링커에 연계된다. 본 발명은 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들을 갖는 단백질의 선택적 변형을 위한 매우 효과적인 방법을 제공하는데, 이 방법은 20개의 자연적으로 통합된 아미노산에서는 볼 수 없는 아미노산 함유하는 기능성 그룹 또는 치환체(케톤, 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 비롯한 그러나 이에 국한되지 않은)를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 비-유전적으로 인코드된 아미노산을 선발 코돈에 반응하여 단백질로 선택적으로 통합시키고, 이들 아미노산은 적합한 반응 PEG 유도체로 후속 변형

시키는 것과 관련된다. 일단 통합되면, 그 다음 해당 아미노산 측쇄는 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 존재하는 특정 기능성 그룹 또는 치환체에 적합하도록 당업자에게 공지된 화학적 방법을 이용하여 변형될 수 있다. 매우 다양한 공지된 화학 방법론이 수용성 중합체를 단백질에 통합시키기 위해 본 발명에서 사용하기에 적합하다. 이러한 방법에는 Huisgen [3+2] 사이클로추가 반응 (*예로써*, Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; 그리고 Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176)에서 차례로 아세틸렌 또는 아지드 유도체들이 내포되나, 이에 국한되지 않은 것들을 사용한 방법이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0310] Huisgen [3+2] 사이클로추가 방법은 친핵성 치환 반응이라기 보다 사이클로추가가 연루된 방법이기 때문에, 단백질은 매우 높은 선택성을 갖도록 변형될 수 있다. 이 반응은 촉매량의 Cu(I) 염을 반응 혼합물에 첨가하여 우수한 위치선택성(1,4 > 1,5)으로 수성 조건에서 실온에서 수행할 수 있다. *예로써*, Tornoe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064; 그리고, Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; 및 WO 03/101972 참고. [3+2] 사이클로추가를 통해 본 발명의 단백질에 첨가될 수 있는 분자는 아지도 또는 아세틸렌 유도체를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 적절한 기능 그룹 또는 치환체를 갖는 거의 모든 분자가 내포된다. 이들 분자는 아세틸렌 그룹을 갖는 비-자연적 아미노산(p-프로파르길옥시페닐알라닌을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 또는 아지도 그룹(p-아지도-페닐알라닌을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)을 갖는 비-자연적 아미노산에 추가될 수 있다.

[0311] Huisgen [3+2] 사이클로추가로 인한 5-구성원 고리는 일반적으로 환원 환경에서 가역적이지 않으며, 수성 환경에서 장기간 가수분해에 대해 안정적이다. 결과적으로, 다양한 물질의 물리적 및 화학적 특성은 본 발명의 활성 PEG 유도체 또는 TLR-링커 유도체를 사용하여 까다로운 수성 조건하에서 변형될 수 있다. 더 중요한 것은, 상기 아지드와 아세틸렌 모이어티는 서로 특이적이기 때문에(예를 들면, 20개의 일반적인, 유전적으로-인코드된 아미노산중 임의의 것과도 반응하지 않음), 단백질은 매우 높은 선택성을 갖는 하나 또는 그 이상의 특정 부위에서 변형될 수 있다.

[0312] 본 발명은 수용성이며, 가수분해적으로 안정적인 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들, 그리고 하나 또는 그 이상의 아세틸렌 또는 아지드 모이어티를 갖는 관련된 친수성 중합체를 또한 제공한다. 아세틸렌 모이어티를 함유하는 상기 PEG 중합체 유도체들은 선발 코돈에 반응하여 단백질에 선택적으로 도입된 아지드 모이어티와의 커플링에 대해 상당히 선택적이다. 유사하게, 아지드 모이어티를 함유하는 상기 PEG 중합체 유도체들은 선발 코돈에 반응하여 단백질에 선택적으로 도입된 아세틸렌 모이어티와의 커플링에 대해 상당히 선택적이다. 더욱 특이적으로, 상기 아지드 모이어티는 알킬 아지드, 아릴 아지드 및 이들 아지드의 유도체들을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 알킬 및 아릴 아지드의 유도체는 아세틸렌-특이적 반응성이 유지되는 한, 다른 치환기를 내포할 수 있다. 상기 아세틸렌 모이어티은 알킬 및 아릴 아세틸렌 그리고 이들 각각의 유도체들을 포함한다. 알킬 및 아릴 아세틸렌의 유도체는 아지드-특이적 반응이 유지되는 한, 다른 치환기를 내포할 수 있다.

[0313] 본 발명은 다양한 기능성 그룹, 치환체 또는 모이어티를 갖는 물질에 다른 물질이 콘쥬게이트된 물질을 제공하는데, 이들 물질에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 라벨; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광교차링커; 방사성핵종; 세포독성 화합물; 약물; 친화력 라벨; 광친화력 라벨; 반응 화합물; 지수; 제 2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 킬레이트; 공-인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 사카라이드; 수용성 덴드라이머; 사이클로덱스트린; 억제성 리보핵산; 생물재료; 나노입자; 스핀 라벨; 형광단, 금속-함유하는 모이어티; 방사능 활성 모이어티; 신규한 기능성 그룹; 다른 분자와 공유적으로 또는 비-공유적으로 상호작용하는 그룹; 광-감금된 모이어티; 화학-방사선 여기가능한 모이어티; 광-이성체화가능한 모이어티; 바이오틴; 바이오틴의 유도체; 바이오틴 유사체; 무거운 원자를 통합한 모이어티; 화학적으로 절단가능한 그룹; 광절단가능한 그룹; 신장된 측쇄; 탄소-연계된 당(sugar); 산화환원-활성제; 아미노 티오산; 독성 모이어티; 동위원소적으로 라벨된 모이어티; 생물물리학적 프로브; 인광성 그룹; 화학발광성 그룹; 고-밀도 전자 그룹; 자성 그룹; 개재성 그룹; 발색단; 에너지 전달제; 생물학적으로 활성제; 검출가능한 라벨; 작은 분자; 양자점; 나노전달자; 방사성뉴클레오티드; 방사성전달자; 중성자-포획자, 또는 상기의 임의의 조합, 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질. 본 발명에는 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 갖는 물질에 대응하는 아세틸렌 또는 아지드 모이어티를 갖는 PEG 중합체 유도체들의 콘쥬게이트를 또한 내포한다. 예를 들면, 아지드 모이어티를 함유하는 PEG 중합체는 아세틸렌 기능 그룹을 품고 있는 단백질에서 비-유전적으로 인코드된 아미노산 위치에 있는 생물학적으로 활성 분자에 커플링될 수 있다. 상기 PEG와 생물학적으로 활성 분자를 커플링시키는 링키지에는 Huisgen [3+2] 사

이클로추가 산물이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0314] PEG가 생물 재료의 표면 변형에 사용될 수 있다는 것은 당업계에 잘 확립되어 있다(예로써, U.S. 특허 6,610,281; Mehvar, R., J. Pharm Pharm Sci., 3(1):125-136 (2000) 이들은 본원의 참고자료에 편입됨). 본 발명에는 하나 또는 그 이상의 반응 아지드 또는 아세틸렌 부위를 갖는 표면, 그리고 Huisgen [3+2] 사이클로추가 링키지를 통하여 해당 표면에 커플링된 본 발명의 하나 또는 그 이상의 아지드-또는 아세틸렌-함유하는 중합체를 포함하는 생물재료가 또한 내포된다. 생물재료 및 다른 물질들은 상기 아지드 또는 아세틸렌 링키지이외의 링키지, 이를 테면, 카르복실산, 아민, 알코올 또는 티올 모이어티를 포함하는 링키지를 통하여 아지드-또는 아세틸렌-활성화된 중합체 유도체들에 커플링되어, 후속 반응에 아지드 또는 아세틸렌 모이어티가 이용가능하도록 남길 수 있다.

[0315] 본 발명에는 본 발명의 아지드-및 아세틸렌-함유하는 중합체를 합성하는 방법이 내포된다. 상기 아지드-함유하는 PEG 유도체의 경우, 상기 아지드는 해당 중합체의 탄소 원자에 직접적으로 결합될 수 있다. 대안으로, 상기 아지드-함유하는 PEG 유도체는 생성된 중합체가 이의 말단에 아지드 부분을 갖도록 통상적인 활성화된 중합체의 한 말단에 아지드 부분을 갖는 연계 제제를 부착시킴으로써 제조될 수 있다. 상기 아세틸렌-함유하는 PEG 유도체의 경우, 상기 아세틸렌은 해당 중합체의 탄소 원자에 직접적으로 결합될 수 있다. 대안으로, 상기 아세틸렌-함유하는 PEG 유도체는 생성된 중합체가 이의 말단에 아세틸렌 부분을 갖도록 통상적인 활성화된 중합체의 한 말단에 아세틸렌 부분을 갖는 연계 제제를 부착시킴으로써 제조될 수 있다.

[0316] 더욱 특이적으로, 상기 아지드-함유하는 PEG 유도체의 경우, 적어도 하나의 활성 히드록실 모이어티를 갖는 수용성 중합체는 그 위에 더 큰 반응성 모이어티, 이를 테면, 메실레이트, 트레실레이트, 토실레이트 또는 할로겐 이탈 그룹을 갖도록 치환된 중합체를 만드는 반응을 겪는다. 술포닐 산 할로겐화물, 할로겐 원자 및 다른 이탈 그룹을 함유하는 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들을 제조하고 이용하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 그 다음, 결과적으로 치환된 중합체는 해당 중합체의 말단에 더 큰 반응성 모이어티 대신 아지드 모이어티로 대체하기 위한 반응을 겪는다. 대안으로, 적어도 하나의 활성 친핵성 또는 친전자성 모이어티를 갖는 수용성 중합체는 PEG 중합체와 연계 제제 사이에 공유 결합이 형성되고, 아지드 부분이 중합체 말단에 위치하도록, 한 말단에 아지드를 갖는 연계 제제와의 반응을 겪는다. 아민, 티올, 하이드라지드, 하이드라진, 알코올, 카르복실레이트, 알데히드, 케톤, 티오에스테르 및 이와 유사한 것들을 비롯한 친핵성 모이어티 및 친전자성 모이어티는 당업자에게 공지되어 있다.

[0317] 더욱 특이적으로, 아세틸렌-함유하는 PEG 유도체의 경우, 적어도 하나의 활성 히드록실 모이어티를 수용성 중합체는 아세틸렌 모이어티를 함유하는 전구체로부터 할로겐 또는 다른 활성화된 이탈 그룹을 대체하기 위한 반응을 겪는다. 대안으로, 적어도 하나의 활성 친핵성 또는 친전자성 모이어티를 갖는 수용성 중합체는 PEG 중합체와 연계 제제 사이에 공유 결합이 형성되고, 아세틸렌 부분이 중합체 말단에 위치하도록, 한 말단에 아세틸렌을 갖는 연계 제제와의 반응을 겪는다. PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들의 유기 합성, 준비 및 사용에 있어서, 할로겐 모이어티, 활성화된 이탈 그룹, 친핵성 모이어티 및 친전자성 모이어티는 당업자에게 잘 확립된 것들이다.

[0318] 본 발명은 단백질의 선택적 변형을 위해, 변형된 단백질에 다른 물질, 이를 테면, PEG 및 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들, 링커, 또는 또다른 TC 폴리펩티드, 함유하는 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 수용성 중합체를 단백질에 추가하는 방법을 또한 제공한다. 상기 아지드-및 아세틸렌-함유하는 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들을 이용하여 생체적합성, 안정성, 용해도 및 면역원성의 결여가 중요한 표면 및 분자의 속성을 변형시킬 수 있는데, 한편으로 동시에, 기존의 공지된 수단과 비교하여, PEG 유도체 또는 TLR-링커 유도체를 단백질에 부착시키는 선택적이 더 큰 수단을 제공한다.

[0319] ***본 발명을 이용하여 일반적인 재조합 핵산 방법***

[0320] 본 발명의 많은 구체예들에서, 관심대상의 TC의 표적화 폴리펩티드를 인코드하는 핵산을 재조합 방법을 이용하여 단리하고, 클론시키고, 그리고 변경시킬 것이다. 단백질 발현 또는 TC의 표적화 폴리펩티드로부터 변이체, 유도체들, 발현 카세트, 또는 이로부터 유래된 다른 서열의 생성에 이들 구체예들이 이용되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 서열은 이종성 프로모터에 작동가능하도록 연계된다.

[0321] 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC의 표적화 폴리펩티드를 포함하는 뉴클레오티드 서열은 부모 폴리펩티드의 아미노산 서열을 기반으로 합성되고, 그 다음 관련 아미노산 잔기(들)의 도입 (즉, 통합 또는 치환)

또는 제거(즉, 결손 또는 치환)에 영향을 주기 위해 해당 뉴클레오티드 서열을 변화시킬 수 있다. 상기 뉴클레오티드 서열은 통상적인 방법에 따라 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 편리하게 변형될 수 있다. 대안으로, 상기 뉴클레오티드 서열은 올리고뉴클레오티드 합성기를 이용하고, 재조합 폴리펩티드가 생산될 숙주 세포에 우호적인 코돈을 이용하여 바람직하게 선택함으로써 화학 합성에 의해 준비될 수 있지만, 이에 국한되지 않고, 이때 올리고뉴클레오티드는 원하는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 기반으로 기획된다. 예를 들면, 원하는 폴리펩티드의 일부분을 코딩하는 몇 개의 작은 올리고뉴클레오티드를 합성하고, PCR, 결찰 또는 결찰 쇄 반응을 통하여 어셈블리될 수 있다 *예로써,* Barany, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 189-193 (1991); U.S. 특허 6,521,427 (이들은 본원의 참고자료에 편입됨) 참고.

[0322] 본 발명은 재조합 유전학 분야에서 일상적인 기술을 활용하다. 본 발명의 일반적인 사용 방법을 설명하는 기본 텍스트에는 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 및 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., 1994))가 내포된다.

[0323] 본 발명은 정법 tRNA/RS 쌍을 통하여 비-자연적 아미노산의 생체내 통합을 위한 진핵 숙주 세포, 비-진핵 숙주 세포, 및 유기체에 관계한다. 숙주 세포는 해당 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 내포하는 구조체, 가령, 본 발명의 벡터, 예를 들면, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있지만, 이에 국한되지 않은 구조체로 유전적으로 공작된다(형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 공작).

[0324] 표적 핵산을 세포로 도입시키는 몇 가지 공지된 방법들이 이용가능하며, 이들중 임의의 것은 본 발명에 이용될 수 있다. 여기에는 DNA를 함유하는 박테리아 원형질체를 수령 세포에 융합, 전기천공, 발사체 투하 및 바이러스 벡터 감염 등등이 내포된다(하기에서 추가 논의됨). 박테리아 세포를 사용하여 본 발명의 DNA 구조체를 함유하는 플라스미드의 수를 증폭할 수 있다. 박테리아는 대수기(log phase)로 성장시키고, 박테리아 내의 플라스미드는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 단리될 수 있다(예를 들어, Sambrook 참조). 추가로, 박테리아로부터 플라스미드를 정제하기 위한 상업적으로 이용가능한 키트들이 있다(예로써, EasyPrep™, FlexiPrep™ 이둘 모두 Pharmacia Biotech의 제품; StrataClean™ (Stratagene 제품); 그리고, QIAprep™ (Qiagen의 제품) 참고). 그런 다음, 분리 및 정제된 플라스미드를 추가로 조작하여 다른 플라스미드를 생성하고, 이를 세포의 형질감염에 이용하거나, 또는 관련 벡터에 통합시켜 유기체를 감염시킨다. 전형적인 벡터는 전사 및 해독 종결자, 전사 및 번역 개시 서열, 및 특정 표적 핵산의 발현 조절에 유용한 프로모터를 함유한다. 벡터는 선택적으로 적어도 하나의 독립적인 종결자 서열, 진핵생물 또는 원핵생물, 또는 둘 모두에서(셔틀 벡터를 포함하나 이에 제한되지 않음)에서 해당 카세트의 복제를 허용하는 서열 및 원핵생물 및 진핵생물 시스템 모두에 대한 선택 마커를 함유하는 일반적인 발현 카세트를 포함한다. 벡터는 원핵생물, 진핵생물 또는 둘 모두에서 복제 및 통합에 적합하다. Gillam & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, *et al.*, Nature, 328:731 (1987); Schneider, E., *et al.*, Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (위의 모두다) 참고. 클로닝에 유용한 박테리아 및 박테리오파지 카탈로그는 예로써, ATCC에 의해 제공되는, 예로써, ATCC에 의해 출간된, The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna *et al.* (eds)에서 제공된다. 서열화, 복제 및 분자 생물학의 기타 측면과 기본 이론적 고려 사항에 대한 추가 기본 절차는 Watson *et al.* (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY에서 또한 찾아볼 수 있다. 추가로, 필수적으로 임의의 핵산 (및 실질적으로 임의의 라벨된 핵산, 표준 또는 비-표준이던 간에)은 Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, World Wide Web, mcrc.com에서 이용가능), The Great American Gene Company (Ramona, CA World Wide Web, genco.com에서 이용가능), ExpressGen Inc (Chicago, IL World Wide Web, expressgen.com에서 이용가능), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) 및 많은 다른 공급처로부터 다양한 상업적 공급원으로부터 맞춤제작 또는 표준 주문할 수 있다.

[0325] 선발 코돈

[0326] 본 발명의 선발 코돈은 단백질 생합성 기계의 유전적 코돈 프레임워크를 확장한다. 예를 들면, 선발 코돈에는 독특한 삼-염기 코돈, 넌센스 코돈, 이를 테면, 중단 코돈이 내포되는데, 암버 코돈 (UAG), 오크레 코돈, 또는 오팔 코돈 (UGA), 비-자연적 코돈, 네 개 또는 그 이상의 염기 코돈, 래어 코돈, 또는 이와 유사한 것들을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는다. 원하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드로 도입될 수 있는 다수의 선발 코돈이 있음이 당업자에게는 자명하며, 상기 TC의 적어도 일부분을 인코드하는 단일 폴리뉴클레오티드에서 .하나 또는 그 이상의, 두 개 또는 그 이상의, 세 개 또는 그 이상의, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 선발 코

돈이 있지만, 이에 국한되지 않는다.

[0327] 한 구체예에서, 상기 방법은 생체 내에서 하나 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산을 통합시키기 위한 중단 코돈인 선별 코돈의 사용이 관련된다. 예를 들면, UAG를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 중단 코돈을 인지하는 O-tRNA가 만들어지고, 원하는 비-자연적 아미노산으로 O-RS에 의해 아미노아실화된다. 이러한 O-tRNA는 숙주의 자연 발생적 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해 인지되지 않는다. 통상적인 부위-지정 돌연변이유발은 TAG를 포함하나, 이에 국한되지 않는 중단 코돈을 관심 폴리펩티드의 관심 부위에 도입하기 위해 사용될 수 있다. *예로써,* Sayers, J.R., et al. (1988), *5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis.* Nucleic Acids Res, 16:791-802 참고. O-RS, O-tRNA 및 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산이 생체 내에서 결합될 때, 상기 비-자연적 아미노산은 UAG 코돈에 대한 반응으로 통합되어 명시된 위치에 비천연 아미노산을 함유하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0328] 생체내 비-자연적 아미노산의 통합은 진핵 숙주 세포의 상당한 교란 없이 수행될 수 있다. 예를 들면, UAG 코돈에 대한 억제 효율은 암버 억제인자 tRNA를 포함하지만, 이에 국한되지 않는 O-tRNA와 진핵생물 방출 인자 (eRF를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음) (정지 코돈에 결합하고 리보솜에서 성장하는 펩티드의 방출이 개시된다)간의 경쟁에 따라 달라지고, 억제 효율은 O-tRNA 및/또는 억제인자 tRNA의 발현 수준을 증가시키는 것을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 것에 의해 조절될 수 있다.

[0329] 비-자연적 아미노산은 또한 래어 코돈으로 또한 인코드될 수 있다. 예를 들면, 시험관내 단백질 합성 반응에서 아르기닌 농도가 감소할 때, 래어 아르기닌 코돈, AGG은 알라닌으로 아실화된 합성 tRNA에 의한 Ala 삽입에 효율적인 것으로 입증되었다. *예로써,* Ma et al., Biochemistry, 32:7939 (1993) 참고. 이 경우, 합성 tRNA는 대장균에서 소수종으로 존재하는 자연 발생 tRNA Arg와 경쟁한다. 일부 유기체는 모든 삼중-코돈을 사용하지 않는다. 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)의 미-할당 코돈 AGA는 시험관 내 전사/해독 추출물의 아미노산 삽입에 사용되었다. *예로써,* Kowal and Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997) 참고. 본 발명의 성분은 생체내에서 이들 래어 코돈을 사용하도록 만들 수 있다.

[0330] 선발 코돈은 네 개 또는 그 이상의 염기 코돈, 이를 테면, 네 개, 다섯 개, 여섯 개 또는 그 이상 염기 코돈이 내포되나, 이에 국한되지 않는, 연장된 코돈을 또한 포함한다. 4개 염기 코돈의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: AGGA, CUAG, UAGA, CCCU 및 이와 유사한 것들. 5개 염기 코돈의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC 및 이와 유사한 것들. 본 발명의 특징은 프레임시프트(frameshift) 억제에 기초한 확장된 코돈 사용이 내포된다. 네 개 또는 그 이상의 염기 코돈은 하나의 또는 다중 비-자연적 아미노산을 동일한 단백질로 삽입시킬 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. 예를 들면, 안티코돈 루프, 예를 들면, 적어도 8-10 nt개 안티코돈 루프와 함께, 특정 프레임시프트 억제제 tRNAs를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 돌연변이된 O-tRNAs 존재 하에, 네 개 또는 그 이상의 염기 코돈은 단일 아미노산으로 판독된다. 다른 구체예들에서, 상기 안티코돈 루프는 적어도 4-염기 코돈, 적어도 5-염기 코돈, 또는 적어도 6-염기 코돈 또는 그 이상으로 디코딩될 수 있지만, 그러나 이에 국한되지 않는다. 256가지의 가능한 4-염기 코돈이 있기 때문에, 다중 비-자연적 아미노산은 네 개 또는 그 이상의 염기 코돈을 이용하여 동일한 세포 안에서 인코딩될 수 있다. Anderson et al., (2002) *Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size*, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) *Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli*, J. Mol. Biol. 307: 755-769 참고.

[0331] 예를 들면, 시험관 내 생합성 방법에서 비-자연적 아미노산을 단백질로의 통합에 4-염기 코돈이 사용되었다. *예로써,* Ma et al., (1993) Biochemistry, 32:7939; 그리고 Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34 참고. CGGG 및 AGGU는 2-나프틸알라닌 및 리신의 NBD 유도체를 화학적으로 아실화된 두 개의 프레임시프트 억제제 tRNAs와 함께 시험관 내에서 스트렙트아비딘에 동시 통합에 사용되었다. *예로써,* Hohsaka et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194 참고. 생체내 연구에서, Moore et al.는 UAGN 코돈을 억제하는 NCUA 안티코돈 (N은 U, A, G 또는 C일 수 있음)이 있는 tRNALeu 유도체의 능력을 조사하였고, 그리고 4-중항 UAGA는 0 또는-1 프레임에서 거의 디코딩 없이, 13~26%의 효율로 UCUA 안티코돈을 사용하는 tRNALeu에 의해 디코딩될 수 있음을 알아내었다. Moore et al., (2000) J. Mol. Biol., 298:195 참고. 한 구체예에서, 래어 코돈 또는 넌센스 코돈에 기초된 연장된 코돈이 본 발명에 이용될 수 있으며, 이는 다른 원치 않는 부위에서 미스센스(missense) 판독 및 프레임시프트 억제를 줄일 수 있다.

[0332] 주어진 시스템의 경우, 선발 코돈에는 내인성 시스템이 자연 염기 코돈을 사용하지 않는 (또는 거의 사용하지

않는) 자연 3개 염기 코돈 중 하나가 또한 내포될 수 있다. 예를 들면, 여기에는 자연 3-염기 코돈을 인지하는 tRNA가 없는 시스템, 및/또는 3염기 코돈이 래어 코돈인 시스템이 내포된다.

[0333] 선발 코돈에는 임의선택적으로 비-자연적 염기 쌍들이 내포된다. 이들 비-자연적 염기 쌍은 기존의 유전적 알파벳을 추가 확장시킨다. 하나의 추가 염기쌍은 삼중항 코돈의 수를 64개에서 125개로 증가시킨다. 세 번째 염기 쌍의 속성에는 안정적이고 선택적인 염기쌍, 중합효소에 의한 높은 충실도로 DNA로의 효율적인 효소적 통합, 그리고 발생초기의 비-자연적 염기쌍 합성 후 효율적인 지속적인 프라이머 확장이 내포된다. 방법 및 조성물에 채택될 수 있는 비-자연적 염기쌍에 대한 설명은 예로써, Hirao, et al., (2002) *An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein*, Nature Biotechnology, 20:177-182가 내포된다. Wu, Y., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630 또한 참고. 기타 관련 출판물은 아래에 나열되어 있다.

[0334] 생체 내 사용의 경우, 비-자연적 뉴클레오사이드는 막 투과성이며, 인산화되어 상응하는 트리포스페이트를 형성한다. 추가로, 증가된 유전 정보는 안정적이며, 세포 효소에 의해 파괴되지 않는다. Benner와 다른 사람들의 기존 시도에서 표준 Watson-Crick 쌍과 다른 수소 결합 패턴이 활용되었으며, 그 중 가장 주목할만한 예는 iso-C:iso-G 쌍이다. *예로써,* Switzer et al., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322; 그리고 Piccirilli et al., (1990) Nature, 343:33; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602 참고. 이러한 염기는 일반적으로 자연 염기들과 어느 정도 잘못된 짝을 이루고, 효소적으로 복제될 수 없다. Kool과 동료들은 염기 사이의 소수성 패킹 상호작용이 수소 결합을 대체하여 염기쌍 형성을 유도할 수 있음을 입증했다. Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602; 그리고 Guckian and Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825 참고. 위의 모든 요구 사항을 충족하는 비-자연적 염기쌍을 개발하기 위해, Schultz, Romesberg 및 동료들은 일련의 비-자연적 소수성 염기를 체계적으로 합성하고 연구했다. PICS:PICS 자체-쌍은 자연 염기 쌍들보다 더 안정적인 것으로 밝혀졌으며, 대장균 DNA 중합효소 I (KF)의 Klenow 단편에 의해 DNA에 효율적으로 통합될 수 있다. *예로써,* McMinn et al., (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6; 그리고 Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274 참고. 3MN:3MN 자체-쌍은 생물학적 기능에 충분한 효율성과 선택도로 KF에 의해 합성될 수 있다. *예로써,* Ogawa et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:8803 참고. 그러나, 두 염기 모두 추가 복제를 위한 쇄 종결자 역할을 한다. PICS 자체 쌍을 복제하는 데 사용할 수 있는 돌연변이 DNA 중합효소가 최근에 진화했다. 추가로, 7AI 자체 쌍은 복제될 수 있다. 예로써, Tae et al., (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439 참고. 새로운 금속염기 쌍인 Dipic:Py도 개발되었으며, 이것은 Cu(II)와 결합할 때 안정적인 쌍을 형성한다. Meggers et al., (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714 참고. 확장 코돈 및 비-자연적 코돈은 본질적으로 천연 코돈에 직교(orthogonal)하기 때문에, 본 발명의 방법은 이러한 특성을 이용하여 이들을 위한 직교 tRNA를 생성할 수 있다.

[0335] 해독 우회 시스템은 원하는 폴리펩티드에 비-자연적 아미노산을 혼입하기 위해 또한 사용될 수 있다. 해독 우회 시스템에서, 큰 서열은 유전자에 통합되지만, 그러나 단백질로 해독되지 않는다. 이 서열은 리보솜이 해당 서열을 뛰어 넘고, 해당 삽입의 하류 해독이 재개하도록 유도하는 신호 역할을 하는 구조를 함유한다.

[0336] 관심대상 단백질, 이를 테면, TC의 표적화 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자는 폴리펩티드의 임의의 원하는 위치에 시스테인을 도입하도록 쉽게 돌연변이될 수 있다. 시스테인은 반응성 분자, 수용성 고분자, 단백질 또는 다양한 기타 분자를 관심 단백질로의 도입에 광범위하게 사용된다. 폴리펩티드의 원하는 위치로 시스테인 혼입을 위한 적합한 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 이를 테면, U.S. 특허 번호 6,608,183 (본원에 참고자료에 편입됨)에 기술된 것들과 표준 돌연변이유발 기술이 있다.

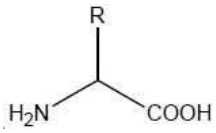
[0337] ***III.비-자연적으로 인코드된 아미노산***

[0338] 매우 다양한 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 본 발명에서 사용하는데 적합하다. 임의의 수의 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 TC로 도입될 수 있다. 일반적으로, 도입되는 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 20개의 통상적인, 유전적으로-인코드된 아미노산 (즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 그리고 발린)에 대해 실질적으로 화학적으로 비활성이다 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산에는 20개의 통상적인 아미노산에서 볼 수 없는 기능 그룹와 효과적으로, 선택적으로 반응하는 측쇄 기능 그룹 (아지도, 케톤, 알데히드 및 아미노옥시 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은)이 내포되어 안정적인 콘쥬게이트를 형성한다. 예를 들면, 아지도 기능성 그룹을 함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 내포된 TC의 표적화 폴리펩티드는 중합체 (폴리(에틸렌 글리콜을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)와 반응할 수 있고, 또는, 대안으로, 상기 아지드와 알킨 기능 그룹의 선택적 반응으로 인한 안정적인 콘쥬게이트를 형성할 수 있는 제 2 폴리펩티드 또는 링커 함유하는 알킨 모이어티)와 반응하여 Huisgen [3+2] 사이

클로추가 산물이 형성될 수 있다.

[0339] 알파-아미노산의 일반적인 구조는 다음 (화학식 I)과 같이 도시된다:

[0340] I

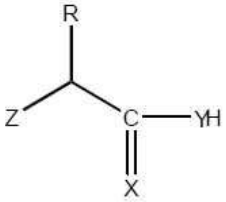
[0341] 

[0342] 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 상기-열거된 화학식을 갖는 전형적인 임의의 구조이며, 이때 R 그룹은 20개의 자연 아미노산에 이용된 것 이외의 임의의 치환체이며, 본 발명에 사용하는데 적합할 수 있다. 본 발명의 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 측쇄 구조에서만 오로지 자연 아미노산과 전형적으로 상이하기 때문에, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 다른 아미노산 (자연 또는 비-자연적으로 인코드된 것을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)과 자연 발생적 폴리펩티드에서 형성되는 것과 동일한 방식으로, 아미드 결합을 형성한다. 그러나, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 자연 아미노산과 구별되는 측쇄 그룹을 갖는다. 예를 들면, R은 임의선택적으로 알킬-, 아릴-, 아실-, 케토-, 아지도-, 히드록실-, 하이드라진, 시아노-, 할로-, 하이드라지드, 알케닐, 알키닐, 에테르, 티올, 셀레노-, 술포닐-, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로사이클릭, 에논, 이민, 알데히드, 에스테르, 티오산, 히드록실아민, 아미노 그룹, 또는 이와 유사한 것들 또는 임의의 이의 조합을 포함한다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 관심대상의 다른 비-자연적으로 발생적 아미노산에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 광활성화가능한 교차-링커를 포함하는 아미노산, 스핀-라벨된 아미노산, 형광 아미노산, 금속 결합 아미노산, 금속-함유하는 아미노산, 방사능활성 아미노산, 신규한 기능성 그룹을 갖는 아미노산, 다른 분자와 공유적으로 또는 비-공유적으로 반응하는 아미노산, 광-감금된 및/또는 광-이성체화가능한 아미노산, 바이오틴 또는바이오틴 유사체를 포함하는 아미노산, 당화된 아미노산 이를 테면, 당(sugar) 치환된 세린, 다른 탄수화물 변형된 아미노산, 케토-함유하는 아미노산, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에테르를 포함하는 아미노산, 무거운 원자 치환된 아미노산, 화학적으로 절단가능한 및/또는 광절단가능한 아미노산, 자연 아미노산과 비교하였을 때 신장된 측쇄를 갖는 아미노산 (약 5개 또는 약 10개 탄소보다 많은 탄화수소를 갖는, 그러나 이에 국한되지 않은 길이의 탄화수소 또는 폴리에테르), 탄소-연계된 당(sugar)-함유하는 아미노산, 산화환원-활성 아미노산, 아미노 티오산 함유하는 아미노산, 그리고 하나 또는 그 이상의 독성 모이어티를 포함하는 아미노산.

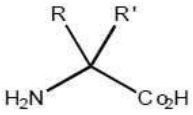
[0343] 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는, 그리고 수용체 중합체와 반응에 유용한 예시적인 비-자연적으로 인코드된 아미노산에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 카르보닐, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드, 세미카르바자이드, 아지드 및 알킨 반응 그룹을 갖는 아미노산. 일부 구체예들에서, 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 사카라이드 모이어티를 포함한다. 이러한 아미노산의 예로는 *N*-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, *N*-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, *N*-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, *N*-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 *O*-만노사미닐-L-세린이 내포된다. 이러한 아미노산의 예로는 해당 아미노산과 사카라이드 간의 자연-발생적 N- 또는 O-링키지가 자연계에서 흔히 볼 수 없는 링키지-알켄, 옥심, 티오에테르, 아미드 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는 공유 링키지로 대체되는 예시들이 또한 내포된다. 이러한 아미노산의 예로는 자연-발생적 단백질에서 흔히 볼 수 없는 사카라이드, 이를 테면, 2-데옥시-글루코스, 2-데옥시갈락토스 및 이와 유사한 것들이 또한 내포된다.

[0344] 본원에서 제공되는 비-자연적으로 인코드된 아미노산들중 많은 것들은 시판되는 이용가능한 것들로써, 예로써, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Novabiochem (a division of EMD Biosciences, Darmstadt, Germany), 또는 Peptech (Burlington, MA, USA)에서 시판되는 것들이다. 상업적으로 입수할 수 없는 것들은 본원에 제공된 바와 같이, 또는 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 임의로 합성된다. 유기 합성 기술의 경우, 예로써, Organic Chemistry by Fessendon and Fessendon, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); 및 Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)를 참고한다. U.S. 특허 번호 7,045,337 및 7,083,970 (이들은 본원의 참고자료에 편입됨) 또한 참고. 신규한 측쇄를 함유하는 비-자연적 아미노산에 추가로, 본 발명에 사용에 적합할 수 있는 비-자연적 아미노산은 화학식 II 및 III의 구조로 도시된 것들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 변형된 백본 구조를 임의선택적으로 포함한다:

II

[0345] 

III

[0346] 

[0347] 이때 Z는 전형적으로 OH, NH_2, SH, NH-R', 또는 S-R'을 포함하며; X 및 Y (동일하거나 또는 상이할 수 있음)는 전형적으로 S 또는 O를 포함하고, 그리고 R 및 R' (임의선택적으로 동일하거나 또는 상이함)은 화학식 I을 갖는 비-자연적 아미노산의 경우 상기에서 기재된 R 그룹의 구성성분과 동일한 목록에서 선택되거나, 뿐만 아니라 수소이다. 예를 들면, 본 발명의 비-자연적 아미노산은 화학식 II 및 III로 도시된 바와 같이 아미노 또는 카르복실 그룹에 임의선택적으로 치환을 포함한다. 이러한 유형의 비-자연적 아미노산에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 20개의 일반 자연 아미노산에 대응하는 측쇄 또는 비-자연적 측쇄를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 α-히드록시 산, α-티오산, α-아미노티오카르복실레이트. 추가로, α-탄소에서 치환에는 임의선택적으로 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: L, D, 또는 α-α-디치환된 아미노산 이를 테면, D-글루탐산염, D-알라닌, D-메틸-O-티로신, 아미노부틸산, 그리고 이와 유사한 것들. 다른 구조적 대체물에는 환형 아미노산, 이를 테면, 프롤린 유사체들, 뿐만아니라 3, 4,6, 7, 8, 그리고 9-구성원의 고리 프롤린 유사체, β 및 γ 아미노산 이를 테면, 치환된 β- 알라닌 및 γ-아미노 부틸산이 내포된다.

[0348] 많은 비-자연적 아미노산은 자연 아미노산, 이를 테면, 티로신, 글루타민, 페닐알라닌, 그리고 이와 유사한 것들에 기초하며, 본 발명에서 사용하는데 적합하다. 티로신 유사체들에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 파라-치환된 티로신, 오르소-치환된 티로신, 그리고 메타 치환된 티로신, 여기에서 치환된 티로신은 케토 그룹 (아세틸 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은), 벤조일 그룹, 아미노 그룹, 하이드라진, 히드록시아민, 티올 그룹, 카르복시 그룹, 이소프로필 그룹, 메틸 그룹, C_6-C_{20} 직쇄 쇄 또는 분기된 탄화수소, 포화된 또는 불포화된 탄화수소, O-메틸 그룹, 폴리에테르 그룹, 니트로 그룹, 알키닐 그룹 또는 이와 유사한 것들을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 추가로, 다중적으로 치환된 아릴 고리가 또한 고려된다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 글루타민 유사체에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: α-히드록시 유도체들, γ-치환된 유도체들, 환형 유도체들, 그리고 아미드 치환된 글루타민 유도체들. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 페닐알라닌 유사체의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 파라-치환된 페닐알라닌, 오르소-치환된 페닐알라닌, 그리고 메타-치환된 페닐알라닌, 여기에서 이 치환체는 히드록시 그룹, 메톡시 그룹, 메틸 그룹, 알릴 그룹, 알데히드, 아지도, 요오드, 브로모, 케토 그룹 (아세틸 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음), 벤조일, 알키닐 그룹, 또는 이와 유사한 것들을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 비-자연적 아미노산의 특정 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: *p*-아세틸-L-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcβ-세린, L-Dopa, 플로오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, *p*-요오드-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, 그리고 p-프로파르길옥시-페닐알라닌, 그리고 이와 유사한 것들. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 다양한 비-자연적 아미노산의 구조의 예들이 예를 들면, WO 2002/085923의 "In vivo incorporation of unnatural amino acids"에서 제공된다. Kiick et al., (2002) *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*, PNAS 99:19-24 (추가적으로 메티오닌 유사체의 경우 본원의 참고자료에 편입됨) 또한 참고. 국제 출원 PCT/US06/47822, "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides" (본원의 참고자료에 편입됨)에서는 p-아미노-페닐알라닌을 비롯한 그러나 이에

국한되지 않은 방향족 아민 모이어티의 환원성 알킬화 및 환원성 아민화를 기재하고 있다.

[0349] 본 발명의 또다른 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 갖는 TC 폴리펩티드는 공유적으로 변형된다. 생물학적 시스템의 다양한 기능에 직교하는 선택적 화학 반응은 화학 생물학에서 중요한 도구로 인식된다. 합성 화학의 레퍼토리에 상대적으로 신참으로서, 이러한 생체 직교 반응은 화합물 라이브러리 합성, 단백질 공학, 기능적 단백질체학 및 세포 표면의 화학적 리모델링을 위한 새로운 전략에 영감을 주었다. 아지드는 바이오콘쥬게이션을 위한 독특한 화학적 핸들로서 중요한 역할을 확보했다. Staudinger 결찰은 세포의 당-콘쥬게이트에 대사적으로 도입된 아지도-당을 태그하기 위해 포스핀과 함께 사용되었다. Staudinger 결찰은 생리학적 손상 없이 살아있는 동물에서 수행할 수 있지만; 그럼에도 불구하고 Staudinger 반응에 문제가 없는 것은 아니다. 필수 포스핀은 공기 산화에 취약하며, 개선된 수용해도 및 증가된 반응 속도를 위한 최적화는 종합적으로 어려운 것으로 입증되었다.

[0350] 상기 아지드 그룹은 생체직교 반응성의 대체 모드를 갖는다: Huisgen이 기술한 알킨과의 [3+2] 고리화 첨가. 고전적인 형태에서, 이 반응은 합리적인 반응 속도를 위해 높은 온도(또는 압력)가 필요하기 때문에 생물학적 시스템에 적용이 제한적이다. Sharpless와 동료들은 생리학적 온도와 풍부하게 기능화된 생물학적 환경에서 쉽게 진행되는 "클릭 화학"이라고 명명된 구리(I)-촉매된 버전의 개발로 이러한 장애를 극복했다. 이 발견은 복잡한 조직 용해물에서 바이러스 입자, 핵산 및 단백질의 선택적 변형을 가능하게 했다. 불행히도, 필수 구리 촉매는 박테리아와 포유류 세포 모두에 독성이 있어, 세포가 생존 가능한 상태로 유지되어야 하는 경우의 적용은 배제된다. 전자-철회 치환기에 의해 활성화된 알킨의 무-촉매 Huisgen 고리화 첨가는 주변 온도에서 발생하는 것으로 보고되었다. 그러나, 이들 화합물은 생물학적 친핵체와 Michael 반응을 겪는다.

[0351] 한 구체예에서, 비-자연적 아미노산 (이를 테면, *p*-(프로파르길옥시)-페닐알라닌)이 내포된 TC의 표적화 폴리펩티드 조성물이 제공된다. *p*-(프로파르길옥시)-페닐알라닌을 포함하는 다양한 조성물 및 단백질 및/또는 세포를 비롯한 그러나 이에 국한되지 않는 것들이 또한 제공된다. 한 측면에서, *p*-(프로파르길옥시)-페닐알라닌 비-자연적 아미노산이 내포된 조성물에는 정법 tRNA가 더 내포된다. 상기 비-자연적 아미노산은 상기 정법 tRNA에 결합(공유적으로, 그러나 이에 국한되지 않음)될 수 있고, 아미노-아실 결합을 통하여 상기 정법 tRNA에 공유적으로 결합될 수 있고, 상기 정법 tRNA의 말단 리보스 당의 3'OH 또는 2'OH에 공유적으로 결합될 수 있다.

[0352] 단백질에 통합될 수 있는 비-자연적 아미노산을 통한 화학적 모이어티는 단백질의 다양한 이점과 조작을 제공한다. 예를 들면, 케토 기능 그룹의 독특한 반응으로 시험관 내 및 생체 내에서 다수의 히드라진 또는 히드록실아민-함유 시약으로 단백질을 선택적으로 변형시킬 수 있다. 무거운 원자 비-자연적 아미노산, 예를 들면, X-선 구조 데이터의 위상을 결정하는 데 유용할 수 있다. 비-자연적 아미노산을 사용한 무거운 원자의 부위-특이적 도입은 무거운 원자의 위치 선택에 있어 선택성과 유연성을 또한 제공한다. 광반응 비-자연적 아미노산 (벤조페논 및 아릴아지드 (페닐아지드를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는) 측쇄를 갖는 아미노산, 그러나 이에 국한되지 않음)은 예를 들면, 단백질의 효율적인 생체 내 및 시험관 내 광교차연계를 허용한다. 광반응 비-자연적 아미노산의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: p-아지도-페닐알라닌 및 p-벤조일-페닐알라닌. 광반응성 비-자연적 아미노산을 갖는 단백질은 시간적-제어를 제공하는 광반응성 그룹의 여기에 의해 마음대로 가교될 수 있다. 하나의 예로서, 비-자연적 아미노산의 메틸 그룹은 핵 자기 공명 및 진동 분광법의 사용(이에 국한되지 않는)에 의한 국부 구조 및 역학의 프로브로서 동위원소적으로 라벨된 메틸 그룹(이에 국한되지 않는)으로 치환될 수 있다. 알키닐 또는 아지도 기능성 그룹은 예를 들면, [3+2] 사이클로추가 반응을 통하여 분자로 단백질의 선택적 변형이 가능하다.

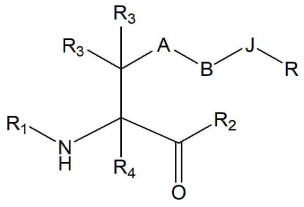
[0353] 폴리펩티드의 아미노 말단에 통합된 비-자연적 아미노산은 20개의 자연 아미노산에 이용되는 것 이외의 임의의 치환체인 R 그룹과 알파-아미노산에 일반적으로 존재하는 NH_2 그룹과는 상이한 제 2의 반응 그룹으로 구성될 수 있다. 유사한 비-자연적 아미노산은 알파-아미노산에 일반적으로 존재하는 COOH 그룹과는 상이한 제 2 반응 그룹과 함께 C-말단에 통합될 수 있다.

[0354] 본 발명의 비-자연적 아미노산은 20개의 자연 아미노산에서 이용할 수 없는 추가적인 특성을 제공하도록 선택되거나, 또는 설계될 수 있다. 예를 들면, 비-자연적 아미노산은 선택적으로 설계되거나 또는 선택되어, 단백질의 생물학적 특성, 예를 들어, 이들이 통합된 단백질의 생물학적 특성을 변형시킬 수 있다. 예를 들면, 비-자연적 아미노산이 단백질로 함입됨으로써 임의선택적으로 변형될 수 있는 속성은 다음과 같다: 독성, 생체분포, 용해도, 안정성, 예로써, 열, 가수분해, 산화, 효소 분해 저항성 및 이와 유사한 것들, 정제 및 처리 시설, 구조적 속성, 분광학적 속성, 화학적 및/또는 광화학적 속성 촉매 활성, 산화환원 전위, 반감기, 다른 분자와의 반응 능력 예로써, 공유적으로 또는 비-공유적으로, 그리고 이와 유사한 것들.

[0355] 일부 구체예들에서 본 발명은 옥심 결합에 의해 연계된 수용성 중합체, 예로써, PEG에 연계된 TC를 제공한다. 비-자연적으로 인코드된 아미노산의 많은 유형들이 옥심 결합 형성에 적합하다. 이들에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 비-자연적으로 인코드된 아미노산 함유하는 카르보닐, 디카르보닐, 또는 히드록실아민 그룹. 이러한 아미노산은 U.S. 특허 공개 번호 2006/0194256, 2006/0217532, 및 2006/0217289 그리고 WO 2006/069246의 "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides"에서 기재되고 있다(이들 문헌은 각 전문이 본원의 참고자료에 편입됨). 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 U.S. 특허 번호 7,083,970 및 U.S. 특허 번호 7,045,337 (이들의 전문이 본원의 참고자료에 편입됨)에 기재되어 있다.

[0356] 본 발명의 일부 구체예들은 하나 또는 그 이상의 위치에서 파라-아세틸페닐알라닌 아미노산으로 치환된 TC 폴리펩티드를 이용한다. p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성은 Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003) (본원의 참고자료에 편입됨)에 기재되어 있다. 다른 카르보닐-또는 디카르보닐-함유하는 아미노산은 당업자에 의해 유사하게 제조될 수 있다. 더욱이, 본원에 내포된 비-자연적 아미노산의 비-제안적인 예시적 합성은 U.S. 특허 번호 7,083,970 (이의 전문이 본원에서 제시됨)에 기재되어 있다.

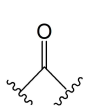
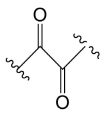
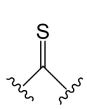
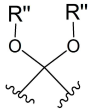
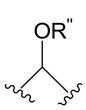
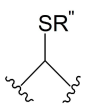
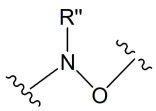
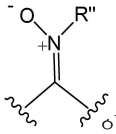
[0357] 친전자성 반응성 그룹이 있는 아미노산은 다른 것들 중에서 친핵성 부가 반응을 통해 분자를 연결하는 다양한 반응을 허용한다. 이러한 친전자성 반응 그룹에는 카르보닐 그룹 (케토 그룹 및 디카르보닐 그룹 내포), 카르보닐-유사 그룹 (카르보닐 그룹 (케토 그룹 및 디카르보닐 그룹 내포)와 유사한 반응을 하고, 카르보닐 그룹에 구조적으로 유사), 차폐된 카르보닐 그룹 (카르보닐 그룹 (케토 그룹 및 디카르보닐 그룹 내포)으로 용이하게 전환할 수 있는), 또는보호된 카르보닐 그룹 (탈보호기 카르보닐 그룹 (케토 그룹 및 디카르보닐 그룹 내포)과 유사한 반응성을 갖는)이 내포된다. 이러한 아미노산에는 화학식 (IV)의 구조를 갖는 아미노산이 내포된다:

[0358]  (IV),

[0359] 이때:

[0360] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

[0361] B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-$S(O)_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')C(O)O-,-$S(O)_k$N(R')-,-N(R')C(O)N(R')-,-N(R')C(S)N(R')-,-N(R')$S(O)_k$N(R')-,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,-$C(R')_2$-N=N-, 그리고-$C(R')_2$-N(R')-N(R')-로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

[0362] J는  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 또는  이며;

[0363] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0364] 각 R''은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 또는 보호 그룹이거나, 또는 하나 이상의 R'' 그룹이 존재할 경우, 두 개의 R''는 임의선택적으로 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0365] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0366] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

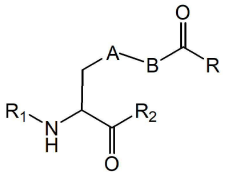
[0367] R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 H, 할로겐, 저가 알킬, 또는 치환된 저가 알킬, 또는 R_3과 R_4는, 또는 두 개의 R_3 그룹은 임의선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0368] 또는-A-B-J-R 그룹은 함께, 적어도 하나의 카르보닐 그룹 (디카르보닐 그룹을 비롯한), 보호된 카르보닐 그룹 (보호된 디카르보닐 그룹을 비롯한), 또는 차폐된 카르보닐 그룹 (차폐된 디카르보닐 그룹을 비롯한)을 포함하는 이-환형 또는 삼-환형 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0369] 또는-J-R 그룹은 함께, 적어도 하나의 카르보닐 그룹 (디카르보닐 그룹을 비롯한), 보호된 카르보닐 그룹 (보호된 디카르보닐 그룹을 비롯한), 또는 차폐된 카르보닐 그룹 (차폐된 디카르보닐 그룹을 비롯한)을 포함하는 일-환형 또는 이-환형 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0370] 단서 조항으로, A가 페닐렌이며, 각 R_3는 H, B가 존재할 때; 그리고 A가-$(CH_2)_4$-이며, 각 R_3는 H이며, B는-NHC(O)(CH_2CH_2)-이 아닐 때; 그리고 A 및 B가 존재하지 않을 때, 그리고 각 R_3는 H이며, R 메틸이 아니다.

[0371] 추가로, 화학식 (V)의 구조를 갖는 것들이 내포된다:

[0372]  (V),

[0373] 이때:

[0374] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

[0375] B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-$S(O)_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')C(O)O-,-$S(O)_k$N(R')-,-N(R')C(O)N(R')-,-N(R')C(S)N(R')-,-N(R')$S(O)_k$N(R')-,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,-$C(R')_2$-N=N-, 그리고-$C(R')_2$-N(R')-N(R')-로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

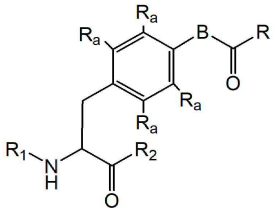
[0376] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0377] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0378] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0379] 단서 조항으로, A가 페닐렌이며, B가 존재할 때; 그리고 A가-$(CH_2)_4$-이며, B는-NHC(O)(CH_2CH_2)-가 아닐 때; 그리고 A 및 B가 존재하지 않을 때, R 메틸이 아니다.

[0380] 추가로, 화학식 (VI)의 구조를 갖는 것들이 내포된다:

[0381]  (VI),

[0382] 이때:

[0383] B는 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-$S(O)_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')C(O)O-,-$S(O)_k$N(R')-,-N(R')C(O)N(R')-,-N(R')C(S)N(R')-,-N(R')$S(O)_k$N(R')-,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,-$C(R')_2$-N=N-, 그리고-$C(R')_2$-N(R')-N(R')-로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

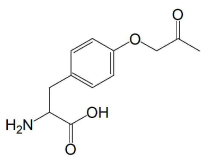
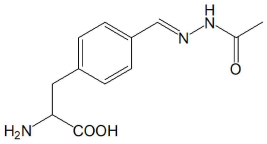
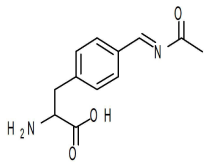
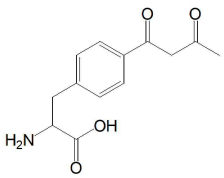
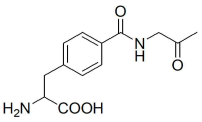
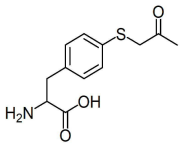
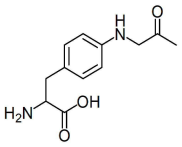
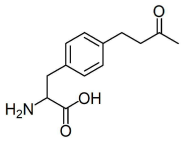
[0384] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0385] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

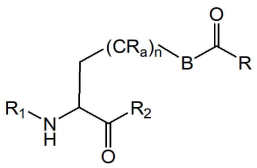
[0386] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0387] 각 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, -$N(R')_2$, -$C(O)_kR'$ (여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$C(O)N(R')_2$,-OR', 그리고-$S(O)_kR'$로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 각 R' 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이다.

[0388] 추가로, 다음 아미노산들이 내포된다:

[0389]  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 그리고  , 이때 이러한 화합물들은 임의선택적으로 아미노 보호된 그룹, 카르복실 보호된 또는 이의 염이다. 추가로, 다음 비-자연적 아미노산들중 임의의 것은 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 통합될 수 있다.

[0390] 추가로, 화학식 (VII)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0391]  (VII)

[0392] 이때

[0393] B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케

닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-$S(O)_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')C(O)O-,-$S(O)_k$N(R')-,-N(R')C(O)N(R')-,-N(R')C(S)N(R')-,-N(R')$S(O)_k$N(R')-,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,-C(R')$_2$-N=N-, 그리고-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

[0394] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

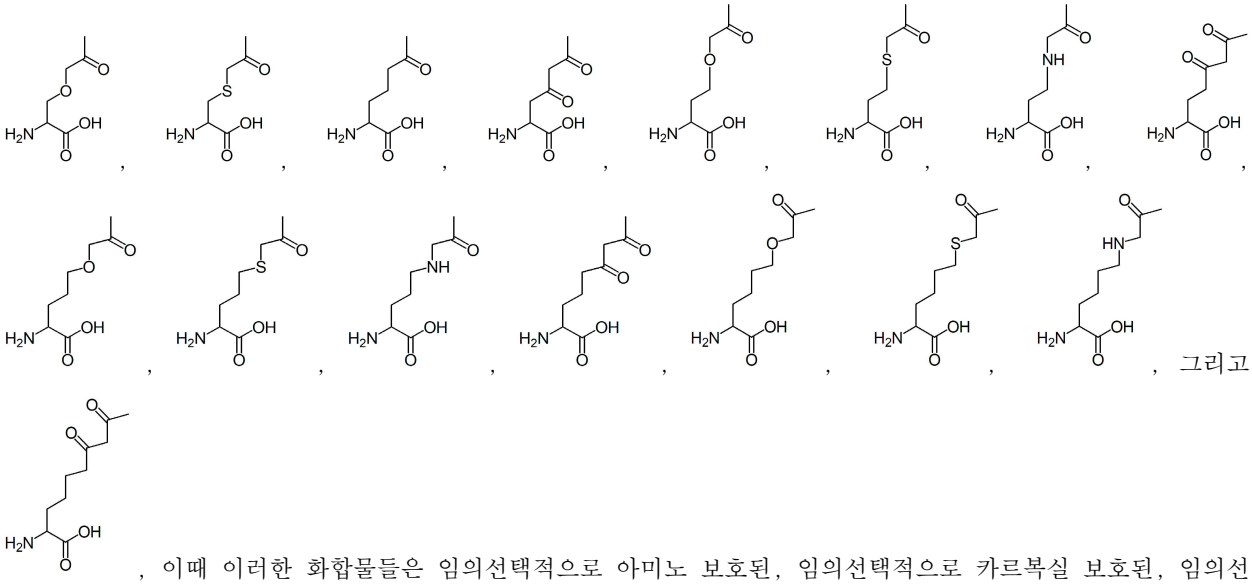
[0395] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0396] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

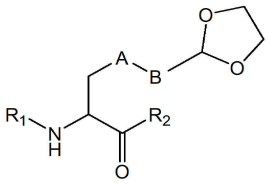
[0397] 각 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬,-N(R')$_2$,-C(O)$_k$R' (여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-C(O)N(R')$_2$,-OR', 그리고-S(O)$_k$R'로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 각 R' 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며; 그리고 n은 0 ~ 8이고;

[0398] 단서 조항으로, A가-$(CH_2)_4$-인 경우, B는-NHC(O)(CH_2CH_2)-이 아니다.

[0399] 추가로, 다음 아미노산들이 내포된다:

[0400]  , 이때 이러한 화합물들은 임의선택적으로 아미노 보호된, 임의선택적으로 카르복실 보호된, 임의선택적으로 아미노 보호된, 그리고 카르복실 보호된, 또는 이의 염이다. 추가로, 이들 비-자연적 아미노산 및 다음 비-자연적 아미노산들중 임의의 것들은 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 통합될 수 있다.

[0401] 추가로, 화학식 (VIII)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0402]  (VIII),

[0403] 이때 A는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌,

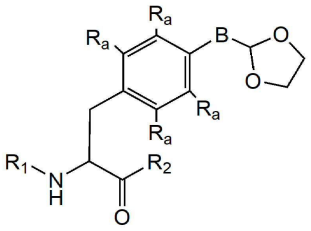
헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

[0404] B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-$S(O)_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')C(O)O-,-$S(O)_k$N(R')-,-N(R')C(O)N(R')-,-N(R')C(S)N(R')-,-N(R')$S(O)_k$N(R')-,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,-$C(R')_2$-N=N-, 그리고-$C(R')_2$-N(R')-N(R')-로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

[0405] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0406] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0407] 추가로, 화학식 (IX)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0408]  (IX),

[0409] B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-$S(O)_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')C(O)O-,-$S(O)_k$N(R')-,-N(R')C(O)N(R')-,-N(R')C(S)N(R')-,-N(R')$S(O)_k$N(R')-,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,-$C(R')_2$-N=N-, 그리고-$C(R')_2$-N(R')-N(R')-로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

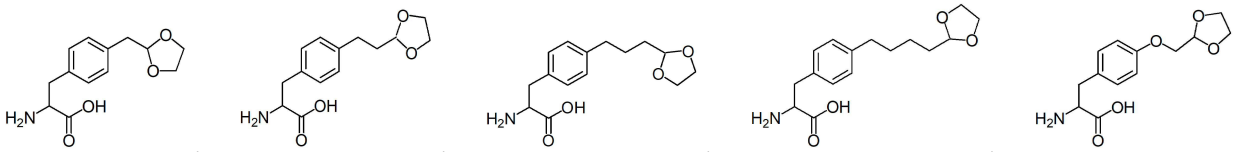
[0410] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

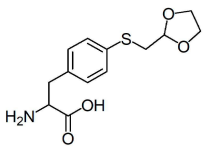
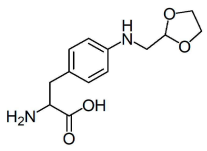
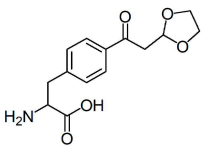
[0411] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0412] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

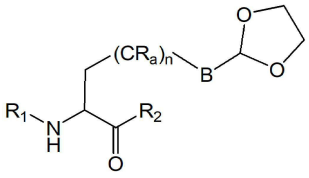
[0413] 이때 각 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬,-$N(R')_2$,-$C(O)_kR'$ (여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-$C(O)N(R')_2$,-OR', 그리고-$S(O)_kR'$로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 각 R' 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이다.

[0414] 추가로, 다음 아미노산들이 내포된다:

[0415] 


,

, 및

, 이때 이러한 화합물들은 임의선택적으로 아미노 보호된, 임의선택적으로 카르복실 보호된, 임의선택적으로 아미노 보호된, 그리고 카르복실 보호된, 또는 이의 염이다. 추가로, 이들 비-자연적 아미노산 및 다음 비-자연적 아미노산들중 임의의 것들은 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 통합될 수 있다.

[0416] 추가로, 화학식 (X)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0417] 
(X),

[0418] 이때 B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S(O)$_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-S(O)$_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')C(O)O-,-S(O)$_k$N(R')-,-N(R')C(O)N(R')-,-N(R')C(S)N(R')-,-N(R')S(O)$_k$N(R')-,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,-C(R')$_2$-N=N-, 그리고-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

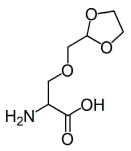
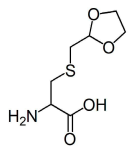
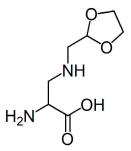
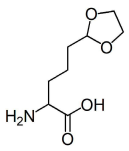
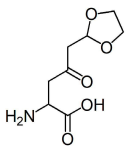
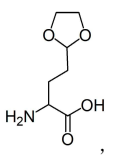
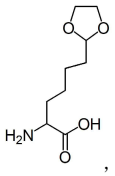
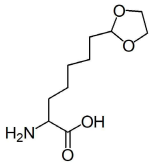
[0419] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0420] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0421] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0422] 각 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬,-N(R')$_2$,-C(O)$_k$R' (여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),-C(O)N(R')$_2$,-OR', 그리고-S(O)$_k$R'로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 각 R' 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며; 그리고 n은 0 ~ 8이고;

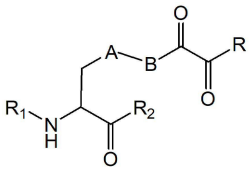
[0423] 추가로, 다음 아미노산들이 내포된다:

[0424] 
,

,

,

,

,

,

, 그리고

, 이때 이러한 화합물들은 임의선택적으로 아미노 보호된, 임의선택적으로 카르복실 보호된, 임의선택적으로 아미노 보호된 그리고 카르복실 보호된, 또는 이의 염이다. 추가로, 이들 비-자연적 아미노산 및 다음 비-자연적 아미노산들중 임의의 것들은 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 통합될 수 있다.

[0425] 단일카르보닐 구조에 추가로, 본원에 기재된 비-자연적 아미노산에는 이를 테면, 디카르보닐, 디카르보닐 유사,

차폐된 디카르보닐 및 보호된 디카르보닐 그룹과 같은 것들이 내포될 수 있다.

[0426] 예를 들면, 화학식 (XI)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:



[0427] (XI),

[0428] 이때 A는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

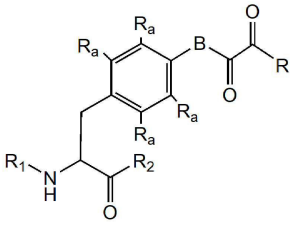
[0429] B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,$-S(O)_k-$(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),$-S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,$-N(R')C(O)O-$,$-S(O)_kN(R')-$,$-N(R')C(O)N(R')-$,$-N(R')C(S)N(R')-$,$-N(R')S(O)_kN(R')-$,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,$-C(R')_2-N=N-$, 그리고$-C(R')_2-N(R')-N(R')-$로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

[0430] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0431] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0432] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0433] 추가로, 화학식 (XII)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:



[0434] (XII),

[0435] B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,$-S(O)_k-$(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),$-S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,$-N(R')C(O)O-$,$-S(O)_kN(R')-$,$-N(R')C(O)N(R')-$,$-N(R')C(S)N(R')-$,$-N(R')S(O)_kN(R')-$,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,$-C(R')_2-N=N-$, 그리고$-C(R')_2-N(R')-N(R')-$로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

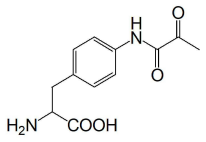
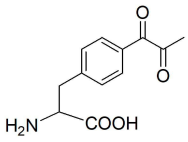
[0436] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0437] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

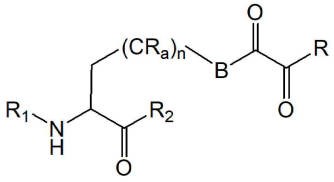
[0438] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0439] 이때 각 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬,$-N(R')_2$,$-C(O)_kR'$ (여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),$-C(O)N(R')_2$,-OR', 그리고$-S(O)_kR'$로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 각 R' 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이다.

[0440] 추가로, 다음 아미노산들이 내포된다:

[0441]  및  , 이때 이러한 화합물들은 임의선택적으로 아미노 보호된, 임의선택적으로 카르복실 보호된, 임의선택적으로 아미노 보호된 그리고 카르복실 보호된, 또는 이의 염이다. 추가로, 이들 비-자연적 아미노산 및 다음 비-자연적 아미노산들중 임의의 것들은 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 통합될 수 있다.

[0442] 추가로, 화학식 (XIII)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0443]  (XIII),

[0444] 이때 B는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 저가 헤테로알킬렌,-O-,-O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-S-,-S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,$-S(O)_k$-(여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),$-S(O)_k$(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)-,-C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(S)-,-C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')-,-NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-C(O)N(R')-,-CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-CSN(R')-,-CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,-N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,$-N(R')C(O)O-$,$-S(O)_kN(R')-$,$-N(R')C(O)N(R')-$,$-N(R')C(S)N(R')-$,$-N(R')S(O)_kN(R')-$,-N(R')-N=,-C(R')=N-,-C(R')=N-N(R')-,-C(R')=N-N=,$-C(R')_2-N=N-$, 그리고$-C(R')_2-N(R')-N(R')-$로 구성된 그룹에서 선택된 링커이며; 여기에서 각 R'는 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며;

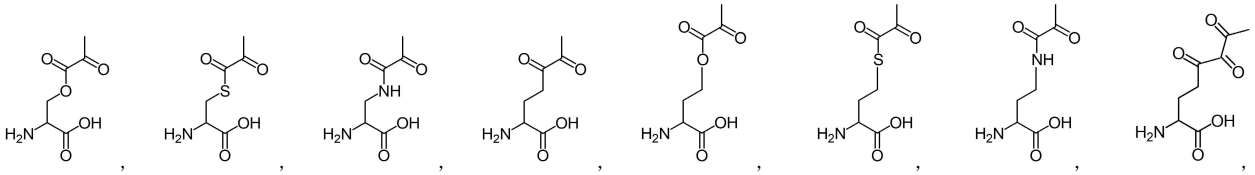
[0445] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

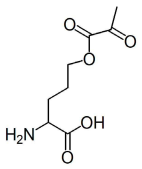
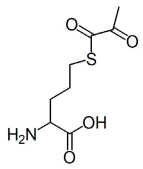
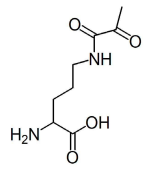
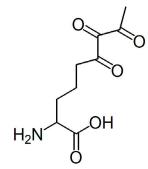
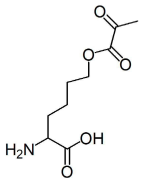
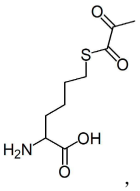
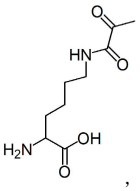
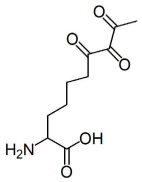
[0446] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0447] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

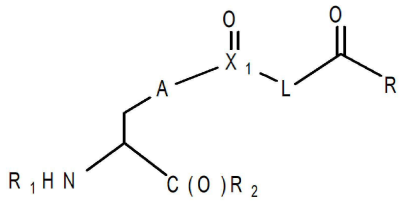
[0448] 각 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬,$-N(R')_2$,$-C(O)_kR'$ (여기에서 k는 1, 2, 또는 3임),$-C(O)N(R')_2$,-OR', 그리고$-S(O)_kR'$로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 각 R' 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이며; 그리고 n은 0 ~ 8이고;

[0449] 추가로, 다음 아미노산들이 내포된다:

[0450] 








, 그리고  , 이때 이러한 화합물들은 임의선택적으로 아미노 보호된, 임의선택적으로 카르복실 보호된, 임의선택적으로 아미노 보호된 그리고 카르복실 보호된, 또는 이의 염이다. 추가로, 이들 비-자연적 아미노산 및 다음 비-자연적 아미노산들중 임의의 것들은 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 통합될 수 있다.

[0451] 추가로, 화학식 (XIV)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:



[0452] (XIV);

[0453] 이때:

[0454] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

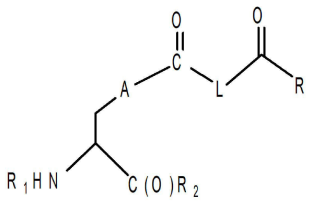
[0455] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0456] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0457] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0458] X_1은 C, S, 또는 S(O)이며; 그리고 L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, 여기에서 R'는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0459] 추가로, 화학식 (XIV-A)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:



[0460] (XIV-A)

[0461] 이때:

[0462] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

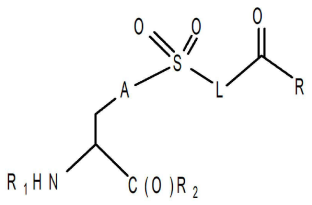
[0463] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0464] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0465] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0466] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, 여기에서 R'는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0467] 추가로, 화학식 (XIV-B)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0468] 

(XIV-B)

[0469] 이때:

[0470] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

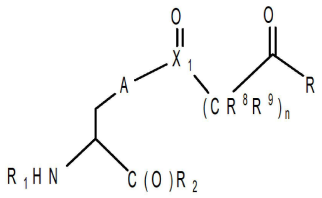
[0471] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0472] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0473] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0474] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, 여기에서 R'는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0475] 추가로, 화학식 (XV)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0476] 

(XV);

[0477] 이때:

[0478] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

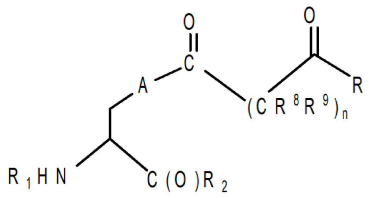
[0479] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0480] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0481] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0482] X_1은 C, S, 또는 S(O)이며 ; 그리고 n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이며; 그리고 각 CR^8R^9 그룹 상에서 각 R^8 및 R^9은 H, 알콕시, 알킬아민, 할로겐, 알킬, 아릴로 구성된 그룹에서 독립적으로 선택되거나, 또는 임의의 R^8 및 R^9는 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성하거나, 또는 인접 R^8 그룹에 대해 임의의 것은 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0483] 추가로, 화학식 (XV-A)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0484] 

(XV-A)

[0485] 이때:

[0486] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

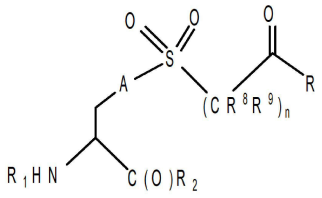
[0487] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0488] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0489] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0490] n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이며; 그리고 각 CR^8R^9 그룹 상에서 각 R^8 및 R^9은 H, 알콕시, 알킬아민, 할로겐, 알킬, 아릴로 구성된 그룹에서 독립적으로 선택되거나, 또는 임의의 R^8 및 R^9는 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성하거나, 또는 인접 R^8 그룹에 대해 임의의 것은 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0491] 추가로, 화학식 (XV-B)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0492] 

(XV-B)

[0493] 이때:

[0494] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

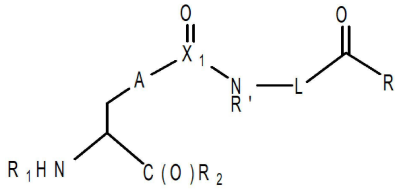
[0495] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0496] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0497] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0498] n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이며; 그리고 각 CR^8R^9 그룹 상에서 각 R^8 및 R^9은 H, 알콕시, 알킬아민, 할로겐, 알킬, 아릴로 구성된 그룹에서 독립적으로 선택되거나, 또는 임의의 R^8 및 R^9는 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성하거나, 또는 인접 R^8 그룹에 대해 임의의 것은 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0499] 추가로, 화학식 (XVI)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0500]  (XVI);

[0501] 이때:

[0502] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

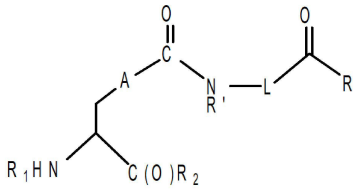
[0503] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0504] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0505] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0506] X_1은 C, S, 또는 S(O)이며; 그리고 L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, 여기에서 R'는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0507] 추가로, 화학식 (XVI-A)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0508]  (XVI-A)

[0509] 이때:

[0510] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

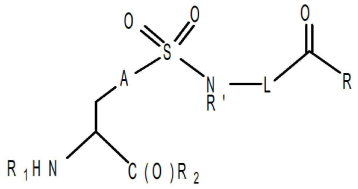
[0511] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0512] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0513] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0514] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, 여기에서 R'는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0515] 추가로, 화학식 (XVI-B)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0516]  (XVI-B)

[0517] 이때:

[0518] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

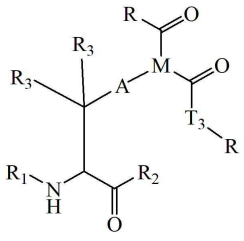
[0519] R는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0520] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0521] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

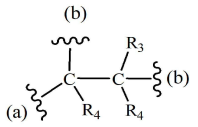
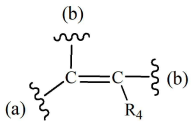
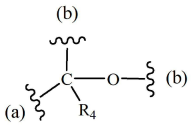
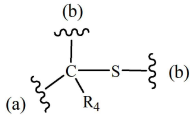
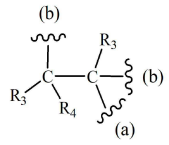
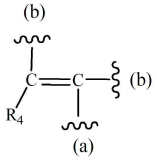
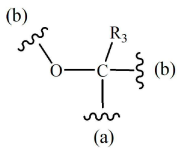
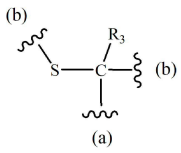
[0522] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이며, 여기에서 R'는 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0523] 추가로, 화학식 (XVII)의 구조를 갖는 것들이 내포된다:

[0524]  (XVII),

[0525] 이때:

[0526] A는 임의선택적이며, 그리고 존재한다면, 저가 알킬렌, 치환된 저가 알킬렌, 저가 사이클로알킬렌, 치환된 저가 사이클로알킬렌, 저가 알케닐렌, 치환된 저가 알케닐렌, 알키닐렌, 저가 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저가 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저가 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아릴킬렌, 또는 치환된 아릴킬렌이며;

[0527] M은-$C(R_3)$-,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 또는  이며, 여기에서 (a)는 A 그룹에 결합을 나타내고 (b)는 각 카르보닐 그룹에 결합을 나타내고, R_3 및 R_4는 독립적으로 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R_3과 R_4 는, 또는 두 개 R_3 그룹 또는 두 개 R_4 그룹은 임의선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

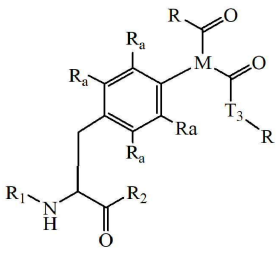
[0528] R는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0529] T_3은 결합, C(R)(R), O, 또는 S이며, 그리고 R는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

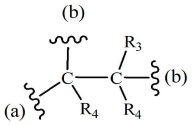
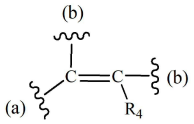
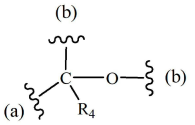
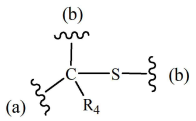
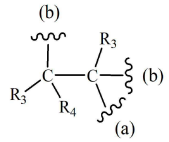
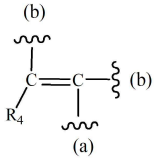
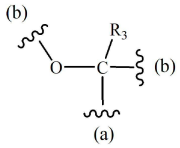
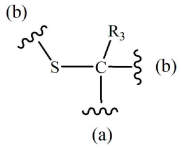
[0530] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0531] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이다.

[0532] 추가로, 화학식 (XVIII)의 구조를 갖는 것들이 내포된다:

[0533]  (XVIII),

[0534] 이때:

[0535] M은 $-C(R_3)-$,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 또는  이며, 여기에서 (a)는 A 그룹에 결합을 나타내고 (b)는 각 카르보닐 그룹에 결합을 나타내고, R_3 및 R_4는 독립적으로 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R_3과 R_4는 또는 두 개 R_3 그룹 또는 두 개 R_4 그룹은 임의선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0536] R는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

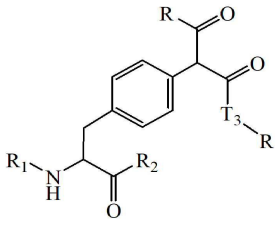
[0537] T_3은 결합, C(R)(R), O, 또는 S이며, 그리고 R는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0538] R_1은 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, H, 아미노 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며; 그리고

[0539] R_2는 임의선택적이며, 그리고 존재할 경우, OH, 에스테르 보호 그룹, 수지, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드이며;

[0540] 각 R_a 는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (여기에서 k는 1, 2, 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, 그리고 $-S(O)_kR'$로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며, 여기에서 각 R' 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이다.

[0541] 추가로, 화학식 (XIX)의 구조를 갖는 것들이 내포된다:

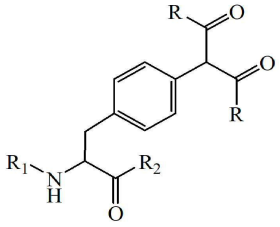
[0542]  (XIX),

[0543] 이때:

[0544] R는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며; 그리고

[0545] T_3은 O, 또는 S이다.

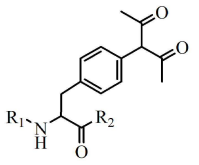
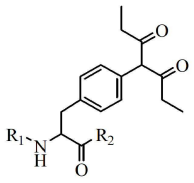
[0546] 추가로, 화학식 (XX)의 구조를 갖는 것들이 내포된다:

[0547]  (XX),

[0548] 이때:

[0549] R는 H, 할로겐, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0550] 추가로, 화학식 (XXI)의 구조를 갖는 다음 아미노산들이 내포된다:

[0551]  , 그리고  .

[0552] 일부 구체예들에서, 비-자연적 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 반응성 카르보닐 또는 디카르보닐 기능성 그룹을 생성하도록 화학적으로 변형된다. 예를 들면, 콘쥬게이션 반응에 유용한 알데히드 기능 그룹은 인접한 아미노 그룹과 히드록실 그룹을 갖는 기능 그룹로부터 생성될 수 있다 여기에서 생물학적으로 활성 분자는 폴리펩티드, 예를 들면, N-말단 세린 또는 트레오닌 (일반적으로 존재하거나, 또는 화학적 또는 효소적 절단을 통해 노출될 수 있는)을 이용하여 과요오드산염을 사용하여 순한 산화성 절단 조건에서 알데히드 기능 그룹을 만들 수 있다. 예로써, Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994) 참고. 그러나, 당업계에 공지된 방법은 펩티드 또는 단백질의 N-말단에 있는 아미노산으로 국한된다.

[0553] 본 발명에서, 인접한 히드록실 그룹 및 아미노 그룹을 품고 있는 비-자연적 아미노산은 "차폐된" 알데히드 기능 그룹로서 폴리펩티드에 통합될 수 있다. 예를 들면, 5-히드록시리신은 엡실론 아민에 인접한 하이드록실 그룹을 품고 있다. 알데히드를 생성하기 위한 반응 조건은 전형적으로 폴리펩티 내의 다른 부위에서 산화를 피하기 위해, 순한 조건 하에서 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가하는 것을 포함한다. 산화 반응의 pH는 일반적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 약 1.5몰 과량의 메타과요오드산나트륨을 폴리펩티드의 완충된 용액에 첨가한 다음, 암실에서 약 10분 동안 항온처리하는 것과 관련된다. 예로써 U.S. 특허 번호 6,423,685 참고.

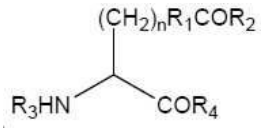
[0554] 카르보닐 또는 디카르보닐 기능 그룹은 수용액에서 순한 조건 하에 선택적으로 히드록실아민-함유하는 시약과 반응하여 생리학적 조건 하에 안정적인 대응하는 옥심 링키지를 만들 수 있다. 예로써, Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995) 참고. 더욱이, 카르보닐 그룹 또는 디카르보닐 그룹의 독특한 반응성은 다른 아미노산 측쇄의 존재 하에 선택적 변형을 허용한다. 예로써, Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)

참고.

[0555] **A.카르보닐 반응 그룹**

[0556] 카르보닐 반응 그룹을 갖는 아미노산은 그중에서도 특히 친핵성 첨가 또는 알돌 축합 반응을 통해 분자 (PEG 또는 기타 수용성 분자를 포함하나, 이에 국한되지 않음)를 연결하는 다양한 반응을 허용한다.

[0557] 예시적인 카르보닐-함유하는 아미노산은 다음과 같이 제시될 수 있다:

[0558] 

[0559] 이때 n은 0-10이며; R_1는 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이며; R_2는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 및 치환된 아릴이며; 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹이며, 그리고 R_4는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이며, R_2는 단순 알킬 (즉, 메틸, 에틸, 또는 프로필)이며, 케톤 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라(*para*) 위치에 있다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이며, R_2는 단순 알킬 (즉, 메틸, 에틸, 또는 프로필)이며, 케톤 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 메타(*meta*) 위치에 있다.

[0560] *p*-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 *m*-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성은 Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)(본원의 참고자료에 편입됨)에 기재되어 있다. 다른 카르보닐-함유하는 아미노산은 당업자에 의해 유사하게 제조될 수 있다.

[0561] 일부 구체예들에서, 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 반응성 카르보닐 기능성 그룹을 생성하도록 화학적으로 변형된다. 예를 들면, 콘쥬게이션 반응에 유용한 알데히드 기능 그룹은 인접한 아미노 그룹과 히드록실 그룹을 갖는 기능 그룹로부터 생성될 수 있다 여기에서 생물학적으로 활성 분자는 폴리펩티드, 예를 들면, N-말단 세린 또는 트레오닌 (일반적으로 존재하거나, 또는 화학적 또는 효소적 절단을 통해 노출될 수 있는)을 이용하여 과요오드산염을 사용하여 순한 산화성 절단 조건에서 알데히드 기능 그룹을 만들 수 있다. *예로써*, Gaertner, *et al., Bioconjug. Chem.* 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Gaertner *et al., J. Biol. Chem.* 269:7224-7230 (1994) 참고. 그러나, 당업계에 공지된 방법은 펩티드 또는 단백질의 N-말단에 있는 아미노산으로 국한된다.

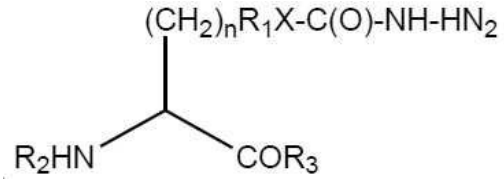
[0562] 본 발명에서, 인접한 히드록실 그룹 및 아미노 그룹을 품고 있는 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 "차폐된" 알데히드 기능 그룹로서 폴리펩티드에 통합될 수 있다. 예를 들면, 5-히드록시리신은 엡실론 아민에 인접한 하이드록실 그룹을 품고 있다. 알데히드를 생성하기 위한 반응 조건은 전형적으로 폴리펩티 내의 다른 부위에서 산화를 피하기 위해, 순한 조건 하에서 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가하는 것을 포함한다. 산화 반응의 pH는 일반적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 약 1.5몰 과량의 메타과요오드산나트륨을 폴리펩티드의 완충된 용액에 첨가한 다음, 암실에서 약 10분 동안 항온처리하는 것과 관련된다. *예로써* U.S. 특허 번호 6,423,685 (본원의 참고자료에 편입됨) 참고.

[0563] 카르보닐 기능 그룹은 수성 용액에서 순한 조건 하에서 선택적으로 하이드라진-, 하이드라지드-, 히드록실아민-, 또는 세미카르바자이드-함유하는 시약과 반응하여 생리학적 상태에서 안정적인 대응하는 히드라존, 옥심, 또는 세미카르바존 링키지를 차례로 만들 수 있다. *예로써,* Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995) 참고. 더욱이, 더욱이, 카르보닐 그룹의 독특한 반응성은 다른 아미노산 측쇄의 존재 하에 선택적 변형을 허용한다. *예로써*, Cornish, V. W., *et al., J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., *et al., Science* 276:1125-1128 (1997) 참고.

[0564] **B.하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바자이드 반응 그룹**

[0565] 친핵성 그룹, 이를 테면, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바자이드를 함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 다양한 친전자성 그룹과 반응하여, 콘쥬게이트 (PEG 또는 다른 수용성 중합체를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)가 형성되도록 한다.

[0566] 예시적인 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바자이드-함유하는 아미노산은 다음과 같이 제시될 수 있다:

[0567] 

[0568] 이때 n은 0-10이며; R_1는 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 또는 존재하지 않고; X는 O, N, 또는 S이거나, 또는 존재하지 않고; R_2는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹이며, 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다.

[0569] 일부 구체예들에서, n은 4이며, R_1은 존재하지 않고, 그리고 X는 N이다. 일부 구체예들에서, n은 2이며, R_1은 존재하지 않고, 그리고 X는 존재하지 않는다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이며, X는 O이고, 그리고 산소 원자는 아릴 고리 상의 알파 그룹에 대해 *파라*에 위치한다.

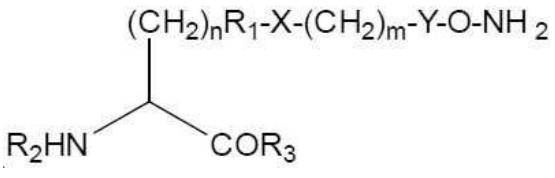
[0570] 하이드라지드-, 하이드라진-, 그리고 세미카르바자이드-함유하는 아미노산은 상업적 공급원으로부터 이용가능하다. 예를 들면, L-글루탐산염-□-하이드라지드는 Sigma Chemical (St. Louis, MO)으로부터 이용가능하다. 상업적으로 입수할 수 없는 다른 아미노산은 당업자에 의해 제조될 수 있다. *예로써,* U.S. 특허 번호 6,281,211 (본원의 참고자료에 편입됨) 참고.

[0571] 하이드라지드, 하이드라진 또는 세미카르바자이드 기능 그룹을 품고 있는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 함유하는 폴리펩티드는 알데히드 또는 유사한 화학 반응성을 가진 기타 기능 그룹을 함유하는 다양한 분자와 효율적이고 선택적으로 반응할 수 있다. *예로써,* Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995) 참고. 하이드라지드, 하이드라진 및 세미카르바자이드 기능 그룹의 독특한 반응성으로 인해, 20개의 일반적인 아미노산에 있는 친핵성 그룹 (세린 또는 트레오닌의 히드록실 그룹, 또는 리신의 아미노 그룹 및 N-말단을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)에 비교하여, 알데히드, 케톤 및 기타 친전자성 그룹에 대해 훨씬 더 반응성이 높다.

[0572] **C.아미노옥시-함유하는 아미노산**

[0573] 아미노옥시(히드록실아민이라고도 불림)를 함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 다양한 친전자성 그룹과 반응하여, 콘쥬게이트 (PEG 또는 다른 수용성 중합체를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)를 형성할 수 있도록 한다. 하이드라진, 하이드라지드 및 세미카르바자이드와 마찬가지로, 상기 아미노옥시 그룹의 강화된 친핵성은 알데히드 또는 유사한 화학 반응성을 가진 다른 기능 그룹을 함유하는 다양한 분자와 효과적으로, 그리고 선택적으로 반응할 수 있도록 한다. *예로써,* Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001) 참고. 반면 하이드라진 그룹과의 반응 결과는 대응하는 히드라존이 존재하지만, 그러나, 옥심은 아미노옥시 그룹과 카르보닐-함유하는 그룹 이를 테면, 케톤과의 반응으로부터 일반적으로 생성된다.

[0574] 아미노옥시 그룹을 함유하는 예시적인 아미노산은 다음과 같이 제시될 수 있다:

[0575] 

[0576] 이때 n은 0-10이며; R_1는 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 또는 존재하지 않고; X는 O, N, S이거나, 또는 존재하지 않고; m은 0-10이며; Y = C(O), 또는 존재하지 않고; R_2는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹이며, 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이며, X는 O이며, m은 1이고, 그리고 Y는 존재한다. 일부 구체예들에서, n은 2이고, R_1 및 X는 존재하지 않고, m은 0이고, 그리고 Y는 존재하지 않는다.

[0577] 아미노옥시-함유하는 아미노산은 용이하게 이용가능한 아미노산 전구체 (호모세린, 세린 및 트레오닌)로부터 만들 수 있다. *예로써,* M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003) 참고. 특정 아미노옥시-함유하는 아미노산, 이를 테면, L-2-아미노-4-(아미노옥시)부틸산)은 자연 공급처로부터 단리되었다 (Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997). 다른 아미노옥시-함유하는 아미노산은 당업자에 의해 제조될 수 있다.

[0578] **D.아지드 그룹과 알킨 반응 그룹**

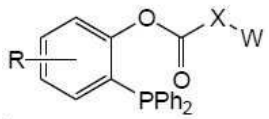
[0579] 아지드 그룹과 알킨 기능 그룹의 독특한 반응성으로 인해 폴리펩티드 및 기타 생물학적 분자의 선택적 변형을 매우 유용하게 만든다. 유기 아지드, 특히 알파틱(alphatic) 아지드 및 알킨은 통상적인 반응성 화학 조건에 대해 일반적으로 안정적이다. 특히, 아지드 기능 그룹과 알킨 기능 그룹은 자연-발생적 폴리펩티드에서 볼 수 있는 20개 일반 아미노산의 측쇄 (즉, R 그룹)에 대해 비활성이다. 그러나, 가까이 보면, 아지드 그룹과 알킨 그룹의 "스프링-로딩된(spring-loaded)" 특성이 드러나고, 그리고 이들은 그들은 Huisgen [3+2] 사이클로추가 반응을 통해 선택적이고, 효율적으로 반응하여 대응하는 트리아졸을 만든다. *예로써*, Chin J., *et al.*, *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002) 참고.

[0580] 상기 Huisgen 사이클로추가 반응은 친핵성 치환보다는 선택적 사이클로추가 반응 (*예로써,* Padwa, A., in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176)이 관련되기 때문에, 아지드 및 알킨-함유하는 측쇄를 품고 있는 비-자연적으로 인코드된 아미노산의 통합은 생성된 폴리펩티드가 비-자연적으로 인코딩된 아미노산의 위치에서 선택적으로 변형되도록 허용한다. 아지드 또는 알킨-함유하는 TC가 연루된 사이클로추가 반응은 Cu(II)를 Cu(I)로 환원시키는 환원 제제 (그 자리에서, 촉매량으로) 존재 하에서 Cu(II) ($CuSO_4$의 촉매량, 그러나 이에 국한되지 않음)를 추가함으로써 수성 조건, 실온에서 실행될 수 있다. *예로써*, Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., *et al.*, *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002) 참고. 예시적인 환원 제제에는 아스코르브산염, 금속성 구리, 퀴닌, 하이드로퀴논, 비타민 K, 글루타티온, 시스테인, Fe^{2+}, Co^{2+}, 및 인가 전위 (applied electric potential)가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0581] 일부 경우들에서, 여기에서 아지드와 알킨 간에 Huisgen [3+2] 사이클로추가 반응이 바람직한 일부 경우들에서, 상기 TC는 알킨 모이어티를 포함하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 상기 아미노산에 부착될 수용성 중합체는 아지드 모이어티를 포함한다. 대안으로, 역-반응(즉, 아미노산 상의 아지드 부분과 수용성 중합체 상에 존재하는 알킨 부분과의 반응이 또한 수행될 수 있다.

[0582] 상기 아지드 기능 그룹은 아릴 에스테르를 함유하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고, 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 기능화되어, 아미드 링키지를 만들 수 있다. 상기 아릴 포스핀 그룹은 제자리에서(*in situ*) 아지드를 환원시키고, 그 다음 생성된 아민은 근위 에스테르 결합과 효율적으로 반응하여 대응하는 아미드를 만든다. *예로써*, E. Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000) 참고. 상기 아지드-함유하는 아미노산은 알킬 아지드 (2-아미노-6-아지도-1-헥사논산을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는) 또는 아릴 아지드 (p-아지도-페닐알라닌)일 수 있다.

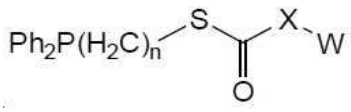
[0583] 아릴 에스테르 및 포스핀 모이어티를 함유하는 예시적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다:

[0584] 

[0585] 이때 X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않고, Ph는 페닐이며, W는 수용성 중합체이고, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 그룹일 수 있다. 예시적인 R 그룹에는-CH_2,-$C(CH_3)_3$,-OR',-NR'R'',-SR',-할로겐,-C(O)R',-CONR'R'',-$S(O)_2$R',-$S(O)_2$NR'R'',-CN 및-NO_2이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. R', R'', R''' 및 R''''은 각 독립적으로 수소, 치환된 또는 치환안된 헤테로알킬, 치환된 또는 치환안된 아릴 (1-3개 할로겐으로 치환된 아릴을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 치환된 또는 치환안된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 그룹, 또는 아릴알킬 그룹이다. 본 발명의 화합물에 하나 이상의 R 그룹이 내포될 때, 예를 들면, 각 R 그룹은

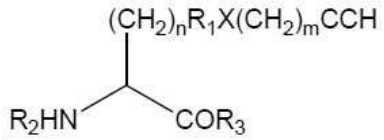
이들 그룹중 하나 이상이 존재할 때, 각 R', R'', R''' 및 R'''' 그룹과 같이 독립적으로 선택된다. R'과 R''가 두 개 R 그룹이 동일한 질소 원자에 부착될 때, 이들은 질소 원자와 조합되어, 5-, 6-, 또는 7-구성원의 고리를 형성한다. 예를 들면,-NR'R''는 1-피롤리디닐 및 4-몰포리닐이 내포되는 것을 의미하나, 이에 국한되지 않는다. 치환체에 대한 상기 논의로부터, 용어 "알킬"이란 수소 그룹이외의 다른 굽에 결합된 탄소 원자가 내포된 것을 의미한다는 것을 당업자는 인지할 것인데, 이를 테면, 할로알킬 (-CF_3 및-CH_2CF_3을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는) 및 아실 (-$C(O)CH_3$,-$C(O)CF_3$,-$C(O)CH_2OCH_3$, 그리고 이와 유사한 것들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)이다.

[0586] 상기 아지드 기능 그룹은 티오에스테르를 함유하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고, 아릴 포스핀 모이어티로 적절하게 기능화되어, 아미드 링키지를 만들 수 있다. 상기 아릴 포스핀 그룹은 제자리에서(*in situ*) 아지드를 환원시키고, 그 다음 생성된 아민은 티오에스테르 링키지와 효율적으로 반응하여 대응하는 아미드를 만든다. 티오에스테르 및 포스핀 모이어티를 함유하는 예시적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다:

[0587] 

[0588] 이때 n은 1-10이며; X는 O, N, S이거나, 또는 존재하지 않고, Ph은 페닐이며, 그리고 W는 수용성 중합체이다.

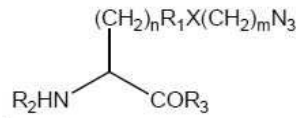
[0589] 예시적인 알킨-함유하는 아미노산은 다음과 같이 제시될 수 있다:

[0590] 

[0591] 이때 n은 0-10이며; R_1는 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 또는 존재하지 않고; X는 O, N, S이거나, 또는 존재하지 않고; m은 0-10이며, R_2는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹이며, 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이고, X는 존재하지 않고, m은 0이고, 아세틸렌 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라(para) 위치에 있다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이며, X는 O이며, m은 1이고, 프로파르길옥시 그룹은 알킬 측쇄에 대해 파라(para) 위치에 있다 (즉, O-프로파르길-티로신). 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1 및 X는 존재하지 않고, 그리고 m은 0이다 (즉, 프로파릴글리신).

[0592] 알킨-함유하는 아미노산은 시판되는 것을 이용할 수 있다. 예를 들면, 프로파르길글리신은 Peptech (Burlington, MA)에서 시판된다. 대안으로, 알킨-함유하는 아미노산을 표준 방법에 따라 만들 수 있다. 예를 들면, *p*-프로파르길옥시페닐알라닌은 예를 들면, Deiters, A., *et al., J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003)에서 기술된 바와 같이 합성할 수 있고, 4-알키닐-L-페닐알라닌은 Kayser, B., *et al., Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997)에서 기술된 바와 같이 합성할 수 있다. 다른 알킨-함유하는 아미노산은 당업자에 의해 제조될 수 있다.

[0593] 예시적인 아지드-함유하는 아미노산은 다음과 같이 제시될 수 있다:

[0594] 

[0595] 이때 n은 0-10이며; R_1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 또는 존재하지 않고; X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않고; m은 0-10이며; R_2는 H, 아미노산, 폴리펩티드, 또는 아미노 말단 변형 그룹, 그리고 R_3는 H, 아미노산, 폴리펩티드; 또는 카르복시 말단 변형 그룹이다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이며, X는 존재하지 않고, m은 0이고, 아지드 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라(*para*) 위치에 있다. 일부 구체예들에서, n은 0-4이고, R_1 및 X는 존재하지 않고, 그리고 m=0이다. 일부 구체예들에서, n은 1이고, R_1은 페닐이고, X

는 0이고, m은 2이며,-아지도에톡시 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라(*para*) 위치에 있다.

[0596] 아지드-함유하는 아미노산은 상업적 공급원으로부터 이용가능하다. 예를 들면, 4-아지도페닐알라닌은 Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL)로부터 구할 수 있다. 시판되지 않는 아지드-함유 아미노산의 경우, 상기 아지드 그룹은 당업자에게 공지된 표준 방법을 사용하여 비교적 쉽게 제조될 수 있는데, 적합한 이탈 그룹 (할로겐화물, 메실레이트, 토실레이트를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)의 변위를 통하여, 또는 적합하게 보호된 락톤의 개방을 통하여 제조될 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. *예로써*, Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York) 참조.

[0597] **E.아미노티올 반응 그룹**

[0598] 베타-치환된 아미노티올 기능성 그룹의 독특한 반응성으로 인하여 티아졸리딘을 통하여 폴리펩티드와 알데히드 그룹을 함유하는 다른 생물학적 분자의 선택적 변형에 매우 유용하다. *예로써*, J. Shao and J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899 참고. 일부 구체예들에서, 베타-치환된 아미노티올 아미노산이 TC 폴리펩티드로 통합되고, 그 다음 알데히드 기능 그룹을 포함하는 수용성 중합체와 반응하다. 일부 구체예들에서, 수용성 중합체, 약물 콘쥬게이트 또는 다른 페이로드는 베타-치환된 아미노티올 아미노산을 포함하는 TC의 표적화 폴리펩티드에 티아졸리딘 형성을 통하여 커플링될 수 있다.

[0599] **F.추가적으로 반응 그룹**

[0600] 본 발명의 TC 폴리펩티드에 통합될 수 있는 추가적으로 반응 그룹 및 비-자연적으로 인코드된 아미노산 (파라-아미노-페닐알라닌을 비롯한 그러나 이에 국한되지 않은)은 다음의 특허 출원에서 기술된다(이들은 본원 참고자료에 전문이 편입됨): U.S. 특허 공개 번호. 2006/0194256, U.S. 특허 공개 번호. 2006/0217532, U.S. 특허 공개 번호. 2006/0217289, U.S. 가특허 번호 60/755,338; U.S. 가특허 번호 60/755,711; U.S. 가특허 번호 60/755,018; 국제 특허 출원 번호. PCT/US06/49397; WO 2006/069246; U.S. 가특허 번호 60/743,041; U.S. 가특허 번호 60/743,040; 국제 특허 출원 번호. PCT/US06/47822; U.S. 가특허 번호 60/882,819; U.S. 가특허 번호 60/882,500; 그리고 U.S. 가특허 번호 60/870,594. 이들 출원은 콘쥬게이션을 위해 PEG 또는 다른 중합체 (히드록실아민 (아미노옥시) 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음) 상에 존재할 수 있는 반응 그룹을 또한 논의한다.

[0601] **TC 폴리펩티드 상에 비-자연적 아미노산의 위치**

[0602] 본원에서 기술되는 방법 및 조성물에는 본 발명의 TC를 만들기 위해 표적화 폴리펩티드로 하나 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산의 통합이 내포된다. 하나 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산은 상기 표적화 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않는 하나 또는 그 이상의 특정 위치로 통합될 수 있다. 이것은 "보존성" 치환 (소수성 아미노산을 비-자연적 또는 자연 소수성 아미노산으로 치환, 벌크(bulky) 아미노산을 비-자연적 또는 자연 벌크 아미노산으로 치환, 친수성 아미노산을 비-자연적 또는 자연 친수성 아미노산으로 치환을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은) 및/또는 활성에 필요하지 않는 위치에 비-자연적 아미노산을 삽입시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0603] 다양한 생화학적 접근법 및 구조적 접근법을 사용하여, TC의 표적화 폴리펩티드 내에서 비-자연적 아미노산으로의 치환을 위해 원하는 부위를 선택할 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적 아미노산은 상기 TLR-작용제 유도체의 C-말단에서 연계된다. 일부 구체예들에서, 상기 비-자연적 아미노산은 상기 TLR-작용제 유도체의 N-말단에서 연계된다. 상기 TC의 표적화 폴리펩티드의 임의의 위치는 비-자연적 아미노산을 통합시키기 위한 선택에 적합하고, 선택은 합리적 설계에 기초하거나 또는 임의의 또는 특별히 원하는 목적 없이 무작위 선택에 기초할 수 있다. 원하는 부위의 선택은 원하는 속성 또는 활성을 갖는 비-자연적 아미노산 폴리펩티드 (추가 변형되거나 또는 변형안된 상태로 유지될 수 있음) 생산에 기반될 수 있는데, 이때 원하는 속성 또는 활성에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 수용체 결합 조절자, 수용체 활성 조절자, 결합자 파트너에 결합하는 조절자, 결합 파트너 활성 조절자, 결합 파트너 형태 조절자, 이량체 또는 다량체 형성, 고유의 분자와 비교하여 활성 또는 속성에 변화없음, 또는 폴리펩티드의 임의의 물리적 또는 화학적 속성, 이를 테면, 용해도, 응집, 또는 안정성의 조정. 대안으로, 생물학적 활성에 중요한 것으로 확인된 부위는 또한 폴리펩티드에 대해 추구되는 원하는 활성에 따라, 비-자연적 아미노산으로의 치환에 대한 우수한 후보일 수 있다. 또다른 대안은 단순히 비-자연적 아미노산으로 폴리펩티드 쇄의 각 위치에서 일련의 치환을 만들고, 폴리펩티드의 활성에 대한 효과를 관찰하는 것이다. 임의의 폴리펩티드에 비-자연적 아미노산으로 임의의 치환을 위한 위치 선택을 위한 임의의 수단, 기술 또는 방법은 본원에 기재된 방법, 기술 및 조성물에 사용하기에 적합하다.

[0604] 결실을 함유하는 폴리펩티드의 자연-발생적 돌연변이체의 구조 및 활성은 비-자연적 아미노산으로의 치환에 대

해 내성이 있을 가능성이 있는 단백질 영역을 결정하기 위해 조사될 수 있다. 비-자연적 아미노산으로의 치환을 용인할 수 없는 잔기가 제거되면, 나머지 위치 각각에서 제안된 치환의 영향은 관련 폴리펩티드, 그리고 임의의 연합된 리간드들 또는 결합 단백질의 3-차원 구조를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 방법을 이용하여 검사할 수 있다. 많은 폴리펩티드의 X-선 결정학 및 NMR 구조는 단백질과 핵산의 큰 분자에 대한 3-차원 구조 데이터를 포함하는 중앙 집중식 데이터베이스인, Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org)에서 이용가능하며, 비-자연적 아미노산으로 치환될 아미노산 위치를 확인하는데 이용될 수 있다. 추가로, 3차원 구조 데이터를 사용할 수 없는 경우, 폴리펩티드의 2차 및 3차 구조를 조사하는 모델을 만들 수 있다. 따라서, 비-자연적 아미노산으로 치환될 수 있는 아미노산 위치의 실체를 용이하게 얻을 수 있다.

[0605] 비-자연적 아미노산의 통합을 위한 예시적인 부위에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 잠재적 수용체 결합 영역에서 제외되는 부위들, 또는 결합 단백질 또는 리간드들에 결합을 위한 영역이 완전하게 또는 부분적으로 용매 노출되거나, 주변 잔기들과 상호작용이 최소이거나, 또는 수소 결합 상호작용이 없거나, 주변 반응 잔기들에 최소한으로 노출될 수 있거나, 및/또는 특정 폴리펩티드와 이의 연합된 수용체, 리간드 또는 결합 단백질의 3-차원 결정 구조에 의해 예측된 바와 같이 매우 유연성이 큰 영역 내에 있다.

[0606] 다양한 비-자연적 아미노산이 폴리펩티드의 주어진 위치로 치환되거나, 또는 통합될 수 있다. 예로써, 특정 비-자연적 아미노산은 폴리펩티드와 이의 연합된 리간드, 수용체 및/또는 결합 단백질의 3-차원 결정 구조의 검사, 보존성 치환에 대한 선호도를 기반으로 통합을 위해 선택될 수 있다.

[0607] 한 구체예에서, 본원에 기재된 방법에는 비-자연적 아미노산을 TC의 표적화 폴리펩티드로 통합시키고, 여기에서 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 제 1 반응 그룹을 포함하며; 그리고 상기 TC의 표적화 폴리펩티드에 제 2 반응 그룹을 포함하는 분자 (제 2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 그리고 임의의 이의 조합을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)를 접촉시키는 것이 내포된다. 특정 구체예들에서, 상기 제 1 반응 그룹은 히드록실아민 모이어티이고, 상기 제 2 반응 그룹은 카르보닐 또는 디카르보닐 모이어티이며, 여기에서 옥심 링키지가 형성된다. 특정 구체예들에서, 상기 제 1 반응 그룹은 카르보닐 또는 디카르보닐 모이어티이며, 상기 제 2 반응 그룹은 히드록실아민 모이어티이며, 여기에서 옥심 링키지가 형성된다. 특정 구체예들에서, 상기 제 1 반응 그룹은 카르보닐 또는 디카르보닐 모이어티이며, 상기 제 2 반응 그룹은 옥심 모이어티이며, 여기에서옥심 교환 반응이 일어난다. 특정 구체예들에서, 상기 제 1 반응 그룹은 옥심 모이어티이며, 상기 제 2 반응 그룹은 카르보닐 또는 디카르보닐 모이어티이며, 여기에서옥심 교환 반응이 일어난다.

[0608] 일부 경우들에서, 비-자연적 아미노산이 통합되는 TC의 표적화 폴리펩티드은 해당 폴리펩티드에서 다른 추가, 치환, 또는 결손과 복합되어, 다른 화학적, 물리적, 약리학적 및/또는 생물학적 고유한 특징(traits)에 영향을 줄 것이다. 일부 경우들에서, 상기 다른 추가, 치환 또는 결손으로 해당 폴리펩티드의 안정성 (펩티드분해에 저항성을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)을 증가시킬 수 있거나, 또는 해당 폴리펩티드가 이의 적절한 수용체, 리간드 및/또는 결합 단백질에 대한 친화력을 증가시킬 수 있다. 일부 경우들에서, 상기 다른 추가, 치환 또는 결손으로 해당 폴리펩티드의 용해도 (대장균(E. coli) 또는 다른 숙주 세포에서 발현될 때, 그러나 이에 국한되지 않음)를 증가시킬 수 있다. 일부 구체예들에서, 대장균(E. coli), 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현 후 해당 폴리펩티드의 용해도를 증가시킬 목적으로 비-자연적 아미노산의 통합을 위한 또다른 부위에 추가하여, 자연적으로 인코드된 또는 비-자연적 아미노산으로 치환을 위한 부위가 선택된다. 일부 구체예들에서, 상기 폴리펩티드는 연합된 리간드, 결합 단백질, 및/또는 수용체에 대한 친화력을 조절하고, 수용체 이량체화를 조절하고(증가 또는 감소, 그러나 이에 국한되지 않음), 수용체 이량체를 안정화시키고, 순환 반감기를 조절하고, 방출 또는 생체-이용성을 조절하고, 정제를 용이하게 하고, 또는 투여를 위한 특정 경로를 개선 또는 변경시키는, 또다른 추가, 치환, 또는 결손을 포함한다. 유사하게, 상기 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 화학 또는 효소 절단 서열, 단백질분해효소 절단 서열, 반응 그룹, 항체-결합 도메인 (FLAG 또는 폴리-His을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음) 또는 다른 친화력 기반 서열 (FLAG, 폴리-His, GST, 등등을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음), 또는 탐지 (GFP를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음), 정제, 조직 또는 세포 막을 통한 운반, 프로드럭 방출 또는 활성화, 크기 감소, 또는 해당 폴리펩티드의 다른 고유특징을 개선시키는 연계된 분자 (바이오틴을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)를 포함할 수 있다.

[0609] ***표적화 모이어티에 대한 예시로써, 항-HER2 항체***

[0610] 본원에 기재된 방법, 조성물, 전략 및 기술은 표적화 모이어티 폴리펩티드 또는 단백질의 특정 유형, 부류 또는 패밀리로 국한되지 않는다. 또한, 실질적으로 임의의 표적화 모이어티 폴리펩티드는 적어도 하나의 “변형된 또는 변형안된” 비-자연적 아미노산 함유하는, 본원에 기재된 TC 표적화 폴리펩티드가 내포되도록 기획되거나,

또는 변형될 수 있다. 오로지 예로써, 상기 표적화 모이어티 폴리펩티드는 다음의 그룹에서 선택된 치료요법적 단백질에 대해 상동성일 수 있다: 알파-1 항-트립신, 앤지오스태틴, 항-용혈성 인자, 항체, 항체 단편, 단일클론 항체 (예로써, 베바치주맙, 세툭시맙, 파니투무맙, 인플릭시맙, 아달리무맙, 바실릭시맙, 다클리주맙, 오말리주맙, 우스테키누맙, 에타너셉트, 젬투주맙, 알렘투주맙, 리툭시맙, 트라스투주맙, 니모투주맙, 팔리비주맙, 그리고 압씨시맙), 아포리포단백질, 아포단백질, 심방성 나트륨이뇨 인자, 심방성 나트륨이뇨 폴리펩티드, 심방성 펩티드, C-X-C 케모킨, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, 칼시토닌, c-kit 리간드, CC 케모킨, 단핵구 화학주성 단백질-1, 단핵구 화학주성 단백질-2, 단핵구 화학주성 단백질-3, 단핵구 염증성 단백질-1 알파, 단핵구 염증성 단백질-i 베타, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, CD40 리간드, c-kit 리간드, 콜라겐, 콜로니 자극 인자 (CSF), 보체 인자 5a, 보체 억제제, 보체 수용체 1, 사이토킨, 상피 호중구 활성화 펩티드-78, MIP-16, MCP-1, 상피 성장 인자 (EGF), 상피 호중구 활성화 펩티드, 에리트로포에틴 (EPO), 각질제거 독소, 인자 IX, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 X, 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 피브리노겐, 피브로넥틴, 4-나선 번들 단백질, G-CSF, glp-1, GM-CSF, 글루코세레브로시다제, 고나도트로핀, 성장 인자, 성장 인자 수용체, 성장 호르몬 방출 인자, hedgehog 단백질, 헤모글로빈, 간세포 성장 인자 (hGF), 히루딘, 인간 성장 호르몬 (hGH), 인간 혈청 알부민, ICAM-1, ICAM-1 수용체, LFA-1, LFA-1 수용체, 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), IGF-I, IGF-II, 인터페론 (IFN), IFN-알파, IFN-베타, IFN-감마, 인터루킨 (IL), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, 각질세포 성장 인자 (KGF), 락토페린, 백혈병 억제성 인자, 루시퍼라제, 뉴투린, 호중구 억제성 인자 (NIF), 온코스태틴 M, 골원성 단백질, 종양유전자 산물, 파라시토닌, 부갑상선 호르몬 (PTH), PD-ECGF, PDGF, 펩티드 호르몬, 플레오트로핀, 단백질 A, 단백질 G, 발열성 외독소 A, 발열성 외독소 B, 발열성 외독소 C, 펩티드 YY (PYY), 릴랙신, 레닌, SCF, 작은 생합성 단백질, 가용성 보체 수용체 I, 가용성 I-CAM 1, 가용성 인터루킨 수용체, 가용성 TNF 수용체, 소마토메딘, 소마토스태틴, 소마토트로핀, 스트렙토키나제, 초-항원, 스타필로코커스 장내독소, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, 스테로이드 호르몬 수용체, 수퍼옥시드 디스무타제, 독성 쇼크 증후군 독소, 티모신 알파 1, 조직 플라스미노겐 활정자, 종양 성장 인자 (TGF), 종양 괴사 인자, 종양 괴사 인자 알파, 종양 괴사 인자 베타, 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR), VLA-4 단백질, VCAM-1 단백질, 맥관 내피 성장 인자 (VEGF), 유로키나제, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos, myc, jun, myb, rel, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 테스토스테론 수용체, 알도스테론 수용체, LDL 수용체, 그리고 코르티코스테론.

[0611] 한 구체예에서, 유방암, 소-세포 폐암, 난소암, 자궁내막암, 방광암, 두경부암, 전립선암, 위암, 자궁경부암, 자궁암, 식도암, 및결장암으로 구성된 그룹에서 선택된, HER-2를 과다-발현시키는 고형 종양을 치료하는 방법이 있다. 또다른 구체예에서, 상기 고형 종양은 유방암이다. 추가 구체예에서, 상기 고형 종양은 난소암이다.

[0612] 따라서, 트라스투주맙에 대한 다음 설명은 예시의 목적으로만 제공되며, 본원에 기재된 방법, 조성물, 전략 및 기술의 범위에 대한 제한이 아니다. 더욱이, 본 출원에서 트라스투주맙에 대한 언급은 임의의 항체의 예로서 일반 용어를 사용하기 위한 것이다. 따라서, 트라스투주맙과 관련하여, 본원에 기재된 변형 및 화학은 본원에 구체적으로 열거된 것을 포함하는 임의의 항체 또는 단일클론 항체에 동일하게 적용될 수 있음을 이해해야 한다.

[0613] 트라스투주맙은 HER2/neu 수용체의 세포외 세그먼트의 도메인 IV에 결합하는 인간화된 단일클론 항체다. HER2 유전자(HER2/neu 및 ErbB2 유전자라고도 함)는 초기 유방암의 20-30%에서 증폭되어, 과다-발현된다. 또한, 암에서 HER2는 미토겐이 도달하지 않고, 수용체에 결합하지 않고, 신호를 보내 과활성 상태로 만들 수 있다.

[0614] HER2는 세포막을 통해 확장되어, 세포 외부에서 내부로 신호를 전달한다. 건강한 사람의 경우, 미토겐이라고 하는 신호 전달 화합물이 세포막에 도달하여, HER 수용체 패밀리의 다른 구성원의 외부 부분에 결합한다. 그다음, 이렇게 결합된 수용체가 HER2에 연계되어(이량체화되어), 이를 활성화시킨다. 그 다음, HER2는 해당 세포의 내부로 신호를 보낸다. 이 신호는 다양한 생화학적 경로를 통과한다. 상기 경로에는 PI3K/Akt 경로 및 MAPK 경로가 내포된다. 이러한 신호는 세포의 혈관(혈관신생)의 침입, 생존 및 성장을 촉진시킨다.

[0615] 트라스투주맙으로 처리된 세포는 세포 주기의 G1 단계에서 정지되고, 증식은 감소된다. 트라스투주맙은 HER2/neu의 하향 조절에 의해 그 효과의 일부를 유도하여, 수용체 이량체화의 붕괴 및 하류 PI3K 캐스케이드를 통한 신호 전달을 유도하는 것으로 제시되었다. 그러면, P27Kip1은 인산화되지 않고, 핵으로 진입할 수 있고, cdk2 활성을 억제하여, 세포 주기의 중단이 일어난다. 또한, 트라스투주맙은 항-혈관신생 인자의 유도 및 전-혈관신생 인자들의 억제 모두에 의해 혈관신생을 억제시킨다. 암에서 관찰되는 제어안된 성장에 대한 원인은 세포외 도메인의 방출을 초래하는 HER2/neu의 단백질 분해 절단 때문일 수 있다고 생각된다. 트라스투주맙은 유방암

세포에서 HER2/neu 엑토도메인 절단을 억제하는 것을 보여주었다.

[0616] ***비-진핵세포 및 진핵세포에서 발현***

[0617] 클로닝된 TC 폴리뉴클레오티드의 높은 수준의 발현을 얻기 위해, 전형적으로 본 발명의 TC 폴리펩티드의 표적화 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 서브클론시키는데, 이때 벡터는 전사를 지시하는 강한 프로모터, 전사/해독 종결자, 그리고 단백질을 인코딩하는 핵산이라면, 해독 개시를 위한 리보솜 결합 부위를 함유한다. 적합한 박테리아 프로모터들은 당업자에게 공지되어 있으며, 예로써, Sambrook *et al.* 및 Ausubel *et al.*에 기술되어 있다.

[0618] 본 발명의 TC 폴리펩티드 발현을 위한 박테리아 발현 시스템에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 대장균(*E. coli*), 바실러스 종(*Bacillus sp.*), 슈도모나스 플루레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 그리고 살로넬라(*Salmonella*) (Palva *et al.*, *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach *et al.*, *Nature* 302:543-545 (1983)). 이러한 발현 시스템을 위한 키트 또한 시판되는 것을 이용할 수 있다. 포유류 세포, 효모 및 곤충 세포에 대한 진핵생물 발현 시스템은 당업자에게 공지되어 있고, 또한 상업적으로 이용가능하다. 정법 tRNAs 및 아미노아실 tRNA 합성효소(상기 기재됨)가 본 발명의 TC 폴리펩티드를 발현하는데 사용되는 경우, 발현을 위한 숙주 세포는 정법 성분을 사용하는 능력에 기초하여 선택된다. 예시적인 숙주 세포에는 Gram-양성 박테리아 (*B. 브레비스(brevis)*, *B. 서브틸리스(subtilis)*, 또는 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 이에 국한되지 않음) 및 Gram-음성 박테리아 (대장균(*E. coli*), 슈도모나스 플루레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 뿐만 아니라 효모 및 다른 진핵 세포가 내포된다. O-tRNA/O-RS 쌍을 포함하는 세포들이 본원에서 기술된 바와 같이, 이용될 수 있다.

[0619] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비-진핵 숙주 세포는 비-자연적 아미노산을 포함하는 단백질을 유용한 대량으로 합성하는 능력을 제공한다. 한 측면에서, 상기 조성물에는 임의선택적으로 적어도 10 마이크로그램, 적어도 50 마이크로그램, 적어도 75 마이크로그램, 적어도 100 마이크로그램, 적어도 200 마이크로그램, 적어도 250 마이크로그램, 적어도 500 마이크로그램, 적어도 1 밀리그램, 적어도 10 밀리그램, 적어도 100 밀리그램, 적어도 하나의 램그, 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산을 포함하는 단백질, 또는 생체내 단백질 생산 방법으로 얻을 수 있는 양 (본원의 재조합 단백질 생산 및 정제에서 상세하게 제공됨)이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 또다른 측면에서, 상기 단백질은 상기 조성물 안에 다음의 농도로 임의선택적으로 존재하나, 이에 국한되지 않는다: 세포 용해물, 완충액, 약제학적 완충액, 또는 다른 액상 현탁액 (약 1 nl ~ 약 100 L 또는 그 이상의 부피, 그러나, 이에 국한되지 않음)의 리터당 적어도 10 마이크로그램의 단백질, 리터당 적어도 50 마이크로그램의 단백질, 리터당 적어도 75 마이크로그램의 단백질, 리터당 적어도 100 마이크로그램의 단백질, 리터당 적어도 200 마이크로그램의 단백질, 리터당 적어도 250 마이크로그램의 단백질, 리터당 적어도 500 마이크로그램의 단백질, 리터당 적어도 1 밀리그램의 단백질, 또는 리터당 적어도 10 밀리그램의 단백질 또는 그 이상. 진핵 세포에서 적어도 하나의 비-자연적 아미노산이 내포된 단백질의 대량 생산(시험관 내 해독을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 다른 방법으로 일반적으로 가능한 것보다 더 많은 양이 내포되나, 이에 국한되지 않음)은 본 발명의 특징이다.

[0620] TC 폴리펩티드의 표적화 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에는 신호 펩티드를 인코드하는 서열이 내포될 수도 있고, 내포되지 않을 수도 있다. 상기 신호 펩티드는 이것이 발현되는 세포로부터 분비될 때 존재한다. 이러한 신호 펩티드는 임의의 서열일 수 있다. 상기 신호 펩티드는 원핵 또는 진핵의 것일 수 있다. Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152:89 104)는포유류 세포에서 사용하기 위한 신호 펩티드 (뮤린 Ig 카파 경쇄 신호 펩티드)를 기술한다. 다른 신호 펩티드에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: S. 세르비시에(cerevisiae)의 알파-인자 신호 펩티드(U.S. 특허 번호 4,870,008, 본원의 참고자료에 편입됨), 마우스의 타액 아밀라제의 신호 펩티드 (O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646), 변형된 카르복시펩티다제 신호 펩티드 (L. A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897), 효모 BAR1 신호 펩티드 (WO 87/02670, 본원의 참고자료에 편입됨), 그리고 효모 아스파르트 단백질분해효소 3 (YAP3) 신호 펩티드 (cf. M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137).

[0621] 적합한 포유동물 숙주 세포의 예는 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, (예로써 CHO-K1; ATCC CCL-61), 녹색 원숭이 세포 (COS) (예로써 COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); 마우스 세포 (예로써 NS/0), 아기 햄스터 신장 (BHK) 세포주 (예로써 ATCC CRL-1632 또는 ATCC CCL-10), 그리고 인간 세포 (예로써 HEK 293 (ATCC CRL-1573)), 뿐만 아니라 조직 배양에서 식물 세포. 이들

세포주 및 기타 세포주는 공공 기탁기관 이를 테면, American Type Culture Collection, Rockville, Md에서 얻을 수 있다. 상기 TC 폴리펩티드의 개선된 당화를 제공하기 위해, 포유류 숙주 세포는 시알릴트랜스퍼라제 (예로써 U.S. 특허 번호 5,047,335에서 기술된 1,6-시알릴트랜스퍼라제(본원의 참고자료에 편입됨)를 발현시키도록 변형될 수 있다.

[0622] 포유류 숙주 세포에 외인성 DNA를 도입하는 방법에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 인산칼슘-매개된 형질감염, 전기천공, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염, 리포솜 매개 형질감염, 바이러스 벡터, 그리고 Lipofectamin 2000을 이용한 Life Technologies Ltd, Paisley, UK에서 기술된 형질감염 방법 및 FuGENE 6을 이용한 Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA에서 기술된 형질감염 방법. 이러한 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, Ausbel et al. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA에서 설명되어 있다. 포유동물 세포의 배양은 확립된 방법, 예로써 (Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA 및 Harrison Mass. and Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997)에서 기술된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0623] *I. 대장균, 슈도모나스 종, 그리고 다른 원핵생물* 박테리아 발현 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 박테리아 숙주에서 사용할 수 있는 다양한 벡터가 있다. 벡터는 단일 카피, 또는 낮거나 또는 높은 다중-카피 벡터일 수 있다. 벡터는 클로닝 및/또는 발현을 위해 사용될 수 있다. 벡터에 관한 풍부한 문헌, 많은 벡터의 상업적 이용가능성, 벡터와 벡터의 제한효소-맵 및 특성을 설명하는 매뉴얼을 고려할 때, 본원에서 광범위한 논의가 필요하지 않다. 잘 알려진 바와 같이, 벡터는 일반적으로 선택을 허용하는 마커를 포함하며, 이러한 마커는 세포독성제 내성, 원형영양 또는 면역성을 제공할 수 있다. 종종, 서로 다른 특성을 제공하는 복수의 마커가 존재한다.

[0624] 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 중합효소에 결합하고, 코딩 서열(예로써, 구조 유전자)의 mRNA로의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 일반적으로 해당 코딩 서열의 5' 말단에 근접하게 위치하는 전사 개시 영역을 가질 것이다. 이 전사 개시 영역은 전형적으로 RNA 중합효소 결합 부위 및 전사 개시 부위를 포함한다. 박테리아 프로모터는 RNA 합성이 시작되는 인접 RNA 중합효소 결합 부위와 중첩될 수 있는 오퍼레이터라고 하는 제 2 도메인을 또한 가질 수 있다. 오퍼레이터는 유전자 억제 단백질이 오퍼레이터에 결합하여, 특정 유전자의 전사를 억제할 수 있기 때문에, 네가티브 조절된 (유도성) 전사를 허용한다. 구성적 발현은 오퍼레이터와 같은 네가티브 조절 요소가 없을 때, 발생할 수 있다. 추가로, 포지티브 조절은 유전자 활성화 단백질 결합 서열에 의해 달성될 수 있으며, 존재하는 경우 일반적으로 RNA 중합효소 결합 서열에 근접(5')해서 존재한다. 유전자 활성화제 단백질의 예는 분해대사산물 활성화제 단백질(CAP)이며, 이는 대장균(E. coli)에서 lac 오페론의 전사를 시작하는 데 도움이 된다(Raibaud et al., Annu. Rev. Genet. (1984) 18:173 참고). 따라서, 조절된 발현은 포지티브이거나 또는 네가티브일 수 있으며, 이에 따라 전사를 향상시키거나 감소시킬 수 있다.

[0625] 용어 “박테리아 숙주” 또는 “박테리아 숙주 세포”는 재조합 벡터 또는 기타 전달 DNA의 수용체로 사용될 수 있거나 또는 사용된 박테리아를 의미한다. 이 용어에는 형질감염된 원래의 박테리아 숙주 세포의 자손이 내포된다. 단일 부모 세포의 자손은 우발적이거나 또는 의도된 돌연변이로 인해, 형태 또는 게놈 또는 전체 DNA 보체가 원래 부모세포와 완전하게 완전히 동일하지 않을 수 있음을 인지할 것이다. 관련 속성을 특징으로 하는 부모세포와 충분히 유사한 모세포의 자손, 예를 들어, TC 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 존재는 이 정의에서 의도하는 자손에 내포된다.

[0626] TC 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 박테리아의 선택은 당업자에게 공지되어 있다. 발현을 위한 박테리아 숙주의 선택에서, 적합한 숙주에는 그중에서도 특히 우수한 봉입체 형성 능력, 낮은 단백질 분해 활성 및 전반적인 견고성을 갖는 것으로 나타난 숙주들이 내포될 수 있다. 박테리아 숙주는 일반적으로 다음을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은 다양한 출처에서 구할 수 있다: Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA); 및 American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA) 산업적/제약적 발효는 일반적으로 K 균주(예로써 W3110) 또는 B 균주(예로써 BL21)에서 유래된 박테리아를 사용한다. 이들 균주는 성장 매개변수가 매우 잘 알려져 있고, 강력하기 때문에 특히 유용하다. 추가로, 이들 균주는 비-병원성이며, 안전성 및 환경상의 이유로 상업적으로 중요하다. 적합한 대장균(*E. coli*) 숙주의 다른 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: BL21, DH10B의 균주들 또는 이의 유도체들. 본 발명의 방법들의 또다른 구체예에서, 대장균(*E. coli*) 은 OMP-및 LON-을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않은 단백질분해효소 마이너스 균주다. 숙주 세포 균주는 다음이 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종일 수 있다: *슈도모나스 플로레센스(Pseudomonas fluorescens), 슈도모나스*

에어루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 그리고 *슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)*. *슈도모나스 플로레센스(Pseudomonas fluorescens)*, biovar 1, (균주 MB101로 명명됨)은 재조합 생산에 유용한 것으로 알려져 있고, 치료요법적 단백질 생산 공정에 이용가능하다. 슈도모나스 발현 시스템의 예로는 숙주 균주로 The Dow Chemical Company에서 이용가능하다 (Midland, MI, worldwide web, dow.com).

[0627] 재조합 숙주 세포 균주가 확립되면 (즉, 발현 구조체가 숙주 세포 안으로 도입되었으며, 적절한 발현 구조체를 갖는 세포가 단리된 경우), 해당 재조합 숙주 세포 균주는 TC 폴리펩티드의 생산에 적절한 조건 하에서 배양된다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 재조합 숙주 세포 균주의 배양 방법은 이용되는 발현 구조체의 성질 및 숙주 세포의 실체에 따라 달라질 것이다. 재조합 숙주 균주는 일반적으로 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 배양된다. 재조합 숙주 세포는 전형적으로 탄소, 질소 및 무기 염의 동화 가능한 공급원을 함유하고, 임의로 비타민, 아미노산, 성장 인자 및 당업자에게 공지된 기타 단백질성 배양 보충제를 함유하는 액체 배지에서 배양된다. 숙주 세포의 배양을 위한 액체 배지는 바람직하지 않은 미생물의 성장을 방지하기 위해 항생제 또는 항진균제를 임의선택적으로 함유하고, 및/또는 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 항생제를 포함하지만, 이에 국한되지 않는 화합물을 임의로 함유할 수 있다.

[0628] 재조합 숙주 세포는 배취식(batch) 또는 연속 형식으로 배양될 수 있으며, 세포 수확(TC 폴리펩티드가 세포내 축적되는 경우) 또는 배양 상청액을 배취식 또는 연속식 형식으로 수확할 수 있다. 원핵 숙주 세포에서 생산하기 위해, 배취식 배양 및 세포 수확이 바람직하다.

[0629] 본 발명의 TC 폴리펩티드는 재조합 시스템에서 발현 후, 정상적으로 정제된다. TC 폴리펩티드는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 박테리아 숙주 세포에서 생산된 TC 폴리펩티드는 난용성 또는 불용성(봉입체 형태)일 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 본원에 개시된 방법 및 당업계에 공지된 방법을 이용하여, 재조합적으로 생성된 단백질의 용해도를 증가시킬 목적으로, 선택된 TC 폴리펩티드에서 아미노산 치환이 용이하게 이루어질 수 있다. 불용성 단백질의 경우, 단백질은 원심분리에 의해 숙주 세포 용해물로부터 수집될 수 있고, 추가로 세포의 균질화가 뒤따를 수 있다. 난용성 단백질의 경우, 폴리에틸렌이민(PEI)을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 화합물을 첨가하여, 부분적으로 가용성 단백질의 침전을 유도할 수 있다. 그 후 침전된 단백질은 원심분리에 의해 편리하게 수집될 수 있다. 재조합 숙주 세포는 당업자에게 공지된 다양한 방법을 사용하여, 세포 내로부터 봉입체를 방출하기 위해 파괴되거나 또는 균질화될 수 있다. 숙주 세포 파괴 또는 균질화는 효소 세포 파괴, 초음파 처리, 다운스(dounce) 균질화 또는 고압 방출 파괴를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는, 잘 알려진 기술을 사용하여 수행할 수 있다. 본 발명의 방법들의 한 구체예에서, 고압 방출 기술을 사용하여, 대장균(*E. coli*) 숙주 세포를 파괴하여, TC 폴리펩티드의 봉입체를 방출시킨다. TC 폴리펩티드의 봉입체를 취급할 때, 가용화, 기계적 전단 또는 단백질 분해와 같은 요인으로 인한 손실 없이 봉입체의 수율을 최대화하기 위해, 반복 시 균질화 시간을 최소화하는 것이 유리할 수 있다.

[0630] 불용성 또는 침전된 TC 폴리펩티드는 당업계에 공지된 다수의 적합한 가용화제 중 임의의 것을 사용하여 가용화시킬 수 있다. 상기 TC 폴리펩티드는 우레아 또는 구아니딘 히드로클로라이드로 가용화시킬 수 있다. 가용화된 TC 폴리펩티드의 부피는 최소화되어 편리하게 관리할 수 있는 배취 크기를 사용하여 큰 배취를 만들 수 있다. 이 인자는 재조합 숙주가 부피가 수천 리터인 배취로 확장시킬 수 있는 대규모 상업 환경에서 중요할 수 있다. 추가로, 대규모-상업적 환경에서 TC 폴리펩티드를 제조할 때, 특히 인간의 약학적 용도를 위해, 기계와 용기 또는 단백질 제품 자체를 손상시킬 수 있는 가혹한 화학 물질의 사용을 가능하다면 피해야 한다. 본 발명의 방법에서, 더 강력한 변성 제제인 구아니딘 히드로클로라이드 대신, 더 약한 변성 제제인 우레아를 TC 폴리펩티드 봉입체 가용화에 사용될 수 있음을 보여주었다. 우레아의 사용은 TC 폴리펩티드 봉입체를 효율적으로 가용화하면서, TC 폴리펩티드의 제조 및 정제 공정에 사용되는 스테인리스 스틸 장비의 손상 위험을 크게 줄인다.

[0631] TC 단백질의 가용성 표적화 폴리펩티드의 경우, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 주변 세포질 공간 또는 배양 배지로 분비될 수 있다. 추가로, 가용성 TC는 숙주 세포의 세포질에 존재할 수 있다. 정제 단계를 수행하기 전, 가용성 TC 농축하는 것이 바람직할 수 있다. 당업자에게 공지된 표준 기술을 사용하여, 예를 들어, 세포 용해물 또는 배양 배지로부터 가용성 표적화 폴리펩티드를 농축시킬 수 있다. 추가로, 당업자에게 공지된 표준 기술을 사용하여, 숙주 세포를 파괴하고, 숙주 세포의 세포질 또는 주변 세포질 공간으로부터 가용성 TC를 방출시킬 수 있다.

[0632] 일반적으로, 발현된 폴리펩티드를 변성 및 환원시킨 다음, 폴리펩티드가 바람직한 형태로 다시 폴딩되도록 하는 것이 때때로 바람직하다. 예를 들면, 구아니딘, 우레아, DTT, DTE, 및/또는 세페로닌(chaperonin)을 관심 대상의 해독 산물에 추가할 수 있다. 단백질을 환원, 변성 및 변성시키는 방법은 당업자에게 공지되어 있다 (상기

참고문헌, 그리고 Debinski, et al. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; 그리고 Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270 참고). 예를 들면, Debinski, et al.,은 구아니딘-DTE에서 봉입체 단백질의 변성 및 환원을 설명한다. 단백질은 산화된 글루타티온 및 L-아르기닌을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 산화환원 완충액에서 재폴딩될 수 있다. 재-폴딩 시약은 상기 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드 또는 다른 발현 산물과 접촉되도록 유동되거나 또는 이동될 수 있고, 또는 이 반대가 될 수 있다.

[0633] TC 폴리펩티드의 원핵생물 생산의 경우, 이렇게 생성된 TC 폴리펩티드는 잘못 폴딩되어 생물학적 활성이 부족하거나 또는 감소될 수 있다. 단백질의 생활성은 "재-폴딩"에 의해 복원될 수 있다. 일반적으로, 잘못 폴딩된 TC 폴리펩티드는 가용화 (여기에서 상기 TC 폴리펩티드는 또한 불용성임), 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 카오트로픽 제제 (예로써 우레아 및/또는 구아니딘)를 이용하여 폴리펩티드 쇄를 풀고, 환원시키고, 그리고 이황화물 결합을 환원시킬 수 있는 환원 제제 (예로써 디티오트레톨, DTT 또는 2-멀캅토에탄올, 2-ME)를 이용하여 재-폴딩된다. 적절한 농도의 카오트로프에서, 그 다음 산화 제제 (예로써, 산소, 시스틴 또는 시스타민)가 추가되고, 이로써 이황화물 결합의 재형성이 가능해진다. TC 폴리펩티드는 당분야에 공지된 표준 방법, 이를 테면, U.S. 특허 번호 4,511,502, 4,511,503, 및 4,512,922(이들의 내용은 본원의 참고자료에 이의 전문이 편입된다)에서 기술된 것들을 이용하여 재폴딩될 수 있다. 상기 TC 폴리펩티드는 다른 단백질과 함께 공동-폴딩되어, 이종이량체 또는 이종다량체를 형성할 수 있다.

[0634] 재-폴딩 후, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 추가 정제될 수 있다. TC의 정제는 당업자에게 공지된, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등 또는 이들의 임의의 조합을 비롯한, 다양한 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 추가 정제는 정제된 단백질의 건조 또는 침전 단계를 또한 내포할 수 있다.

[0635] 정제 후, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 정용여과 및 투석을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는 당업계에 공지된 다양한 방법 중 임의의 것에 의해 상이한 완충액으로 교환 및/또는 농축될 수 있다. 단일 정제 단백질로 제공되는 TC는 응집 및 침전될 수 있다.

[0636] TC의 정제된 표적화 폴리펩티드는 (역상 고성능 액체 크로마토그래피, RP-HPLC, 또는 도데실 술페이트 나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, SDS-PAGE에 의해 측정할 때) 적어도 90% 순도 또는 적어도 95% 순도, 또는 적어도 96% 순도, 또는 적어도 97% 순도, 또는 적어도 98% 순도, 또는 적어도 99% 또는 더 큰 순도를 가질 수 있다. 상기 TC의 표적화 폴리펩티드의 순도의 정확한 수치값과 무관하게, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 약제학적 산물로 사용하기 위해, 또는 이를 테면, 수용성 중합체 이를 테면, PEG와의 콘쥬게이션을 위한 추가 공정을 위해, 충분한 순도를 갖는다.

[0637] 특정 TC 분자는 다른 활성 성분들 또는 단백질 (부형제, 담체, 그리고 안정화제, 혈청 알부민 및 이와 유사한 것들을 제외한) 없이 치료요법제로 이용되거나, 또는 또다른 단백질 또는 중합체와 복합체를 이룰 수 있다.

[0638] 비-자연적 아미노산은 원하는 암버 넌센스 돌연변이를 함유하는 유전자로 프로그래밍된 단백질 합성 반응에 화학적으로 아미노아실화된 억제인자 tRNA를 추가하여, 시험관 내 단백질에 부위-특이적으로 통합될 수 있음을 이미 보여주었다. 이러한 접근 방식을 사용하면, 특정 아미노산에 대한 영양 요구성 균주를 사용하여, 일반적인 20개 아미노산중 다수를 구조적으로 가까운 동족체, 가령, 페닐알라닌의 경우 플루오로페닐알라닌으로 대체할 수 있다. *예로써,* Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, Science, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, et al., Science 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. *Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide,* J. Am Chem Soc, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al., FASEB J. 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. *Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins*, Methods in Enz., vol. 202, 301-336 (1992); 그리고 Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. *Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code*, Annu Rev Biophys. Biomol Struct. 24, 435-62 (1995) 참고.

[0639] 예를 들면, 정지 코돈 UAG를 인지하는 억제인자 tRNA를 만들고, 비-자연적 아미노산을 이용하여 화학적으로 아미노아실화시켰다. 단백질 유전자의 관심 부위에 정지 코돈 TAG를 도입하기 위해, 통상적인 부위-지향적 돌연변이유발이 사용되었다. *예로써,* Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' *Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagensis*, Nucleic Acids Res, 16(3):791-802 (1988) 참

고. 아실화된 억제인자 tRNA와 돌연변이 유전자를 시험관내 전사/해독 시스템에서 복합시킬 때, 상기 비-자연적 아미노산은 특정 위치에 해당 아미노산을 함유하는 단백질을 제공하는 UAG 코돈에 대한 응답으로 통합되었다. [^{3}H]-Phe를 이용한 실험과 α-히드록시 산을 이용한 실험에서, 오직 원하는 아미노산만 UAG 코돈에 의해 지정된 위치에 통합되고, 이 아미노산은 단백질의 다른 위치에 통합되지 않음이 입증되었다. *예로써,* Noren, et al, *supra*; Kobayashi et al., (2003) Nature Structural Biology 10(6):425-432; 그리고 Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. *Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins,* Science, 255(5041):197-200 (1992) 참고.

[0640] tRNA는 화학적 또는 효소적 아미노아실화를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 방법 또는 기술에 의해 원하는 아미노산으로 아미노아실화될 수 있다.

[0641] 아미노아실화는 아미노아실 tRNA 합성효소 또는 다른 효소 분자 (리보자임을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)에 의해 달성될 수 있다. 용어 "리보자임"은 "촉매 RNA"와 호환된다. Cech 및 공동작업자들 (Cech, 1987, Science, 236:1532-1539; McCorkle et al., 1987, Concepts Biochem. 64:221-226) 은 촉매 (리보자임)으로 작용할 수 있는 자연 발생적 RNAs의 존재를 실증하였다. 그러나, 이러한 자연적 RNA 촉매는 절단 및 스플라이싱을 위해 리보핵산 기질에만 작용한다는 것을 보여주었지만, 인위적 진화를 통한 리보자임의 최근 개발은 다양한 화학 반응에 대한 촉매의 레퍼토리를 확장시켰다. 연구에 따르면, 자체 (2')3'-말단에서 아미노아실-RNA 결합을 촉매할 수 있는 RNA 분자가 확인되었고(Illangakekare et al., 1995 Science 267:643-647), 그리고 한 RNA 분자에서 다른 분자로 아미노산을 전달할 수 있는 RNA 분자가 확인되었다 (Lohse et al., 1996, Nature 381:442-444).

[0642] U.S. 특허 출원 공개 2003/0228593 (본원의 참고자료에 편입됨)에서는 리보자임을 구축하고, 자연적으로 인코드된 아미노산과 비-자연적으로 인코드된 아미노산의 tRNAs의 아미노아실화에 이를 이용하는 방법이 기재되어 있다. tRNA를 아미노아실화할 수 있는 효소 분자(리보자임을 포함하지만, 이에 국한되지 않는)의 기질-고정된 형태는 아미노아실화된 생성물의 효율적인 친화성 정제를 가능하게 할 수 있다. 적합한 기질의 예는 아가로스, 세파로스 및 자기 비드가 내포된다. 아미노아실화를 위한 기질-고정형 리보자임의 생산 및 사용이 Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 및 U.S. 특허 출원 공개 2003/0228593 (본원의 참고자료에 편입됨)에 설명되어 있다.

[0643] 아미노아실화에서 합성효소 사용을 회피하기 위한, 화학 아미노아실화 방법에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: Hecht 및 공동작업자들에 의해 소개된 방법들 (Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517), 그리고 Schultz, Chamberlin, Dougherty 및 다른 이들에 의해 소개된 방법들 (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al. Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34), (본원의 참고자료에 편입됨). 이러한 방법 또는 다른 화학적 아미노아실화 방법을 사용하여 tRNA 분자를 아미노아실화할 수 있다.

[0644] 촉매 RNA를 만드는 방법은 무작위화된 리보자임 서열의 개별 풀(pools)을 생성하고, 이 풀에 대해 유도 진화를 수행하고, 원하는 아미노아실화 활성에 대해 풀을 스크리닝하고, 그리고 원하는 아미노아실화 활성을 나타내는 리보자임의 서열을 선택하는 것들이 연루될 수 있다.

[0645] 재구성된 해독 시스템이 또한 사용될 수도 있다. 정제된 해독 인자들의 혼합물은 mRNA를 단백질, 뿐만 아니라 용해물 또는 정제된 해독 인자들, 이를 테면, 개시 인자-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α 또는 β), 신장 인자 T (EF-Tu), 또는 종료 인자들이 보충된 용해물로 mRNA를 성공적으로 해독하는데 또한 이용되었다. *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al. editors, Wiley Interscience, 1993 (본원의 참고자료에 명시적으로 편입됨)에 기재되어 있는 바와 같이, 무-세포 시스템은 또한 전사/해독 시스템과 커플링될 수 있는데, 이때 DNA가 해당 시스템으로 도입되고, mRNA로 전사되고, mRNA가 해독된다. 진핵생물 전사 시스템에서 전사되는 RNA는 이종핵 RNA(hnRNA) 또는 5'-말단 캡 (7-메틸 구아노신) 및 3'-말단 poly A 꼬리가 달린 성숙한

mRNA의 형태일 수 있으며, 이는 특정 해독 시스템에서 이점이 될 수 있다. 예를 들면, 캡핑된 mRNA는 망상적혈구 용해물 시스템에서 고-효율로 해독된다.

[0646] ***TC 폴리펩티드에 결합된 거대분자 중합체***

[0647] 본원에 기재된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 대한 다양한 변형은 본원에 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략을 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 변형에는 상기 폴리펩티드의 비-자연적 아미노산 성분에 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않은 추가 기능 그룹의 통합이 내포된다: 라벨; 염료; 중합체; 수용성 중합체; 폴리에틸렌 글리콜의 유도체; 광교차링커; 방사성핵종; 세포독성 화합물; 약물; 친화력 라벨; 광친화력 라벨; 반응 화합물; 지수; 제 2 단백질 또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 유사체; 항체 또는 항체 단편; 금속 킬레이트; 공-인자; 지방산; 탄수화물; 폴리뉴클레오티드; DNA; RNA; 안티센스 폴리뉴클레오티드; 사카라이드; 수용성 덴드리머; 사이클로덱스트린; 억제성 리보핵산; 생물재료; 나노입자; 스핀 라벨; 형광단, 금속-함유하는 모이어티; 방사능활성 모이어티; 신규한 기능성 그룹; 다른 분자와 공유적으로 또는 비-공유적으로 상호작용하는 그룹; 광-감금된 모이어티; 화학-방사선 여기가능한 모이어티; 광-이성체화가능한 모이어티; 바이오틴; 바이오틴의 유도체; 바이오틴 유사체; 무거운 원자를 통합한 모이어티; 화학적으로 절단가능한 그룹; 광절단가능한 그룹; 신장된 측쇄; 탄소-연계된 당(sugar); 산화환원-활성제; 아미노 티오산; 독성 모이어티; 동위원소적으로 라벨된 모이어티; 생물물리학적 프로브; 인광성 그룹; 화학발광성 그룹; 고-밀도 전자 그룹; 자성 그룹; 개재성 그룹; 발색단; 에너지 전달제; 생물학적으로 활성제; 검출가능한 라벨; 작은 분자; 양자점; 나노전달자; 방사성뉴클레오티드; 방사성전달자; 중성자-포획자, 또는 상기의 임의의 조합, 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질. 본 명세서에 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략의 예시적이고 비제한적인 예로서, 하기 설명은 비-자연적 아미노산 폴리펩티드에 거대분자 중합체를 첨가하는 것에 초점을 맞출 것이며, 여기에 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략은 위에 나열된 기능 그룹을 포함하되 이에 국한되지 않는 다른 기능 그룹의 추가에 적용 가능하다는 것을 인지할 것이다 (필요한 경우 및 당업자가 본 명세서의 개시 내용으로 만들 수 있는 적절한 수정과 함께).

[0648] 매우 다양한 거대분자 중합체 및 기타 분자가 본 발명의 TC 폴리펩티드에 연결되어 TC 폴리펩티드의 생물학적 특성을 조절하고 및/또는 TC 분자에 새로운 생물학적 특성을 제공할 수 있다. 이들 거대분자 중합체는 자연적으로 인코드된 아미노산을 통하여, 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 통하여, 또는 자연 또는 비-자연적 아미노산의 임의의 기능을 하는 치환체, 또는 자연 또는 비-자연적 아미노산에 추가된 임의의 치환체 또는 기능성 그룹을 통하여 TC 폴리펩티드에 연계될 수 있다. 이들 중합체의 분자량은 약 100 Da ~ 약 100,000 Da 또는 그 이상을 비롯하여, 그러나 이에 국한되지 않은 넓은 범위가 될 수 있다. 이들 중합체의 분자량은 100 Da ~ 약 100,000 Da, 예를 들면, 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 그리고 100 Da가 될 수 있지만, 그러나 이에 국한되지 않은다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체의 분자량은 약 10,000 Da ~ 약 40,000 Da이다.

[0649] 본 발명은 중합체:단백질 콘쥬게이트의 실질적인 동질의 조제물을 제공한다. "실질적으로 동질의(homogenous)"은 본원에 사용된 바와 같이, 중합체:단백질 콘쥬게이트 분자가 전체 단백질의 절반 이상으로 관찰된다라는 것을 의미한다. 상기 중합체:단백질 콘쥬게이트는 생물학적 활성을 갖고, 현재 본원에서 제공되는 "실질적으로 균질한" 페길화된 TC 폴리펩티드 조제물은 균질한 조제물의의 장점, 예를 들어 로트 대 로트 약동학의 예측 가능성에서 임상 적용의 용이함을 나타낼 만큼 충분히 균질한 것들이다.

[0650] 중합체:단백질 콘쥬게이트 분자의 혼합물 제조를 선택할 수 있으며, 그리고 본원에서 제공되는 이점은 혼합물에 포함할 단일-폴리머:단백질 접합체의 비율을 선택할 수 있다는 점이다. 따라서, 원하는 경우, 다양한 수 (즉, 디-, 트리-, 테트라-, 등등)의 중합체 모이어티가 부착된 다양한 단백질의 혼합물을 만들 수 있고, 본 발명의 방법을 이용하여 준비된 단일-중합체:단백질 콘쥬게이트에 전술한 콘쥬게이트를 복합시키고, 그리고 사전결정된 비율의 단일-중합체:단백질 콘쥬게이트 조제물을 가질 수 있다.

[0651] 선택된 중합체는 그것이 부착된 단백질이 생리학적 환경과 같은 수용성 환경에서 침전되지 않도록 수용성일 수 있다. 상기 중합체는 분기된 것일 수 있거나, 또는 분기안된 것일 수 있다. 최종-산물 조제물의 치료적 사용을 위해, 중합체는 약제학적으로 허용가능할 것이다.

[0652] 중합체의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 폴리알킬 에테르 및 알콕시-캡핑된 이의 유사체 (예로써, 폴리옥시에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌/프로필렌 글리콜, 그리고 메톡시 또는 에톡시-캡핑된 이의 유사체, 특별히 폴리옥시에틸렌 글리콜, 후자의 경우는 폴리에틸렌글리콜 또는 PEG로도 알려짐); 폴리비닐피롤리돈; 폴리비닐알킬 에테르; 폴리옥사졸린, 폴리알킬 옥사졸린 및 폴리히드록시알킬 옥사졸린; 폴리아크릴아미드, 폴리알킬 아크릴아미드, 그리고 폴리히드록시알킬 아크릴아미드 (예로써, 폴리히드록시프로필메트아크릴아미드 및 이의 유도체들); 폴리히드록시알킬 아크릴레이트; 폴리시알산 및 이의 유사체들; 친수성 펩티드 서열; 폴리사카라이드 및 이들의 유도체들 (덱스트란 및 덱스트란 유도체들, 예로써, 카르복시메틸덱스트란, 덱스트란 술페이트, 아미노덱스트란을 비롯함); 셀룰로오스 및 이의 유도체들, 예로써, 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록시알킬 셀룰로오스; 키틴 및 이의 유도체들, 예로써, 키토산, 숙시닐 키토산, 카르복시메틸키틴, 카르복시메틸키토산; 히알루론산 및 이의 유도체들; 전분; 알기네이트; 콘드로이틴 술페이트; 알부민; 풀루란 및 카르복시메틸 풀루란; 폴리아미노산 및 이의 유도체들, 예로써, 폴리글루탐산, 폴리리신, 폴리아스파르트산, 폴리아스파르타미드; 말레산 무수물 공중합체 이를 테면,: 스티렌 말레산 무수물 공중합체, 디비닐에틸 에테르 말레산 무수물 공중합체; 폴리비닐 알코올; 이의 공중합체; 이의 삼원중합체; 이의 혼합물들; 그리고 전술한 것들의 유도체들.

[0653] 단백질 분자에 대한 폴리에틸렌 글리콜 분자의 비율은 반응 혼합물의 농도와 마찬가지로 가변적일 수 있다. 일반적으로, 최적의 비율 (미-반응 단백질 또는 중합체가 최소한의 과량으로 남아 있게되는 반응 효율 측면에서)은 선택된 폴리에틸렌 글리콜의 분자량 및 이용 가능한 반응성 기의 수에 의해 결정될 수 있다. 분자량과 관련하여, 일반적으로 중합체의 분자량이 높을수록, 단백질에 부착될 수 있는 중합체 분자의 수가 더 적게 된다. 유사하게, 이러한 매개변수를 최적화할 때, 폴리머의 분기화를 고려해야 한다. 일반적으로, 분자량이 높을수록(또는 가지가 많을수록) 폴리머:단백질 비율이 높아진다.

[0654] 본원에 사용된 바와 같이, 그리고 PEG:TC 폴리펩티드 콘쥬게이트를 고려할 때, 용어 "치료요법적으로 유효량"이란 환자에게 원하는 이점을 제공하는 양을 지칭한다. 그 양은 개인마다 다르며, 환자의 전반적인 신체 상태 및 치료할 상태의 기저 원인을 비롯한, 여러 요인에 따라 달라질 것이다. 치료에 사용되는 TC 폴리펩티드의 양은 허용 가능한 변화율을 제공하고, 원하는 반응을 유익한 수준으로 유지시킨다. 본 조성물의 치료학적 유효량은 공개적으로 이용가능한 재료 및 절차를 사용하여, 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있다.

[0655] 수용성 중합체는 선형, 포크형 또는 분기형을 포함하나, 이에 국한되지 않는 임의의 구조적 형태일 수 있다. 전형적으로, 상기 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜), 이를 테면, 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)이지만, 그러나 다른 수용성 중합체 또한 이용될 수 있다. 예로써, PEG는 본 발명의 특정 구체예들을 설명하는데 이용된다.

[0656] PEG는 상업적으로 이용 가능하거나 또는 당업자에게 공지된 방법(Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161)에 따라 에틸렌 글리콜의 개환(ring-opening) 중합에 의해 제조될 수 있는 잘 알려진 수용성 중합체다. 용어 "PEG"는 PEG의 크기 이의 말단의 변형에 관계없이, 모든 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포괄하기 위해 광범위하게 사용되며, 다음 식에 의해 TC 폴리펩티드에 연결된 것으로 나타낼 수 있다:

[0657] $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$

[0658] 이때 n은 2 ~ 10,000이며, X는 H 또는 C_{1-4} 알킬, 보호 그룹, 또는말단 기능성 그룹을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않은 말단 변형이다.

[0659] 일부 경우들에서, 본 발명에 이용된 PEG는 이의 한 단부에서 히드록시 또는 메톡시로 종료되며, 즉, X는 H 또는 CH_3 ("메톡시 PEG")이다. 대안으로, 상기 PEG는 반응 그룹으로 종료되고, 이로 인하여 이중-기능성 중합체가 형성된다. 전형적인 반응 그룹에는 20개의 일반적인 아미노산에서 볼 수 있는 기능 그룹와 반응시키기 위해 흔히 이용되는 반응 그룹 (말레이미드 그룹, 활성화된 카르보네이트 (p-니트로페닐 에스테르를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 활성화된 에스테르 (N-히드록시숙시니미드, p-니트로페닐 에스테르를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는) 및 알데히드를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 뿐만 아니라 20개의 일반적인 아미노산에 대해 비활성이지만, 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 존재하는 상보적인 기능성 그룹 (아지드 그룹, 알킨 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)과는 특이적으로 반응을 하는 기능성 그룹이 내포될 수 있다. PCE의 다른 단부(상기 화학식에서 Y로 나타냄)는 자연-발생적 또는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 통하여 직접 또는 간접적으로 TC 폴리펩티드에 부착된다. 예를 들면, Y는 아미드, 폴리펩티드에 대해 아민 그룹에 대한 카르바마이트 또는 우레아 링키지 (리신의 입실론 아민 또는 *N*-말단을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음)일 수 있다. 대안으로, Y는 티올 그룹에 대해 말레이미드 링키지 (시스테인의 티올 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한

되지 않음)일 수 있다. 대안으로, Y는 20개의 일반적인 아미노산을 통해 일반적으로 접근할 수 없는 잔기에 대한 링키지일 수 있다. 예를 들면, PEG 상에 아지드 그룹은 TC 폴리펩티드 상의 알킨 그룹과 반응하여 Huisgen [3+2] 사이클로추가 산물을 만들 수 있다. 대안으로, PEG 상의 알킨 그룹은 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 존재하는 아지드 그룹과 반응하여 유사한 산물을 형성할 수 있다. 일부 구체예들에서, 강한 친핵체(하이드라진, 하이드라지드, 히드록실아민, 세미카르바자이드를 비롯한 그러나 이에 국한되지 않는)는 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 존재하는 알데히드 또는 케톤 그룹과 반응하여 히드라존, 옥심 또는 세미카르바존을 형성할 수 있고, 이용가능한 어떤 경우에는 적절한 환원제로 처리하면 추가 환원될 수 있다. 대안으로, 강한 친핵체는 TC 폴리펩티드에 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 통하여 통합될 수 있고, 이를 이용하여 상기 수용성 중합체에 존재하는 케톤 또는 알데히드 그룹과 선호적으로 반응시킬 수 있다.

[0660] PEG의 임의의 분자 질량은 원하는 대로, 약 100달톤(Da) ~ 100,000Da 또는 그 이상(일부 경우 0.1-50 kDa 또는 10-40 kDa, 그러나, 이에 국한되지 않음)을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 실질적으로 원하는 대로 사용될 수 있다. PEG의 분자량은 약 100 Da ~ 약 100,000 Da 또는 그 이상을 비롯하여, 그러나 이에 국한되지 않은 넓은 범위가 될 수 있다. PEG는 약 100 Da ~ 약 100,000 Da, 가령, 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 그리고 100 Da일 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, PEG는 약 100 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG는 약 100 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG는 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG는 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG는 약 10,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 1 ~ 100 kDa(1 ~ 50 kDa 또는 5 ~ 20 kDa를 포함하나, 그러나 이에 국한되지 않음) 범위의 분자량을 갖는 각 쇄를 갖는 PEG 분자를 포함하나, 이에 국한되지 않는 분기된 PEGs가 또한 사용될 수 있다. 분기된 쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 100,000 Da 또는 그 이상일 수 있지만, 그러나 이에 국한되지 않는다. 분기된 쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 그리고 1,000 Da를 포함하나, 그러나 이에 국한되지 않는 약 1,000 Da ~ 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 분기된 쇄 PEG의 각 쇄의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 20,000 Da이다. 광범위한 PEG 분자가 본원에 참고로 편입된 Shearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog를 포함하나, 이에 국한되지 않는 문헌에 기재되어 있다.

[0661] 일반적으로, PEG 분자의 적어도 하나의 말단은 비-자연적으로-인코드된 아미노산과의 반응에 이용가능하다. 예를 들면, 아미노산 측쇄와의 반응을 위한 알킨 및 아지드 모이어티를 품고 있는 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들을 이용하여 본원에 기술된 바와 같이, PEG를 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 부착시킬 수 있다. 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 아지드를 포함한다면, 상기 PEG는 [3+2] 사이클로추가 산물의 형성에 영향을 주는 알킨 모이어티, 또는 아미드 링키지의 형성에 영향을 주는 활성화된 PEG 종 (즉, 에스테르, 카르보네이트) 함유하는 포스핀 그룹을 전형적으로 함유할 것이다. 대안으로, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 알킨을 포함한다면, 상기 PEG는 [3+2] Huisgen 사이클로추가 산물의 형성에 영향을 주는 아지드 모이어티를 전형적으로 함유할 것이다. 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 카르보닐 그룹을 포함한다면, 상기 PEG는 대응하는 히드라존, 옥심, 그리고 세미카르바존 링키지의 형성에 영향을 주기 위해, 차례로 강력한 친핵체 (하이드라지드, 하이드라진, 히드록실아민, 또는 세미카르바자이드 기능 그룹을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)를 전형적으로 함유할 것이다. 다른 대안에서, 상기 기재된 반응 그룹 방향의 역을 이용할 수 있는데, 즉, 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산에서 아지드 모이어티는 알칸을 함유하는 PEG 유도체 함유하는 알킨과 반응할 수 있다.

[0662] 일부 구체예들에서, PEG 유도체가 있는 TC 폴리펩티드는 비-자연적으로 인코딩된 아미노산의 측쇄에 존재하는 화학적 기능 그룹과 반응성인 화학적 기능을 함유한다.

[0663] 일부 구체예들에서, 본 발명은 평균 분자량 약 800 Da ~ 약 100,000 Da의 수용성 중합체 백본을 포함하는, 아지드-및 아세틸렌-함유하는 중합체 유도체들을 제공한다. 상기 수용성 중합체의 중합체 백본은 폴리(에틸렌 글리

콜)일 수 있다. 그러나, 폴리(에틸렌)글리콜 및 폴리(덱스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜)을 비롯한 그러나 이에 국한되지 않는 다른 관련된 중합체가 내포된, 그러나 이에 국한되지 않는 광범위한 각종 수용성 중합체가 본 발명의 실행에 또한 적합하며, PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)의 용어는 이러한 모든 분자를 포괄하는 의도로 이용됨을 인지해야 한다. 용어 PEG에는 임의의 형태의 폴리(에틸렌 글리콜), 가령, 이중-기능성 PEG, 다중부문으로 된 PEG, 유도체화된 PEG, 포크형 PEG, 분기된 PEG, 펜던트 PEG (즉, 해당 중합체 백본에 대해 하나 또는 그 이상의 기능성 그룹 펜던트를 갖는 PEG 또는 관련된 중합체), 또는 분해가능한 링키지를 갖는 PEG가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0664] PEG는 전형적으로 투명하고, 무색 무취이며, 물에 용해되고 열에 안정적이며, 많은 화학 물질에 대해 불활성이며, 가수분해 또는 열화되지 않으며, 그리고 일반적으로 무독성이다. 폴리(에틸렌 글리콜)은 생체 적합성으로 간주되며, 즉, PEG는 해를 입히지 않고, 살아있는 조직 또는 유기체와 공존할 수 있다라고 말할 수 있다. 보다 구체적으로, PEG는 실질적으로 비-면역원성이며, 즉 PEG는 신체에서 면역 반응을 일으키는 경향이 없다. 신체에서 일부 바람직한 기능을 갖는 분자, 이를 테면, 생물학적 활성제에 부착될 때, PEG는 이 제제를 차폐하는 경향이 있고, 유기체가 이 제제의 존재를 용인할 수 있도록 면역 반응을 감소 또는 제거할 수 있다. PEG 콘쥬게이트는 실질적인 면역 반응을 일으키지 않거나, 또는 응고 또는 기타 바람직하지 않은 효과를 일으키지 않는 경향이 있다. 화학식--CH_2CH_2O--$(CH_2CH_2O)_n$-CH_2CH_2--화학식을 가지고, 이때 n은 약 3 ~ 약 4000, 전형적으로 약 20 ~ 약 2000인 PEG가 본 발명의 사용에 적합하다. 약 800 Da ~ 약 100,000 Da의 분자량을 갖는 PEG은 본 발명의 일부 구체예들에서 중합체 백본으로 특히 유용하다. PEG의 분자량은 약 100 Da ~ 약 100,000 Da 또는 그 이상을 비롯하여, 그러나 이에 국한되지 않은 넓은 범위가 될 수 있다. PEG의 분자량은 약 100 Da ~ 약 100,000 Da, 가령, 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 그리고 100 Da일 수 있지만, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, PEG의 분자량은 약 100 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG의 분자량은 약 100 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, PEG의 분자량은 약 10,000 Da ~ 약 40,000 Da이다.

[0665] 상기 중합체 백본은 선형이거나 또는 분기된 형일 수 있다. 분기된 중합체 백본은 당분야에 일반적으로 공지되어 있다. 전형적으로, 분기된 중합체는 중심 분기 코어 모이어티 및 중심 분기 코어에 연결된 복수의 선형 중합체 쇄들을 갖는다. PEG는 글리세롤, 글리세롤 올리고머, 펜타에리트리톨 및 소르비톨과 같은 다양한 폴리올에 에틸렌 옥사이드를 첨가하여 제조할 수 있는 분기형 형태로 일반적으로 사용된다. 중앙 분기 모이어티는 또한 리신과 같은 여러 아미노산에서 유래할 수 있다. 상기 분기된 폴리(에틸렌 글리콜)는 일반적으로 $R(-PEG-OH)_m$로 나타낼 수 있고, 이때 R은 중심 모이어티, 이를 테면, 글리세롤, 글리세롤 올리고머, 또는 펜타에리트리톨로부터 유래되며, 그리고 m은 갈래(arms)의 수를 나타낸다. 다중-갈래로 된 PEG 분자, 이를 테면, U.S. 특허 번호 5,932,462; 5,643,575; 5,229,490; 4,289,872; U.S. 특허 출원 2003/0143596; WO 96/21469; 그리고 WO 93/21259 (각각은 본원의 참고자료에 편입됨)에 기술된 것들이 중합체 백본으로 또한 이용된다.

[0666] 분기된 PEG는 $PEG(--YCHZ_2)_n$로 나타내는 포크형 PEG일 수도 있으며, 이때 Y는 연계 그룹이며, Z는 특정 길이의 원자 쇄에 의해 CH에 연계된 활성화된 말단 그룹이다. 여전히 또다른 분기된 형태인 펜던트 PEG는 PEG 쇄의 단부보다는 PEG 백본의 길이를 따라 반응 그룹, 이를 테면, 카르복실을 가진다.

[0667] 이러한 형태의 PEG에 추가적으로, 약한 또는 분해가능한 링키지가 백본 안에 있도록 이들 중합체가 또한 만들어질 수 있다. 예를 들면, PEG는 폴리머 백본에서 가수분해의 대상이 되는 에스테르 결합으로 제조될 수 있다. 아래 나타낸 바와 같이, 가수분해로 해당 중합체가 저가 분자량의 단편들로 절단된다:

[0668] $-PEG-CO_2-PEG-+H_2O \rightarrow PEG-CO_2H+HO-PEG-$

[0669] 용어 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 PEG는 본원에 개시된 것들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는, 당업계에 공지된 모든 형태를 나타내거나 또는 내포된다는 것을 당업자들은 인지할 것이다.

[0670] 많은 다른 중합체들 또한 본 발명의 사용에 적합하다. 일부 구체예들에서, 2 ~ 약 300개의 말단을 갖는, 수용성 중합체 백본이 본 발명에 특히 유용하다. 적합한 중합체의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 다른 폴리(알킬렌 글리콜), 이를 테면, 폴리(프로필렌 글리콜) ("PPG"), 이의 공중합체 (에틸렌 글리콜과 프로

필렌 글리콜의 공중합체를 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는), 이의 삼원중합체, 이의 혼합물들, 그리고 이와 유사한 것들. 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 다를 수 있지만, 일반적으로 약 800 Da ~ 약 100,000 Da, 흔히 약 6,000 Da ~ 약 80,000 Da가 된다. 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 그리고 100 Da을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는, 약 100 Da ~ 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 100 Da ~ 약 50,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 100 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 1,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 5,000 Da ~ 약 40,000 Da이다. 일부 구체예들에서, 상기 중합체 백본의 각 쇄의 분자량은 약 10,000 Da ~ 약 40,000 Da이다.

[0671] 당해 기술분야의 통상의 기술자는 실질적으로 수용성인 백본에 대한 상기 목록이 결코 완전하지 않고, 단지 예시적이며, 상기 기재된 품질을 갖는 모든 중합체 물질이 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 고려된다는 것을 인식할 것이다.

[0672] 본 발명의 일부 구체예들에서, 상기 중합체 유도체들은 "다중-기능을 하는"이란 의미는 상기 중합체 백본은 적어도 두 개의 말단을 갖고, 많게는 약 300개의 말단을 갖고, 이들 말단은 기능 그룹에 의해 기능화되거나, 또는 활성화된다는 것을 의미한다. 다중-기능성 중합체 유도체들 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 2개의 말단을 갖는 선형 중합체로서, 각각의 말단은 동일하거나 또는 상이한 기능 그룹에 결합된다.

[0673] 용어 "보호된"이란 특정 반응 조건 하에서 화학적으로 반응 기능성 그룹의 반응을 막아주는 "보호 그룹" 또는 모이어티가 존재함을 지칭한다. 상기 보호 그룹은 보호될 화학적으로 반응 그룹의 유형에 따라 가변적일 것이다. 예를 들면, 만약 화학적으로 반응 그룹이 아민 또는 하이드라지드라면, 이 보호 그룹은 tert-부틸옥시카르보닐 (t-Boc) 및 9-플루오레닐메톡시카르보닐 (Fmoc)의 군에서 선택될 것이다. 만약 화학적으로 반응 그룹이 티올이라면, 이 보호 그룹은 오르소피리딜이황화물일 수 있다. 만약 화학적으로 반응 그룹이 카르복실산, 이를테면, 부탄 또는 프로피온산, 또는히드록실 그룹이라면, 이 보호 그룹은 벤질 또는 알킬 그룹 이를 테면, 메틸, 에틸, 또는 tert-부틸일 수 있다. 당업계에 공지된 다른 보호 그룹 또한 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0674] 문헌에서 예시되는 말단 기능성 그룹의 특정 예시로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: N-숙시니미딜 카르보네이트 (예로써, U.S. 특허 번호 5,281,698, 5,468,478 참고), 아민 (예로써, Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983) 참고), 하이드라지드 (예로써, Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978) 참고), 숙시니미딜 프로피오네이트 및 숙시니미딜 부타노에이트 (예로써, Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; U.S. 특허 번호 5,672,662 참고), 숙시니미딜 숙시네이트 (예로써, Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984) 및 Joppich et al. Makromol. Chem. 180:1381 (1979 참고), 숙시니미딜 에스테르 (예로써, U.S. 특허 번호 4,670,417 참고), 벤조트리아졸 카르보네이트 (예로써, U.S. 특허 번호 5,650,234 참고), 글리시딜 에테르 (예로써, Pitha et al. Eur. J Biochem. 94:11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)참고, 옥시카르보닐이미다졸 (예로써, Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985) 참고), p-니트로페닐 카르보네이트 (예로써, Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985); 그리고 Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991) 참고), 알데히드 (예로써, Harris et al. J. Polym.Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984), U.S. 특허 번호 5,824,784, U.S. 특허 번호 5,252,714 참고), 말레이미드 (예로써, Goodson et al. Biotechnology (NY) 8:343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984) 참고), 그리고 Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)), 오르소피리딜-이황화물 (예로써, Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314(1993) 참고), 아크릴올 (예로써, Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993) 참고), 비닐술폰 (예로써, U.S. Pat. No. 5,900,461 참고). 위의 모든 참고 문헌 및 특허는 본원의 참고자료에 편입된다.

[0675] 비-자연적으로 인코드된 아미노산, 이를 테면, *p*-아지도-L-페닐알라닌을 함유하는 TC 폴리펩티드의 페길화 (PEGylation (즉, 임의의 수용성 중합체의 추가)는 임의의 편리한 방법에 의해 수행된다. 예를 들면, TC 폴리펩티드는 알킨 말단 mPEG 유도체로 페길화된다. 간략하게 설명하자면, 과량의 고체 mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH를 *p*-

아지도-L-Phe-함유하는 TC 폴리펩티드의 수성 용액에 실온에서 교반시키면서 추가한다. 전형적으로, 수용액은 반응이 수행될 pH (일반적으로 약 pH 4-10)에 가까운 pK_a를 갖는 완충제로 완충된다. pH 7.5에서 페길화를 위한 적합한 완충액의 예로는 예를 들면, 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: HEPES, 포스페이트, 보레이트, 트리스-HCl, EPPS, 그리고 TES. pH는 지속적으로 모니터링되고, 필요한 경우 조정된다. 이 반응은 전형적으로 약 1-48시간 동안 계속되도록 허용된다.

[0676] 이 반응 산물은 후속적으로 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용되어, 유리 mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH로부터 페길화된 TC 폴리펩티드 및 차단되지 않은 PEG가 분자의 양쪽 말단에서 활성화되고, 이로 인하여 TC 폴리펩티드 분자가 교차연계됨으로써 형성될 수 있는 페길화된 TC 폴리펩티드의 임의의 고-분자량 복합체를 분리한다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 동안의 조건은 유리 mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH가 컬럼을 통하여 이동하고, 하나 또는 그 이상의 PEG 그룹에 콘쥬게이트된 하나의 TC 폴리펩티드 분자를 함유하는, 원하는 형태로 형성된 후, 임의의 교차연계된 페길화된 TC 폴리펩티드 복합체가 유리되는 조건이다. 적합한 조건은 가교된 복합체 대비 목적하는 접합체의 상대적 크기에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 원하는 콘쥬게이트를 함유하는 용리액은 한외여과로 농축되고, 정용여과로 탈염된다.

[0677] 상기에서 대략 설명된 용리 방법들을 이용하여 실질적으로 정제된 PEG-TC가 만들어질 수 있는데, 여기에서 생산된 상기 PEG-TC의 순도는 적절한 방법, 이를 테면, SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC, 그리고 모세관 전기영동을 통하여 측정할 때, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%의 순도 수준, 특이적으로, 적어도 약 75%, 80%, 85%의 순도 수준, 그리고 더 특이적으로, 적어도 약 90%의 순도 수준, 적어도 약 95%의 순도 수준, 적어도 약 99% 또는 더 큰 순도 수준을 갖는다. 필요할 경우, 소수성 크로마토그래피에 의해 획득된 페길화된 TC 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 하나 또는 그 이상의 과정을 통하여 추가 정제될 수 있는데, 이때 방법은 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 친화력 크로마토그래피; 음이온-또는 양이온-교환 크로마토그래피 (DEAE SEPHAROSE을 이용하나, 그러나 이에 국한되지 않음); 실리카 상에서 크로마토그래피; 역상 HPLC; 겔 여과 (SEPHADEX G-75을 이용하나, 그러나 이에 국한되지 않음); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기-압출 크로마토그래피, 금속-킬레이트 크로마토그래피; 한외여과/정용여과; 에탄올 침전; 암모니움 술페이트 침전; 크로마토포커싱; 변위 크로마토그래피; 전기영동 절차 (예비 등전점 포커싱을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음), 차등 용해도 (암모니움 술페이트 침전을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않음), 또는 추출. 겉보기 분자량은 구형 단백질 표준과 비교하여, GPC로 추정할 수 있다 (Preneta, AZ in Protein purification methods, practical approach (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). 상기 TC-PEG 콘쥬게이트의 순도는 단백질 분해(트립신 절단을 포함하나, 이에 국한되지 않음)에 이어, 질량 분광분석법 분석에 의해 평가될 수 있다. Pepinsky RB., *et al., J. Pharmcol. & Exp. Ther.* 297(3):1059-66 (2001).

[0678] 본 발명의 TC 폴리펩티드의 표적화 폴리펩티드의 아미노산에 연계된 수용성 중합체는 제한 없이 추가로 유도되거나 또는 대체될 수 있다.

[0679] **<u>아지드-함유하는 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들</u>**

[0680] 본 발명의 또다른 구체예에서, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 비-자연적으로 인코드된 아미노산 상에 존재하는 알킨 모이어티와 반응할 아지드 모이어티를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다. 일반적으로, 상기 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들의 평균 분자량 범위는 1-100 kDa, 일부 구체예들에서, 10-40 kDa일 것이다.

[0681] 일부 구체예들에서, 상기 아지드-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

[0682] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$

[0683] 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등등)이며, m은 2-10이며, n은 100-1,000 (즉, 평균 분자량은 5-40 kDa임)이다.

[0684] 또다른 구체예에서, 상기 아지드-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

[0685] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$

[0686] 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등등)이며, m은 2-10이며, p는 2-10이고, n은 100-1,000 (즉, 평균 분자량은 5-40 kDa임)이다.

[0687] 본 발명의 또다른 구체예에서, 알킨-함유하는 아미노산을 포함하는 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 말단 아지드 모이어티를 함유하는 분기된 PEG 유도체로 변형되며, 상기 분기된 PEG의 각 쇄는 10-40 kDa 범위의 분자량, 5-20 kDa 범위의 분자량을 가질 것이다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 상기 아지드-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

[0688] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pN_3$

[0689] 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등등)이며, m은 2-10이며, p는 2-10이고, 그리고 n은 100-1,000이며, 그리고 X는 임의선택적으로O, N, S 또는 카르보닐 그룹 (C=O)이며 (이들 각각은 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있다).

[0690] **<u>알킨-함유하는 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들</u>**

[0691] 본 발명의 또다른 구체예에서, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 비-자연적으로 인코드된 아미노산 상에 존재하는 아지드 모이어티와 반응할 알킨 모이어티를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다.

[0692] 일부 구체예들에서, 상기 알킨-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

[0693] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$

[0694] 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등등)이며, m은 2-10이며, n은 100-1,000 (즉, 평균 분자량은 5-40 kDa임)이다.

[0695] 본 발명의 또다른 구체예에서, 알킨-함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC의 표적화 폴리펩티드는 아미드 링키지에 의해 PEG 백본에 연계된 말단 아지드 또는 말단 알킨 모이어티를 함유하는 PEG 유도체로 변형된다.

[0696] 일부 구체예들에서, 상기 알킨-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

[0697] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C\equiv CH$

[0698] 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등등)이며, m은 2-10이며, p는 2-10이며, n은 100-1,000이다.

[0699] 본 발명의 또다른 구체예에서, 아지드-함유하는 아미노산을 포함하는 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 말단 알킨 모이어티를 함유하는 분기된 PEG 유도체로 변형되며, 상기 분기된 PEG의 각 쇄는 10-40 kDa 범위의 분자량, 5-20 kDa 범위의 분자량을 가질 것이다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 상기 알킨-말단 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

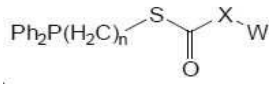
[0700] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_p\ C\equiv CH$

[0701] 이때 R은 단순 알킬 (메틸, 에틸, 프로필, 등등)이며, m은 2-10이며, p는 2-10이고, 그리고 n은 100-1,000이며, 그리고 X는 임의선택적으로 O, N, S 또는 카르보닐 그룹 (C=O)이거나, 또는 존재하지 않는다.

[0702] **<u>포스핀-함유하는 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들</u>**

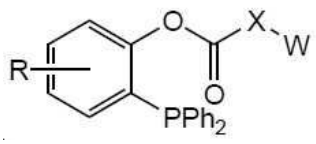
[0703] 본 발명의 또다른 구체예에서, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 활성화된 기능성 그룹 (에스테르, 카르보네이트를 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않은)을 함유하는 PEG 유도체로 변형되는데, 이 유도체는 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 아지드 모이어티와 반응하게 되는 아릴 포스핀 그룹을 더 포함한다. 일반적으로, 상기 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들의 평균 분자량 범위는 1-100 kDa, 일부 구체예들에서, 10-40 kDa일 것이다.

[0704] 일부 구체예들에서, 상기 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

[0705] 

[0706] 이때 n은 1-10이며; X는 O, N, S이거나, 또는 존재하지 않고, Ph은 페닐이며, 그리고 W는 수용성 중합체이다.

[0707] 일부 구체예들에서, 상기 PEG 유도체는 다음의 구조를 가질 것이다:

[0708] 

[0709] 이때 X는 O, N, S이거나 또는 존재하지 않고, Ph는 페닐이며, W는 수용성 중합체이고, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 그룹일 수 있다. 예시적인 R 그룹에는-CH_2,-$C(CH_3)_3$,-OR',-NR'R'',-SR',-할로겐,-C(O)R',-CONR'R'',-$S(O)_2$R',-$S(O)_2$NR'R'',-CN 및-NO_2이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. R', R'', R''' 및 R'''' 은 각 독립적으로 수소, 치환된 또는 치환안된 헤테로알킬, 치환된 또는 치환안된 아릴 (1-3개 할로겐으로 치환된 아릴을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), 치환된 또는 치환안된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 그룹, 또는 아릴알킬 그룹이다. 본 발명의 화합물에 하나 이상의 R 그룹이 내포될 때, 예를 들면, 각 R 그룹은 이들 그룹중 하나 이상이 존재할 때, 각 R', R'', R''' 및 R'''' 그룹과 같이 독립적으로 선택된다. R'과 R''가 동일한 질소 원자에 부착될 때, 이들은 질소 원자와 조합되어, 5-, 6-, 또는 7-구성원의 고리를 형성한다. 예를 들면,-NR'R''는 1-피롤리디닐 및 4-몰포리닐이 내포되는 것을 의미하나, 이에 국한되지 않는다. 치환체에 대한 상기 논의로부터, 용어 "알킬"이란 수소 그룹이외의 다른 굽에 결합된 탄소 원자가 내포된 것을 의미한다는 것을 당업자는 인지할 것인데, 이를 테면, 할로알킬 (-CF_3 및-CH_2CF_3을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는) 및 아실 (-$C(O)CH_3$,-$C(O)CF_3$,-$C(O)CH_2OCH_3$, 그리고 이와 유사한 것들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)이다.

[0710] **다른 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들, 그리고 전반적인 콘쥬게이션 기술**

[0711] TC 폴리펩티드에 연계될 수 있는 다른 예시적인 PEG 분자, 뿐만 아니라 페길화(PEGylation) 방법에는 다음에서 기술된 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 예로써, U.S. 특허 공개 번호. 2004/0001838; 2002/0052009; 2003/0162949; 2004/0013637; 2003/0228274; 2003/0220447; 2003/0158333; 2003/0143596; 2003/0114647; 2003/0105275; 2003/0105224; 2003/0023023; 2002/0156047; 2002/0099133; 2002/0086939; 2002/0082345; 2002/0072573; 2002/0052430; 2002/0040076; 2002/0037949; 2002/0002250; 2001/0056171; 2001/0044526; 2001/0021763; U.S. 특허 번호 6,646,110; 5,824,778; 5,476,653; 5,219,564; 5,629,384; 5,736,625; 4,902,502; 5,281,698; 5,122,614; 5,473,034; 5,516,673; 5,382,657; 6,552,167; 6,610,281; 6,515,100; 6,461,603; 6,436,386; 6,214,966; 5,990,237; 5,900,461; 5,739,208; 5,672,662; 5,446,090; 5,808,096; 5,612,460; 5,324,844; 5,252,714; 6,420,339; 6,201,072; 6,451,346; 6,306,821; 5,559,213; 5,747,646; 5,834,594; 5,849,860; 5,980,948; 6,004,573; 6,129,912; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO095/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 및 EP 154 316, (본원의 참고자료에 편입됨). 본원에서 기재하는 PEG 분자들중 임의의 것들은 단일 쇄, 분기된 쇄, 다중-갈림(arm) 쇄, 단일 기능을 하는, 이중-기능을 하는, 다중-기능을 하는, 또는 임의의 이의 조합을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 임의의 형태로 이용될 수 있다.

[0712] 히드록실아민 (아미노옥시) PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않은, 추가적으로 중합체 및 PEG 유도체들 또는 TLR-링커 유도체들은 다음의 특허에서 기재되어 있다(이들은 모두 본원에 이의 전문이 참고자료에 편입되어 있다): U.S. 특허 공개 번호. 2006/0194256, U.S. 특허 공개 번호. 2006/0217532, U.S. 특허 공개 번호. 2006/0217289, U.S. 가특허 번호 60/755,338; U.S. 가특허 번호 60/755,711; U.S. 가특허 번호 60/755,018; 국제 특허 출원 번호. PCT/US06/49397; WO 2006/069246; U.S. 가특허 번호 60/743,041; U.S. 가특허 번호 60/743,040; 국제 특허 출원 번호. PCT/US06/47822; U.S. 가특허 번호 60/882,819; U.S. 가특허 번호 60/882,500; 그리고 U.S. 가특허 번호 60/870,594.

[0713] ***TC 폴리펩티드의 당화***

[0714] 당화는 폴리펩티드 이를 테면, TC 폴리펩티드의 물리적 속성(예로써, 용해도)에 극적으로 영향을 줄 수 있고, 단백질 안정성, 분비, 그리고 준-세포성 국소화에 또한 중요할 수 있다. 당화된 폴리펩티드는 또한 향상된 안정성을 나타낼 수 있거나, 또는 하나 또는 그 이상의 약동학적 특성, 이를 테면, 반감기를 개선시킬 수 있다. 추

가로, 용해도 개선은 예를 들어, 비-당화된 폴리펩티드를 포함하는 제형보다 약제학적 투여에 더 적합한 제형의 생성을 가능하게 할 수 있다.

[0715] 본 발명에는 사카라이드 잔기들을 품고 있는 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 통합된 TC 폴리펩티드가 내포된다. 상기 사카라이드 잔기들은 자연적 잔기(N-아세틸글루코사민을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않음) 또는 비-자연적 잔기 (3-플루오르갈락토스을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않음)일 수 있다. 상기 사카라이드는 N- 또는 O-연계된 글리코시드 링키지 (N-아세틸갈락토스-L-세린을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않음) 또는 비-자연적 링키지 (옥심 또는 대응하는 C-또는 S-연계된 글리코시드를 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않음)에 의해 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 연계될 수 있다.

[0716] 상기 사카라이드 (글리코실을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않음) 모이어티는 시험관내 또는 생체내에서 TC 폴리펩티드에 추가될 수 있다. 본 발명의 일부 구체예들에서, 카르보닐-함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC의 표적화 폴리펩티드는 아미노옥시 그룹으로 유도체화된 사카라이드로 변형되어, 옥심 링키지에 의해 연계된 대응하는 당화된 폴리펩티드가 생성된다. 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 일단 부착되면, 상기 사카라이드는 TC 폴리펩티드에 결합된 올리고사카라이드를 만들기 위해, 글리코실트랜스퍼라제 및 기타 효소로 처리하여 추가로 손볼 수 있다. *예로써*, H. Liu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003) 참고.

[0717] 본 발명의 일부 구체예들에서, 카르보닐-함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC 폴리펩티드는 아미노옥시 유도체로 준비된, 특정 구조를 갖는 글리칸으로 직접적으로 변형된다. 아지드, 알킨, 하이드라지드, 하이드라진, 그리고 세미카르바자이드를 비롯한, 다른 기능 그룹을 이용하여 상기 사카라이드를 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 연계시킬 수 있음을 당업자는 인지할 것이다.

[0718] 본 발명의 일부 구체예들에서, 그 다음, 아지드 또는 알키닐-함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드는 차례로, 알키닐 또는 아지드 유도체들을 이용한, Huisgen [3+2] 사이클로추가 반응(이에 국한되지 않음)에 의해 변형될 수 있다. 이 방법을 사용하면, 단백질이 매우 높은 선택성을 가지도록 변형될 수 있다.

[0719] ***TC 이량체 및 다량체***

[0720] 본 발명은 TC 및 TC 유사체 조합, 이를 테면, 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체, 또는 이종다량체 (즉, 삼량체, 사량체, 등등)를 제공하며, 이때 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 함유하는 TC는 또다른 TC 또는 임의의 다른 폴리펩티드(TC가 아닌)에 이의 폴리펩티드 백본에 직접적으로 결합되거나, 또는 링커를 통하여 결합될 수 있다. 단량체에 비교하여 증가된 분자량으로 인해, 상기 TC 이량체 또는 다량체 콘쥬게이트는 단량체 TC에 비교하여, 상이한 약리학적, 약동학적, 약력학적, 조절된 치료 반감기 또는 조절된 혈장 반감기(이에 국한되지 않는) 새로운 또는 바람직한 속성들을 나타낼 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 TC 이량체는 해당 TC 수용체의 신호 전달(signal transduction)을 조절할 것이다. 다른 구체예들에서, 본 발명의 TC 이량체 또는 다량체는 TC 수용체 길항제, 작용제, 또는 조절자로 작용할 것이다.

[0721] 일부 구체예들에서, TC를 함유하는 이량체 또는 다량체에서 하나 또는 그 이상의 TC 분자는 수용성 중합체에 연계된 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함한다.

[0722] 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드는 Asn-Lys 아미드 링키지 또는 Cys-Cys 이황화물 링키지(이에 국한되지 않음)에 의해 직접 연계된다. 일부 구체예들에서, 상기 TC 폴리펩티드, 및/또는 상기 연계된 비-TC 분자는 제 1 TC 폴리펩티드의 하나의 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 이량체화를 용이하게 하는 알킨(이에 국한되지 않음)이 내포된 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 제 2 분자의 제 2 비-자연적으로 인코드된 아미노산에 있는 아지드는 Huisgen [3+2] 사이클로추가를 통하여 콘쥬게이트될 것이다. 대안으로, 케톤-함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC, 및/또는 상기 연계된 비-TC 분자는 히드록실아민-함유하는 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 제 2 폴리펩티드에 콘쥬게이트될 수 있고, 이 폴리펩티드는 대응하는 옥심의 형성을 통하여 활성화된다.

[0723] 대안으로, 두 개의 TC 폴리펩티드, 및/또는 연계된 비-펩티드 TC 분자는 링커를 통하여 연계된다. 임의의 이종- 또는 동종-이중-기능성 링커를 이용하여 두 개 분자, 및/또는 연계된 비-펩티드 TC 분자를 연계할 수 있고, 이때 이들 분자는 동일한 또는 상이한 주요 서열을 가질 수 있다. 일부 경우들에서, 상기 TC, 및/또는 상기 연계된 비-펩티드 TC 분자를 묶을 때 이용되는 링커는 이중-기능성 PEG 시약일 수 있다. 상기 링커는 광역의 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. TC와 연계된 엔티티 간에, 또는 TC와 이의 수용체 간에, 또는 연계된 엔티티와

이의 결합 파트너(존재한다면) 간에 원하는 공간적 상관관계 또는 형태를 제공하기 위해 더 큰 분자량의 또는 더 작은 분자량의 링커가 이용될 수 있다. 더 긴 또는 더 짧은 분자 길이를 갖는 링커를 또한 이용하여 TC와 연계된 엔티티 간의, 또는 연계된 엔티티와 이의 결합 파트너 (존재한다면) 간의 원하는 공간 또는 유연성을 또한 제공할 수 있다.

[0724] 일부 구체예들에서, 본 발명은 덤벨 구조를 갖는 수용성 이중-기능성 링커를 제공하는데, 여기에는 다음이 내포된다: a) 중합체 백본의 적어도 제 1 단부 상에 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 히드록실아민, 또는 카르보닐-함유하는 모이어티; 그리고 b) 중합체 백본의 제 2 단부 상에 적어도 제 2 기능성 그룹. 제 2 기능성 그룹은 상기 제 1 기능성 그룹과 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 구체예들에서 제 2 기능성 그룹은 상기 제 1 기능성 그룹과 반응하지 않는다. 일부 구체예들에서, 본 발명은 분기된 분자 구조의 적어도 하나의 갈래(arm)를 포함하는 수용성 화합물들을 제공한다. 예를 들면, 상기 분기된 분자 구조는 가지모양(dendritic)일 수 있다.

[0725] 일부 구체예들에서, 본 발명은 다음 구조를 갖는 수용성 활성화된 중합체와의 반응에 의해 형성된 하나 또는 그 이상의 TC 폴리펩티드를 포함하는 다량체를 제공한다: $R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$ 이때 n은 약 5 ~ 3,000이며, m은 2-10이고, X는 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 아미노옥시 그룹, 히드록실아민, 아세틸, 또는 카르보닐-함유하는 모이어티이며, 그리고 R은 캡핑 그룹, 기능 그룹, 또는 이탈 그룹으로 X와 동일하거나 또는 상이할 수 있다. R은 예를 들면, 히드록실, 보호된 히드록실, 알콕실, N-히드록시숙시니미딜 에스테르, 1-벤조트리아졸일 에스테르, N-히드록시숙시니미딜 카르보네이트, 1-벤조트리아졸일 카르보네이트, 아세탈, 알데히드, 알데히드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타아크릴레이트, 아크릴아미드, 활성 술폰, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복실산, 보호된 카르복실산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐술폰, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요오드아세타미드, 에폭시드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 그리고 트레실레이트, 알켄, 그리고 케톤으로 구성된 군에서 선택된 기능 그룹일 수 있다.

[0726] ***TC 폴리펩티드 활성 및 HER2 표적에 대한 TC 폴리펩티드의 친화력 측정***

[0727] TC 폴리펩티드 활성 표준 분석 또는 알려진 시험관내 또는 생체내 분석을 사용하여 결정할 수 있다. TC는 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 생물학적 활성에 대해 분석될 수 있다. 이러한 분석에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: TC-반응성 유전자들의 활성화, 수용체 결합 분석, 항-바이러스 활성 분석, 세포변성 효과 억제 분석, 항-증식성 분석, 면역조절 분석 및 MHC 분자의 유도를 모니터링하는 분석.

[0728] TC 폴리펩티드는 TC-민감성 신호 전달 경로를 활성화하는 능력에 대해 분석될 수 있다. 한 가지 예는 인터페론-자극된 반응 요소(ISRE) 분석이다. TC 수용체를 구성적으로 발현하는 세포는 ISRE-루시퍼라제 벡터(pISRE-luc, Clontech)로 일시적으로 형질감염된다. 형질감염 후, 상기 세포는 상기 TC의 표적화 폴리펩티드로 처리된다. 다수의 단백질 농도, 예를 들면, 0.0001-10 ng/mL이 용량-반응 곡선을 생성하기 위해 테스트된다. 상기 TC 폴리펩티드가 TC 수용체에 결합하고, 이를 활성화시킨다면, 결과적으로 신호 전달 캐스캐이드는 루시퍼라제 발현을 유도한다. 예를 들어, TopCount™ 또는 Fusion™ 마이크로플레이트 판독기 및 Steady-Glo® 루시퍼라제 분석 시스템(Promega)을 사용하여, 다양한 방법으로 발광성을 측정할 수 있다.

[0729] TC 폴리펩티드는 TC 수용체에 결합하는 능력에 대해 분석될 수 있다. 비-자연적 아미노산을 포함하는 비-페길화된 또는 페길화된 TC 폴리펩티드의 경우, TC의 수용체에 대한 이의 친화력은 BIAcore™ 바이오센서 (Pharmacia)를 사용하여 측정될 수 있다. 적합한 결합 분석에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: BIAcore 분석 (Pearce et al., Biochemistry 38:81-89 (1999)) 및 AlphaScreen™ 분석 (PerkinElmer).

[0730] 상기 TC 폴리펩티드를 생성하기 위해 어떤 방법이 사용되었는 지 에 관계없이, TC 폴리펩티드는 생물학적 활성에 대한 분석의 대상이 된다. 일반적으로, 생물학적 활성에 대한 테스트는 원하는 결과, 이를 테면, 생물학적 활성의 증가 또는 감소 (변형된 TC와 비교하여), 상이한 생물학적 활성 (변형된 TC와 비교하여), 수용체 또는 결합 파트너 친화력 분석, TC 자체 또는 이의 수용체 (변형된 TC와 비교하여)의 형태적 또는 구조적 변경, 또는 혈청 반감기 분석에 대한 분석을 제공해야 한다.

[0731] ***효능, 생체 내 기능적 반감기 및 약동학적 매개변수 측정***

[0732] 본 발명의 중요한 측면은 폴리펩티드를 수용성 폴리머 모이어티에 콘쥬게이션되거나 또는 콘쥬게이션 없이, TC를 구축함으로써 얻을 수 있는 연장된 생물학적 반감기이다. 투여 후, TC 혈청 농도의 감소 속도는 콘쥬게이트

된 TC 폴리펩티드 및 비-콘쥬게이트된 TC 폴리펩티드, 그리고 이의 변이체로의 처리에 대한 생물학적 반응을 평가하는 것이 중요할 수 있다. 본 발명의 콘쥬게이트된 TC 폴리펩티드 및 비-콘쥬게이트된 TC 폴리펩티드, 그리고 이의 변이체는 예로써 피하를 통한 투여 또는 i.v. 투여 후 혈정 반감기를 연장시킬 수 있는데, 이는 예로써, ELISA 방법 또는 일차 스크리닝 분석에 의해 측정될 수 있다. 상업적 공급처,이를 테면, 이를 테면, Invitrogen (Carlsbad, CA)로부터 ELISA 또는 RIA 키트를 이용할 수 있다. 생체내 생물학적 반감기의 측정은 본원에 기재된 바와 같이 수행된다.

[0733] 비-자연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 TC의 표적화 폴리펩티드의 효능 및 기능적 생체내 반감기는 당업자에게 공지된 프로토콜에 따라 결정될 수 있다.

[0734] 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC 폴리펩티드의 약동학적 매개변수는 정상적인 Sprague-Dawley 수컷 쥐에서 평가할 수 있다 (처리 그룹당 N=5 마리 동물). 동물에게 단일 용량의 25 ug/(렛)을 iv로 또는 50 ug/(렛)을 sc로 제공하고, 대략적으로 5-7개의 혈액 샘플을 사전-정해둔 일정에 따라 취하며, 일반적으로 수용성 중합체에 콘쥬게이트되지 않은, 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC 폴리펩티드의 경우 약 6시간, 그리고 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하고, 수용성 중합체에 콘쥬게이트된 TC 폴리펩티드의 경우 약 4일 동안이 된다. 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 없는 TC의 약동학 데이터를 비-자연적으로 인코드된 아미노산을 포함하는 TC 폴리펩티드로부터 얻은 데이터와 직접적으로 비교할 수 있다.

[0735] ***투여 및 약제학적 조성물***

[0736] 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질 (TC, 합성효소, 하나 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산을 포함하는 단백질, 등등, 그러나, 이에 국한되지 않음)은 치료요법적 사용을 목적으로, 임의선택적으로, 약제학적으로 적합한 담체에 복합된, 그러나, 이에 국한되지 않은 것에서 이용될 수 있다. 이러한 조성물은 예를 들면, 치료요법적으로 유효량의 화합물, 그리고 약제학적으로 수용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체 또는 부형제에는 염수, 완충된 염수, 덱스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및/또는 이의 조합이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 상기 제형은 투여 방식에 맞게 만들어진다. 일반적으로, 단백질을 투여하는 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 본 발명의 폴리펩티드의 투여에 적용될 수 있다. 조성물은 약학적으로 허용되는 염으로 존재하는 것과 같은 수용성 형태일 수 있으며, 이는 산 및 염기 부가 염을 모두 포함하는 것을 의미한다.

[0737] 당업자에게 공지된 방법에 따라 효능, 조직 대사를 확인하고, 투여량을 추정하기 위해, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드를 포함하는 치료요법적 조성물을 하나 또는 그 이상의 적절한 시험관 내 및/또는 생체 내 질환 동물 모델에서 임의선택적으로 테스트한다. 특히, 투여량은 즉, 관련 분석에서 자연적인 아미노산 동족체에 대해 본원에서의 비-자연적 아미노산의 활성, 안정성 또는 다른 적합한 척도를 초기에 결정될 수 있다 (하나 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산이 내포되도록 변형된 TC의 표적화 폴리펩티드를 자연 아미노산 TC 폴리펩티드와 비교, 및 하나 또는 그 이상의 비-자연적 아미노산이 내포되도록 변형된 TC의 표적화 폴리펩티드와 현재 이용가능한 TC 처리의 비교).

[0738] 투여는 분자를 혈액 또는 조직 세포와 궁극적으로 접촉하도록 도입하기 위해 일반적으로 사용되는 임의의 경로를 통해 이루어진다. 본 발명의 비-자연적 아미노산 폴리펩티드는 임의선택적으로 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 수용가능한 담체와 함께, 임의의 적합한 방식으로 투여된다. 본 발명의 내용에서 이러한 폴리펩티드를 환자에게 투여하는 적합한 방법들이 이용가능하지만, 하나 이상의 경로를 이용하여 특정 조성물을 투여할 수 있고, 특정 경로는 대개 다른 경로보다 더 즉각적이고, 효과적인 조치 또는 반응을 제공할 수 있다.

[0739] 약제학적으로 허용가능한 담체는 투여되는 특정 조성물, 뿐만 아니라, 이 조성물을 투여하는데 이용되는 특정 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물의 매우 다양한 적합한 제형이 존재한다.

[0740] 본 발명의 TC 폴리펩티드는 단백질 또는 펩티드에 적합한 임의의 통상적인 경로를 통하여 투여될 수 있는데, 비경구적으로, 예를 들어, 피하 또는 정맥내, 또는 임의의 다른 형태의 주사 또는 주입될 수 있다(이에 국한되지 않음). 폴리펩티드 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 피하, 국소, 설하 또는 직장 수단을 포함하나, 이에 국한되지 않는 다수의 경로에 의해 투여될 수 있다. 비-자연적 아미노산 폴리펩티드(변형된 또는 변형 안된)를 포함하는 조성물은 리포좀을 통하여 또한 투여될 수 있다. 이러한 투여 경로 및 적절한 제형은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 상기 TC 폴리펩티드는 단독으로, 또는 다른 적합한 성분들 이를 테면, 약제학적 담체와 복합되어 이용될 수 있다. 상기 TC 폴리펩티드는 다른 제제 또는 치료요법적제와 복합되어 이용될 수 있다.

[0741] 비-자연적 아미노산을 포함하는 TC 폴리펩티드 단독으로, 또는 다른 적합한 성분과 함께 흡입을 통하여 투여할

수 있는 에어로졸 제형 (즉, 이들은 "분무될 수 있다")으로 또한 만들어질 수 있다. 에어로졸 제형은 가압된 수용가능한 추진체, 이를 테면, 디클로로디플루오르메탄, 프로판, 질소, 그리고 이와 유사한 것들에 위치될 수 있다.

[0742] 비경구 투여, 이를 테면, 예를 들면, 관절내(관절에서), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 그리고 피하 경로에 의한 투여에 적합한 제형에는 수성 및 비수성, 등장성 멸균 주사 용액이 내포되는데, 이것은 항산화제, 완충제, 정균제 및 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질, 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정제 및 보존제를 함유할 수 있다. TC의 제형은 앰플 및 바이알과 같은 단위-용량 또는 다중-용량 밀봉 용기로 제공될 수 있다.

[0743] 비경구 투여 및 정맥내 투여가 바람직한 투여 방법이다. 특히, 현재 사용중인 제형과 함께, 자연 아미노산 상동체 치료요법제 (EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFNs 예로써 TC, 인터루킨, 항체, FGFs에 일반적으로 사용되는 것들, 및/또는 임의의 다른 약제학적으로 전달되는 단백질을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는)에 이미 사용중인 투여 경로는 본 발명의 폴리펩티드에 대한 바람직한 투여 경로 및 제형을 제공한다.

[0744] 본 발명의 맥락에서 환자에게 투여되는 용량은 용도에 따라, 시간 경과에 따른 환자에게 유익한 치료 반응 또는 다른 적절한 활성을 갖기에 충분하다. 용량은 특정 벡터 또는 제형의 효능, 사용된 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 활성, 안정성 또는 혈청 반감기, 치료를 받게 된 환자의 상태, 환자의 체중 또는 환자의 표면적에 의해 결정된다. 용량의 크기는 특정 환자에서 특정 벡터, 제형 또는 이와 유사한 것들에 수반되는 임의의 불리한 부작용의 존재, 그 성질 및 그 정도에 의해 또한 결정된다.

[0745] 질환(호중구 감소증, 재생 불량성 빈혈, 순환 호중구 감소증, 특발성 호중구 감소증, Chdiak-Higashi 증후군, 전신 홍반 루푸스(SLE), 백혈병, 골수이형성 증후군 및 골수섬유증, 또는 이와 유사한 것들을 비롯한 질환, 그러나, 이에 국한되지 않는 질환)의 치료 또는 예방에 있어서 투여될 벡터 또는 제제의 유효량을 결정함에 있어서, 의사는 순환 혈장 수준, 제제 독성 및 질환 진행을 평가한다.

[0746] 예를 들어, 70kg 환자에게 투여되는 용량은 일반적으로 관련 조성물의 변경된 활성 또는 혈청 반감기에 대해 조정된 현재 사용되는 치료 단백질의 용량과 등가인 범위이다. 본 발명의 벡터 또는 약제학적 제형은 항체 투여, 백신 투여, 세포독성제의 투여, 자연 아미노산 폴리펩티드, 핵산, 뉴클레오티드 유사체, 생물학적 반응 조절제 등을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않은 임의의 공지된 통상적인 요법에 의해 치료 조건을 보완할 수 있다.

[0747] 투여를 위해, 본 발명의 제형은 관련 제형의 LD-50 또는 ED-50, 및/또는 해당 환자의 체중 및 전반적인 건강에 대해 적용되는, 그러나, 이에 국한되지 않은 다양한 농도에서 다양한 농도에서 상기 비-자연적 아미노산 폴리펩티드의 임의의 부작용의 관찰을 통하여 결정된 속도로 투여된다. 단일 또는 분할 투여를 통해 투여될 수 있다.

[0748] 제형 주입을 받는 환자에게서 열, 오한 또는 근육통이 발생하면, 적절한 용량의 아스피린, 이부프로펜, 아세트아미노펜 또는 기타 통증/열 조절 약물을 투여받는다. 주입에 대해 열, 근육통 및 오한과 같은 반응을 경험하는 환자는 아스피린, 아세트아미노펜 또는 디펜히드라민을 포함하지만 이에 국한되지 않는 것들을 이러한 주입 30분 전, 사전-투약한다. 메페리딘은 해열제와 항-히스타민제에 빠르게 반응하지 않는 더 심한 오한과 근육통에 사용된다. 세포 주입은 반응의 중증도에 따라, 지연되거나 또는 중단된다.

[0749] 본 발명의 TC의 표적화 폴리펩티드의 인간 형태는 포유동물 대상체에게 직접 투여될 수 있다. 투여는 TC 폴리펩티드를 대상체에 도입하기 위해 일반적으로 사용되는 임의의 경로에 의해 이루어진다. 주어진 경우에 가장 적합한 경로는 치료되는 상태의 특성과 중증도에 따라 달라지기는 하지만, 본 발명의 구체예들에 따른 TC 폴리펩티드 조성물에는 다음의 투여에 적합한 것들이 내포된다: 구강, 직장, 국소, 흡입에 적합한 것들 (에어로졸을 통하여, 그러나, 이에 국한되지 않음), 볼 (혀 아래, 그러나, 이에 국한되지 않음), 질, 비경구 (피하, 근육내, 피내, 관절내, 흉막내, 복강내, 뇌내, 동맥내, 또는 정맥내, 그러나, 이에 국한되지 않음), 국소 (즉, 기도 표면을 포함한 피부 및 점막 표면 모두), 폐, 안내, 비강 및 경피 투여. 투여는 국소적으로 또는 전신으로 투여될 수 있다. 화합물의 제형은 앰플 및 바이알과 같은 단위 용량 또는 다중 용량 밀봉 용기에 제공될 수 있다. 본 발명의 TC 폴리펩티드는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께, 주사가능한 단위 투여량 형태(용액, 현탁액 또는 에멀젼을 포함하나, 이에 국한되지 않음)의 혼합물로 제조될 수 있다. 본 발명의 TC 폴리펩티드는 또한 연속 주입(삼투 펌프와 같은 미니펌프를 포함하나, 이에 국한되지 않음), 단일 볼루스 또는 서방성 데포 제형에 의해 투여될 수 있다.

[0750] 투여에 적합한 제형에는 수성 및 비-수성 용액 (이들 용액은 항산화제, 완충제, 정균제 및 제형을 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있고), 그리고 수성 및 비-수성 멸균 용액 (이들은 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정제

및 보존제가 내포될 수 있음)이 내포된다. 용액 및 현탁액은 앞서 설명한 종류의 멸균 분말, 과립 및 정제로 제조할 수 있다.

[0751] 냉동-건조는 관심대상 단백질 조제물에서 물을 제거하는 역할을 하는 단백질을 제시하기 위해 일반적으로 사용되는 기술이다. 냉동-건조(freeze-drying) 또는 동결건조(lyophilization)는 건조 대상 물질을 먼저 동결시킨 다음, 진공 환경에서 승화에 의해 얼음 또는 동결 용매를 제거하는 공정이다. 부형제는 냉동-건조 공정 동안 안정성을 향상시키고 및/또는 저장시 동결건조된 제품의 안정성을 향상시키기 위해 사전-동결건조된 제형에 내포될 수 있다. Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990) 및 Arakawa et al. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991).

[0752] 약제의 분무 건조는 또한 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," in Drug Dev. Ind. Pharm, 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992) 참고. 소분자 의약품 외에도, 효소, 혈청, 혈장, 미생물 및 효모와 같은 다양한 생물학적 물질이 분무 건조되었다. 분무 건조는 1단계 공정에서 액체 제약 조제물을 미세하고, 먼지 없는 또는 응집된 분말로 전환할 수 있기 때문에 유용한 기술이다. 기본 기술은 다음 4단계를 포함한다: a) 공급 용액을 분무로 분무하는 단계; b) 분무-공기 접촉; c) 스프레이의 건조; 그리고 d) 건조 공기로부터 건조 생성물의 분리. U.S. 특허 번호 6,235,710 및 6,001,800, (본원의 참고자료에 편입됨)에서는 분무 건조에 의한 재조합 에리트로포에틴을 준비하는 과정을 기술한다.

[0753] 본 발명의 약제학적 조성물 및 제형은 약제학적으로 수용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 투여되는 특정 조성물, 뿐만 아니라, 이 조성물을 투여하는데 이용되는 특정 방법에 의해 일부분적으로 결정된다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물(임의의 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 내포됨)의 매우 다양한 적합한 제형이 존재한다 (*에로써, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. 1985) 참고).

[0754] 적합한 담체에는 다음의 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 숙시네이트, 포스페이트, 보레이트, HEPES, 구연산염, 히스티딘, 이미다졸, 아세테이트, 바이카르보네이트, 그리고 다른 유기 산를 함유하는 완충제; 아스코르브산을 포함하지만 이에 국한되지 않는 항산화제; 약 10개 미만의 잔기를 포함하나, 이에 국한되지 않는 저-분자량 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 단백질; 폴리비닐피롤리돈을 비롯한 그러나, 이에 국한되지 않는 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 히스티딘 또는 히스티딘 유도체들, 메티오닌, 글루탐산염, 또는 리신을 비롯한 그러나, 이에 국한되지 않는 아미노산; 트레할로스, 수크로스, 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 비롯한 그러나, 이에 국한되지 않는 단당류, 이당류, 그리고 다른 탄수화물; EDTA 및 에덴테이트 이나트륨을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 킬레이트제; 아연, 코발트, 또는 구리를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 이가 금속 이온; 만니톨 또는 소르비톨를 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는 당(sugar) 알코올; 나트륨 및 염화 나트륨당을 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않은 염-형성 카운터 이온; 충전제, 이를 테면, 미세결정 셀룰로오스, 락토스, 옥수수 및 기타 전분; 결합제; 감미제 및 기타 풍미제; 발색제; 및/또는 Tween™(Tween 80 (폴리소르베이트 80) 및 Tween 20 (폴리소르베이트 20을 비롯한, 그러나 이에 국한되지 않는), Pluronics™ 및 기타 플루론 산(플루론 산 F68 (폴옥사머 188)를 비롯한 그러나 이에 국한되지 않음), 또는 PEG를 비롯한, 그러나, 이에 국한되지 않는 비-이온성 계면활성제. 적합한 계면활성제에는 예를 들면, 폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드), 즉, (PEO-PPO-PEO), 또는 폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)에 기반된 폴리에테르, 즉, (PPO-PEO-PPO), 또는 이의 조합이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. PEO-PPO-PEO 및 PPO-PEO-PPO는 상표명 Pluronics™, R-Pluronics™, Tetronics™ 및 R-Tetronics™ (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.)으로 시판되며, U.S. 특허 번호 4,820,352 (본원의 참고자료에 이의 전문이 편입됨)에 추가로 기재되어 있다. 다른 에틸렌/폴리프로필렌 블록 중합체가 적합한 계면활성제일 수 있다. 계면활성제 또는 계면활성제의 조합은 교반으로 인한 스트레스를 포함하지만 이에 국한되지 않는 하나 이상의 스트레스에 대해 페길화된 TC의 안정화에 사용될 수 있다. 위의 것들중 일부는 "벌크제(bulking agents)"라고 할 수 있다. 일부는 "장성 수정자(tonicity modifiers)"라고도 한다. 항균 보존제는 제품 안정성과 항균 효과를 위해 적용될 수도 있는다; 적합한 보존제에는 벤질 알코올, 염화벤잘코늄, 메타크레졸, 메틸/프로필 파라벤, 크레졸 및 페놀, 또는 이들의 조합이 내포되나, 그러나 이에 국한되지는 않는다. U.S. 특허 번호 7,144,574(본원의 참고자료에 편입됨)는 본 발명의 약제학적 조성물 및 제형 및 기타 전달 제제에 적합할 수 있는 추가 물질을 기재한다.

[0755] 수용성 중합체, 이를 테면, PEG에 연계된 것들을 비롯한, 본 발명의 TC 폴리펩티드는 지속-방출 시스템에 의해, 또는 이 시스템의 일부로서 투여될 수 있다. 지속 방출 조성물에는 필름 또는 마이크로캡슐을 포함하나, 그러나 이에 국한되지 않는 성형품 형태의 반-투과성 중합체 매트릭스가 내포하나, 그러나 이에 국한되지는 않는다. 지

속-방출 매트릭스에는 다음과 같은 생체 적합성 물질이 내포된다: 폴리(2-히드록시에틸 메타크릴레이트) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 267-277 (1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982), 에틸렌 비닐 아세테이트 (Langer *et al.*, *supra*) 또는 폴리-D-(-)-3-히드록시부틸산 (EP 133,988), 폴리락티드 (폴리락트산) (U.S. 특허 번호 3,773,919; EP 58,481), 폴리글리코리드 (글리콜산의 중합체), 폴리락티드 코-글리코리드 (락트산과 글리콜산의 공중합체) 폴리무수물, L-글루타민산 및 감마-에틸-L-글루탐산염의 공중합체 (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983), 폴리(오르소)에스테르, 폴리펩티드, 히알루론산, 콜라겐, 콘드로이틴 술페이트, 카르복실산, 지방산, 인지질, 폴리사카라이드, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산 이를 테면, 페닐알라닌, 티로신, 이소류신, 폴리뉴클레오티드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘. 지속-방출 조성물에는 리포솜으로 포획된 화합물이 또한 내포된다. 화합물을 함유하는 리포좀은 당분야에 공지된 방법에 의해 제조된다: DE 3,218,121; Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; U.S. 특허 번호 4,619,794; EP 143,949; U.S. 특허 번호 5,021,234; 일본 특허 출원 83-118008; U.S. 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545; 그리고 EP 102,324. 인용된 모든 참고 문헌 및 특허는 본원의 참고자료에 편입된다.

[0756] 리포좀에 포획된 TC 폴리펩티드는 예로써, DE 3,218,121; Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; U.S. 특허 번호 4,619,794; EP 143,949; U.S. 특허 번호 5,021,234; 일본 특허 출원 83-118008; U.S. 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545; 그리고 EP 102,324에 기재된 것과 같은 방법으로 제조할 수 있다. 리포솜의 조성 및 크기는 잘 알려져 있거나. 또는 당업계의 숙련자에 의해 경험적으로 용이하게 결정될 수 있다. 설명된 바와 같은 리포좀의 몇 가지 예시들은 예로써, Park JW, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1327-1331 (1995); Lasic D and Papahadjopoulos D (eds): Medical Applications of Liposomes (1998); Drummond DC, *et al.*, Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, in Teicher B (ed): Cancer Drug Discovery and Development (2002); Park JW, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C, *et al.*, *Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003)에서 기술되고 있다. 인용된 모든 참고 문헌 및 특허는 본원의 참고자료에 편입된다.

[0757] 본 발명의 맥락에서, 환자에게 투여되는 용량은 시간의 경과에 따라 해당 대상체에서 유익한 반응을 유발하기에 충분해야 한다. 일반적으로, 투여당 비경구로 투여되는 상기 본 발명의 TC 폴리펩티드의 약제학적으로 총 유효량은 치료적 재량에 따라 달라질 수 있지만, 환자 체중의 약 0.01 μg/kg/일 ~ 약 100 μg/kg, 또는 약 0.05 mg/kg ~ 약 1 mg/kg 범위가 된다. 이 구체예의 특정 측면들에서, 상기 콘쥬게이트는 4 μ/kg/일 이상 ~ 약 20 μg/kg/일의 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 여전히 다른 측면들에서, 상기 콘쥬게이트는 4 μg/kg/일 이상 ~ 약 9 μg/kg/일의 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 여전히 다른 측면들에서, 상기 콘쥬게이트약 4 μg/kg/일 ~ 약 12.5 μg/kg/일의 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 특정 측면에서, 상기 콘쥬게이트는 과도한 독성 없이, 허용되는 최대 용량에서, 또는 그 이하의 용량으로 투여될 수 있다. 추가로, 상기 콘쥬게이트는 주당 적어도 2회 투여될 수 있거나, 또는 상기 콘쥬게이트는 주당 적어도 3회, 주당 적어도 4회, 주당 적어도 5회, 주당 적어도 6회 또는 주당 7회 투여될 수 있다. 상기 콘쥬게이트가 한 번 이상 투여되는 특정 측면에서, 상기 콘쥬게이트는 매번 4 μg/kg/일 이상의 투여량으로 투여될 수 있다. 특히, 상기 콘쥬게이트는 2주 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 특정 측면들에서, 인터루킨-10 수용체를 발현시키는 세포의 성장은 참조 샘플, 즉, 본 발명의 콘쥬게이트에 접촉되지 않은 세포 샘플과 비교하였을 때, 적어도 50%, 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 억제될 수 있다. 이 구체예의 특정 측면에서, 상기 콘쥬게이트는 약 5.3 μg/kg/일의 용량, 또는 약 7.1 μg/kg/일, 또는약 9.4 μg/kg/일의 용량, 또는 약 12.5 μg/kg/일의 용량으로 투여될 수 있다. 투여 빈도는 치료적 재량에 따라 또한 달라지며, 인간에게 사용하도록 승인된 상업적으로 이용가능한 TC 폴리펩티드 제품보다 더 빈번하거나 또는 덜 빈번하게 투여될 수 있다. 일반적으로, 상기 TC의 표적화 폴리펩티드, 페길화된 TC 폴리펩티드, 콘쥬게이트된 TC 폴리펩티드, 또는 페길화된 콘쥬게이트된 본 발명의 TC 폴리펩티드는 상기 기재된 임의의 투여 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0758] ***본 발명의 TC의 치료요법적 용도***

[0759] 본 발명의 TC는 광범위한 장애의 치료에 유용하다. 본 발명에는 TC, CD8+ T-세포 자극, 및/또는 TC 제형에 반응하는 암에 위험한, 이러한 암을 가진, 및/또는 이러한 암에 걸렸던 포유류를 치료하는 방법이 또한 내포된다. TCs의 투여로 인하여 단기 효과, 즉, 여러 임상 매개변수에 대한 즉각적인 유익한 효과가 관찰되었으며, 이는 투여 후 12시간 또는 24시간에 일어날 수 있고, 다른 한편으로, 장기적인 유익한 효과, 가령, 종양 성장 진행의 감속, 종양 크기 감소 및/또는 순환 CD8+ T 세포 수준 증가가 또한 일어날 수 있으며, 그리고 본 발명의 상기

TC는 당분야에 공지된 임의의 수단에 의해 투여될 수 있고, 그리고 주입을 통해, 예를 들면, 원하는 약리학적 효과를 얻기에 충분한 용량으로 동맥, 복강내 또는 정맥내 주사 및/또는 주입에 의해 유익하게 투여될 수 있다.

[0760] 상기 TC 용량(dosage)은 치료당, 체중 kg당 10-200 mg, 또는 40-80 mg의 TC 폴리펩티드의 범위일 수 있다. 예를 들면, 투여되는 TC의 투여량은 볼루스 주사 및/또는 임상적으로 필요한 기간, 가령, 몇 분 내지 몇 시간, 예를 들어, 최대 24시간 동안 주입으로서 제공되며, 체중 kg당 약 20-100 mg의 TC 폴리펩티드일 수 있다. 필요한 경우, TC 투여를 한 번 또는 여러 번 반복할 수 있다. TC의 투여는 다른 약제학적 제제, 이를 테면, 화학요법제의 투여와 조합될 수 있다. 더욱이, 본 발명은 암의 예방 및/또는 치료를 요하는 대상체에게 유효량의 TC를 투여하는 것을 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0761] TC의 평균 양은 다양할 수 있으며, 특히 자격을 갖춘 의사의 권장 사항 및 처방에 따라 결정되어야 한다. TC의 정확한 양은 치료되는 병태의 정확한 유형, 치료되는 환자의 병태 및 조성물의 다른 성분과 같은 요인에 따른 선호되는 대상이다. 본 발명은 치료요법적으로 유효량의 또다른 활성제 투여를 제공한다. 제공되는 양은 TC를 사용한 치료를 기반으로 하는 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0762] **실시예들**

[0763] 다음 실시예들은 설명을 위해 제공되지만, 청구된 발명을 제한하는 것은 아니다.

[0764] **실시예 1**: TLR 작용제 합성을 위한 일반 방법론

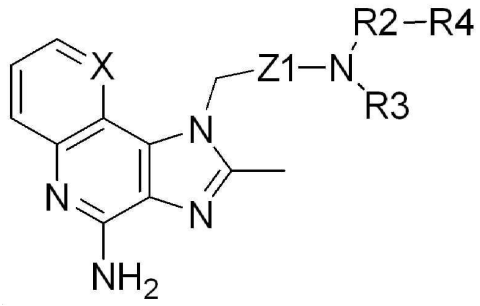
[0765] 본 실시예는 본 발명의 TLR-작용제를 합성하는데 사용되는 일반 방법론을 제공한다.

[0766] 시판되는 모든 무수(anhydrous) 용매는 추가 정제 없이 사용하고, 질소 대기 하에서 보관하였다. 가시화를 위해, UV 광 및/또는 수성 KMnO4 용액으로 착색을 사용하여 Merck사의 실리카 겔 60 F254 플레이트에서 TLC를 수행했다. 실험 절차에서 자세히 설명된 조건들을 사용하여, Teledyne ISCO의 Combi Flash Rf에서 크로마토그래피 정제를 수행했다. 분석용 HPLC는 Phenomenex Gemini-NX C18 5 μm 50 x 4.6 mm 컬럼을 사용하여, Shimadzu 시스템에서 수행되었으며, 이 컬럼은 0.05% TFA를 함유하는 물에서 아세토니트릴의 선형 구배로 분당 1 ml로 용출되었다. (이동상 A: 0.05% 트리플루오르아세트산/물; 이동상 B: 0.05% 트리플루오르아세트산/90% 아세토니트릴 (ACN) 수성 용액) 또는 Waters BEH 1.7 μm v2.1X50 mm 컬럼. 분석 방법 1: 0% B, 1 분, 0-50% B, 11 분, 50-100% B, 0.5 분, 100% B, 1.5 분 동안, 100-0% B, 1 분, 0% B, 2 분 동안; 방법 2: 10-20% B, 1 분, 20-70% B, 11 분, 70-100% B, 0.5 분, 100% B, 1.5 분 동안, 100-10% B, 1 분, 10% B, 2 분 동안; 방법 3: 방법 2: 0-40% B, 1 분, 40-90% B, 11 분, 90-100% B, 0.5 분, 100% B, 1.5 분 동안, 100-10% B, 1 분, 10% B, 2 분 동안; 방법 4: 5%B, 0.3 분, 5% ~ 100% B, 0.3 ~ 1.5 분. 100% B, 1.5 분 ~ 1.8 분, 유속 0.8 ml/분 ~ 1.1 분/분, 0 분 ~ 1.8 분.

[0767] 예비용 HPLC는 스케일에 따라, Gemini-NX C18 5 μm 100 x 30 mm, 150 x 30 mm 또는 250 x 50 mm 컬럼을 사용하여, Shimadzu 시스템에서 수행되었다. 질량 스펙트럼(MS)은 Shimadzu LCMS-2020 시스템에 기록되었고, 데이터는 Shimadzu LabSolutions 소프트웨어를 사용하여 처리되었다. HR-ESI-TOF 분석에는 6230 Accurate-Mass TOFMS 시스템과 결합된 Agilent 1260 Infinity Binary LC가 사용되었다. NMR 스펙트럼 데이터는 500MHz Bruker NMR 분광계에서 수집되었다. 화학적 변위(δ)는 ppm으로 보고되었으며, 중수소 용매 신호에서 참조되었다. 커플링 상수(J)는 헤르츠(Hz)로 보고된다. 스핀 다중도는 다음과 같이 기재된다: s (단일항), br (폭), d (이중항), dd (이중항의 이중항), t (삼중항), q (사중항), 또는 m (다중항). 단량체 항체를 풀링시키고, 0.22μM 필터링시키고, 그리고 추가 사용할 때 까지 ≤65℃에서 보관하였다.

[0768] **실시예 2**: 다음 구조-코어 1, (도 1)을 포함하는 TLR 작용제의 합성:

[0769] 코어 1



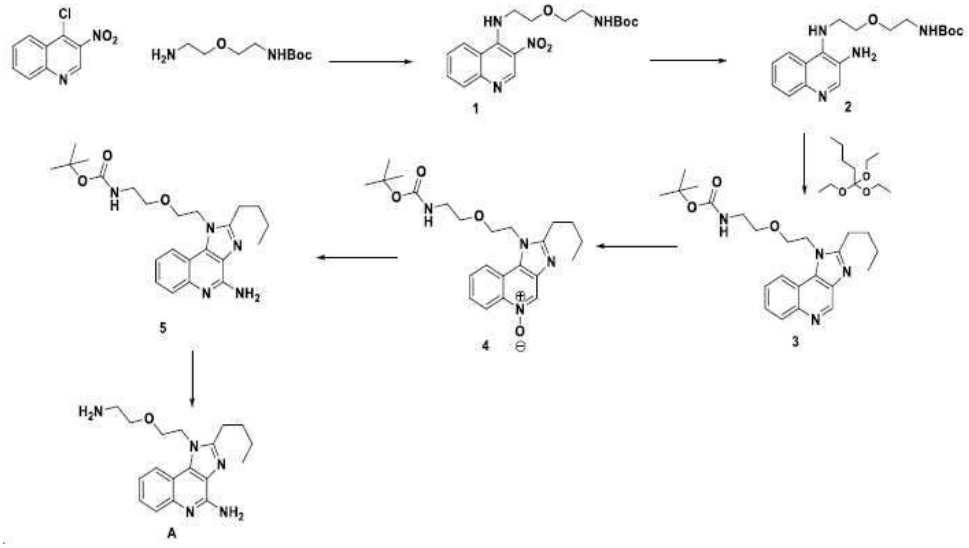
[0770]

[0771] 일부 구체예들에서, X는 CH 또는 NH이며;

[0772] R_2 및 R_3은 각각 연결되어 C_4 내지 C_8 시클로 알킬을 형성하거나, 또는 독립적으로-H, C_1 ~ C_{12} 알킬, 니트로 함유하는 알킬, 방향족 환 또는-$C(NH)NH_2$이며;

[0773] R_4는 C_1 ~ C_{12} 알킬, C_1 ~ C_{12} 치환된 알킬, C_4 ~ C_8 사이클로알킬, C_4 ~ C_8 치환된 사이클로알킬, 방향족 환, 치환된 방향족 환, 방향족 헤테로 환, 치환된, 방향족 헤테로 환,-ONH_2 말단 C_1 ~ C_{12} 알킬이거나, 또는 존재하지 않는다. 일부 구체예들에서, Z_1 = C_1 ~ C_6 알킬, C_3 ~ C_8 사이클로알킬, 또는 C_3 ~ C_8 니트로 함유하는 헤테로사이클이다.

[0774] 코어 1 구조를 갖는 TLR-작용제는 하기 도식에서 공개된 바와 같이 합성되었다.



[0775]

[0776] ***tert*-부틸 2-(2-(3-니트로퀴놀린-4-일아미노)에톡시)에틸카르바마이트 (1)**: 4-클로로-3-니트로퀴놀린 (1750 mg, 8.39 mmol)은 DCM (30 mL)에 용해되었고, 유리 아민 (1800 mg, 8.55 mmol)으로 처리된 후, 이어서 TEA (2.29 mL, 17.3 mmol)로 처리되었다. 이 반응은 실온에서 18h 동안 유지되었으며, 그 다음 H_2O (20 mL), 염수(brine) (10 mL)로 세척된 후, $MgSO_4$ 에서 건조시키고, 그리고 진공에서 농축되었다. 표적 화합물 (1)은 황색 고체 (3130 mg, 99%)로 획득되었다, MS m/z 399 $(M+Na)^+$.

[0777] ***tert*-부틸 2-(2-(3-아미노퀴놀린-4-일아미노)에톡시)에틸카르바마이트 (2):** 니트로 화합물 (1) (3.12 g, 8.29 mmol)은 THF (100 mL) 및 물 (80 mL)에 용해되었다. 아연 (13.55 g, 207.2 mmol)이 한 번에(in one portion) 추가되었고, 이어서 NH_4Cl (13.3 g, 248.6 mmol)이 추가되었다. 현탁액은 실온에서 1h (HPLC) 동안 활발하게 교반되었다. 여과 후, 케이크는 THF (20 mL x 2)로 세척되었다. 여과액(filtrate)에 수성상이 포화될 때까지 NaCl을 첨가하였다. 액상을 수집하고, THF 층을 분리하였다. 수성 층을 THF/EA(50ml/50ml)로 추출하였다. 유기 층을을 복합시키고, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 농축시키면 다음 단계용 잔유물 (2) (3.1g, >100%)를 얻었다. MS

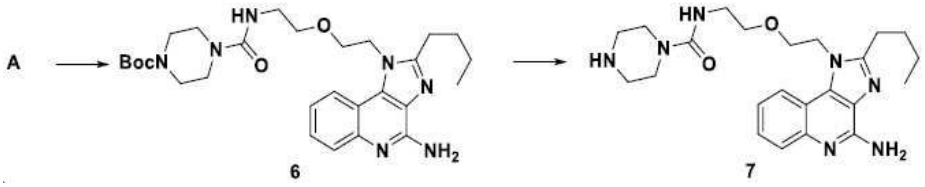
m/z 347 $(M+H)^+$.

[0778] **tert-부틸 2-(2-(2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸카르바마이트 (3):** 아민 화합물 (**2**) (3.1 g, 미정제, <8.95 mmol) 및 트리에틸오르소발레르산염 (3.1 mL, 13.5 mmol)은 톨루엔 (200 mL)에 현탁시키고, 110℃로 가열하였다. 피리딘 HCl (55 mg, 0.48 mmol)이 추가되었다. 반응물은 4h 동안 가열되었다. 혼합물은 48h 동안 실온에서 유지되었다. 액체를 따라내고, 남아있는 고체/잔류물을 교반시키고, 톨루엔(20mL x 2)은 액체와 합쳐지고, 농축시켰다. 잔기들은 DCM에 용해시키고, 컬럼 크로마토그래피 (메탄올/DCM, 0-10-20%, 80 g 컬럼)에 의해 정제하여 표적 화합물 (**3**) (1.05g, 30% 니트로 화합물 **1**로부터 2-단계)을 획득하였다. MS m/z 413 $(M+H)^+$.

[0779] **1-(2-(2-(*tert*-부톡시카르보닐아미노)에톡시)에틸)-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린 5-옥시드 (4):** 화합물 **3** (1.05 g, 2.54 mmol)은 DCM (20 mL)에 용해되었고, *m*CPBA (750 mg, 2.83 mmol)로 처리되었다. 이 반응물은 4h 동안 실온에서 유지되었다. 이 혼합물은 $NaHCO_3$ 포화된 용액 (15 mL x 3)으로 세척되었고, 건조시켰고, 농축시켜, 다음 단계를 위한 미정제 시럽(**4**) (900 mg, 83%)을 획득하였다. MS m/z 429 $(M+H)^+$.

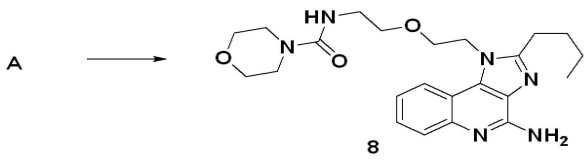
[0780] ***tert*-부틸 2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸카르바마이트 (5):** 압력 튜브에서, 화합물 **4** (900 mg, 2.18 mmol)은 디클로로에탄 (25 mL)에 용해시켰고, 농축된 수산화 암모니움 (28%, 1 mL)으로 처리된 후, 온도를 80 ℃로 올렸다. 이 혼합물에 토실 클로라이드 (470 mg, 2.46 mmol)를 냉각 후 5분에 걸쳐 천천히 추가하였다. 농축된 수산화 암모니움 (0.5 mL)을 추가하였고, 이 튜브를 밀봉하였다. 이 튜브는 80℃에서 4h 동안 가열시켰다. 식힌 후, 이 혼합물은 DCM (60 mL)로 희석시키고, 물 (40 mL)로 세척시키고, 건조시켰고, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제시키면, 표적 화합물 (**5**) (750 mg, 80%)이 수득되었다. MS m/z 428 $(M+H)^+$.

[0781] **1-(2-(2-아미노에톡시)에틸)-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (A):** 화합물 **5** (750 mg, 1.75 mmol)은 실온에서 17h 동안 EtOH (20 mL)중 1.25 M HCl로 처리되었다. 그 다음, 이 반응물을 진공에서 건조시켰고, 그리고 잔유물을 EtOH/Et_2O (1/10; 20 mL)에서 재-현탁하였고, 그리고 여과시켰다. 이들 고체를 수거하여, 표적 화합물 (**A**) (600mg, 85%)을 획득하였다. HPLC (방법 1): 5.8 분, MS m/z 328 $(M+H)^+$.

[0782] 

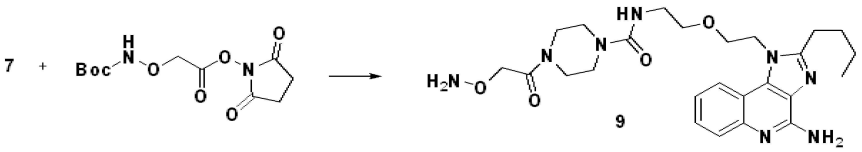
[0783] ***tert*-부틸 4-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸카르바모일)피페라진-1-카르복실레이트 (6):** 화합물 **A**, HCl 염 (100 mg, 0.25 mmol)을 DCM (10mL)에 용해시키고, TEA (68 uL, 0.511 mmol)로 처리하였다. 이 현탁액에 tert-부틸 4-(클로로카르보닐)피페라진-1-카르복실레이트 (75 mg, 0.286 mmol)를 추가하였다. 이 반응물은 실온에서 17h 동안 유지시켰으며, DCM/MeOH (4 mL/1 mL)로 희석시키고, 그 다음 이 용액을 염수로 세척하였다. 유기 상을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하면, 순수 산물 **6** (130 mg, 0.24 mmol, 96%)이 획득되었다. MS m/z 540 $(M+H)^+$.

[0784] **N-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸)피페라진-1-카르복사미드 (7):** 화합물 (**6**) (10 mg, 0.018 mmol)은 실온에서 1h 동안 EtOH 중 HCl(~1.5M, 1 mL)로 처리하였고, 그 다음 60℃에서 1h 동안 처리하였고, 진공에서 건조시켰다. 잔유물을 디에틸 에테르로 세척하였고, 건조시켜, 표적 화합물 (**7**) (9mg, 0.018 mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 440 $(M+H)^+$.

[0785] 

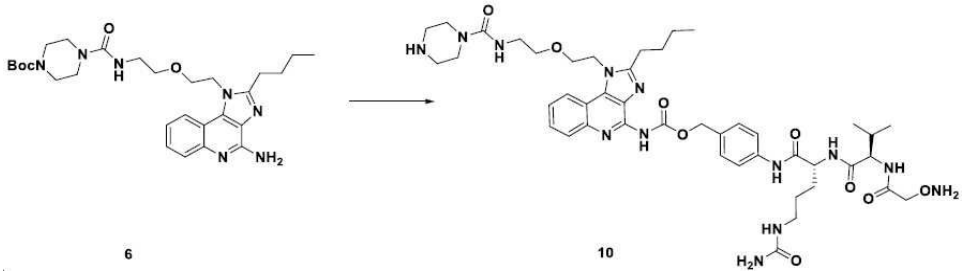
[0786] **N-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸)몰포린-4-카르복사미드 (8):** 화합물 7은

화합물 **6** 에 대해 기술된 유사한 과정을 이용하여 화합물 **A**를 몰포린-4-카르보닐 클로라이드로 처리함으로써, 표적 화합물 **7** (7 mg, 42%)을 획득하였다. MS m/z 441 (M+H).



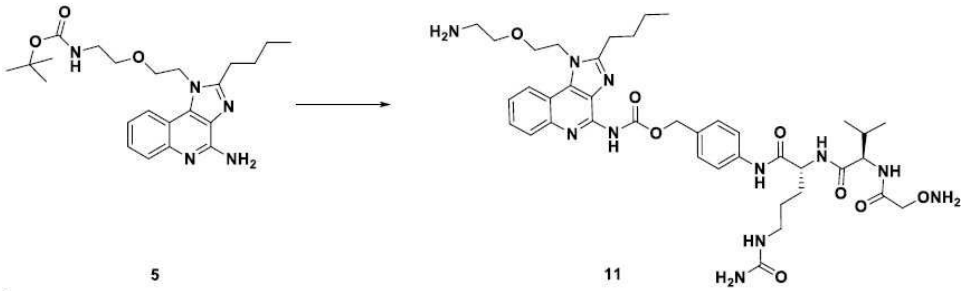
[0787]

[0788] **4-((R)-2-((R)-2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 4-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸카르바모일)피페라진-1-카르복실레이트 (9):** 화합물 **7** (22 mg, 0.02 mmol)을 DCM (1 mL)에 용해시키고, DIPEA (3.5 uL, 0.02 mmol)로 처리한 후, 이어서 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트 (3.3 mg, 0.011 mmol)으로 처리하였다. 이 반응물은 17h 동안 실온에서 유지되었다. 이 혼합물에 TFA (0.3 mL)를 추가하였고, 15 분 동안 교반시켰다. 진공에서 건조 후, 잔유물은 Prep-HPLC에 의해 정제하여, 화합물 **9** (15 mg, 화합물 **7**로부터 22%)를 획득하였다. MS m/z 918 $(M+H)^+$.



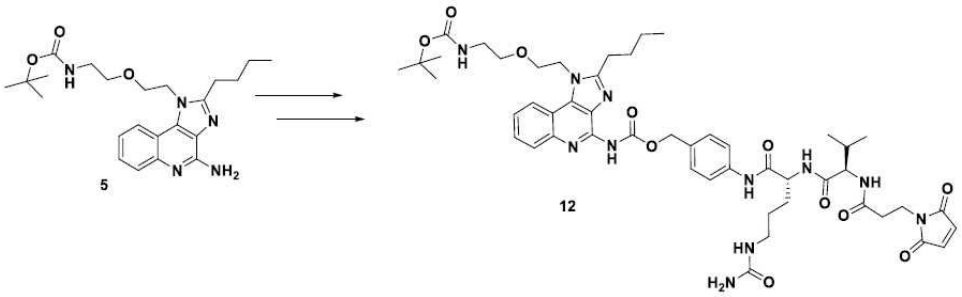
[0789]

[0790] **4-((R)-2-((R)-2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 2-부틸-1-(2-(2-(피페라진-1-카르복사미도)에톡시)에틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일카르바마이트 (10)):** 화합물 **6** (65 mg, 0.097 mmol)을 DMF (2 mL)에 용해시키고, DIPEA (34 uL, 0.194 mmol)로 처리하였고, 이어서 Fmoc-VC-PAB-PNP (94 mg, 0.116 mmol)로 처리하였다. 이 반응물을 실온에서 1h 동안 유지시켰고, 그리고 물 (10 mL)을 추가하였다. 고체를 수거하였고, 물 (2 mL)로 세척한 후, 그리고 건조시켰다. 황색 고체를 DMF (2mL)에 용해시키고, 디에틸아민 (100 uL, 0.97 mmol)으로 실온에서 30분간 처리하였다. 상기 반응 혼합물을 Prep-LC에서 정제시켜, 중간생성물 Val-Cit-PAB-OCO-(화합물 6)을 얻었다. 이 중간생성물 (11 mg, 0.01 mmol)을 DCM (1 mL)에 용해시키고, DIPEA (3.5 uL, 0.02 mmol)로 처리한 후, 이어서 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트 (3.3 mg, 0.011 momol)으로 처리하였다. 이 반응물은 17h 동안 실온에서 유지되었다. TFA (0.3 mL)를 추가하였고, 15 분 동안 교반시켰다. 진공에서 건조 후, 잔유물은 Prep-HPLC에 의해 정제하여, 화합물 **10** (15 mg, 화합물 **6**으로부터 16%)을 획득하였다. MS m/z 918 $(M+H)^+$.



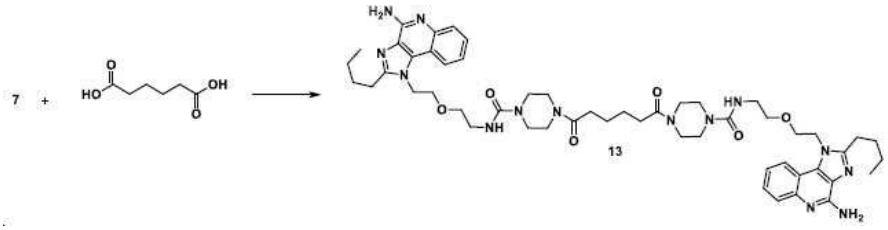
[0791]

[0792] **4-((R)-2-((R)-2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 1-(2-(2-아미노에톡시)에틸)-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일카르바마이트 (11):** 화합물 **11**은 출발 물질로 화합물 **5** 를 이용하고, 화합물 **10** 에서 기술된 유사한 과정을 이용하여, 표적 화합물 **11** (22 mg, 화합물 **5**로부터 21%)을 획득하였다. MS m/z 806 $(M+H)^+$.



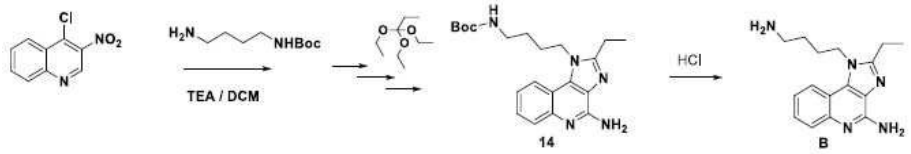
[0793]

[0794] **4-((R)-2-((R)-2-((2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 2-부틸-1-(2-(2-(피페라진-1-카르복사미도)에톡시)에틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일카르바마이트 (12)**: 화합물 **12**는 출발물질로 화합물 **5**, 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 3-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일) 프로파노에이트을 이용하여, 화합물 **10**에서 기술된 유사한 과정에 따라 준비하여, 표적 화합물 **12** (TFA 처리 없음) (15 mg, 화합물 **5**로부터 17%)를 획득하였다. MS m/z 984 $(M+H)^+$.



[0795]

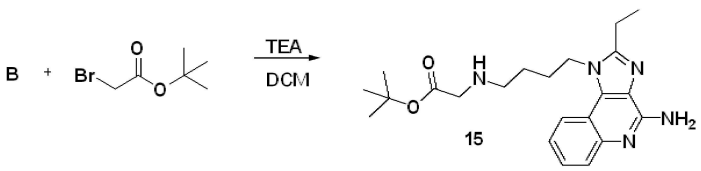
[0796] **아디프-비스-(N-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸)피페라진-1-카르복사미드 (13)**: 화합물 **7** (8 mg, 0.018 mmol) 및 아디프 산 (2 mg, 0.07 mmol)의 DMF (1 mL) 용액에 23℃에서 EDC (3 mg, 0.016 mmol), HOBt (1 mg, 0.018 mmol) 및 DIEA (4 ul, 0.23 mmol)을 추가하였다. 24h 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시키고, 그리고 건조시켜, 화합물 **13** (5 mg, 0.004 mmol, 23%)을 획득하였다. MS m/z 1217 $(M+H)^+$.



[0797]

[0798] **tert-부틸 4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸카르바마이트 (14)**: 화합물 **14**는 출발 물질로 Boc-1,4-부탄디아민 및 트리에틸오르소프로피오네이트를 이용하여 화합물 **5**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비하여, 표적 화합물 **14** (420 mg, 1.095 mmol, 출발 물질로부터 14.5%)을 획득하였다. MS m/z 384 $(M+H)^+$.

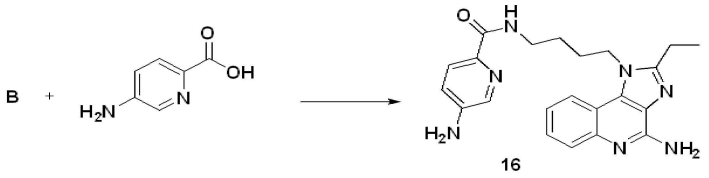
[0799] **1-(4-아미노부틸)-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 2HCl (B)**: 화합물 **14** (400 mg, 1.043 mmol)을 23℃에서 디옥산 중 DCM (0.5mL) 및 4 M HCl(10 mL, 40 mmol)에 추가하였다. 1h 후, LCMS을 통하여 이 반응이 완료됨을 보여주었다. 용매를 진공 하에서 제거하였고, 고-진공 펌프에서 6h 동안 건조시켜, 밝은 황색 고체로 된 화합물 **B** (400 mg, 1.129 mmol, 99%)를 획득하였다. MS m/z 284 $(M+H)^+$.



[0800]

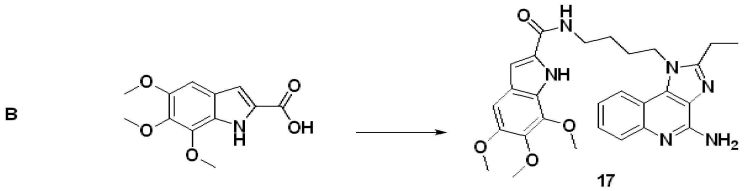
[0801] **tert-부틸 2-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸아미노)아세테이트 (15)**: DCM 중 화합물 **B** (31 mg 0.109 mmol)의 (5 mL) 용액에 tert-부틸 브로모아세테이트 (15 uL, 0.102 mmol)를 23℃에서 추가하였고, 이어서 TEA (88 uL, 0.681 mmol)에서 추가하였다. 24h 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 황색 고체로

된 화합물 **15** (4 mg, 0.006 mmol, 6%)를 획득하였다. MS m/z 398 $(M+H)^+$.



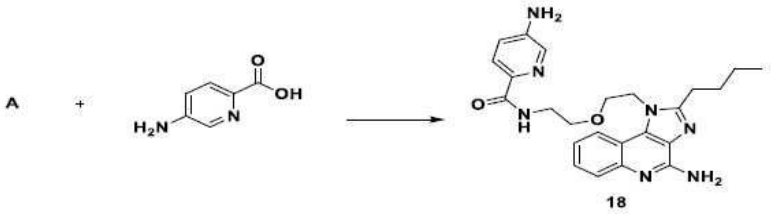
[0802]

[0803] **5-아미노-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)피콜린아미드 (16):** DMF (1 mL)중 화합물 **B** (25 mg, 0.071 mmol) 및 5-아미노피리딘-2-카르복실산 (10 mg, 0.072 mmol)의 용액에 23℃에서 HATU (20 mg, 0.083 mmol) 및 DIEA (50 uL, 0.287 mmol)를 추가하였다. 1h 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시키고, 건조시켜, 백색 고체로 된 화합물 **16** (21 mg, 0.033 mmol, 46%)을 획득하였다. MS m/z 404 $(M+H)^+$.



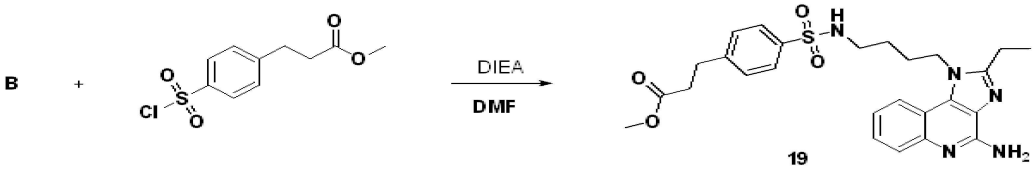
[0804]

[0805] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-5,6,7-트리메톡시-1H-인돌-2-카르복사미드 (17)a:** 화합물 **17**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 5,6,7-트리메톡시-1h-인돌-2-카르복실산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **17** (13 mg, 0.017 mmol, 44%)을 얻었다. MS m/z 517 $(M+H)^+$.



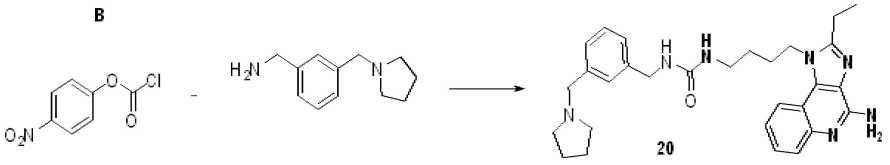
[0806]

[0807] **5-아미노-N-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸)피콜린아미드 (18):** 화합물 **18**은 출발 물질로 화합물 **A** 및 5-아미노피리딘-2-카르복실산을 이용하여, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **18** (24 mg, 0.036 mmol, 82%)을 획득하였다. MS m/z 448 $(M+H)^+$.



[0808]

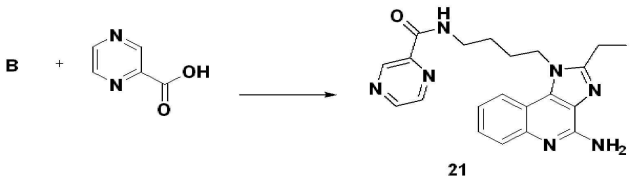
[0809] **메틸 3-(4-(N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)술파모일)페닐)프로파노에이트 (19):** DMF (1 mL)중 화합물 **B** (14 mg, 0.035 mmol) 및 5-아미노피리딘-2-카르복실산 (6 mg, 0.043mmol)의 용액에 23℃에서 DIEA (40 uL, 0.230 mmol)을 추가하였다. 30 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시키고, 그리고 건조시켰고, 밝은 황색 고체로 된 화합물 **19** (15 mg, 0.020 mmol, 58%)를 획득하였다. MS m/z 510 $(M+H)^+$.



[0810]

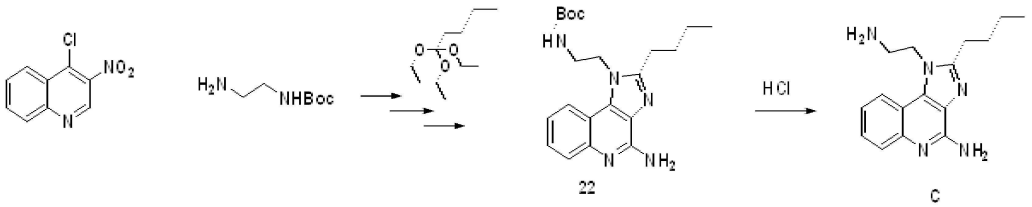
[0811] **1-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-(3-(피롤리딘-1-일메틸)벤질)우레아 (20):** DMF (1 mL)중 (3-(피롤리딘-1-일메틸)페닐)메탄아민 (19 mg, 0.100 mmol) 및 니트로페닐클로로포르메이트 (21 mg,

0.104mmol)의 용액에 23℃에서 DIEA (34 uL, 0.195 mmol)을 추가하였다. 10 분 후, LCMS에서 니트로페놀 활성화가 완료됨을 보여주었다. 이 혼합물에 화합물 **B**를 추가하였다. 2h 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시키고, 건조시켜, 백색 고체로 된 화합물 **20** (3 mg, 0.006 mmol, 6%)을 획득하였다.



[0812]

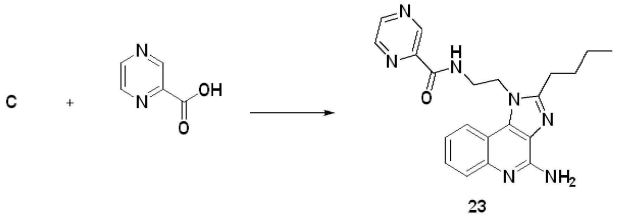
[0813] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)피라진-2-카르복사미드 (21):** 화합물 **28**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 피라진 카르복실산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **21** (11 mg, 0.013 mmol, 23%)을 획득하였다. MS m/z 390 $(M+H)^+$.



[0814]

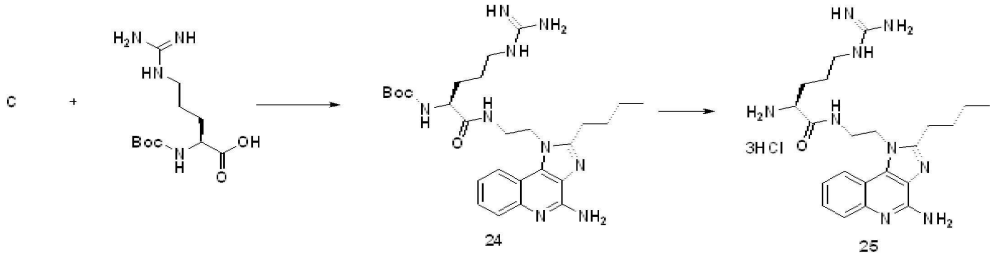
[0815] **tert-부틸 2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸카르바마이트 (22):** 화합물 **22**는 출발 물질로 4-클로로-3-니트로퀴놀린, tert-부틸 2-아미노에틸카르바마이트 및 트리에틸오르소발레르산염을 이용하고, 화합물 **5**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **22** (140mg, 0.365 mmol, 33%)를 획득하였다. MS m/z 384 $(M+H)^+$.

[0816] **1-(4-아미노부틸)-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 3 HCl (C):** 화합물 **C**는 출발 물질로 화합물 **22**을 이용하고, 화합물 **A**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **C** (60 mg, 0.169 mmol, 정량적)를 획득하였다. MS m/z 284 $(M+H)^+$.



[0817]

[0818] **N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)피라진-2-카르복사미드 (23):** 화합물 **23**은 출발 물질로 화합물 **C** 및 피라진 카르복실산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **23** (8 mg, 0.09 mmol, 29%)을 획득하였다. MS m/z 390 $(M+H)^+$.

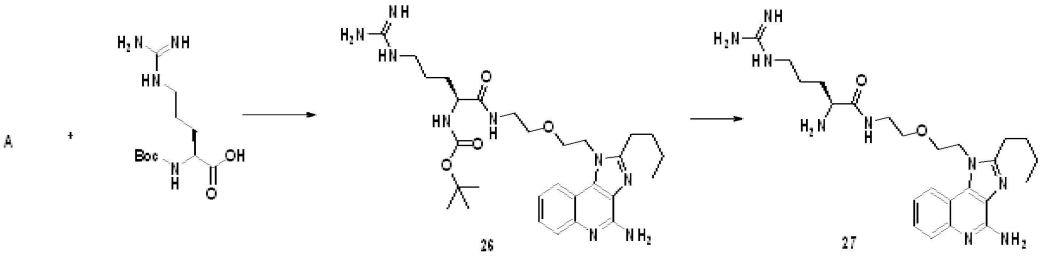


[0819]

[0820] **(S)-tert-부틸 1-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸아미노)-5-구아니디노-1-옥소펜탄-2-일카르바마이트 (24):** 화합물 **24**는 출발 물질로 화합물 **C** 및 Boc-Arg-OH을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **24** (75 mg, 0.098 mmol, 79%)을 획득하였다. MS m/z 540

$(M+H)^+$.

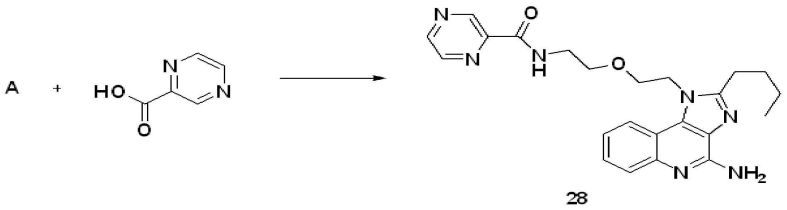
[0821] **(S)-2-아미노-N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)-5-구아니디노펜탄아미드, 3HCl (25):** 화합물 **24** (60 mg, 0.111 mmol)에 23℃에서 디옥산 중 4 M HCl (1 mL, 4 mmol)을 추가하였다. 2h 후, 이 반응물을 진공에서 건조시켰다. 잔유물을 고압 펌프 하에서 건조시켜, 백색 고체로 된 화합물 **25** (64 mg, 0.110 mmol, 정량적)를 획득하였다.



[0822]

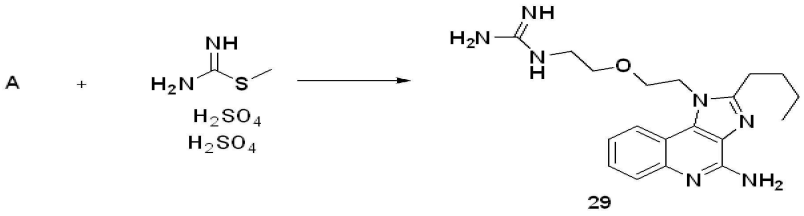
[0823] **(S)-tert-부틸 1-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸아미노)-5-구아니디노-1-옥소펜탄-2-일카르바마이트 (26):** 화합물 **26**은 출발 물질로 화합물 **A** 및 Boc-Arg-OH을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **26** (20 mg, 0.019 mmol, 59%,)을 획득하였다. MS m/z 584 $(M+H)^+$.

[0824] **(S)-2-아미노-N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)-5-구아니디노펜탄아미드 (27):** 화합물 **27**은 출발 물질로 화합물 **26**을 이용하고, 화합물 **25**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **27** (14 mg, 0.016 mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 484 $(M+H)^+$.



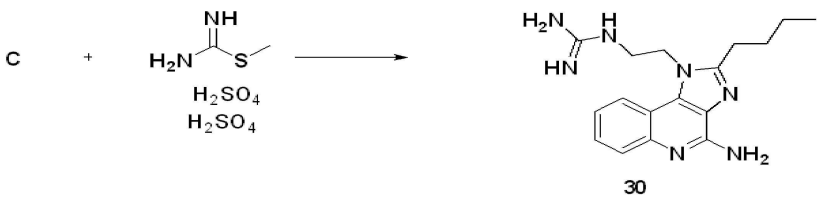
[0825]

[0826] **N-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸)피라진-2-카르복사미드 (28):** 화합물 **28**은 출발 물질로 화합물 **A** 및 피라진 카르복실산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **28** (1.3 mg, 0.001 mmol, 4%)을 획득하였다. MS m/z 434 $(M+H)^+$.



[0827]

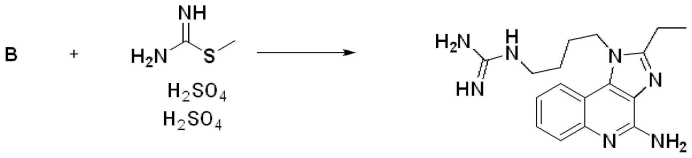
[0828] **1-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸)구아니딘 (29):** DMF (1 mL) 및 물 (1 mL) 중 화합물 **A** (15 mg, 0.038 mmol) 및 메틸 카르밤이미도티오에이트 비스(술페이트) (25 mg, 0.090 mmol)의 용액에 80℃에서 TEA (50 uL, 0.358 mmol)를 추가하였다. 18h 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **29** (12 mg, 0.017 mmol, 45%)를 획득하였다. MS m/z 370 $(M+H)^+$.



[0829]

[0830] **1-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)구아니딘 (30):** 화합물 **30**은 출발 물질로 화합물 **C**

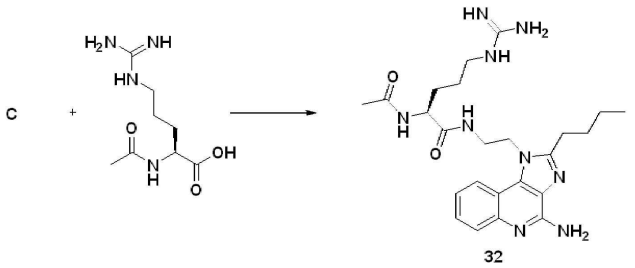
를 이용하고, 화합물 29에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 30 (10 mg, 0.013 mmol, 29%)을 획득하였다. MS m/z 434 $(M+H)^+$.



31

[0831]

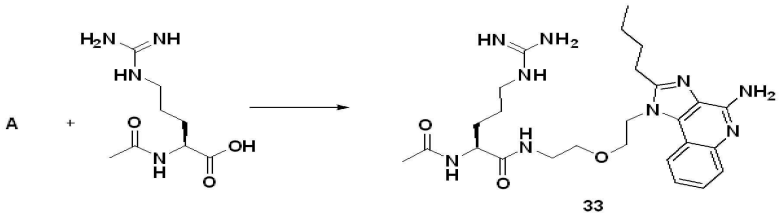
[0832] **1-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)구아니딘 (31):** 화합물 31은 출발 물질로 화합물 B를 이용하고, 화합물 29에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 31(8 mg, 0.010 mmol, 29%)을 획득하였다. MS m/z 326 $(M+H)^+$.



32

[0833]

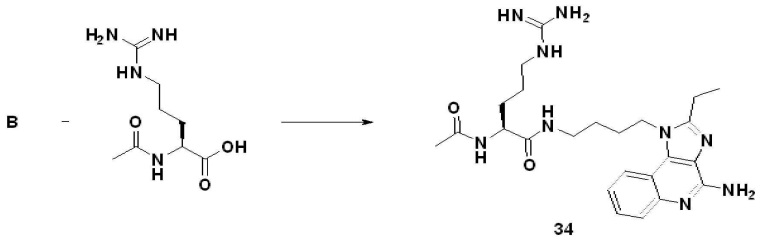
[0834] **(S)-2-아세트아미도-N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)-5-구아니디노펜탄아미드 (32):** 화합물 32는 출발 물질로 화합물 C 및 아세틸-아르긴을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 32 (18 mg, 0.025 mmol, 69%)을 획득하였다. MS m/z 482 $(M+H)^+$.



33

[0835]

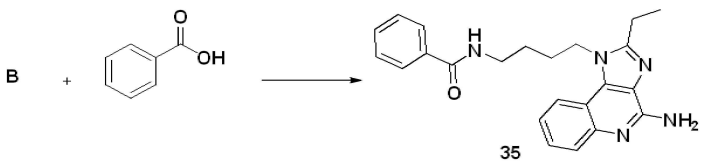
[0836] **(S)-2-아세트아미도-N-(2-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시)에틸)-5-구아니디노펜탄아미드 (33):** 화합물 33은 출발 물질로 화합물 A 및 아세틸-아르긴을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 33 (4 mg, 0.019 mmol, 67%)을 획득하였다. MS m/z 526 $(M+H)^+$.



34

[0837]

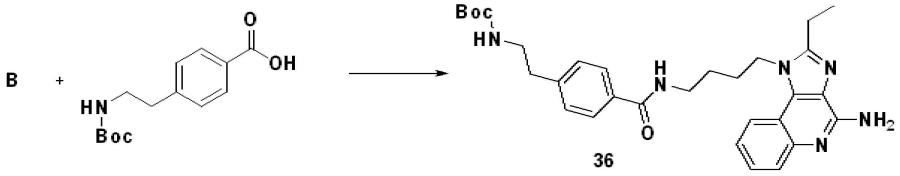
[0838] **(S)-2-아세트아미도-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-5-구아니디노펜탄아미드 (34):** 화합물 34는 출발 물질로 화합물 B 및 아세틸-아르긴을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 34 (5 mg, 0.007 mmol, 30%)을 획득하였다. MS m/z 482 $(M+H)^+$.



35

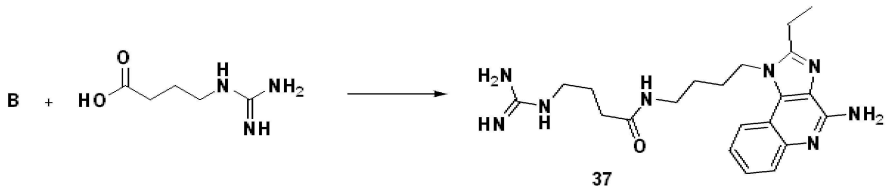
[0839]

[0840] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (35):** 화합물 35는 출발 물질로 화합물 B 및 벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 35 (8 mg, 0.013mmol, 53%)을 획득하였다. MS m/z 388 $(M+H)^+$.



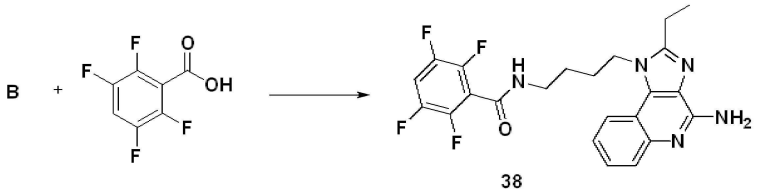
[0841]

[0842] **tert-부틸 4-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸카르바모일)펜에틸카르바마이트 (36):** 화합물 36은 출발 물질로 화합물 B 및 4-((2-boc-아미노)에틸)벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 36 (25 mg, 0.033 mmol, 38%)을 획득하였다. MS m/z 531 $(M+H)^+$.



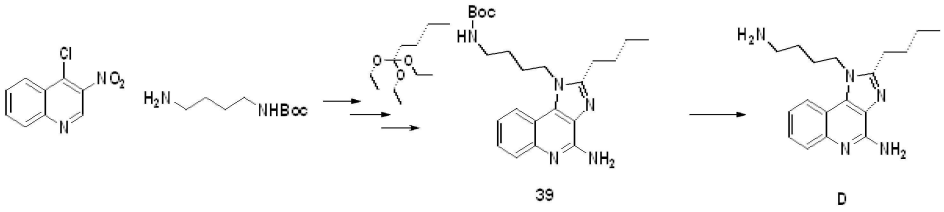
[0843]

[0844] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-구아니디노부탄아미드 (37):** 화합물 37은 출발 물질로 화합물 B 및 4-구아니도 부틸산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 37 (10 mg, 0.016 mmol, 45%)을 획득하였다. MS m/z 411 $(M+H)^+$.



[0845]

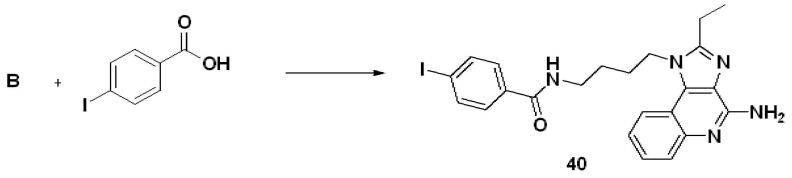
[0846] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-2,3,5,6-테트라플루오르벤즈아미드 (38):** 화합물 38은 출발 물질로 화합물 B 및 2,3,5,6-테트라 플루오르 벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 38 (7 mg, 0.010 mmol, 36%)을 획득하였다. MS m/z 460 $(M+H)^+$.



[0847]

[0848] **tert-부틸 4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸카르바마이트 (39):** 화합물 39는 출발 물질로 4-클로로-3-니트로퀴놀린, tert-부틸 4-아미노부틸카르바마이트 및 트리에틸오르소발레르산염을 이용하고, 화합물 5에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 39 (177 mg, 0.430 mmol, 출발 물질로부터 20%)를 획득하였다. MS m/z 412 $(M+H)^+$.

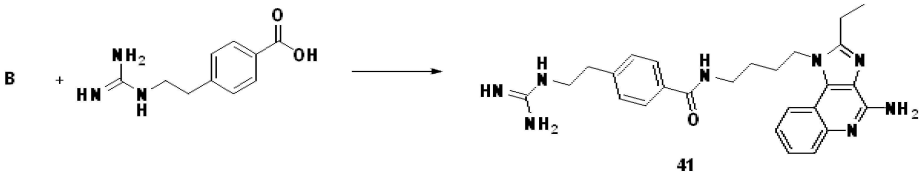
[0849] **1-(4-아미노부틸)-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 3 HCl (D):** 화합물 D는 출발 물질로 화합물 39를 이용하고, 화합물 A에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 D (180 mg, 0.431 mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 312 $(M+H)^+$.



40

[0850]

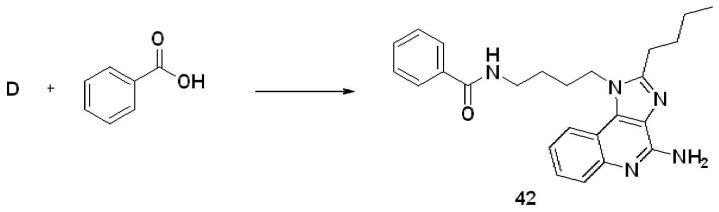
[0851] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-요오드벤즈아미드 (40):** 화합물 **40**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-요오드 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **40** (15 mg, 0.020 mmol, 72%)을 획득하였다. MS m/z 514 $(M+H)^+$.



41

[0852]

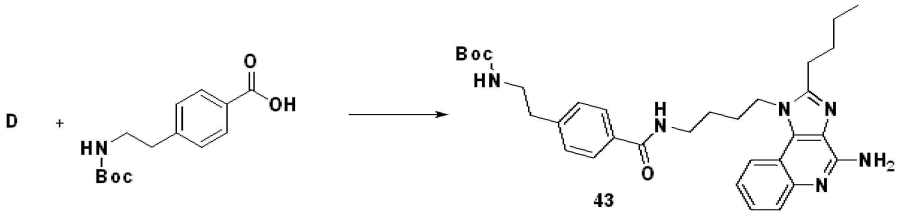
[0853] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(2-구아니디노에틸)벤즈아미드 (41):** 화합물 **41**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-(2-구아니디노에틸)벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **41** (7 mg, 0.009 mmol, 29%)을 획득하였다. MS m/z 473 $(M+H)^+$.



42

[0854]

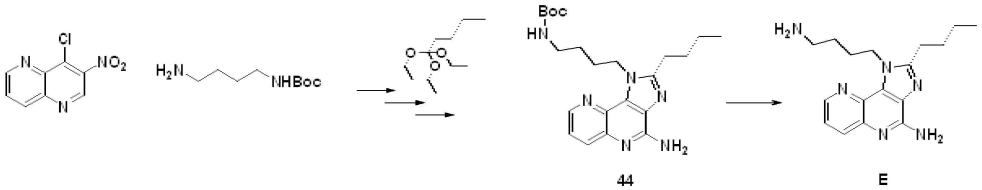
[0855] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (42):** 화합물 **42**는 출발 물질로 화합물 **D** 및 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **42** (6 mg, 0.012 mmol, 38%)를 획득하였다. MS m/z 416 $(M+H)^+$.



43

[0856]

[0857] **tert-부틸 4-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸카르바모일)펜에틸카르바마이트 (43):** 화합물 **43**은 출발 물질로 화합물 **D** 및 4-((2-boc-아미노)에틸)벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **43** (9 mg, 0.010 mmol, 38%)을 획득하였다. MS m/z 559 $(M+H)^+$.



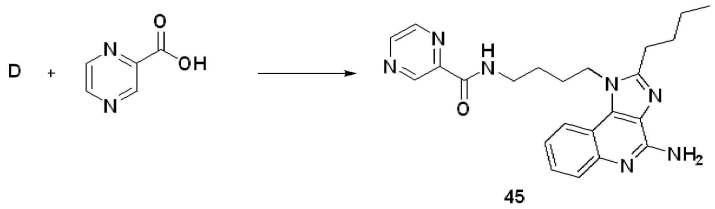
44 E

[0858]

[0859] **tert-부틸 4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸카르바마이트 (44):** 화합물 **44**는 출발 물질로 4-클로로-3-니트로-1,5-나프티리딘, tert-부틸 4-아미노부틸카르바마이트 및 트리에틸오르소발레르산염을 이용하고, 화합물 **5**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **44** (120 mg, 0.159 mmol, 출발 물질로부터 5.3%)를 획득하였다. MS m/z 413 $(M+H)^+$.

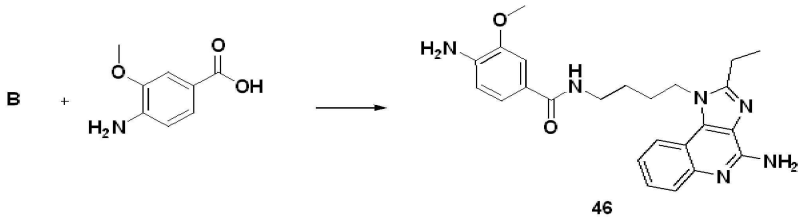
[0860] **1-(4-아미노부틸)-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-4-아민, 4 HCl (E):** 화합물 **E**는 출발 물질로 화

합물 44를 이용하고, 화합물 A에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 E (145 mg, 0.296 mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 313 $(M+H)^+$



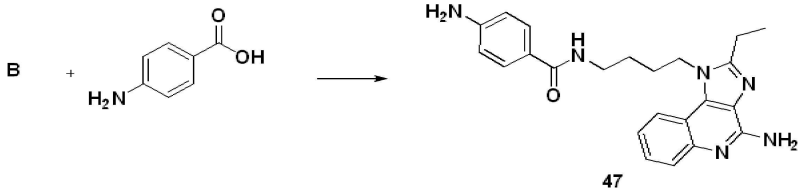
[0861]

[0862] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)피라진-2-카르복사미드 (45)**: 화합물 45는 출발 물질로 화합물 D 및 피라진 카르복실산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 45 (4 mg, 0.004 mmol, 14%)을 획득하였다, MS m/z 418 $(M+H)^+$.



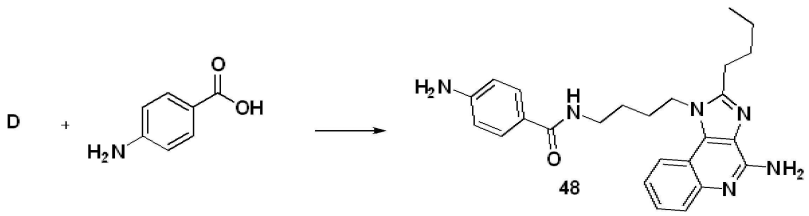
[0863]

[0864] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-메톡시벤즈아미드 (46)**: 화합물 46은 출발 물질로 화합물 B 및 4-아미노-3-메톡시벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 46 (12.1 mg, 0.014 mmol, 58%)을 획득하였다. MS m/z 433 $(M+H)^+$.



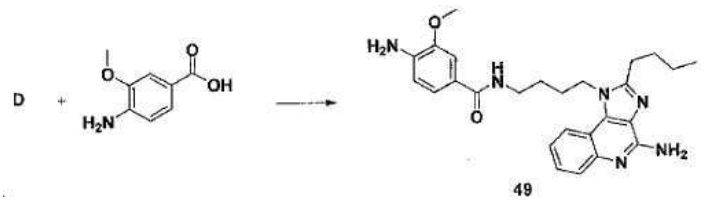
[0865]

[0866] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (47)**: 화합물 47은 출발 물질로 화합물 B 및 4-아미노벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 47 (6 mg, 0.007 mmol, 30%)을 획득하였다. MS m/z 403 $(M+H)^+$.



[0867]

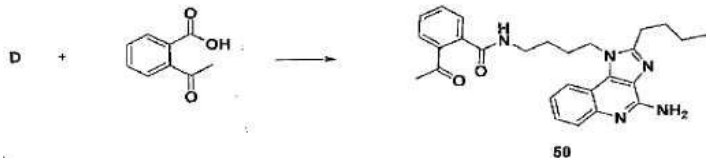
[0868] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (48)**: 화합물 48은 출발 물질로 화합물 D 및 4-아미노벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 48 (0.4 mg, 0.0005 mmol, 2%)을 획득하였다. MS m/z 431 $(M+H)^+$.



[0869]

[0870] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-메톡시벤즈아미드 (49)**: 화합물 49는

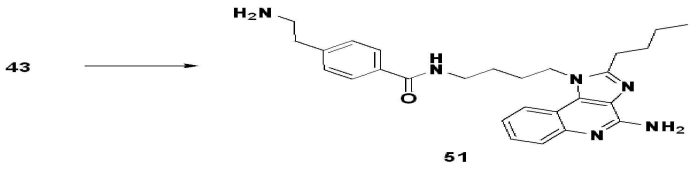
출발 물질로 화합물 D 및 4-아미노-3-메톡시벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 49 (4.2 mg, 0.005 mmol, 21%)를 획득하였다. MS m/z 461 $(M+H)^+$.



50

[0871]

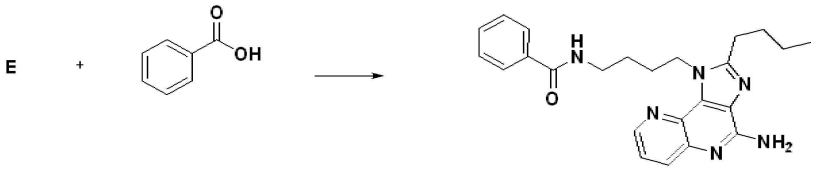
[0872] **2-아세틸-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (50):** 화합물 50은 출발 물질로 화합물 D 및 2-아세틸벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 50 (7.6 mg, 0.01 mmol, 43%)을 획득하였다. MS m/z 458 $(M+H)^+$.



51

[0873]

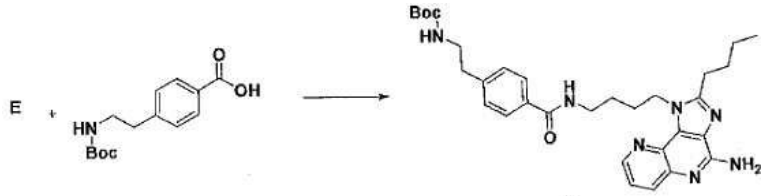
[0874] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(2-아미노에틸)벤즈아미드, 4 HCl (51):** 화합물 51은 출발 물질로 화합물 43을 이용하고, 화합물 A에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 51 (10 mg, 0.017 mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 459 $(M+H)^+$



52

[0875]

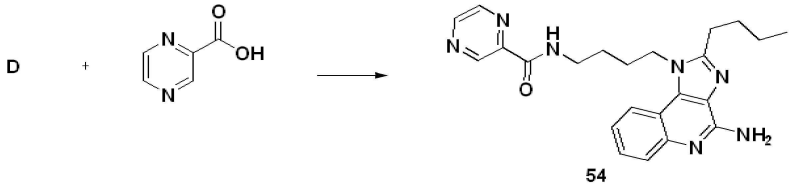
[0876] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)벤즈아미드벤즈아미드 (52):** 화합물 52는 출발 물질로 화합물 E 및 벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 52 (1.5 mg, 0.002 mmol, 8%)를 획득하였다. MS m/z 417 $(M+H)^+$.



53

[0877]

[0878] **tert-부틸 4-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸카르바모일)펜에틸카르바마이트 (53):** 화합물 53은 출발 물질로 화합물 E 및 4-((2-boc-아미노)에틸)벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 53 (3.8 mg, 0.004 mmol, 16%)을 획득하였다. MS m/z 560 $(M+H)^+$.

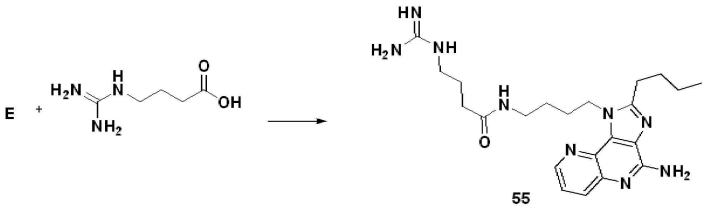


54

[0879]

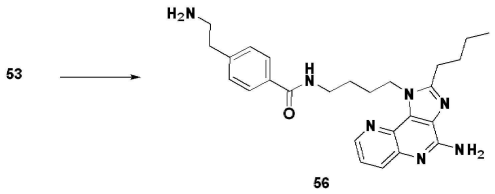
[0880] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)피라진-2-카르복사미드 (54):** 화합물 54는 출발 물질로 화합물 D 및 피라진카르복실산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비

함으로써, 표적 화합물 **54** (3 mg, 0.004mmol, 20%)를 획득하였다. MS m/z 419 $(M+H)^+$.



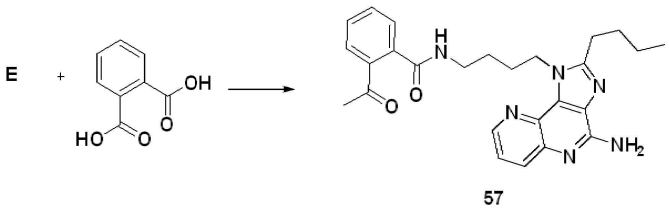
[0881]

[0882] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)-4-구아니디노부탄아미드 (55):** 화합물 **55**는 출발 물질로 화합물 **E** 및 4-구아니도카르복실산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **55** (2 mg, 0.003 mmol, 12%)를 획득하였다. MS m/z 440 $(M+H)^+$.



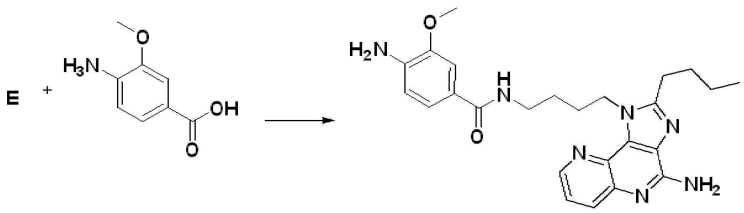
[0883]

[0884] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)-4-(2-아미노에틸)벤즈아미드, 4TFA (56):** 화합물 **53** (3.6 mg, 0.006 mmol)에 23℃에서 DCM (0.5 mL) 및 TFA (1ml)를 추가하였다. 20 분 후, 이 반응물을 진공에서 건조시키고, 그 다음 고압 진공 펌프에서 하룻밤 동안 건조시켜, 표적 화합물 **56** (7 mg, 0.008 mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 460 $(M+H)^+$.



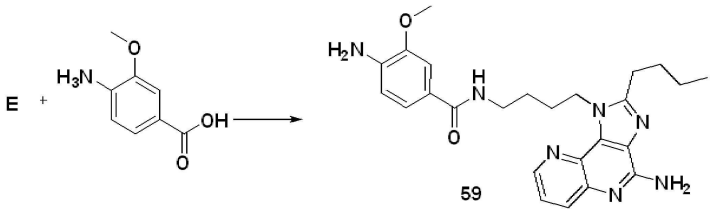
[0885]

[0886] **2-아세틸-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)벤즈아미드 (57):** 화합물 **57**은 출발 물질로 화합물 **E** 및 2-아세틸벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **57** (5.2 mg, 0.006 mmol, 27%)을 획득하였다. MS m/z 459 $(M+H)^+$.



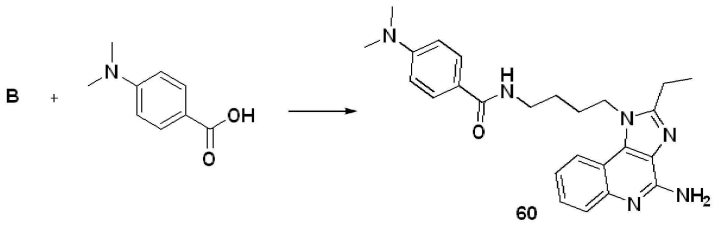
[0887]

[0888] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)-3-메톡시벤즈아미드 (58):** 화합물 **58**은 출발 물질로 화합물 **E** 및 4-아미노-3-메톡시벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **58** (4.3 mg, 0.04 mmol, 20%)을 획득하였다, MS m/z 462 $(M+H)^+$.

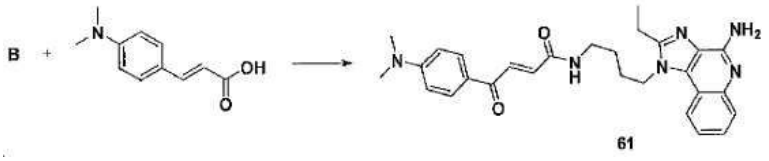


[0889]

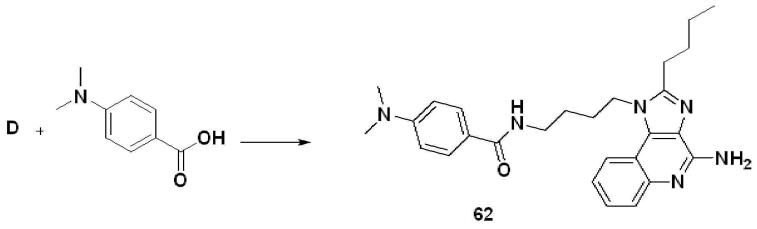
[0890] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (59):** 화합물 59는 출발 물질로 화합물 E 및 4-아미노벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 59 (1.6 mg, 0.002 mmol, 8%)를 획득하였다, MS m/z 432 $(M+H)^+$.

[0891] 

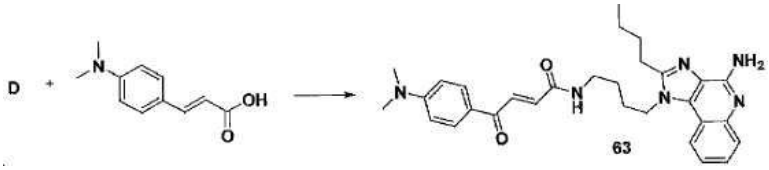
[0892] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)벤즈아미드 (60):** 화합물 60은 출발 물질로 화합물 B 및 4-디메틸 아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 60 (1 mg, 0.001 mmol, 6%)을 획득하였다. MS m/z 431 $(M+H)^+$.

[0893] 

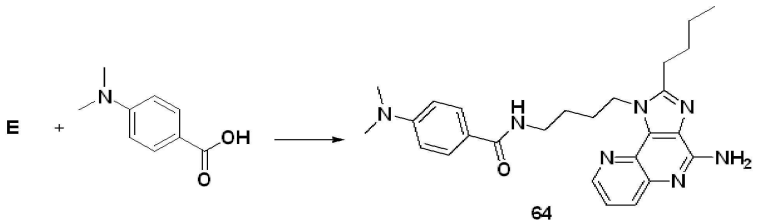
[0894] **(E)-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-(4-(디메틸아미노)페닐)아크릴아미드 (61):** 화합물 61은 출발 물질로 화합물 B 및 4-디메틸 아미노 시나믹산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 61 (2 mg, 0.003 mmol, 11%)을 획득하였다. MS m/z 457 $(M+H)^+$.

[0895] 

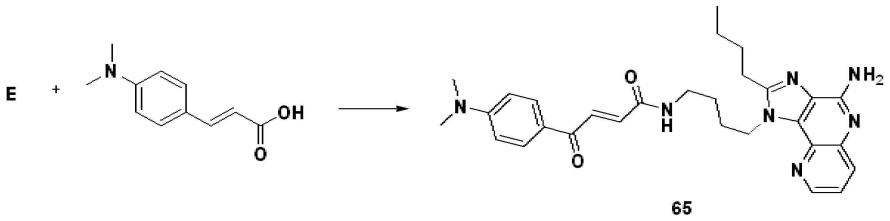
[0896] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)벤즈아미드 (62):** 화합물 62는 출발 물질로 화합물 D 및 4-디메틸 아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 62 (3.5 mg, 0.004 mmol, 20%)를 획득하였다. MS m/z 459 $(M+H)^+$.

[0897] 

[0898] **(E)-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-(4-(디메틸아미노)페닐)아크릴아미드 (63):** 화합물 63은 출발 물질로 화합물 D 및 4-디메틸 아미노 시나믹산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 63 (4.5 mg, 0.005 mmol, 25%)을 획득하였다. MS m/z 485 $(M+H)^+$

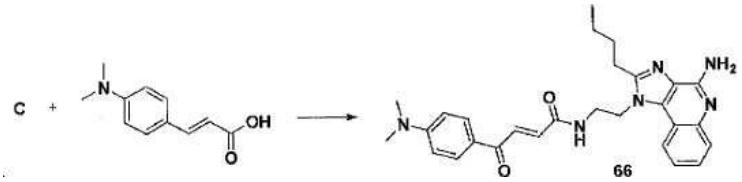
[0899] 

[0900] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)벤즈아미드 (64):** 화합물 **64**는 출발 물질로 화합물 E 및 4-디메틸 아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **64** (0.5 mg, 0.001 mmol, 7%)를 획득하였다. MS m/z 460 $(M+H)^+$.



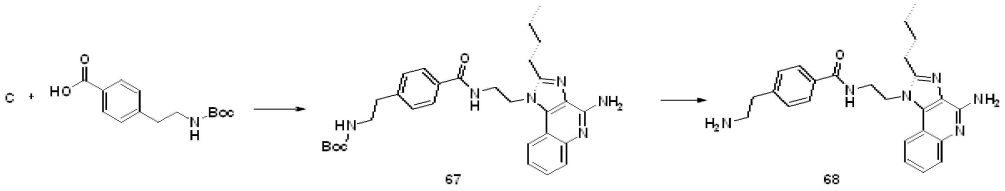
[0901]

[0902] **(E)-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸)-3-(4-(디메틸아미노)페닐)아크릴아미드 (65):** 화합물 **65**는 출발 물질로 화합물 **E** 및 4-디메틸 아미노 시나믹산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **65** (0.5 mg, 0.001 mmol, 7%)를 획득하였다. MS m/z 486 $(M+H)^+$.



[0903]

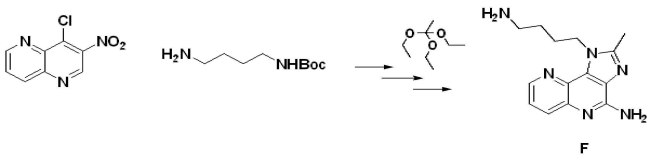
[0904] **(E)-N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)-3-(4-(디메틸아미노)페닐)아크릴아미드 (66):** 화합물 **66**은 출발 물질로 화합물 **C** 및 4-디메틸 아미노 시나믹산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **66** (3 mg, 0.004 mmol, 16%)을 획득하였다. MS m/z 457 $(M+H)^+$.



[0905]

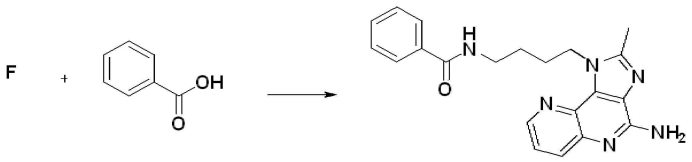
[0906] **tert-부틸 4-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸카르바모일)펜에틸카르바마이트 (67):** 화합물 **67**은 출발 물질로 화합물 **C** 및 4-(2-(tert-부톡시카르보닐아미노)에틸)벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **67** (1.5 mg, 0.002 mmol, 11%)을 획득하였다. MS m/z 457 $(M+H)^+$.

[0907] **N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)-4-(2-아미노에틸)벤즈아미드 (68):** 화합물 **68**은 출발 물질로 화합물 **67**을 이용하고, 화합물 **56**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **68** (2.9 mg, 0.003 mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 431 $(M+H)^+$.



[0908]

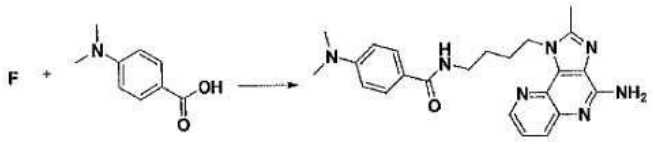
[0909] **1-(4-아미노부틸)-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (F):** 화합물 **F**는 출발 물질로 4-클로로-3-니트로-1,5-나프티리딘, tert-부틸 4-아미노부틸카르바마이트 및 트리에틸오르소아세테이트를 이용하고, 화합물 **A**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **F** (130 mg, 0.316 mmol, 출발 물질로 부터 9%)를 획득하였다. MS m/z 270 $(M+H)^+$.



69

[0910]

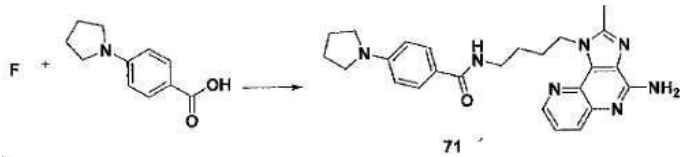
[0911] **N-(4-(4-아미노-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (69):** 화합물 **69**는 출발 물질로 화합물 **F** 및 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **69** (6.5 mg, 0.008 mmol, 42%)를 획득하였다. MS m/z 374 $(M+H)^+$.



70

[0912]

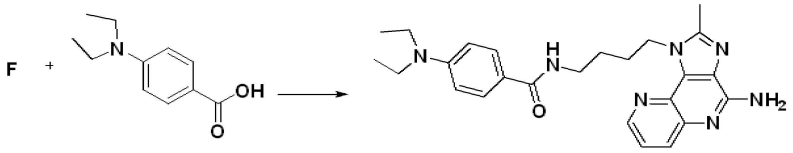
[0913] **N-(4-(4-아미노-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)벤즈아미드 (70):** 화합물 **70**은 출발 물질로 화합물 **F** 및 4-디메틸 아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **70** (6.5mg, 0.009 mmol, 39%)를 획득하였다. MS m/z 417 $(M+H)^+$.



71

[0914]

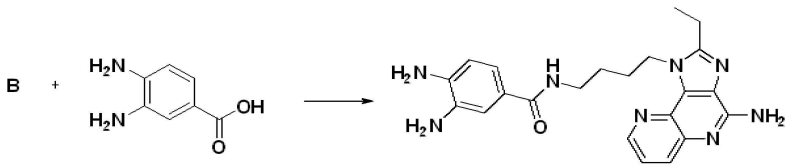
[0915] **N-(4-(4-아미노-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(피롤리딘-1-일)벤즈아미드 (71):** 화합물 **71**은 출발 물질로 화합물 **F** 및 4-(1-피롤리디닐벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **71** (3.1 mg, 0.004 mmol, 18%)을 획득하였다. MS m/z 443 $(M+H)^+$.



72

[0916]

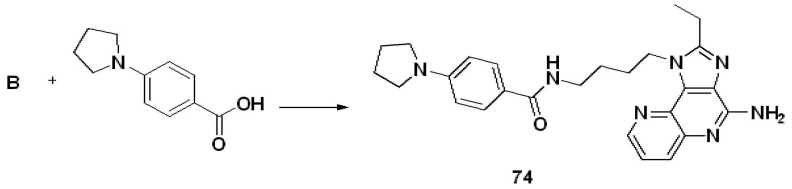
[0917] **N-(4-(4-아미노-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디에틸아미노)벤즈아미드 (72):** 화합물 **72**는 출발 물질로 화합물 **F** 및 4-(디에틸아미노)벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **72** (6.4 mg, 0.008 mmol, 41%)를 획득하였다. MS m/z 445 $(M+H)^+$.



73

[0918]

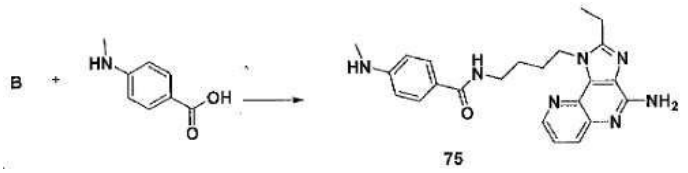
[0919] **3,4-디아미노-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (73):** 화합물 **73**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 3,4-디아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **73** (1.1 mg, 0.001 mmol, 4%)을 획득하였다. MS m/z 418 $(M+H)^+$.



74

[0920]

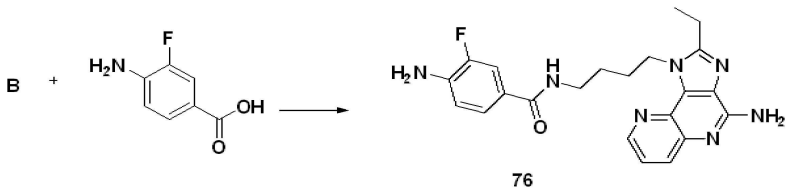
[0921] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(피롤리딘-1-일)벤즈아미드 (74):** 화합물 **74**는 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-(피롤리딘-1-일)벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **74** (4.5 mg, 0.005 mmol, 19%)를 획득하였다. MS m/z 457 $(M+H)^+$.



75

[0922]

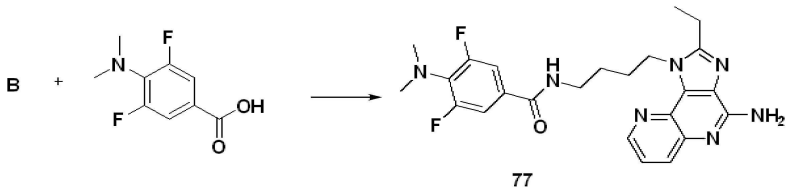
[0923] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(메틸아미노)벤즈아미드 (75):** 화합물 **75**는 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-메틸아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **75** (7.6 mg, 0.009 mmol, 33%)를 획득하였다. MS m/z 417 $(M+H)^+$.



76

[0924]

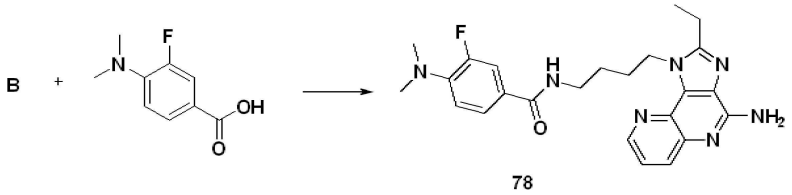
[0925] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-플루오르벤즈아미드 (76):** 화합물 **76**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 3-플루오르-4-아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **76** (7 mg, 0.008 mmol, 31%)을 획득하였다. MS m/z 421 $(M+H)^+$.



77

[0926]

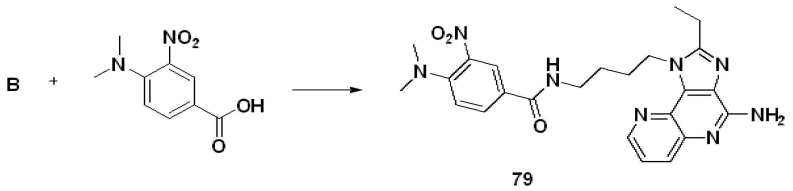
[0927] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (77):** 화합물 **77**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-(디메틸아미노)-3,5-디플루오르 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **77** (9.5 mg, 0.010 mmol, 41%)을 획득하였다. MS m/z 467 $(M+H)^+$.



78

[0928]

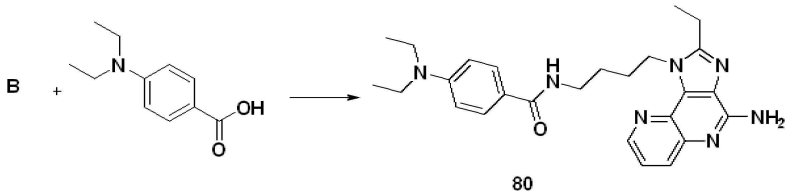
[0929] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)-3-플루오르벤즈아미드 (78):** 화합물 **78**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-(디메틸아미노)-3-플루오르 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **78** (12 mg, 0.013 mmol, 49%)을 획득하였다. MS m/z 449 $(M+H)^+$.



79

[0930]

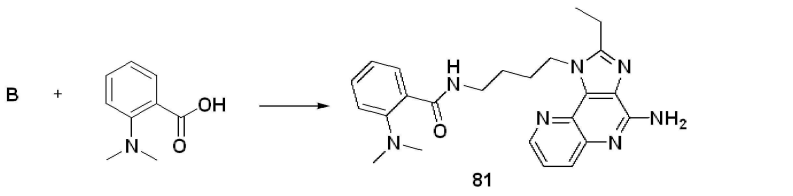
[0931] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)-3-니트로벤즈아미드 (79):** 화합물 **79**는 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-(디메틸아미노)-3-니트로 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **79** (11 mg, 0.012 mmol, 50%)를 획득하였다. MS m/z 476 $(M+H)^+$.



80

[0932]

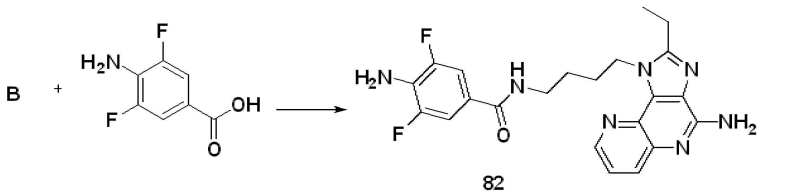
[0933] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디에틸아미노)벤즈아미드 (80):** 화합물 **80**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-(디에틸아미노) 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **80** (10 mg, 0.011 mmol, 42%)을 획득하였다. MS m/z 459 $(M+H)^+$.



81

[0934]

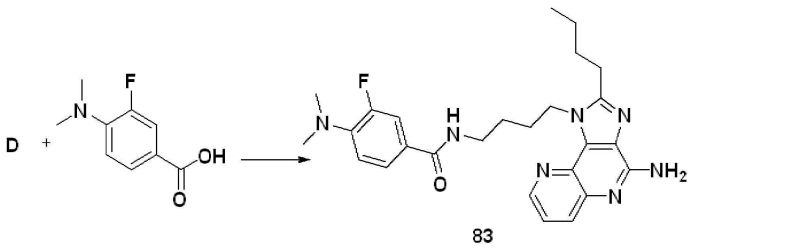
[0935] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-2-(디메틸아미노)벤즈아미드 (81):** 화합물 **81**은 출발 물질로 화합물 **B** 및 2-(디에틸아미노) 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **81** (12.2 mg, 0.014 mmol, 57%)을 획득하였다. MS m/z 431 $(M+H)^+$.



82

[0936]

[0937] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (82):** 화합물 **82**는 출발 물질로 화합물 **B** 및 4-아미노-3,5-디플루오르벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **82** (10.2 mg, 0.011 mmol, 49%,)를 획득하였다. MS m/z 439 $(M+H)^+$.

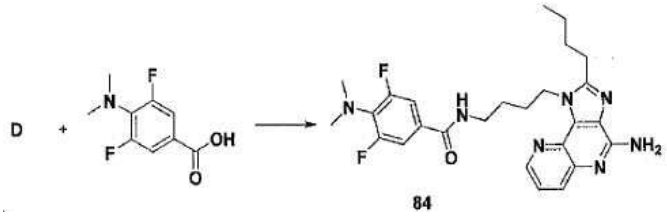


83

[0938]

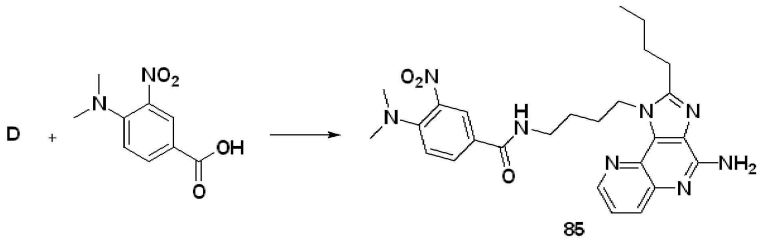
[0939] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)-3-플루오르벤즈아미드 (83):** 화합물 **83**은 출발 물질로 화합물 **D** 및 4-(디메틸아미노)-3-플루오르 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **83** (9 mg, 0.011 mmol, 50%)을 획득하였다. MS m/z 477

$(M+H)^+$.

[0940] 

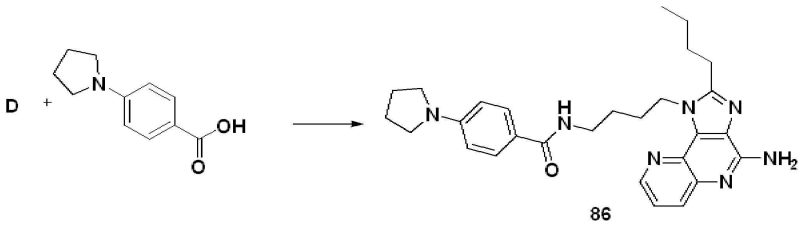
84

[0941] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (84):** 화합물 **84**는 출발 물질로 화합물 **D** 및 4-(디메틸아미노)-3,5-디플루오르 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **84** (7 mg, 0.008 mmol, 38%)를 획득하였다. MS m/z 495 $(M+H)^+$.

[0942] 

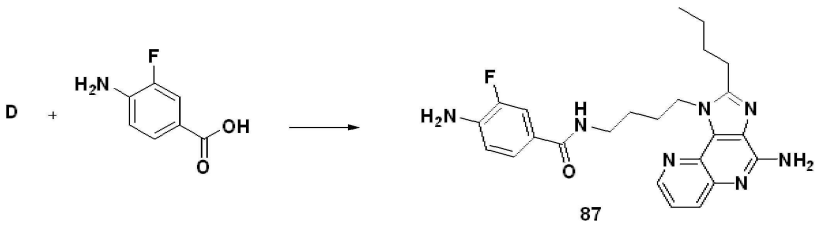
85

[0943] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)-3-니트로벤즈아미드 (85):** 화합물 **85**는 출발 물질로 화합물 **D** 및 4-(디메틸아미노)-3-니트로 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **85** (10 mg, 0.012 mmol, 54%)를 획득하였다. MS m/z 504 $(M+H)^+$.

[0944] 

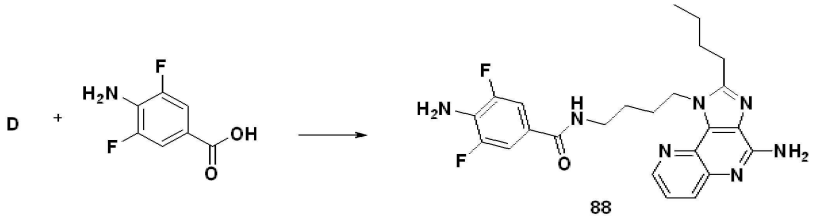
86

[0945] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(피롤리딘-1-일)벤즈아미드 (86):** 화합물 **86**은 출발 물질로 화합물 **D** 및 4-(1-피롤리디닐아미노) 벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **86** (2 mg, 0.002 mmol, 11%)을 획득하였다. MS m/z 485 $(M+H)^+$.

[0946] 

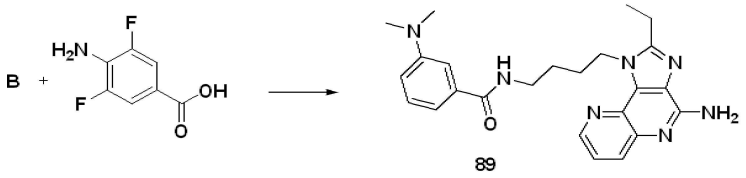
87

[0947] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-플루오르벤즈아미드 (87):** 화합물 87은 출발 물질로 화합물 **D** 및 4-아미노-3-플루오르-벤조산을 이용하고, 화합물 **16**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **87** (6 mg, 0.008 mmol, 20%)을 획득하였다. MS m/z 449 $(M+H)^+$.



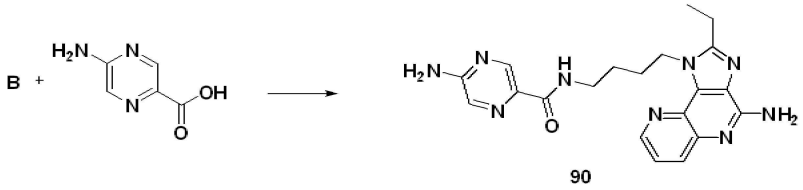
[0948]

[0949] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (88):** 화합물 88은 출발 물질로 화합물 D 및 4-아미노-3,5-디플루오르-벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 88 (6 mg, 0.007 mmol, 34%)을 획득하였다. MS m/z 467 $(M+H)^+$.



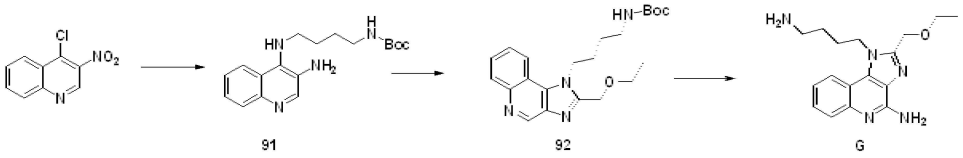
[0950]

[0951] **N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(디메틸아미노)벤즈아미드 (89):** 화합물 89는 출발 물질로 화합물 B 및 4-아미노-3,5-디플루오르벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 89 (10 mg, 0.011mmol, 27%)를 획득하였다. MS m/z 431 $(M+H)^+$.



[0952]

[0953] **5-아미노-N-(4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)피라진-2-카르복사미드 (90):** 화합물 90는 출발 물질로 화합물 B 및 5-아미노피리진-2-카르복실산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 90 (8 mg, 0.009 mmol, 37%)을 획득하였다. MS m/z 405 $(M+H)^+$.

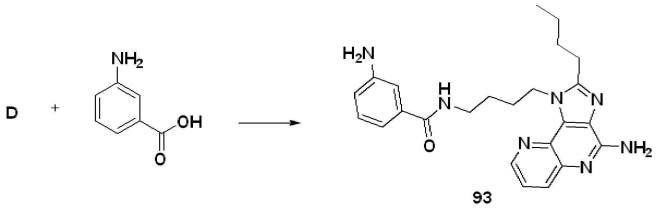


[0954] **tert-부틸 4-(3-아미노퀴놀린-4-일아미노)부틸카르바마이트 (91):** 화합물 91은 4-클로로-3-니트로퀴놀린 및 tert-부틸 4-아미노부틸카르바마이트를 이용하고, 화합물 2에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 91 (5050 mg, 15.284 mmol, 출발 물질로 부터 97%)을 획득하였다. MS m/z 331 $(M+H)^+$.

[0955] **tert-부틸 4-(2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸카르바마이트부틸카르바마이트 (92):** 무수 THF (12 mL)중 tert-부틸 4-(3-아미노퀴놀린-4-일아미노)부틸카르바마이트 (1070 mg, 3.238 mmol)의 용액에 23 ℃에서 트리에틸아민 (885 uL, 8.746 mmol) 및 2-에톡시아세틸 클로라이드 (500 mg, 4.078 mmol)를 추가하였다. 20h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 DCM (50 mL)에 용해시키고, 바이카르보네이트 나트륨 (50 mL) 및 염수(50 mL)로 세척하였고, 그리고 $MgSO_4$에서 건조시켜, 미정제된 중간생성물 (tert-부틸 4-(3-(2-에톡시아세트아미도)퀴놀린-4-일아미노)부틸카르바마이트)를 획득하였다. 이 미정제물을 MeOH (5 mL)에 용해시킨 다음, 밀봉된 튜브 안에서 산화 칼슘 (0.5 g)을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 120℃에서 2.5h 동안 가열하였다. CaO를 여과를 통하여 제거한 후, 용매를 진공 하에서 제거하였고, 잔유물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 92 (346 mg, 0.868 mmol, 27%)를 획득하였다. MS m/z 399 $(M+H)^+$.

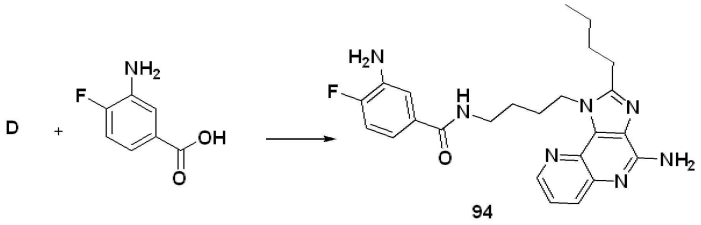
[0956] **1-(4-아미노부틸)-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 3HCl (G):** 화합물 G는 화합물 92 를 이용하여, 화합물 A에 대해 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 G (5270 mg, 0.595 mmol, 출

발 물질로부터 4%)를 획득하였다. MS m/z 312 $(M+H)^+$.



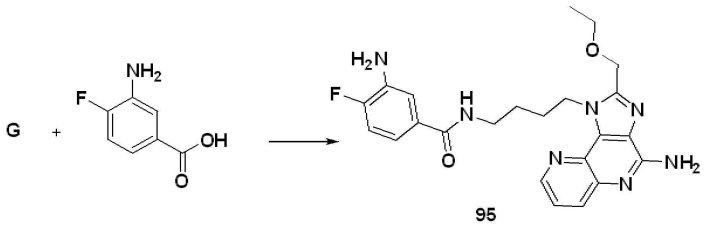
[0957]

[0958] **3-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (93):** 화합물 **93**은 출발 물질로 화합물 **D** 및 3-아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써 표적 화합물 **93** (5 mg, 0.006 mmol, 19%)을 획득하였다, MS m/z 431 $(M+H)^+$.



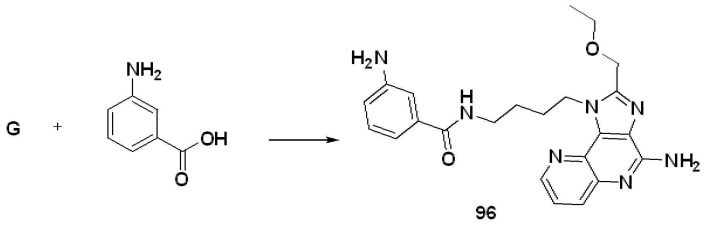
[0959]

[0960] **3-아미노-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-플루오르벤즈아미드 (94):** DMF (1 ml)중 화합물 **D** (10 mg, 0.024 mmol) 및 3-아미노-4-플로로-벤조산 (4 mg, 0.026 mmol)의 용액에 DMTMMT (7 mg, 0.029 mmol) 및 DIEA (30 ul, 0.172 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 10 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 표적 화합물 **94** (5mg, 0.006 mmol, 21%)를 획득하였다, MS m/z 449 $(M+H)^+$.



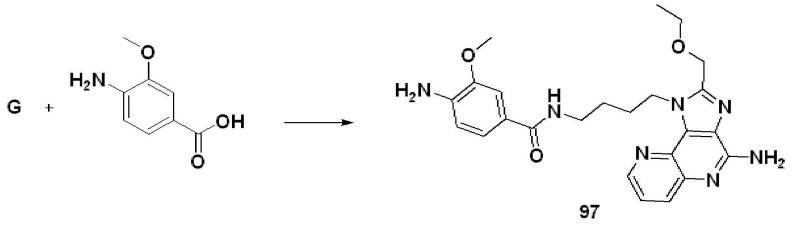
[0961]

[0962] **3-아미노-N-(4-(4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-플루오르벤즈아미드 (95)):** 화합물 **95**는 출발 물질로 화합물 **G** 및 3-아미노-4-플로로-벤조산을 이용하고, 화합물 **94**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **95** (6 mg, 0.007 mmol, 26%)를 획득하였다. MS m/z 451 $(M+H)^+$.



[0963]

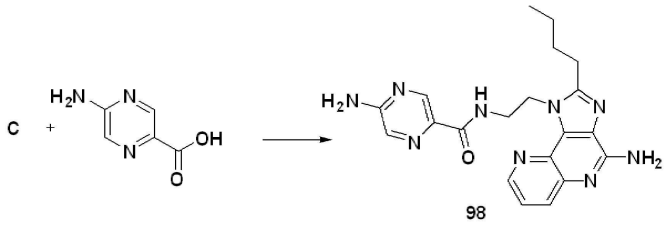
[0964] **3-아미노-N-(4-(4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-플루오르벤즈아미드 (96)):** 화합물 **96**은 출발 물질로 화합물 **G** 및 3-아미노 벤조산을 이용하고, 화합물 **94**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **96** (5 mg, 0.006 mmol, 19%)을 획득하였다. MS m/z 433 $(M+H)^+$.



97

[0965]

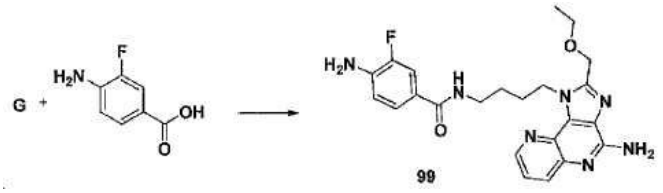
[0966] **3-아미노-N-(4-(4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)벤즈아미드 (97)**: 화합물 97은 출발 물질로 화합물 G 및 4-아미노-3-메톡시 벤조산을 이용하고, 화합물 94에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 97 (5 mg, 0.005 mmol, 23%)을 획득하였다. MS m/z 463 $(M+H)^+$.



98

[0967]

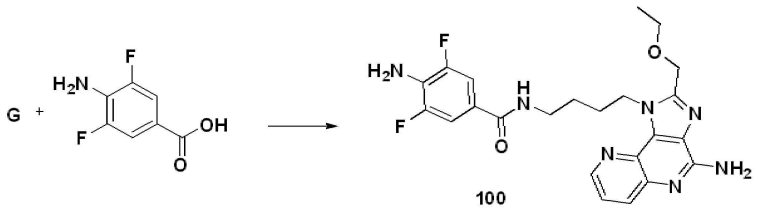
[0968] **5-아미노-N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에티)피라진-2-카르복사미드 (98)**: 화합물 98은 출발 물질로 화합물 C 및 5-아미노-피라진-2-카르복실산을 이용하고, 화합물 16에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 98 (2.13 mg, 0.002 mmol, 11%)을 획득하였다. MS m/z 405 $(M+H)^+$.



99

[0969]

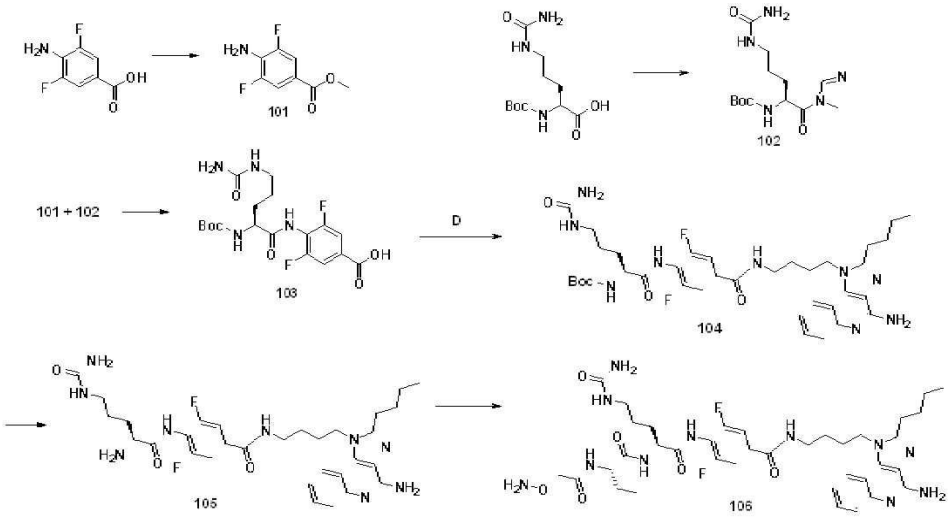
[0970] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3-플루오르벤즈아미드 (99)**: 화합물 99는 출발 물질로 화합물 G 및 3-플루오르-4-아미노벤조산을 이용하고, 화합물 94에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 99 (7.37 mg, 0.008 mmol, 37%)를 획득하였다. MS m/z 451 $(M+H)^+$.



100

[0971]

[0972] **4-아미노-N-(4-(4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (100)**: 화합물 100은 출발 물질로 화합물 G 및 4-아미노-3,5-디플루오르벤조산을 이용하고, 화합물 94에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 100 (9.7 mg, 0.011 mmol, 51%)을 획득하였다. MS m/z 469 $(M+H)^+$.

[0973] 

[0974] **메틸-4-아미노-3,5-디플루오르벤조에이트 (101):** 아세토니트릴 (15 mL)중 4-아미노-3,5-디플루오르벤조산 (2087 mg, 12.055 mmol)의 용액에 티오닐클로라이드 (12 mL)를 추가한 다음, 80℃로 가열하였다. 1h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 톨루엔 (10 mL)을 이 혼합물에 추가하고, 진공 하에서 증발시켰다. 잔유물은 MeOH 무수 (5 mL)에 용해시켰다. 0.5h 후, 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물을 DCM (20 mL)에 용해시키고, 포화 바이카르보네이트 나트륨 (50 mL) 및 염수 (50 mL)로 세척한 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되어, 화합물 **101** (1730 mg, 9.244 mmol, 77%)을 획득하였다. MS m/z 188 $(M+H)^+$.

[0975] **(S)-tert-부틸 1-(1H-이미다조l-1-일)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일카르바마이트 (102):** DMF (5 mL) 중 Boc-Cit-OH (1150 mg, 4.177 mmol)의 용액에 실온에서 CDI (880 mg, 5.427 mmol)를 추가한 다음, 60℃로 가열하였다. 2h 후, 이 혼합물에 CDI (220 mg, 1.357 mmol)를 추가하였다. 이 반응물을 1h 동안 60℃에서 교반시켰다. 3h 후, 이 반응물을 진공에서 건조시켰다. 잔유물을 EtOAc (50 mL)로 희석시키고, 물 (50 mL), 포화 바이카르보네이트 나트륨 (20 mL) 및 염수 (20 mL)로 세척하였다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시킨 후, 이어서 여과하고, 용매는 진공 하에서 제거하여, 화합물 **102** (1465 mg, 4.503 mmol, 미정제)를 획득하였다. MS m/z 326 $(M+H)^+$.

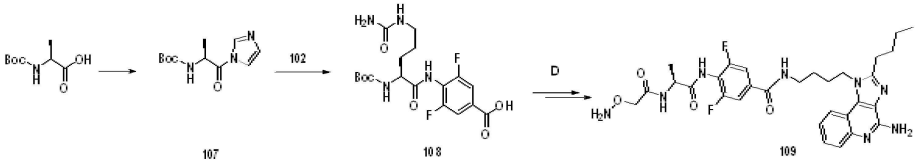
[0976] **(S)-4-(2-(tert-부톡시카르보닐아미노)-5-우레이도펜탄아미도)-3,5-디플루오르벤조산 (103):** THF (2 mL) 중 화합물 **103** (188 mg, 0.578 mmol) 및 화합물 **102** (108 mg, 0.577 mmol)의 용액에 23 ℃에서 NaH, 60% (70 mg, 1.826 mmol)를 추가하였다. 20h 후, 1 mL 물을 추가하고, 이 혼합물을 10 분 동안 교반시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었고, 잔유물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **103** (17 mg, 0.049 mmol, 9%)을 획득하였다. MS m/z 345 $(M+H)^+$.

[0977] **(S)-tert-부틸 1-(4-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸카르바모일)-2,6-디플루오르페닐아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일카르바마이트 (104):** DMF (1 mL) 중 화합물 **D** (20 mg, 0.044 mmol) 및 화합물 **103** (17 mg, 0.040 mmol)의 용액에 23 ℃에서 HATU (16 mg, 0.042 mmol) 및 DIEA (60 uL, 0.344 mmol)를 추가하였다. 20 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **104** (23 mg, 0.022 mmol, 55%)를 획득하였다. MS m/z 724 $(M+H)^+$.

[0978] **(S)-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(2-아미노-5-우레이도펜탄아미도)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (105):** DCM (1 mL)중 화합물 **104** (23 mg, 0.022 mmol)의 용액에 23 ℃에서 TFA (1 mL)를 추가하였다. 15 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물에 10 mL의 톨루엔이 추가된 후, 다시-증발시켰다. 잔유물을 고압 펌프 하에서 건조시켜, 화합물 **105** (24 mg, 0.022 mmol, 정량적)를 획득하였다. MS m/z 624 $(M+H)^+$.

[0979] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-((S)-2-((S)-2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (106):** DMF (1 mL)중 Fmoc-Aoa-Val-OH (11 mg, 0.027 mmol) 및 화합물 **105** (24 mg, 0.022 mmol)의 용액에 23 ℃에서 HATU (9 mg, 0.037 mmol) 및 DIEA (40 ul, 0.023 mmol)을 추가하였다. 10 분 후, 이 혼합물에 피페리딘 (50 uL, 5%)을 추가하였다. 5 분

후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **106** (9 mg, 0.007 mmol, 27%)을 얻었다. MS m/z 796 $(M+H)^+$.

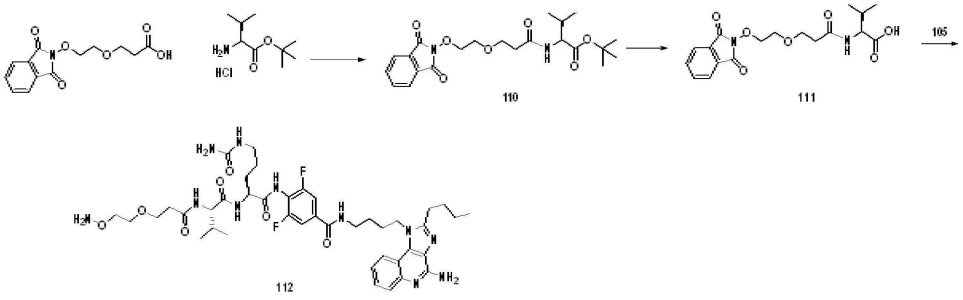


[0980]

[0981] **(S)-tert-부틸 1-(1H-이미다조l-1-일)-1-옥소프로판-2-일카르바마이트 (107):** 화합물 **107**은 화합물 **102**에서 기술된 유사한 과정으로 Boc-알라닌을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **107** (730 mg, 3.051 mmol, 75% 미정제)을 획득하였다. MS m/z 326 $(M+H)^+$.

[0982] **(S)-4-(2-(tert-부톡시카르보닐아미노)-5-우레이도펜탄아미도)-3,5-디플루오르벤조산 (108):** 화합물 **108**은 화합물 **103**에서 기술된 유사한 과정으로 화합물 **107**을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **108** (17 mg, 0.049 mmol, 9%)을 획득하였다. MS m/z 431 $(M+H)^+$.

[0983] **(S)-N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-(2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)프로판아미도)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (109):** 화합물 **109**는 화합물 **106**에서 기술된 유사한 과정으로 화합물 **108** 및 화합물 **D**을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **109** (9 mg, 0.007 mmol, 화합물 108로부터 31%)을 획득하였다. MS m/z 796 $(M+H)^+$.

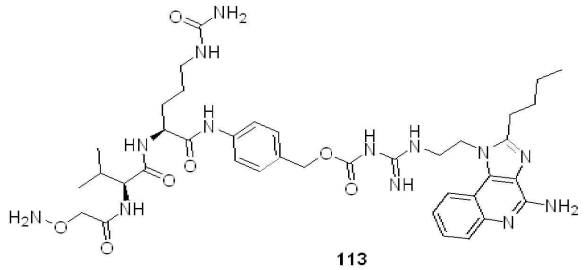


[0984]

[0985] **(S)-tert-부틸 2-(3-(2-(1,3-디옥소이소인돌린-2-일옥시)에톡시)프로판아미도)-3-메틸부타노에이트 (110):** DCM (5 mL)중 3-(2-(1,3-디옥소이소인돌린-2-일옥시)에톡시)프로판산 (295 mg, 1.056 mmol) 및 Val-OtBu, HCl (225 mg, 1.078 mmol)의 용액에 23 ℃에서 DMTMMT (304 mg, 1.260 mmol) 및 DIEA (460 uL, 2.641 mmol)을 추가하였다. 1.5h 후에, 이 용액은 EtOAC (100 mL)로 희석시키고, 1 N HCl (100 mL), 포화 바이카르보네이트 나트륨 (100 mL) 및 염수 (50 mL)로 세척하였다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시키고, 그리고 용매는 진공에서 제거하였다. 잔유물을 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 화합물 **110** (379 mg, 0.872 mmol, 83%)을 획득하였다. MS m/z 435 $(M+H)^+$.

[0986] **(S)-2-(3-(2-(1,3-디옥소이소인돌린-2-일옥시)에톡시)프로판아미도)-3-메틸부탄 산 (111):** 화합물 **110** (379 mg, 0.872 mmol)의 용액에 23 ℃에서 디옥산 중 4M HCl(5 mL, 20 mmol)을 추가하였다. 20h 후, 이 용매는 진공하에서 제거되었고, 그리고 고-진공 펌프를 이용하여 건조시켜, 화합물 **111** (320 mg, 0.846 mmol, 97%)을 획득하였다. MS m/z 379 $(M+H)^+$.

[0987] **N-(4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(아미노옥시)에톡시)프로판아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (112):** DMF (1 mL)중 화합물 **111** (3 mg, 0.007 mmol) 및 화합물 **105** (5 mg, 0.005 mmol)의 용액에 23 ℃에서 DMTMMT (3 mg, 0.012 mmol) 및 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)을 추가하였다. 1.5h 후에, 이 혼합물에 하이드라진, H_2O (2 uL, 0.506 mmol)을 추가하였다. 5 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **112** (2 mg, 0.002 mmol, 21%)을 획득하였다. MS m/z 855 $(M+H)^+$.

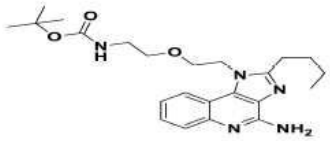
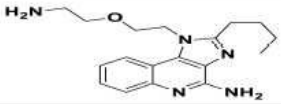
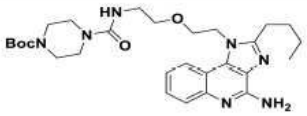
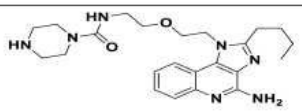
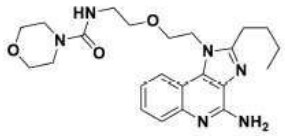
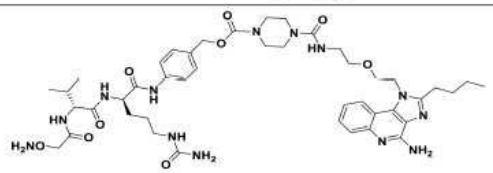
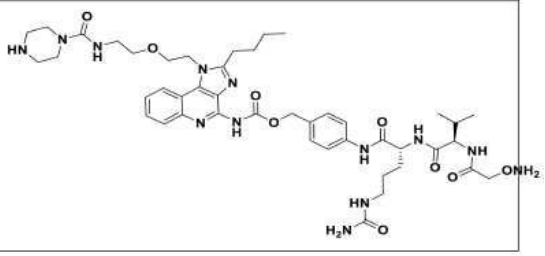
30 

113

[0988]

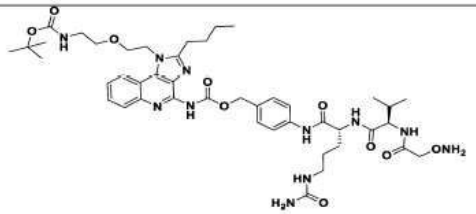
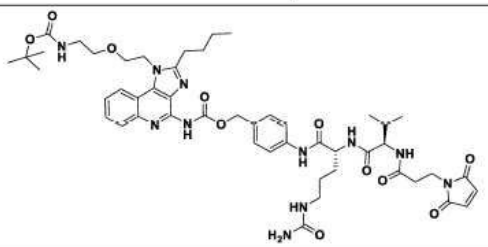
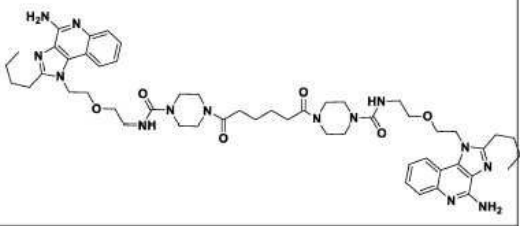
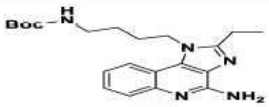
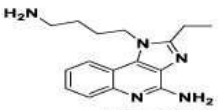
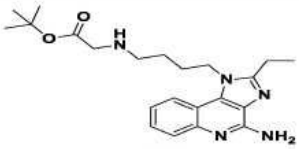
[0989] **(S)-N-(4-((N-(2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸)카르밤이미도일카르바모일옥시)메틸)페닐)-2-((S)-2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미드 (113):** 화합물 **113**은 출발 물질로 화합물 **30**을 이용하고, 화합물 **106**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **113** (2 mg, 0.001 mmol, 화합물 **30**)로부터 2%)을 획득하였다. MS m/z 805 $(M+H)^+$.

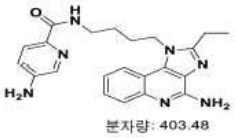
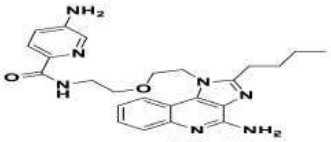
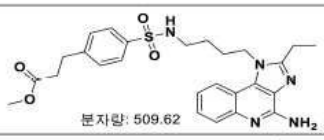
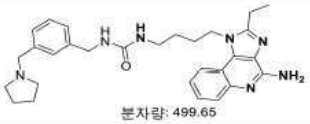
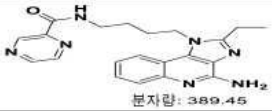
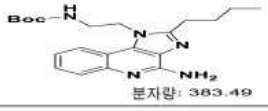
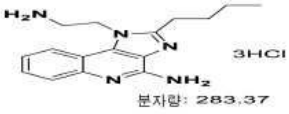
[0990] 표 3-TLR 작용제-코어 1 화합물들

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
5	AXC 621	
A	AXC-622	
6	AXC-625	
7	AXC-626	
8	AXC-627	
9	AXC-638	
10	AXC-639	

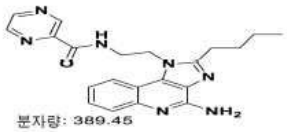
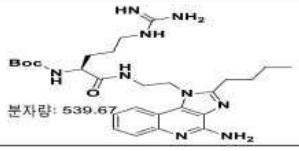
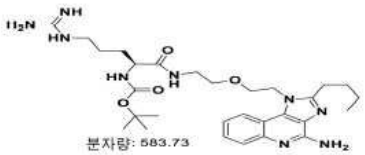
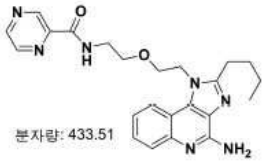
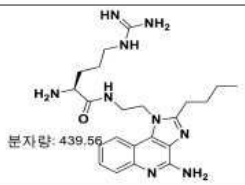
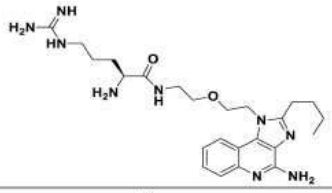
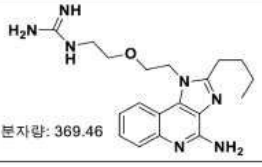
[0991]

[0992]

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
11	AXC-640	
12	AXC-642	
13	AXC-662	
14	AXC-665	 분자량: 383.49
B	AXC-666	 분자량: 283.37
15	AXC-667	 분자량: 397.51

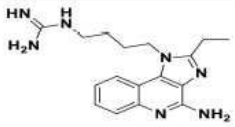
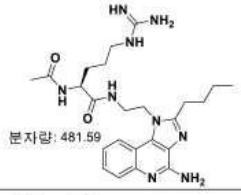
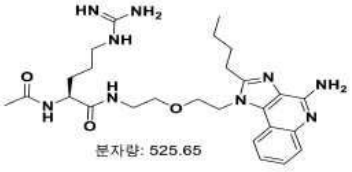
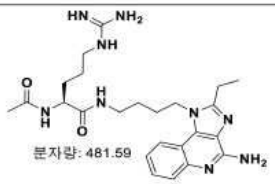
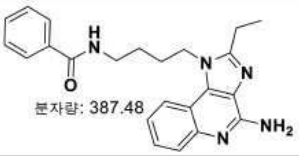
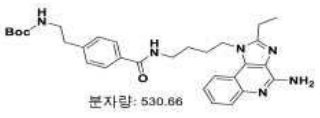
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
16	AXC 668	 분자량: 403.48
17	AXC-669	분자량: 516.59
18	AXC-670	 분자량: 447.53
19	AXC-671	 분자량: 509.62
20	AXC-672	 분자량: 499.65
21	AXC-675	 분자량: 389.45
22	AXC-678	 분자량: 383.49
C	AXC-679	 분자량: 283.37

[0993]

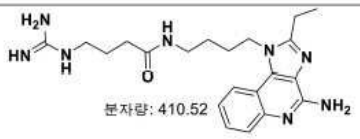
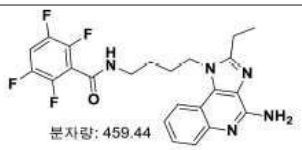
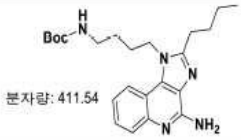
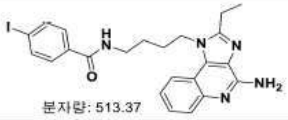
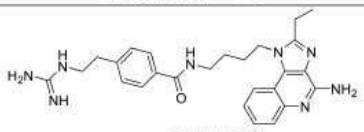
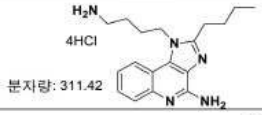
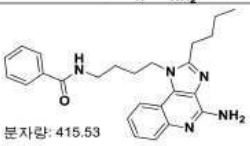
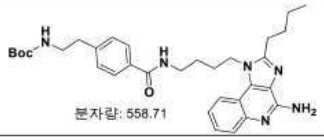
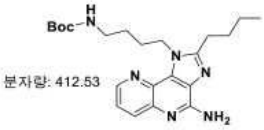
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
23	AXC-681	 분자량: 389.45
24	AXC-687	 분자량: 539.67
26	AXC-688	 분자량: 583.73
28	AXC-689	 분자량: 433.51
25	AXC-690	 분자량: 439.56
27	AXC-691	
29	AXC-696	 분자량: 369.46

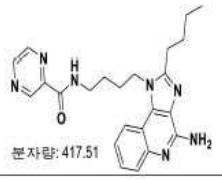
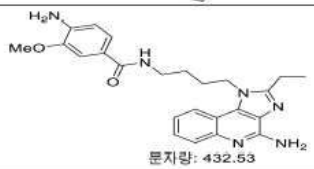
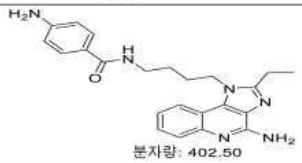
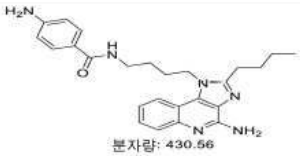
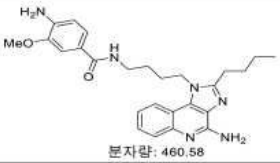
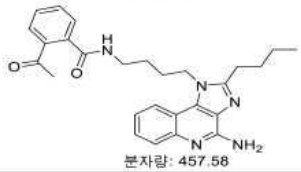
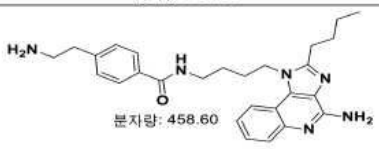
[0994]

[0995]

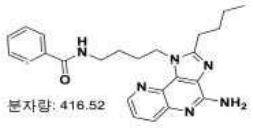
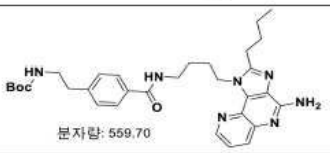
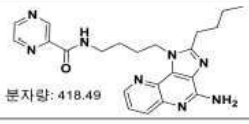
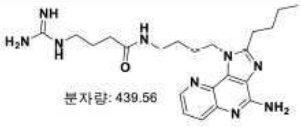
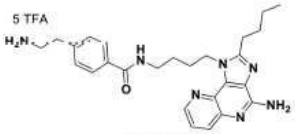
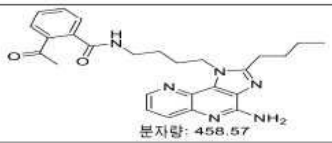
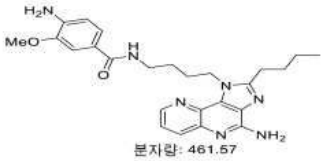
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
30	AXC-697	분자량: 325.41
31	AXC-698	 분자량: 325.41
32	AXC-699	 분자량: 481.59
33	AXC-700	 분자량: 525.65
34	AXC-701	 분자량: 481.59
35	AXC-702	 분자량: 387.48
36	AXC-709	 분자량: 530.66

[0996]

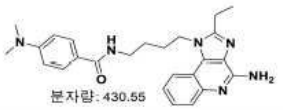
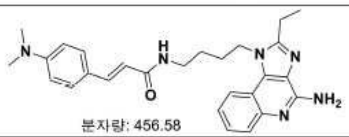
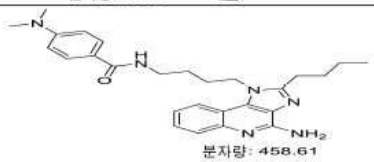
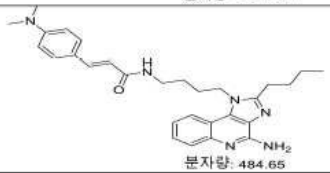
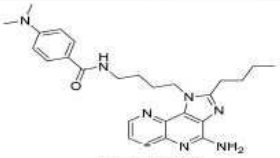
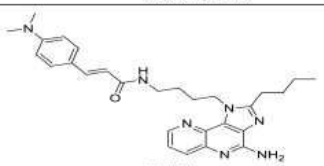
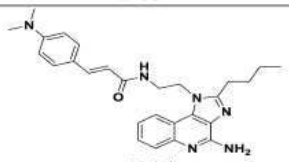
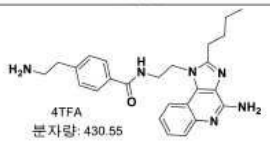
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
37	AXC-710	 분자량: 410.52
38	AXC-711	 분자량: 459.44
39	AXC-712	 분자량: 411.54
40	AXC-713	 분자량: 513.37
41	AXC-714	 분자량: 472.6
D	AXC-715	 분자량: 311.42
42	AXC-716	 분자량: 415.53
43	AXC-717	 분자량: 558.71
44	AXC-718	 분자량: 412.53

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
45	AXC-719	 분자량: 417.51
46	AXC-722	 분자량: 432.53
47	AXC-723	 분자량: 402.50
48	AXC-724	 분자량: 430.56
49	AXC-725	 분자량: 460.58
50	AXC-726	 분자량: 457.58
51	AXC-727	 분자량: 458.60

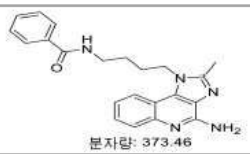
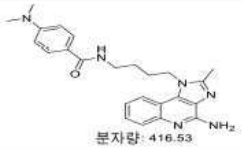
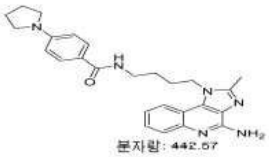
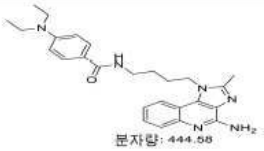
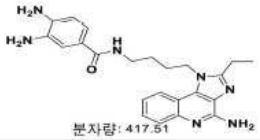
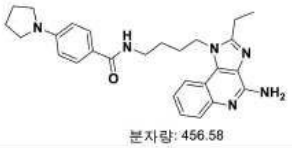
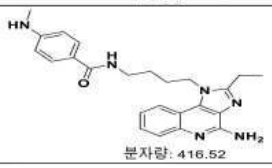
[0997]

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
52	AXC-729	 분자량: 416.52
53	AXC-731	 분자량: 559.70
54	AXC-732	 분자량: 418.49
55	AXC-733	 분자량: 439.56
56	AXC-734	 분자량: 459.59
57	AXC-735	 분자량: 458.57
58	AXC-736	 분자량: 461.57
59	AXC-737	분자량: 431.54

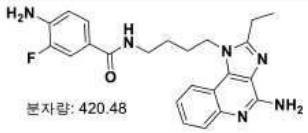
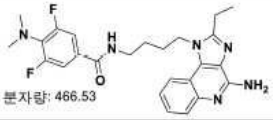
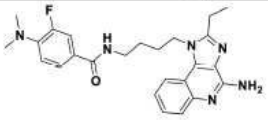
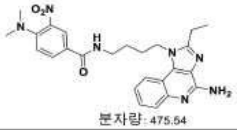
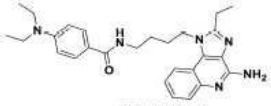
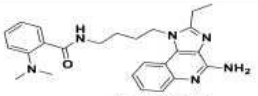
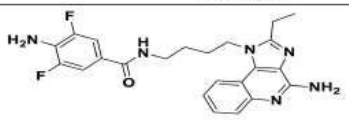
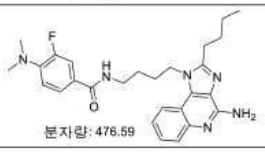
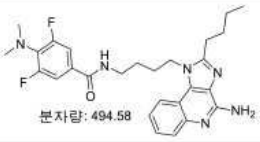
[0998]

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
60	AXC-738	 분자량: 430.55
61	AXC-739	 분자량: 456.58
62	AXC-740	 분자량: 458.61
63	AXC-741	 분자량: 484.65
64	AXC-743	 분자량: 459.60
65	AXC-742	 분자량: 485.64
66	AXC-747	 분자량: 456.58
68	AXC-748	 4TFA 분자량: 430.55

[0999]

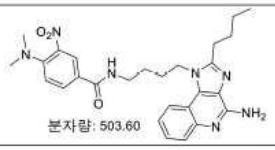
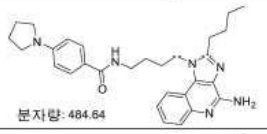
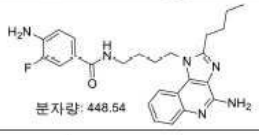
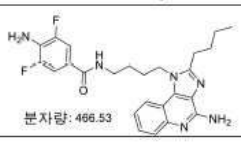
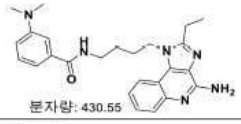
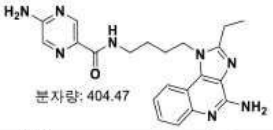
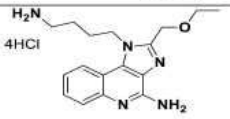
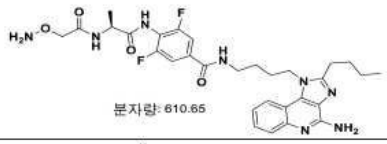
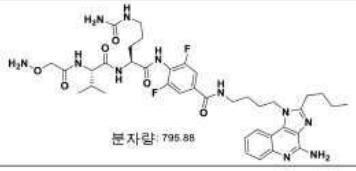
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
69	AXC-749	 분자량: 373.46
70	AXC-750	 분자량: 416.53
71	AXC-751	 분자량: 442.57
72	AXC-752	 분자량: 444.58
73	AXC-754	 분자량: 417.51
74	AXC-755	 분자량: 456.58
75	AXC-756	 분자량: 416.52

[1000]

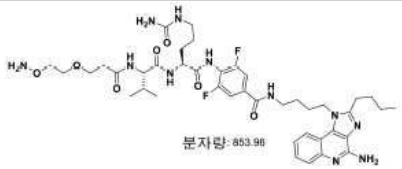
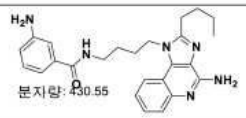
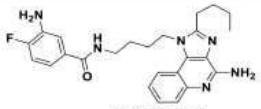
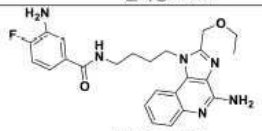
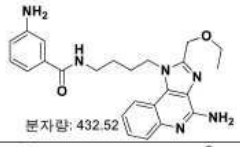
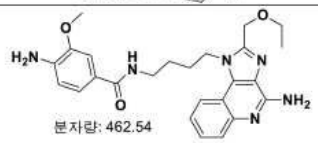
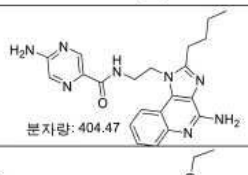
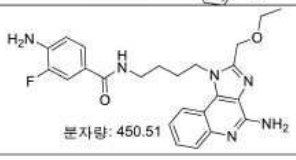
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
76	AXC-757	 분자량: 420.48
77	AXC-758	 분자량: 466.53
78	AXC-759	 분자량: 448.54
79	AXC-760	 분자량: 475.54
80	AXC-761	 분자량: 458.60
81	AXC-762	 분자량: 430.55
82	AXC-764	 분자량: 438.47
83	AXC-771	 분자량: 476.59
84	AXC-772	 분자량: 494.58

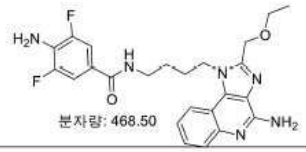
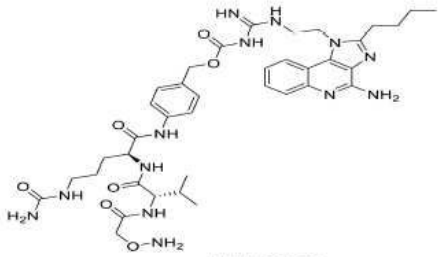
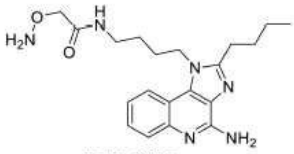
[1001]

[1002]

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
85	AXC-773	 분자량: 503.60
86	AXC-777	 분자량: 484.64
87	AXC-778	 분자량: 448.54
88	AXC-779	 분자량: 466.53
89	AXC-789	 분자량: 430.55
90	AXC-793	 분자량: 404.47
G	AXC-799	 분자량: 313.40
109	AXC-800	 분자량: 610.65
106	AXC-801	 분자량: 795.88

[1003]

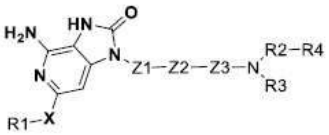
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
112	AXC-802	 분자량: 853.96
93	AXC-803	 분자량: 430.55
94	AXC-804	 분자량: 448.54
95	AXC-805	 분자량: 450.51
96	AXC-806	 분자량: 432.52
97	AXC-807	 분자량: 462.54
98	AXC-808	 분자량: 404.47
99	AXC-809	 분자량: 450.51

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 1 화합물들
100	AXC-810	 분자량: 468.50
113	AXC-831	 분자량: 803.93
192	AXC-910	 분자량: 384.5

[1004]

[1005] **실시예 3:** 다음의 대표적 구조-코어 5 (도 1)을 포함하는 TLR 작용제의 합성:

코어 5

[1006] 

[1007] 일부 구체예들에서, X는 O, S, NH 또는 H이며;

[1008] R1은 C_1 ~ C_{12} 알킬, 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬, 산소 함유하는 C_1 ~ C_{12} 알킬, 헤테로사이클, 치환된 헤테로사이클, 사이클로 알킬, 치환된 사이클로 알킬,$-N_3$, 말단 C_1 ~ C_{12} 알킬, 말단 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬이거나, 또는 존재하지 않는다;

[1009] R_2 또는 R_3은 각각 연결되어 C_4 ~ C_8 시클로 알킬 또는 독립적으로-H, C_1 ~ C_{12} 알킬, 니트로 함유하는 알킬, 산소 함유하는 알킬, 방향족 환을 형성하고;

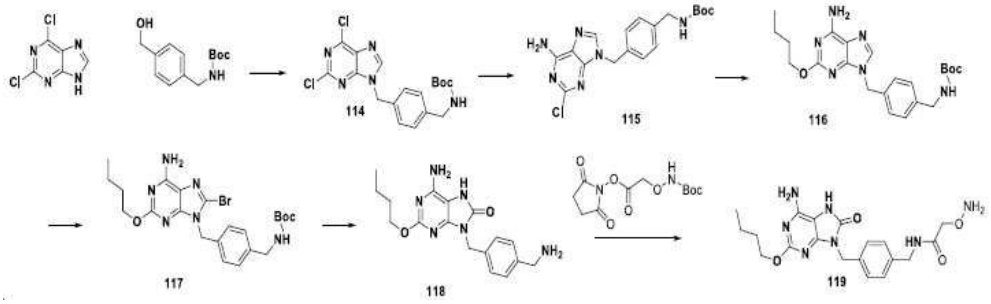
[1010] R_4는$-ONH_2$, 말단 C_1 ~ C_{12} 알킬, C1 ~ C_{12} 알킬, C1 ~ C_{12} 치환된 알킬, C_4 ~ C_8 사이클로알킬, 방향족 환, 치환된 방향족 환, 방향족 헤테로사이클, 치환된 방향족 헤테로사이클이거나, 또는 존재하지 않고;

[1011] Z_1은 C_1 ~ C_6 알킬, C_3 ~ C_{10} 사이클로알킬, C_3 ~ C_{10} 니트로 함유하는 헤테로사이클이며;

[1012] Z_2는 방향족 환, 방향족 헤테로사이클, C_2 ~ C_8 사이클로알킬이거나, 또는 존재하지 않고;

[1013] Z_3은 C_1 ~ C_{12} 알킬, 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬, C_3 ~ C_8 사이클로알킬, 치환된 C_3 ~ C_8 사이클로알킬, 치환된 C_3 ~ C_8 니트로 함유하는 헤테로사이클, C_3 ~ C_8 니트로 함유하는 헤테로사이클이거나, 또는 존재하지 않는다.

[1014] 코어 5 구조를 갖는 TLR-작용제는 하기 도식에서 공개된 바와 같이 합성되었다.

[1015] 

[1016] **tert-부틸 4-((2,6-디클로로-9H-푸린-9-일)메틸)벤질카르바마이트, tert-부틸 4-((2,6-디클로로-7H-푸린-7-일)메틸)벤질카르바마이트(114):** THF (10 mL)중 tert-부틸 4-(히드록시메틸)벤질카르바마이트 (1280 mg, 5.394 mmol) 및 2,6-디클로로푸린 (1050 mg, 5.556 mmol)의 용액에 23℃에서 PPh_3 (1560 mg, 5.948 mmol)을 추가하였다. 30 분 후, DIAD (1600 uL, 8.126 mmol)를 0℃에서 5 분에 걸쳐 추가하였다. 이 혼합물을 50℃에서 교반시켰다. 2 h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔류 혼합물을 EtOAc (100 mL)로 희석시켰고, 절반-포화된 바이카르보네이트 나트륨 (100 mL) 및 염수 (20 mL)을 이용하여 세척하였다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 화합물 **114** (2268 mg, < 5.555 mmol, PPh_3과 함께 미정제 혼합물)을 획득하였다 MS m/z 409 $(M+H)^+$.

[1017] **tert-부틸 4-((6-아미노-2-클로로-9H-푸린-9-일)메틸)벤질카르바마이트(115):** 화합물 **114** (PPh3의 미정제 혼합물, 2268 mg, <5.555 mmol)를 교반 막대가 장착된 내압 유리 용기에 넣었다. 이 용기에 MeOH중 7N NH_3(12 mL, 84 mmol)를 추가하였다. 이 튜브를 밀봉한 다음 120℃에서 가열하였다. 1h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었고, 잔유물을 DCM (100 mL)에서 용해시켰다. 침전물을 여과에 의해 제거하였다. 이 액체를 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 화합물 **115** (1043 mg, 2.682 mmol, 2,6-디클로로푸린으로부터 50%)을 획득하였다. MS m/z 400 $(M+H)^+$.

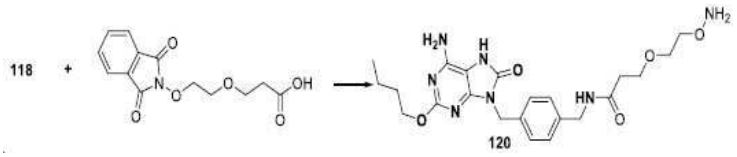
[1018] **tert-부틸 4-((6-아미노-2-부톡시-9H-푸린-9-일)메틸)벤질카르바마이트 (116):** 화합물 **115** (1043 mg, 2.682 mmol)를 23℃에서 건조 질소 가스 하에서 20% n-부톡시드 나트륨 (5 mL, 10.4 mmol)에 용해시키고, 온도를 110℃로 상승시켰다. 1.5h 후, 1ml의 물을 이 혼합물에 첨가하고, 이어서 Boc 무수물 (170 mg, 0.779 mmol)을 첨가하였다. 5 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물을 DCM (30 mL)에 용해시키고, 절반-포화된 바이카르보네이트 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시킨 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 화합물 **116** (560 mg, 1.313 mmol, 49%)을 획득하였다. MS m/z 427 $(M+H)^+$.

[1019] **tert-부틸 4-((6-아미노-8-브로모-2-부톡시-9H-푸린-9-일)메틸)벤질카르바마이트 (117):** DCM (10 mL)중 화합물 **116** (560 mg, 1.313 mmol)의 용액에 23℃에서 브롬 (135 uL, 0.507 mmol)을 추가하였다. 10 분 후, 이 반응물을 진공에서 건조시켰다. 잔유물은 DCM (50 mL)에 용해시키고, 절반-포화된 바이카르보네이트 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시킨 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, HBr 염의 형태로, 화합물 **117** (440 mg, 0.871 mmol, 66%)을 획득하였다, MS m/z 506 $(M+H)^+$.

[1020] **6-아미노-9-(4-(아미노메틸)벤질)-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온 (118):** 화합물 **117** (240 mg, 0.410 mmol) 농축된 HCl 용액, 37%(10mL)에 용해시키고, 그리고 역류시켰다. 4.5h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 물 (10 mL) 및 MeOH (4 mL)를 이 잔유물에 추가하고, NH_3, 28% 용액 (9 mL)을 추가하여 이를 중화시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **118** (11 mg. 0.019 mmol, 5%)을 획득하였다. MS m/z 343 $(M+H)^+$.

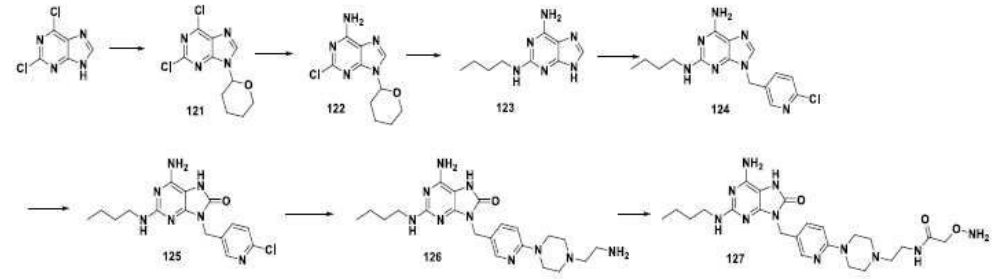
[1021] **N-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)-2-(아미노옥시)아세타미드 (119):** DMF (1 mL) 중 화합물 **118** (5 mg, 0.007 mmol) 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트 (3 mg, 0.010 mmol)의 용액에 23 ℃에서 DIEA (5 uL, 0.057 mmol)를 추가하였다. 10 분 후, 이 용매는 진공 하

에서 제거되었다. 이 잔유물에 DCM (1 mL) 및 TFA (1 mL)를 23℃에서 추가하였다. 10 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **119** (3.6 mg, 0.005 mmol, 65%)를 획득하였다. MS m/z 416 $(M+H)^+$.



[1022]

[1023] **N-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)-3-(2-(아미노옥시)에톡시)프로판아미드 (120):** DMF (1 mL)중 화합물 **118** (5 mg, 0.007 mmol) 및 3-(2-(1,3-디옥소이소인돌린-2-일옥시)에톡시)프로판산 (3 mg, 0.011 mmol)의 용액에 DMTMMT (3 mg, 0.012 mmol) 및 DIEA (8 uL, 0.046 mmol)을 23 ℃에서 추가하였다. 15 분 후, 이 혼합물에 하이드라진, H_2O (3 uL, 0.06 mmol)을 추가하였다. 20 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **120** (3.5 mg, 0.004 mmol, 59%)을 획득하였다. MS m/z 474 $(M+H)^+$.



[1024]

[1025] **2,6-디클로로-9-(테트라히드로-2H-피란-2-일)-9H-푸린 (121):** 에틸 아세테이트 (100 mL)중 2,6-디클로로푸린 (2950 mg, 15.608 mmol)의 자성에 의해 교반된 용액에 벤술폰산 (30 mg, 0.19 mmol)을 추가하였고, 그리고 이 혼합물은 건조 질소 하에서 50 ℃로 가열시켰다. 교반된 혼합물에 1h에 걸쳐 50 ℃에서 3,4-디히드로-2H-피란 (2200 uL, 26.153 mmol)을 추가하였다. 이 온도를 23 ℃로 낮추었다. 1h 후, 이 혼합물을 절반-포화된 $NaHCO_3$ (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시키고, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매를 진공하에서 제거하였고, 잔유물을 고-진공 펍프에서 건조시켜, 화합물 **121** (4170 mg, 15.269 mmol, 98%)을 획득하였다. MS m/z 274 $(M+H)^+$.

[1026] **2-클로로-9-(테트라히드로-2H-피란-2-일)-9H-푸린-6-아민 (122):** 화합물 **121** (4170 mg, 15.269 mmol)을 교반 막대가 장착된 내압 유리 용기에 넣었다. 이 용기에 MeOH중 7N NH_3(12.84 mmol)를 추가하였다. 이 튜브를 밀봉한 다음, 110 ℃에서 가열하였다. 3.5h 후, 이 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 하룻밤 동안 세워 두었다. 침전물을 여과시키고, MeOH (5 mL)로 세척하였다. 고체를 고-진공 펌프에서 건조시켜, 화합물 **122** (3450 mg, 13.6 mmol, 89%)를 획득하였다. MS m/z 254 $(M+H)^+$.

[1027] **2-클로로-9-(테트라히드로-2H-피란-2-일)-9H-푸린-6-아민 (123):** 화합물 **122** (1746 mg, 6.882 mmol)를 교반 막대가 장착된 내압 유리 용기에 넣었다. 이 용기에 n-부틸아민 (7 mL, 70.86 mmol)) 및 DIEA (2.3 mL, 13.25 mmol)을 추가하였다. 이 튜브를 밀봉한 다음, 150 ℃에서 가열하였다. 5h 후, 이 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 용매는 진공에서 제거하였다. 잔유물은 DCM (100 mL)에 용해시키고, 물 (30 mL) 및 염수 (50 ml)로 세척시킨 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물 (중간생성물)을 MeOH (10 mL) 및 TFA (2 mL)에 용해시키고, 23 ℃에서 하룻밤 동안 교반시켰다. 18h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물에 EtOAc (10 mL) 및 헥산 (50 mL)을 추가하여, 침전시켰다. 침전물을 여과 및 건조 진공 펌프로 수집하여, 2 TFA 염 형태의 화합물 **123** (1640 mg, 3.777 mmol, 55%)을 획득하였다. MS m/z 207 $(M+H)^+$.

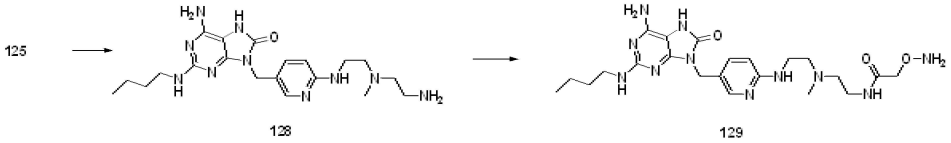
[1028] **N2-부틸-9-((6-클로로피리딘-3-일)메틸)-9H-푸린-2,6-디아민 (124):** DMF (5 mL)중 화합물 **123** (1640 mg, 3.777 mmol) 및 2-클로로-5-(클로로메틸)피리딘 (900 mg, 5.556 mmol)의 용액에 K_2CO_3 (2600 mg, 18.813 mmol)을 추가하였고, 그리고 이 혼합물을 질소 가스 하에서 50 ℃에서 교반시켰다. 24h 후, 얼음 냉각수 (100 mL)를 이 혼합물에 추가하였고, 그리고 침전물을 분리시켰다. 이 침전물을 DCM (100 mL)에 용해시키고, 염수 (50 mL)로 세척

하고, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 1% ~ 10% MeOH/DCM 구배를 이용한 섬광 크로마토그래피(실리카 겔)로 정제하여, 화합물 **124** (1020 mg, 3.074 mmol, 81 %)을 획득하였다. MS m/z 332 $(M+H)^+$.

[1029] **6-아미노-2-(부틸아미노)-9-((6-클로로피리딘-3-일)메틸)-7H-푸린-8(9H)-온 (125):** DCM (10 mL)중 화합물 **124** (1020 mg, 3.074 mmol)의 용액에 브롬 (250 uL, 0.939 mmol)을 23 ℃에서 추가하였다. 1.5h 후에, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물을 고압 펌프 하에서 건조시켰다. 8-브로모-N2-부틸-9-((6-클로로피리딘-3-일)메틸)-9H-푸린-2,6-디아민, HBr (1500mg, <3.074 mmol)의 미정제 중간생성물을 농축된 HCl 용액, 37% (15 mL)에 용해시키고, 그리고 용액은 역류시켰다. 8h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물에 물 (10 mL)과 MeOH (4 mL)를 추가하였고, 그리고 NH_3, 28% 용액 (5 mL)을 추가함으로써, 중화시켰다. 침전된 고체를 원심분리(5 분, 4000 rpm)에 의해 분리시키고, MeOH (2 mL) 및 물 (10 mL)로 세척하였다. 이 침전물을 건조시켜, 화합물 **125** (1100mg, 2.421 mmol, 79%)을 획득하였다. MS m/z 348 $(M+H)^+$.

[1030] **6-아미노-9-((6-(4-(2-아미노에틸)피페라진-1-일)피리딘-3-일)메틸)-2-(부틸아미노)-7H-푸린-8(9H)-온 (126):** 화합물 **125** (30 mg, 0.086 mmol) 및 tert-부틸 2-(피페라진-1-일)에틸카르바마이트 (26 mg, 0.113 mmol)의 혼합물을 140 ℃에서 가열시켰다. 20h 후, 이 혼합물을 23 ℃로 냉각시켰다. 이 잔유물에 DCM (0.5 mL) 및 TFA (0.5 mL)를 로딩하였다. 30 분 후. 이 용매는 진공 하에서 제거되었고, 이 잔유물을 Prep-LC로 정제시켜, TFA 염 형태의 화합물 **126** (9 mg, 0.010 mmol, 12%)을 획득하였다. MS m/z 441 $(M+H)^+$.

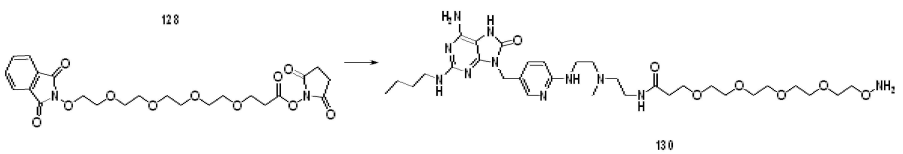
[1031] **N-(2-(4-(5-((6-아미노-2-(부틸아미노)-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)피리딘-2-일)피페라진-1-일)에틸)-2-(아미노옥시)아세타미드 (127):** DMF (1 mL)중 화합물 **126** (9 mg, 0.010 mmol) 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트 (2.5 mg, 0.011 mmol)의 용액에 DIEA (10 uL, 0.060 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 15 분, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물에 DCM (1 mL) 및 TFA (1 mL)를 로딩하였다. 5 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물을 Prep-LC로 정제시켜, TFA 염 형태의 화합물 **127** (8mg, 0.008 mmol, 82%)을 획득하였다. MS m/z 514 $(M+H)^+$.



[1032]

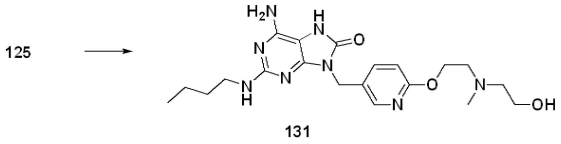
[1033] **6-아미노-9-((6-(2-((2-아미노에틸)(메틸)아미노)에틸아미노)피리딘-3-일)메틸)-2-(부틸아미노)-7H-푸린-8(9H)-온 (128):** 화합물 **125** (30 mg, 0.086 mmol)와 2,2'디아미노-N-메틸디에틸아민 (100 uL, 0.853 mmol)의 혼합물을 130 ℃에서 가열시켰다. 20h 후, 이 혼합물을 23 ℃로 냉각시키고, 그리고 Prep-LC에 의해 정제시켜, 화합물 **128** (40 mg, 0.045 mmol, 52%)을 획득하였다. MS m/z 423 $(M+H)^+$.

[1034] **N-(2-((2-(5-((6-아미노-2-(부틸아미노)-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)피리딘-2-일아미노)에틸)(메틸)아미노)에틸)-2-(아미노옥시)아세타미드 (129):** 화합물 **129**를 출발 물질로 화합물 **128**을 이용하고, 화합물 **127**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **129** (13 mg, 0.012 mmol, 54%)를 획득하였다. MS m/z 502 $(M+H)^+$.



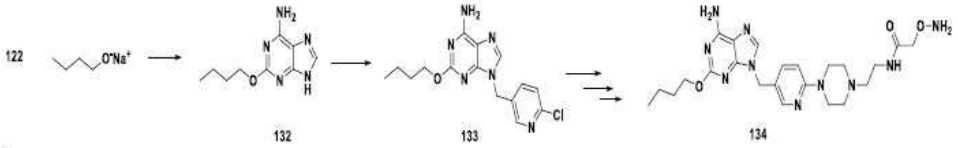
[1035]

[1036] **NH2O-PEG3-Pr-(6-아미노-9-((6-(2-((2-아미노에틸)(메틸)아미노)에틸아미노)피리딘-3-일)메틸)-2-(부틸아미노)-7H-푸린-8(9H)-온)아세타미드 (130):** DMF (1 mL)중 화합물 **128** (20 mg, 0.023 mmol) 및 Phth-PEG4-OSu (10 mg, 0.022 mmol)의 용액에 DIEA (50 uL, 0.287 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 5 분 후, 하이드라진, H_2O (10 uL)을 23℃에서 이 혼합물에 추가하였다. 5 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **130** (20 mg, 0.016 mmol, 70%)을 획득하였다. MS m/z 692 $(M+H)^+$.



[1037]

[1038] **6-아미노-2-(부틸아미노)-9-((6-(2-((2-히드록시에틸)(메틸)아미노)에톡시)피리딘-3-일)메틸)-7H-푸린-8(9H)-온 (131):** DMF (4 mL) 중 화합물 **125** (124 mg, 0.215 mmol)의 용액에 N-메틸디에탄올아민 (200 uL, 1.007 mmol) 및 NaH, 60% (350 mg, 8.750 mmol)을 23℃에서 추가하였다. 이 혼합물을 질소 하에서 60 ℃에서 교반시켰다. 3h 후, 1N HCl (4 mL)를 이 혼합물에 추가하고, Prep LC로 정제시키면, 화합물 **131** (75 mg, 0.085 mmol, 39%)을 획득하였다. MS m/z 431 $(M+H)^+$.

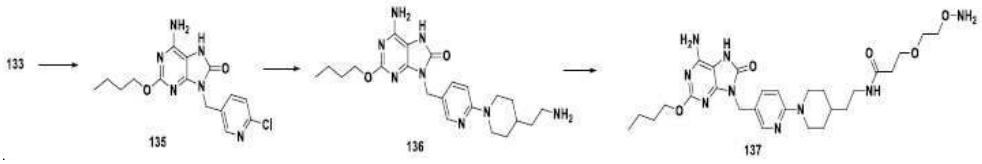


[1039]

[1040] **2-부톡시-9H-푸린-6-아민 (132):** 23 ℃에서 건조 질소 가스 하에서 화합물 **122** (690 mg, 2.720 mmol)을 20% n-부톡시드 나트륨 (8 mL, 16.71 mmol)에 용해시켰다. 추가 후, 이 온도를 100 ℃로 상승시켰다. 20 h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 DCM (30 mL)에 용해시키고, 절반-포화된 바이카르보네이트 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시킨 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매는 진공 하에서 제거되었다. MeOH (5 mL) 및 TFA (1 mL)를 이 잔유물에 추가한 후, 23 ℃에서 교반시켰다. 18h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 DCM (30 mL)에 용해시키고, 바이카르보네이트 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시킨 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매를 진공하에서 제거하여, 미정제된 2-부톡시-9H-푸린-6-아민 (1300 mg, 2.987, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 208 $(M+H)^+$.

[1041] **N2-부틸-9-((6-클로로피리딘-3-일)메틸)-9H-푸린-2,6-디아민 (133):** 화합물 **133**은 출발 물질로 화합물 **132**를 이용하고, 화합물 **124**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **133**(468 mg, 1.406 mmol, 47%)를 획득하였다. MS m/z 333 $(M+H)^+$.

[1042] **N-(2-(4-(5-((6-아미노-2-부톡시-9H-푸린-9-일)메틸)피리딘-2-일)피페라진-1-일)에틸)-2-(아미노옥시)아세타미드 (134):** 화합물 134는 출발 물질로 화합물 **133**을 이용하고, 화합물 **127**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **134** (12 mg, 0.012 mmol, 화합물 **133**으로부터 10%)를 획득하였다. MS m/z 514 $(M+H)^+$.

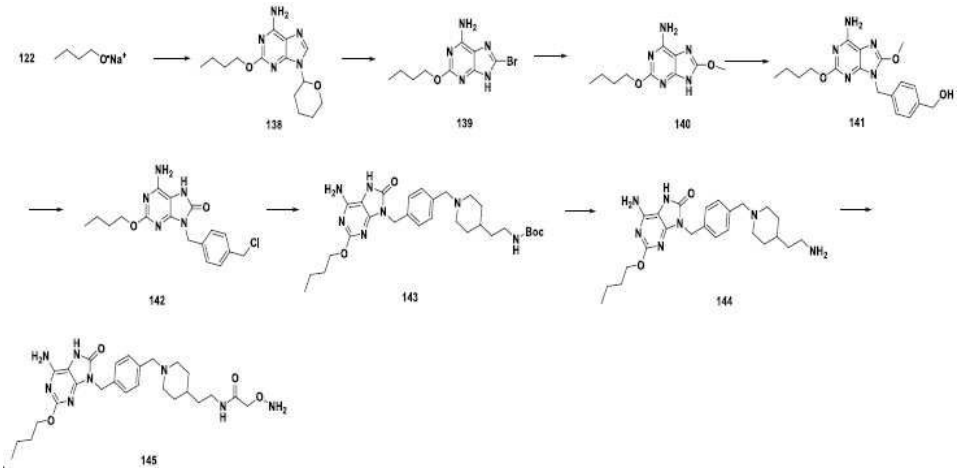


[1043]

[1044] **6-아미노-2-부톡시-9-((6-클로로피리딘-3-일)메틸)-7H-푸린-8(9H)-온 (135):** DCM (10 mL)중 화합물 **133** (124 mg, 0.373 mmol)의 용액에 브롬 (30 uL, 0.113 mmol)을 23 ℃에서 추가하였다. 2h 후, 이 반응물을 진공에서 건조시켰다. 8-브로모-2-부톡시-9-((6-클로로피리딘-3-일)메틸)-9H-푸린-6-아민, HBr (150 mg, <0.373 mmol, 미정제) 미정제 잔유물을 3N HCl 용액 (15 mL)에 용해시키고, 역류시켰다. 20h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **135** (47mg, 0.110 mmol, 29%)를 획득하였다. MS m/z 349 $(M+H)^+$.

[1045] **6-아미노-9-((6-(4-(2-아미노에틸)피페리딘-1-일)피리딘-3-일)메틸)-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온 (136):** 화합물 **135** (46 mg, 0.132 mmol) 및 4-(2-boc-아미노에틸)-피페리딘 (120 mg, 0.526 mmol)을 혼합하였고, 그리고 이 혼합물을 140 ℃에서 교반시켰다. 25 h 후, 이 혼합물을 23 ℃로 냉각시킨 후, DCM (1 mL) 및 TFA (1 mL)를 추가하였다. 10 분 후, 유기 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **136** (11 mg, 0.014 mmol, 11%)을 획득하였다. MS m/z 441 $(M+H)^+$.

[1046] **N-(2-(1-(5-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)피리딘-2-일)피페리딘-4-일)에틸)-3-(2-(아미노옥시)에톡시)프로판아미드 (137):** 화합물 **137**은 출발 물질로 화합물 **136** 및 3-(2-(1,3-디옥소이소인돌린-2-일옥시)에톡시)프로판산을 이용하고, 화합물 **130**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **137** (9 mg, 0.010 mmol, 70%)을 획득하였다. MS m/z 572 $(M+H)^+$.



[1047]

[1048] **9-(4-(2-아미노에틸)벤질)-2-부톡시-9H-푸린-6-아민 (138):** 화합물 **122** (3330 mg, 13.126 mmol)를 23 ℃에서 건조 질소 가스 하에서 20% n-부톡시드 나트륨 (25 mL)에 용해시키고, 이 온도를 100 ℃로 상승시켰다. 1.5 h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 DCM (30 mL)에 용해시키고, 절반-포화된 중탄산 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시킨 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 1 % ~ 4%의 MeOH/DCM 구배를 이용한 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 화합물 **138** (2687mg, 9.224 mmol, 70%)을 획득하였다. MS m/z 292 $(M+H)^+$.

[1049] **8-브로모-2-부톡시-9-(테트라히드로-2H-피란-2-일)-9H-푸린-6-아민 (139):** DCM (50 ml)중 화합물 **138** (2687 mg, 9224 mmol)의 용액에 23 ℃에서 N-브로모숙시니미드 (2000 mg, 11069 mmol)를 추가하였다. 1h 후, 포화된 티오술페이트 나트륨 (20 mL)을 이 혼합물에 추가하였다. 물질을 DCM(20 ml)으로 추출했다. 유기 층은 포화 중탄산 나트륨 (50 mL) 및 염수 (50 mL)로 세척하였고, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 20% ~ 70%의 EtOAc/헥산 구배를 이용하여 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 화합물 **139** (2517 mg, 6.799 mmol, 74%)를 획득하였다. MS m/z 371 $(M+H)^+$.

[1050] **2-부톡시-8-메톡시-9H-푸린-6-아민 (140):** 화합물 **139** (2517 mg, 6.799 mmol)를 23 ℃에서 건조 질소 가스 하에서 25% 메톡시드 나트륨 (20 mL, 42 mmol)에 용해시켰다. 추가 후, 이 온도를 70 ℃로 상승시켰다. 2.5h 후, 이 혼합물을 진공에서 농축시키고, EtOAc (100 mL)에 용해시키고, 물 (100 mL) 및 염수 (100 mL)로 세척한 후, $MgSO_4$ 에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 유기층을 수집하고, 진공에서 증발시켰다. 이 잔유물에 MeOH (10 mL) 및 TFA (3 mL)를 추가하였다. TFA 추가 후 48h 시점에, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **140** (708 mg, 2.984, 44%)을 획득하였다. MS m/z 238 $(M+H)^+$.

[1051] **(4-((6-아미노-2-(부틸아미노)-8-메톡시-9H-푸린-9-일)메틸)페닐)메탄올 (141):** DMF (2 mL)중 화합물 **140**, TFA 염 (25 mg, 0.054 mmol)의 용액에 카르보네이트 칼륨 (20 mg, 0.524 mmol) 및 (4-히드록시메틸)벤질 클로라이드 (11 mg, 0.070 mmol)를 추가한 다음 50 ℃에서 교반시켰다. 2h 후, 용매를 농축시켰다. 이 잔유물에 물을 추가한 다음, 이 혼합물을 DCM (50 mL)로 추출하였다. 유기층을 물 (10 mL) 및 염수 (20 mL)로 세척하고, 이어서 $MgSO_4$에서 건조시키고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, TFA 염 형태의 화합물 **141** (29 mg, 0.042 mmol, 77%)을 획득하였다. MS m/z 357 $(M+H)^+$.

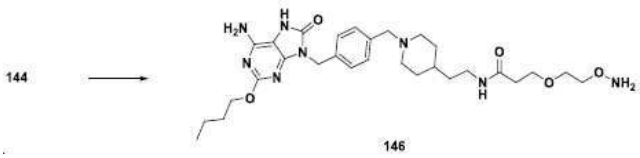
[1052] **6-아미노-2-부톡시-9-(4-(클로로메틸)벤질)-7H-푸린-8(9H)-온 (142):** 화합물 **141** (607 mg, 1.037 mmol)에 디클로로메탄 (10 mL)을 추가하였다. 결과적으로 생성된 현탁액에 티오닐 클로라이드 (1000 uL)를 추가하였고, 이 혼합물을 5℃에서 3 시간 동안 교반시켰다. 톨루엔 (30 mL)을 이 혼합물에 추가하고, 용매를 증발시켰다. 톨루엔 (100 mL)을 다시 이 잔유물에 추가하였고, 용매를 증발시키고, 감압하에서 건조시켜, 화합물 **142** (402 mg,

1.111 mmol, 정량적)를 획득하였다. MS m/z 362 $(M+H)^+$.

[1053] **tert-부틸 2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸카르바마이트 (143):** DMF (2 mL)중 화합물 **142** (166 mg, 0.384 mmol) 및 4-(2-boc-아미노에틸)-피페리딘 (180 mg, 0.788 mmol)의 용액에 DIEA (1000 uL, 5.741 mmol)를 추가하였고, 온도를 80 ℃로 상승시켰다. 3.5h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **143** (205 mg, 0.229 mmol, 29%)을 획득하였다. MS m/z 554 $(M+H)^+$.

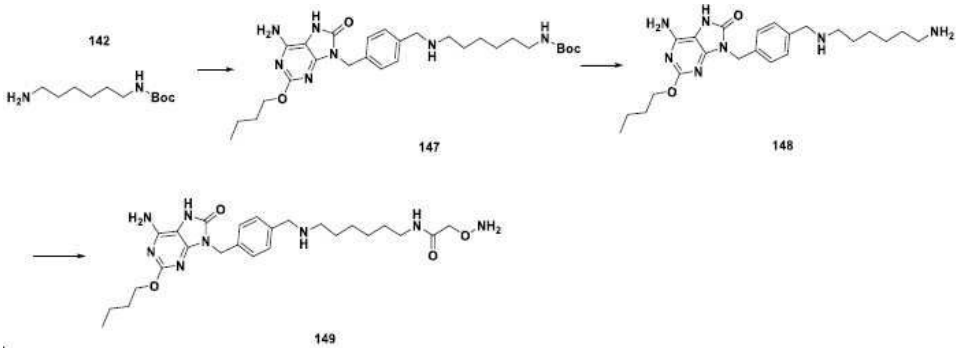
[1054] **6-아미노-9-(4-((4-(2-아미노에틸)피페리딘-1-일)메틸)벤질)-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온 (144):** 화합물 **143** (41mg, 0.052 mmol)을 DCM (2 mL) 및 TFA (1 mL)에 용해시켰다. 5 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 톨루엔(5ml)을 이 잔유물에 추가하고, 진공 하에서 증발시켰다. 잔유물을 고압 펌프 하에서 건조시켜, TFA 염 형태의 화합물 **144** (41mg, 0.052mmol, 정량적)를 획득하였다. MS m/z 454 $(M+H)^+$.

[1055] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-2-(아미노옥시)아세타미드 (145):** 화합물 **145**는 출발 물질로 화합물 **144**를 이용하고, 화합물 **127**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **145** (15 mg, 0.015 mmol, 87%)를 획득하였다. MS m/z 527 $(M+H)^+$.



[1056]

[1057] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-3-(2-(아미노옥시)에톡시)프로펜아미드 (146):** 화합물 **146**은 출발 물질로 화합물 **144**를 이용하고, 화합물 **137**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **146** (16 mg, 0.015 mmol, 87%)를 획득하였다 MS m/z 585 $(M+H)^+$.

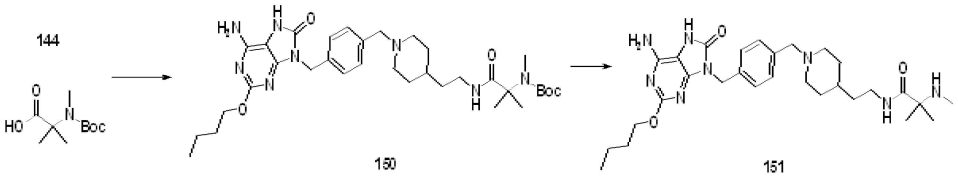


[1058]

[1059] **tert-부틸 2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸카르바마이트 (147):** 화합물 **147**은 출발 물질로 화합물 **142** 및 tert-부틸 6-아미노헥실카르바마이트를 이용하고, 화합물 **143**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **147** (23mg, 0.026 mmol, 14%)을 획득하였다. MS m/z 542 $(M+H)^+$.

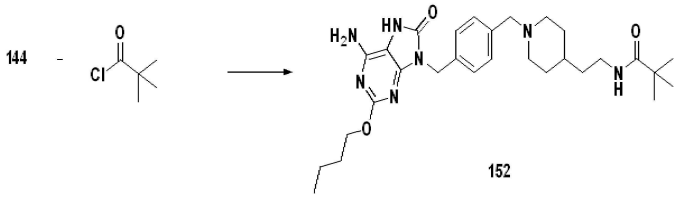
[1060] **6-아미노-9-(4-((6-아미노헥실아미노)메틸)벤질)-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온 (148):** 화합물 **148**은 출발 물질로 화합물 **147**을 이용하고, 화합물 **144**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **148** (24 mg, 0.027mmol, 정량적)을 획득하였다. MS m/z 442 $(M+H)^+$.

[1061] **N-(6-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질아미노)헥실)-2-(아미노옥시)아세타미드 (149):** 화합물 **149**는 출발 물질로 화합물 **148**을 이용하고, 화합물 **127**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **149** (7 mg, 0.008 mmol, 31%)를 획득하였다. MS m/z 515 $(M+H)^+$.

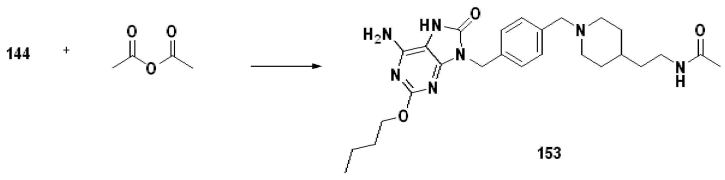
[1062] 

[1063] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-3-(2-(아미노옥시)에톡시)프로판아미드 (150):** DMF (1 mL)중 화합물 **144** (14 mg, 0.018 mmol) 및 N-Boc-N,2-디메틸-알라닌 (5.5 mg, 0.020 mmol)의 용액에 DMTMMT (5 mg, 0.021 mmol) 및 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 30 분 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **150** (7 mg, 0.007 mmol, 37%)을 획득하였다. MS m/z 653 $(M+H)^+$.

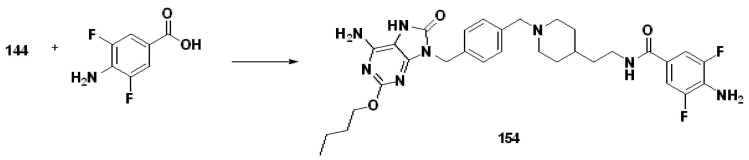
[1064] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-2-메틸-2-(메틸아미노)프로판아미드 (151):** 화합물 **151**은 출발 물질로 화합물 **150**을 이용하고, 화합물 **144**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **151** (5.5 mg, 0.005 mmol, 정량적)를 획득하였다. MS m/z 553 $(M+H)^+$.

[1065] 

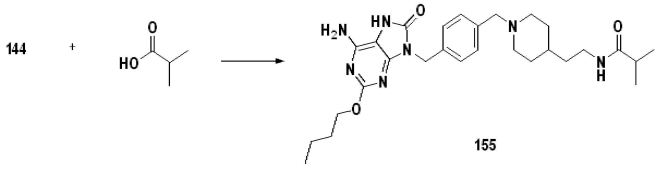
[1066] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)피발아미드 (152):** DMF (1 mL)중 화합물 **144** (14 mg, 0.018 mmol) 및 트리메틸 아세틸 클로라이드 (2.8 ul, 0.022 mmol)의 용액에 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 1h 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **152** (7 mg, 0.008 mmol, 36%)를 획득하였다. MS m/z 538 $(M+H)^+$.

[1067] 

[1068] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)아세타미드 (153):** DMF (1 mL) 중 화합물 **144** (20 mg, 0.022 mmol) 및 아세트 무수물 (2.1 uL, 0.021 mmol)의 용액에 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 1h 후, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **153** (8 mg, 0.010 mmol, 43%)을 획득하였다. MS m/z 496 $(M+H)^+$.

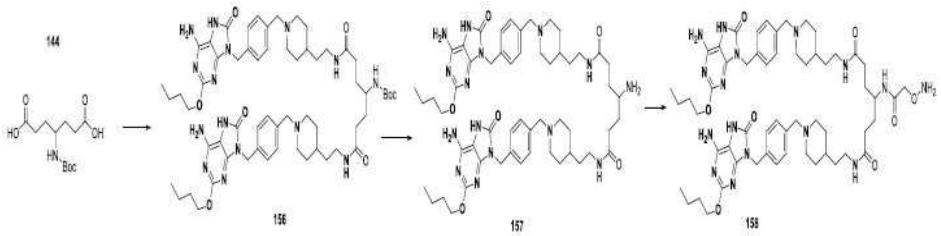
[1069] 

[1070] **4-아미노-N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (154):** 화합물 **154**는 출발 물질로 화합물 144 및 4-아미노-3,5-디플루오르 벤조산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **154** (8 mg, 0.008 mmol, 38%)를 획득하였다. MS m/z 609 $(M+H)^+$.



[1071]

[1072] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)이소부티라미드 (155):** 화합물 **155**는 출발 물질로 화합물 **144** 및 이소부틸산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 화합물 **155** (6 mg, 0.007 mmol, 32%)를 획득하였다. MS m/z 524 $(M+H)^+$.

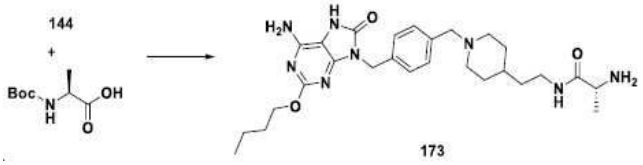


[1073]

[1074] **tert-부틸 1,7-bis(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸아미노)-1,7-디옥소헵탄-4-일카르바마이트 (156):** 화합물 **156**은 출발 물질로 화합물 **144** 및 4-(N-Boc-아미노)-1,6-헵탄디온산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **156** (15 mg, 0.009 mmol, 34%)을 획득하였다. MS m/z 1147 $(M+H)^+$.

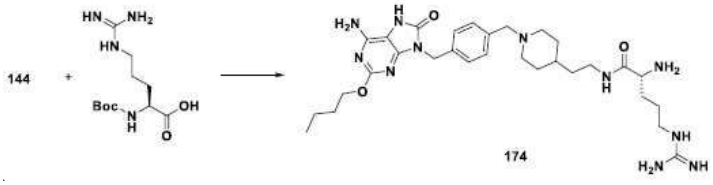
[1075] **4-아미노-N1,N7-비스(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)헵탄디아미드 (157):** 화합물 **157**은 출발 물질로 화합물 **156**을 이용하고, 화합물 **144**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **157**(15 mg, 0.01 mmol, 정량적))를 획득하였다. MS m/z 1047 $(M+H)^+$.

[1076] **N1,N7-비스(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-4-(2-(아미노옥시)아세트아미도)헵탄디아미드 (158):** 화합물 **158**은 출발 물질로 화합물 **157** 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트를 이용하고, 화합물 **145**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **158** (5 mg, 0.003 mmol, 34%)을 획득하였다. MS m/z 1120 $(M+H)^+$.



[1077]

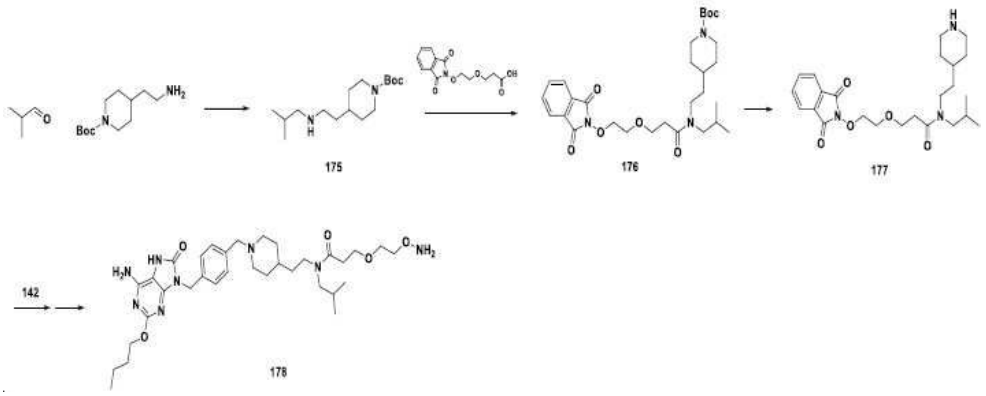
[1078] **(S)-2-아미노-N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)프로판아미드 (173):** DMF (1 mL)중 화합물 **144** (20 mg, 0.022 mmol) 및 N-Boc-알라닌 (5 mg, 0.026 mmol)의 용액에 DMTMMT (6 mg, 0.025 mmol) 및 DIEA (20 uL, 0.115 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 10 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물에 DCM (1ml) 및 TFA (1ml)를 추가하였다. 10 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었고, 잔유물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **173** (8 mg, 0.009 mmol, 42%)을 획득하였다. MS m/z 525 $(M+H)^+$.



[1079]

[1080] **(S)-2-아미노-N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-5-구아니디노펜탄아미드 (174):** 화합물 **174**는 출발 물질로 화합물 **144**를 이용하고, 화합물 **173**에서 기술된 유사한

과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **174**(10 mg, 0.011 mmol, 48%)를 획득하였다. MS m/z 610 $(M+H)^+$.



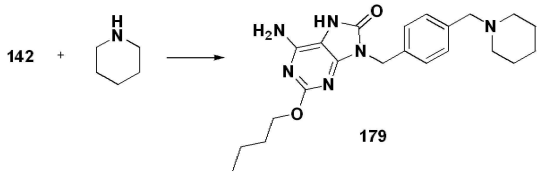
[1081]

[1082] **tert-부틸 4-(2-(이소부틸아미노)에틸)피페리딘-1-카르복실레이트 (175):** 4-(2-아미노에틸)-1-Boc-피페리딘 (520 mg, 2.278 mmol) 및 이소부티르알데히드 (230 ul, 3.190 mmol)를 23 ℃에서 메탄올 (10 ml)에 용해시켰다. 2h 후, 수소화붕소나트륨 (142 mg, 3.754 mmol)을 이 혼합물에 추가하였다. 10 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물을 DCM (100 mL)에 용해시키고, 포화된 $NaHCO_3$ (50 mL) 및 염수 (50 ml)에 세척시키고, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 잔유물을 Prep-LC로 정제시키고, 무색의 유리같은 고체 형태의 화합물 **175** (499 mg, 1.755 mmol, 55%)를 획득하였다. MS m/z 285 $(M+H)^+$.

[1083] **tert-부틸 4-(2-(3-(2-(1,3-디옥소이소인돌린-2-일옥시)에톡시)-N-이소부틸프로판아미도)에틸)피페리딘-1-카르복실레이트 (176):** EtOAc (10 ml)중 화합물 **175** (80 mg, 0.201 mmol) 및 Phth-PEG1-COOH (56 mg, 0.201 mmol)의 용액에 CMPI (62 mg, 0.243 mmol) 및 DIEA (70 ul, 0.402 mmol)를 23 ℃에서 추가하였다. 3h 후, 이 침전물을 여과를 통하여 제거하였고, 여과액을 섬광 크로마토그래피로 정제시키면, 백색 고체 형태의 화합물 **176** (65 mg, 0.119 mmol, 59%)을 획득하였다. MS m/z 546 $(M+H)^+$.

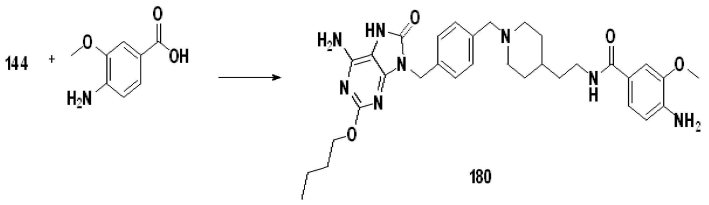
[1084] **3-(2-(1,3-디옥소이소인돌린-2-일옥시)에톡시)-N-이소부틸-N-(2-(피페리딘-4-일)에틸)프로판아미드 (177):** 화합물 177은 출발 물질로 화합물 **176**을 이용하고, 화합물 **144**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **177** (66 mg, 0.118 mmol, 정량적)를 획득하였다. MS m/z 446 $(M+H)^+$.

[1085] **N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-3-(2-(아미노옥시)에톡시)-N-이소부틸프로판아미드 (178):** 화합물 **178**은 출발 물질로 화합물 **177** 및 화합물 **142**를 이용하고, 화합물 **143**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비하고, 이어서 화합물 **130**에서 기술된 바와 같이, 하이드라진, H_2O (10 uL)으로 처리함으로써, 화합물 **178** (19 mg, 0.019 mmol, 7%)을 획득하였다. MS m/z 641 $(M+H)^+$.



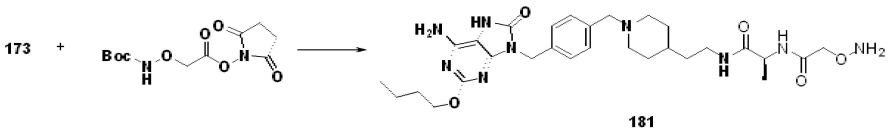
[1086]

[1087] **6-아미노-2-부톡시-9-(4-(피페리딘-1-일메틸)벤질)-7H-푸린-8(9H)-온 (179):** 화합물 **179**는 출발 물질로 화합물 **142**를 이용하고, 화합물 **143**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **179** (31 mg, 0.041 mmol, 54%)를 획득하였다. MS m/z 411 $(M+H)^+$.



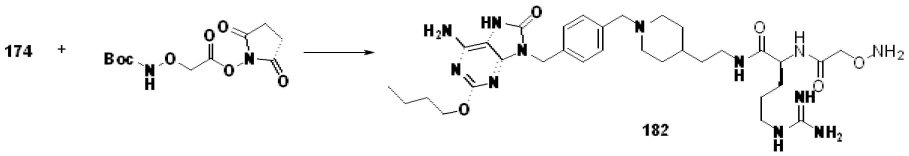
[1088]

[1089] **4-아미노-N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-3-메톡시벤즈아미드 (180):** 화합물 180은 출발 물질로 화합물 144 및 4-아미노-3-메톡시벤조산을 이용하고, 화합물 150에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 180 (8 mg, 0.008 mmol, 39%)을 획득하였다. MS m/z 603 $(M+H)^+$.



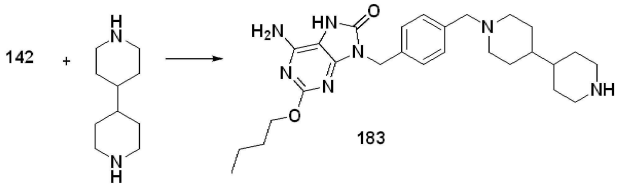
[1090]

[1091] **(S)-N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)프로판아미드 (181):** 화합물 181은 출발 물질로 화합물 173 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트를 이용하고, 화합물 127에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 181 (5 mg, 0.005 mmol, 58%)을 획득하였다. MS m/z 598 $(M+H)^+$.



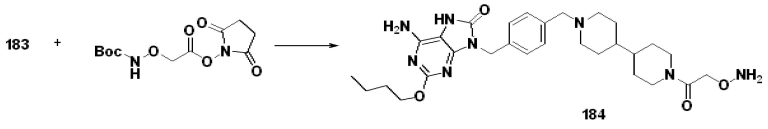
[1092]

[1093] **(S)-N-(2-(1-(4-((6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)-5-구아니디노펜탄아미드 (182):** 화합물 182는 출발 물질로 화합물 174 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트를 이용하고, 화합물 127에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 182 (5 mg, 0.004 mmol, 42%)를 획득하였다. MS m/z 683 $(M+H)^+$.



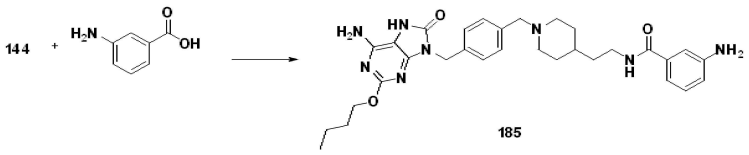
[1094]

[1095] **9-(4-(4,4'-비피페리딘-1-일메틸)벤질)-6-아미노-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온온 (183):** 화합물 183은 출발 물질로 화합물 142 및 4,4'-비피페리딘을 이용하고, 화합물 143에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 화합물 183 (13 mg, 0.016 mmol, 7%)을 획득하였다. MS m/z 494 $(M+H)^+$.

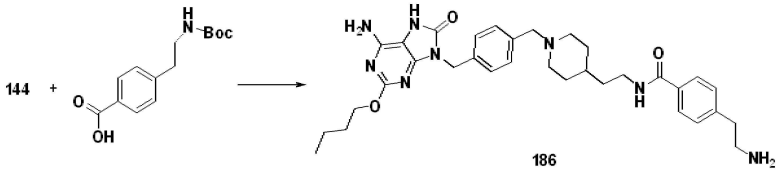


[1096]

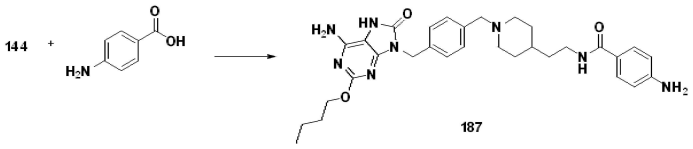
[1097] **6-아미노-9-(4-((1'-(2-(아미노옥시)아세틸)-4,4'-비피페리딘-1-일)메틸)벤질)-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온 (184):** 화합물 184는 출발 물질로 화합물 183 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트를 이용하고, 화합물 127에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 184 (5 mg, 0.005 mmol, 18%)를 획득하였다. MS m/z 567 $(M+H)^+$.

[1098] 

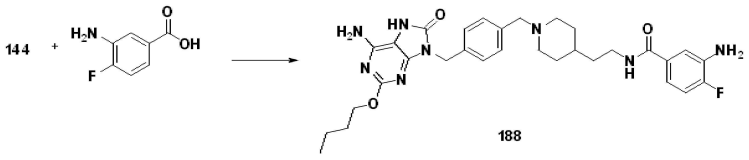
[1099] **3-아미노-N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)벤즈아미드 (185):** 화합물 185는 출발 물질로 화합물 144 및 3-아미노벤조산을 이용하고, 화합물 150에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 185 (8 mg, 0.009 mmol, 53%)를 획득하였다. MS m/z 572 $(M+H)^+$.

[1100] 

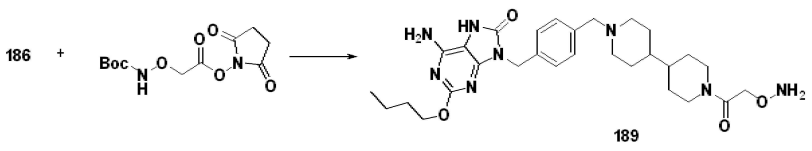
[1101] **N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-4-(2-아미노에틸)벤즈아미드 (186):** 화합물 186은 출발 물질로 화합물 144 및 4-(2-Boc-아미노)에틸벤조산을 이용하고, 화합물 173에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 186 (9 mg, 0.010 mmol, 58%)을 획득하였다. MS m/z 600 $(M+H)^+$.

[1102] 

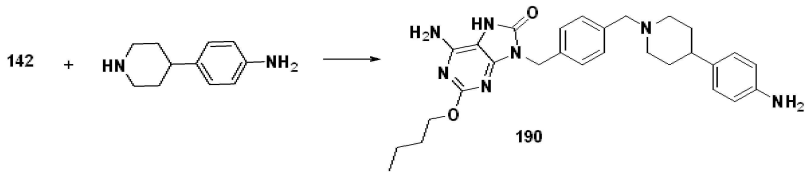
[1103] **4-아미노-N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)벤즈아미드벤즈아미드 (187):** 화합물 187은 출발 물질로 화합물 144 및 4-아미노벤조산을 이용하고, 화합물 150에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 187 (8 mg, 0.009 mmol, 53%)을 획득하였다. MS m/z 572 $(M+H)^+$.

[1104] 

[1105] **3-아미노-N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-4-플루오르벤즈아미드 (188):** 화합물 188은 출발 물질로 화합물 144 및 3-아미노-4-플루오르벤조산을 이용하고, 화합물 150에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 188 (11 mg, 0.011 mmol, 64%)을 획득하였다. MS m/z 590 $(M+H)^+$.

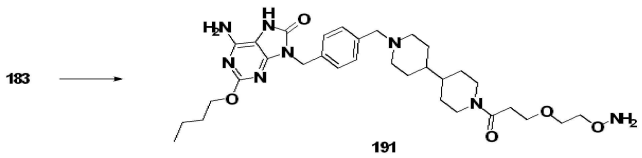
[1106] 

[1107] **N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-4-(2-(2-(아미노옥시)아세트아미도)에틸)벤즈아미드 (189):** 화합물 189는 출발 물질로 화합물 186 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트를 이용하고, 화합물 127에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 189 (11 mg, 0.010 mmol, 94%)를 획득하였다. MS m/z 673 $(M+H)^+$.



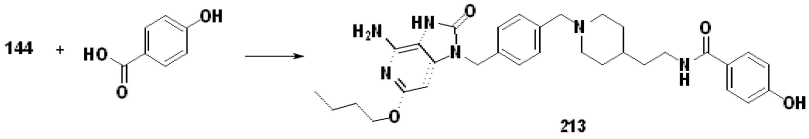
[1108]

[1109] **6-아미노-9-(4-((4-(4-아미노페닐)피페리딘-1-일)메틸)벤질)-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온 (190):** 화합물 **190**는 출발 물질로 화합물 **142** 및 4-(4-아미노페닐)-피페리딘을 이용하고, 화합물 **143**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 화합물 **190** (3 mg, 0.004 mmol, 5%)을 획득하였다. MS m/z 502 $(M+H)^+$.



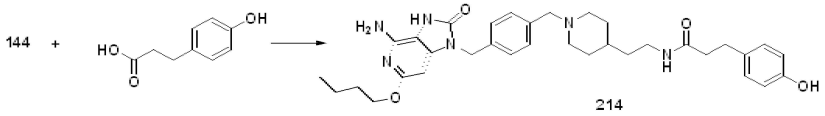
[1110]

[1111] **6-아미노-9-(4-((1'-(3-(2-(아미노옥시)에톡시)프로판oyl)-4,4'-비피페리딘-1-일)메틸)벤질)-2-부톡시-7H-푸린-8(9H)-온 (191):** 화합물 **191**은 출발 물질로 화합물 **183**을 이용하고, 화합물 **137**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **191** (13 mg, 0.012 mmol, 48%)을 획득하였다. MS m/z 625 $(M+H)^+$.



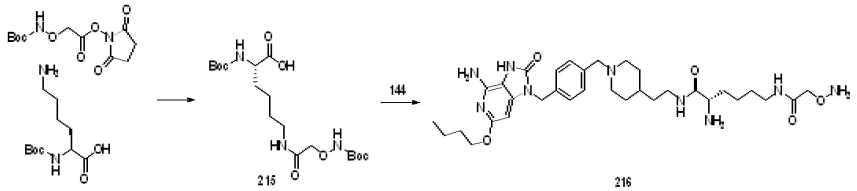
[1112]

[1113] **N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-4-히드록시벤즈아미드 (213):** 화합물 **213**은 출발 물질로 화합물 **144** 및 4-히드록시 벤조산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **213** (10 mg, 0.011 mmol, 66%)을 획득하였다. MS m/z 573 $(M+H)^+$.



[1114]

[1115] **N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)-3-(4-히드록시페닐)프로판아미드 (214):** 화합물 **214**는 출발 물질로 화합물 **144** 및 3-(4-히드록시페닐)프로판산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 **214** (9 mg, 0.010 mmol, 58%)를 획득하였다. MS m/z 601 $(M+H)^+$.

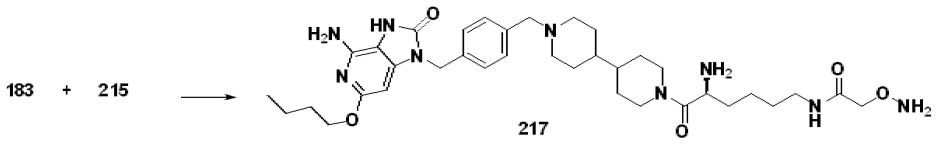


[1116]

[1117] **Boc-Lys(Boc-아미노옥시 아세틸)-OH (215):** DMF (5 mL)중 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 2-(tert-부톡시카르보닐아미노옥시)아세테이트 (399 mg, 1.384 mmol) 및 Boc-Lys-OH (335 mg, 1.360 mmol)에 23℃에서 DIEA (750 ul, 4.306 mmol)를 추가하였다. 2h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물을 EtOAc (50 mL)로 희석시키고, 1N HCl (50 ml) 및 염수 (20 mL)로 세척하였다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시키고, 그리고 용매는 진공에서 제거하였다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 백색 고체 형태의 화합물 **215** (480 mg, 1.144 mmol, 83%)을 획득하였다. MS m/z 420 $(M+H)^+$.

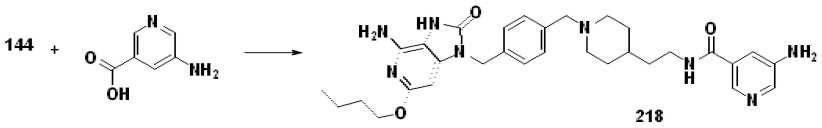
[1118] **(S)-2-아미노-N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤**

질)피페리딘-4-일)에틸)-6-(2-(아미노옥시)아세트아미도)헥산아미드 (216): 화합물 216은 출발 물질로 화합물 144 및 화합물 215를 이용하고, 화합물 173에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 216 (6 mg, 0.006 mmol, 37%)을 획득하였다. MS m/z 654 $(M+H)^+$.



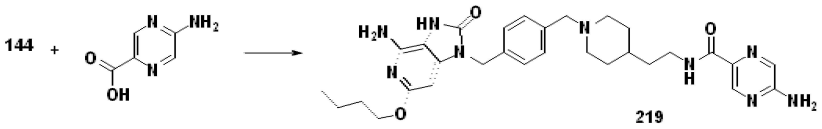
[1119]

[1120] (S)-N-(5-아미노-6-(1'-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)-4,4'-비피페리딘-1-일)-6-옥소헥실)-2-(아미노옥시)아세타미드 (217): 화합물 217은 출발 물질로 화합물 183 및 화합물 215를 이용하고, 화합물 173에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 217 (6 mg, 0.006 mmol, 37%)을 획득하였다. MS m/z 654 $(M+H)^+$.



[1121]

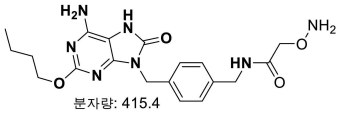
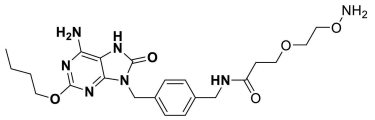
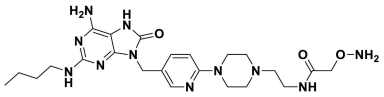
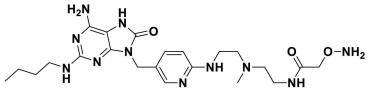
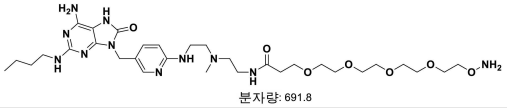
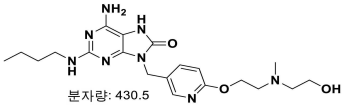
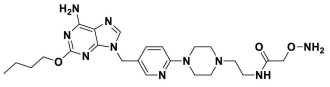
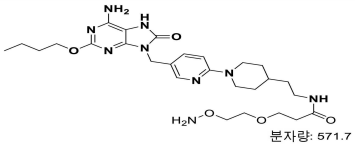
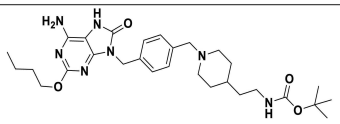
[1122] 5-아미노-N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)니코틴아미드 (218): 화합물 218은 출발 물질로 화합물 144 및 5-아미노니코틴산을 이용하고, 화합물 150에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 218(1 mg, 0.001 mmol, 7%)을 획득하였다. MS m/z 573 $(M+H)^+$.



[1123]

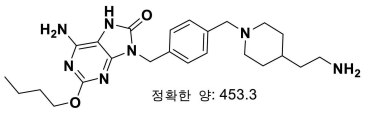
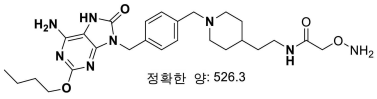
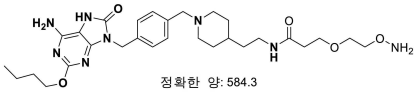
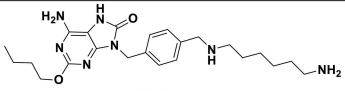
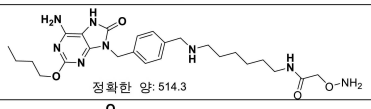
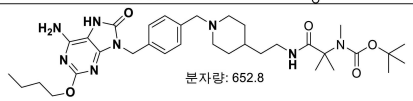
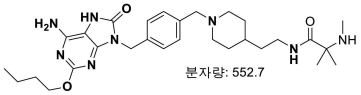
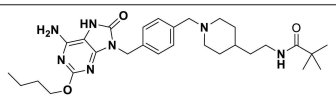
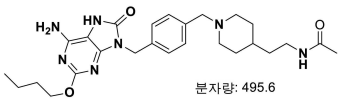
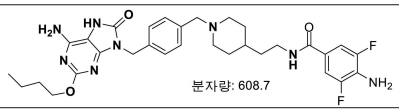
[1124] 5-아미노-N-(2-(1-(4-((4-아미노-6-부톡시-2-옥소-2,3-디히드로-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)메틸)벤질)피페리딘-4-일)에틸)피라진-2-카르복사미드 (219): 화합물 219는 출발 물질로 화합물 144 및 5-아미노-피라진-카르복실산을 이용하고, 화합물 150에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 표적 화합물 219 (10 mg, 0.11 mmol, 66%)을 획득하였다. MS m/z 574 $(M+H)^+$.

[1125] 표 4-TLR 작용제-코어 5 화합물들

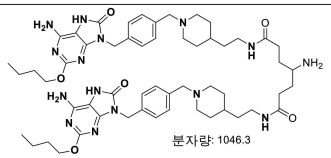
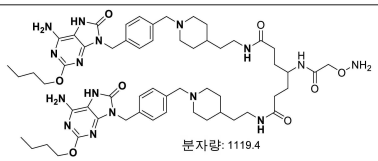
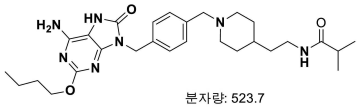
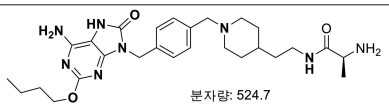
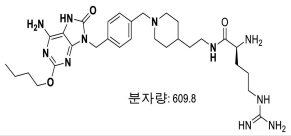
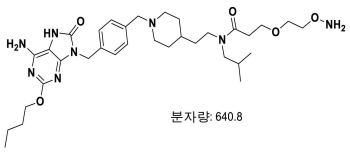
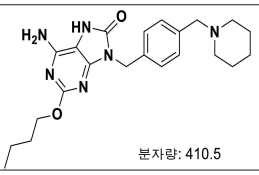
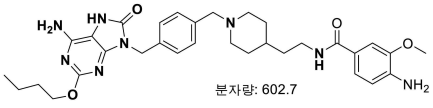
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 5 화합물들
119	AXC-862	 분자량: 415.4
120	AXC-863	 분자량: 473.5
127	AXC-867	 분자량: 513.6
129	AXC-868	 분자량: 501.6
130	AXC-869	 분자량: 691.8
131	AXC-872	 분자량: 430.5
134	AXC-873	 분자량: 498.6
137	AXC-876	 분자량: 571.7
143	AXC-877	 분자량: 553.7

[1126]

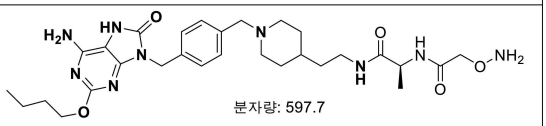
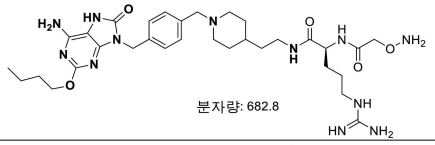
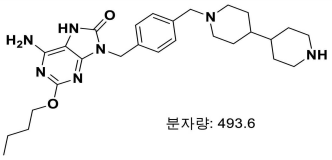
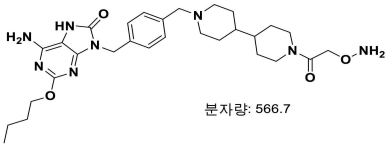
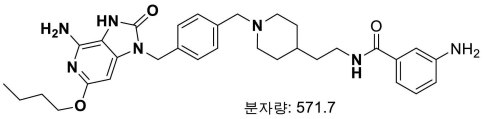
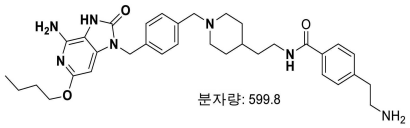
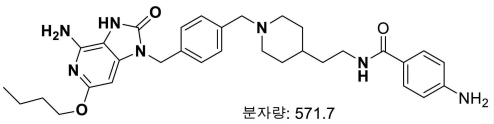
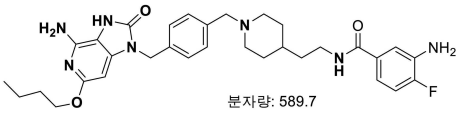
[1127]

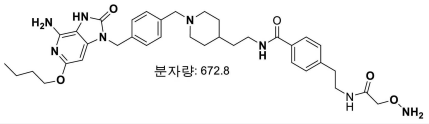
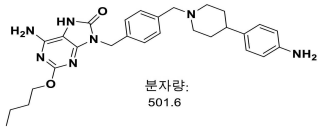
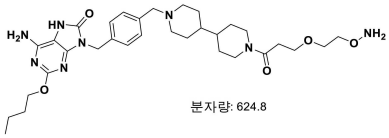
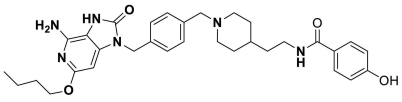
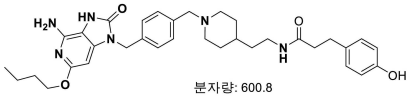
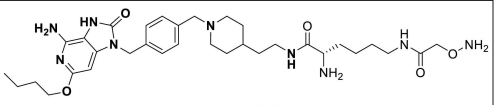
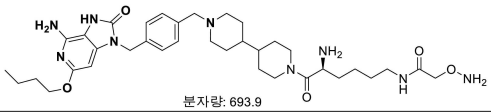
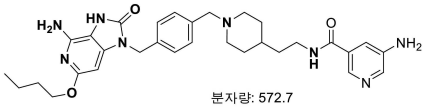
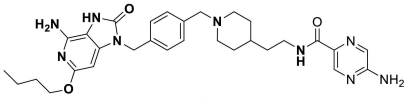
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 5 화합물들
144	AXC-878	 정확한 양: 453.3
145	AXC-879	 정확한 양: 526.3
146	AXC-880	 정확한 양: 584.3
148	AXC-881	 정확한 양: 441.3
149	AXC-882	 정확한 양: 514.3
150	AXC-883	 분자량: 652.8
151	AXC-884	 분자량: 552.7
152	AXC-885	 분자량: 537.7
153	AXC-886	 분자량: 495.6
154	AXC-887	 분자량: 608.7

[1128]

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 5 화합물들
157	AXC-888	 분자량: 1046.3
158	AXC-889	 분자량: 1119.4
155	AXC-890	 분자량: 523.7
173	AXC-891	 분자량: 524.7
174	AXC-892	 분자량: 609.8
178	AXC-893	 분자량: 640.8
179	AXC-894	 분자량: 410.5
180	AXC-895	 분자량: 602.7

[1129]

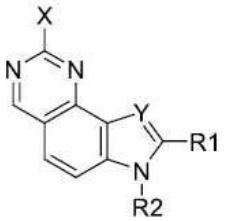
화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 5 화합물들
181	AXC-896	 분자량: 597.7
182	AXC-897	 분자량: 682.8
183	AXC-898	 분자량: 493.6
184	AXC-901	 분자량: 566.7
185	AXC-903	 분자량: 571.7
186	AXC-904	 분자량: 599.8
187	AXC-905	 분자량: 571.7
188	AXC-906	 분자량: 589.7

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 5 화합물들
189	AXC-907	 분자량: 672.8
190	AXC-908	 분자량: 501.6
191	AXC-909	 분자량: 624.8
213	AXC-911	 분자량: 572.7
214	AXC-912	 분자량: 600.8
216	AXC-913	 분자량: 653.8
217	AXC-914	 분자량: 693.9
218	AXC-915	 분자량: 572.7
219	AXC-916	 분자량: 573.7

[1130]

[1131] **실시예 4**: 다음 구조-코어 3, (도 1)을 포함하는 TLR 작용제의 합성:

코어 3



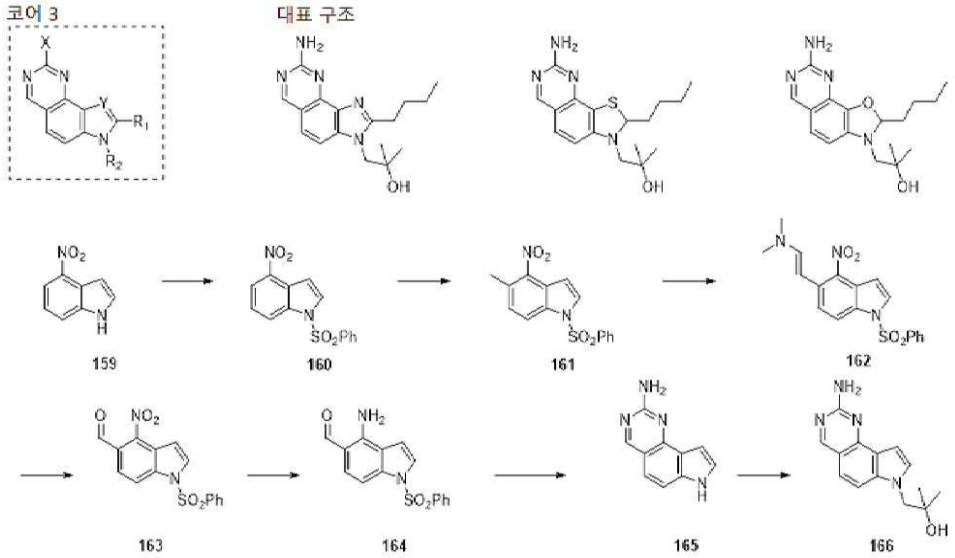
[1132]

[1133] 일부 구체예들에서, X는 N 또는 H이며; Y는 C, 또는 N이며;

[1134] R_1은 C_1 ~ C_{12} 알킬, 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬, 산소 함유하는 C_1 ~ C_{12} 알킬, 헤테로사이클, 치환된 헤테로사이클, 또는 H이며;

[1135] R_2는 C_1 ~ C_{12} 알킬, C_1 ~ C_{12} 치환된 알킬, C_4 ~ C_8 사이클로알킬, 방향족 환, 치환된 방향족 환, 방향족 헤테로 환, 치환된 방향족 헤테로 환,$-ONH_2$, 말단 C_1 ~ C_{12} 알킬, 또는 H이다.

[1136] 코어 3 구조를 갖는 TLR-작용제는 하기 도식에서 공개된 바와 같이 합성되었다.



[1137]

[1138] **4-니트로-1-토실-1H-인돌 (160):** 화합물 **159** (4-니트로-1H-인돌), (2.43 g, 15.0 mmol)를 THF (15 mL)에 용해시켰다. THF (30 mL)중 수소화나트륨 (900 mg, 22.5 mmol)을 0℃에서 이 현탁액에 점적시켰다. 이 용액은 실온으로 데우고, 추가 1h 동안 교반시켰다. 그 다음, THF (15 mL)중 토실 클로라이드 (3.0 g, 15.75 mmol)를 서서히 추가하였고, 반응물을 하룻밤 동안 교반시키고, 이 용액이 $NaHCO_3$와 Et_2O 사이에 분획되었다. 수성 층을 추출하고 (3 x 75 mL), 복합 유기 층들을 염수로 세척시킨 후, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 진공에서 농축되었다. 결과적으로 생성된 고체를 AcCN에서 취하고, 초음파처리하고, 여과시켰다. 고체 (출발 물질)을 이용하지 않았다. 액체를 회전증발시켜, 잔유물 (**160**)을 다음 단계에 이용하였다 (3.12 g). MS m/z NO2는 관찰되지 않았다.

[1139] **5-메틸-4-니트로-1-(페닐술포닐)-1H-인돌 (161):** 화합물 **160** (3.11 g, 9.83 mmol)을 -15 ℃에서 THF (98.3 ml)에 용해시켰다. 염화 메틸마그네슘(4.9 mL, 14.75 mmol)을 추가하였고, 이 용액을 1h 45분 동안 교반시켰다. 그 다음, 온도는 -10 ℃이하로 유지시키면서, DDQ (3.79 g, 16.71 mmol)를 추가하였다. 반응물을 실온으로 데우고, 하룻밤 동안 교반시켰다. 그 다음, 반응물을 DCM로 희석시켜, 이 반응을 중단시킨 후, 회전증발시켰다. SiO_2 플러그를 통하여 DCM로 용출시키면서 이 미정제물질을 통과시켰다. 용리액을 건조시켰고, 컬럼 크로마토그래피 (헥산/DCM, 0-40%, 40 g 컬럼)에서 정제시켜, 표적 화합물 **161** (2.06 g, 2-단계에 걸쳐 63%)을 획득하였다. MS m/z NO2는 관찰되지 않았다.

[1140] **(E)N,N-디메틸-2-(4-니트로-1-(페닐술포닐)-1H-인돌-5-일)에텐-1-아민 (162):** 5-메틸-4-니트로-1-(페닐술포닐)-1H-인돌 (**161**) (0.83 g, 2.63 mmol)을 DMF (26.3 ml)에 용해시켰다. N,N-디메틸포름아미드 디메틸 아세탈 (3.54 mL, 26.3 mmol)을 추가하였고, 반응물을 115℃에서 가열시켰다. 반응물을 회전 증발기로 증발시켰다. 잔유물 (화합물 **162**)을 다음 반응 (0.98 g)에 이용하였다. MS m/z NO2는 관찰되지 않았다.

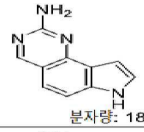
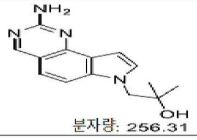
[1141] **4-니트로-1-(페닐술포닐)-1H-인돌-5-카르브알데히드 (163):** THF (13.2 ml) 및 물 (13.2 mL)중 화합물 **162** (0.98 g, 2.6 mmol)의 용액에 메타과요오드산 나트륨염 (1.7 g mg, 7.9 mmol)을 추가하였고, 교반시켰다. 반응물을 여과시키고, EtOAc (50 mL)로 세척하였다. 유기 층은 $NaHCO_3$로 세척하였고, $MgSO_4$로 건조시켰고여과시키고, 그리고 회전 증발기를 통하여 증발시켰다. 잔유물 (화합물 **163**, 0.56 g)을 진공 펌프 상에서 건조시켰고, 다음 반응에 이용하였다. MS m/z NO_2는 관찰되지 않았다.

[1142] **4-아미노-1-(페닐술포닐)-1H-인돌-5-카르브알데히드 (164):** MeOH (47 mL)중 화합물 **163** (0.56 g, 1.7 mmol)의 용액에 Pd/C (0.03 g)를 추가하였다. 반응물을 수소 (이중 풍선/1 atm) 대기 하에서 교반시켰다. 반응을 셀라이트로 여과시키고, MeOH로 세척하였다. 용매를 진공에서 건조시켰고, 잔유물은 컬럼 크로마토그래피 (헥산/EtOAc, 0-50%, 12 g 컬럼)를 통하여 정제시켜, 표적 화합물 **164** (93 mg, 3-단계에 걸쳐12%)을 획득하였다, MS m/z 301 $(M+H)^+$.

[1143] **7H-피롤[2,3-h]퀴나졸린-2-아민** (165): DMA (3.1 mL)중 화합물 **164** (0.092 g, 0.31 mmol)의 용액에 구아니딘 카르보네이트 (279 mg, 3.09 mmol)를 추가하였고, 150℃에서 교반시켰다. LCMS에서 반응이 완료되었음을 확인하고, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 표적 화합물 **165** (6 mg, 11%)를 획득하였다, MS m/z 257 $(M+H)^+$.

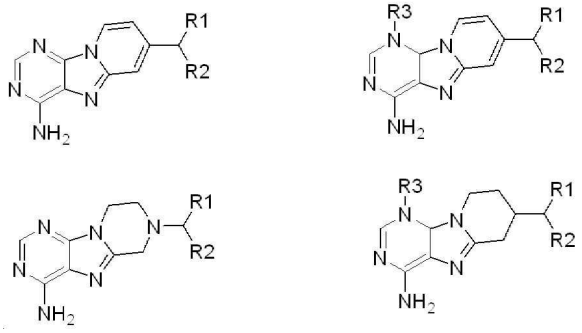
[1144] **1-(2-아미노-7H-피롤[2,3-h]퀴나졸린-7-일)-2-메틸프로판-2-올** (166): 수소화나트륨 (미네랄 오일에 60% 분산액, 2.2 mg, 0.054 mmol), 5 mL의 헥산을 0 ℃에서 추가하고, 이 용액을 휘저었다. 헥산을 제거하여 미네랄 오일를 씻어내었다. 그 다음, DMF (1.1 mL)중 화합물 **165** (2 mg, 0.011 mmol)를 이 용액에 점적 추가시키고, 1h 동안 교반시켰다. 그 다음, 이소부틸렌 옥시드 (1 uL, 0.011 mmol)를 점적 추가시키고, 반응물을 교반시켰다. 반응물을 여과시키고, 그리고 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시키면, 표적 화합물 **166** (1.5 mg, 23%)을 획득하였다, MS m/z 185 $(M+H)^+$.

[1145] 표 5-TLR 작용제-코어 3 화합물들

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 3 화합물들
165	AXC-837	 분자량: 184.20
166	AXC-847	 분자량: 256.31

[1146]

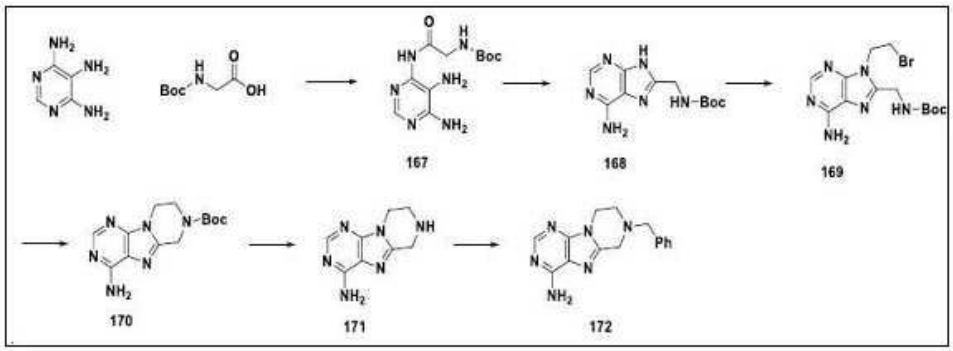
[1147] **실시예 5:** 다음의 대표적 구조-코어 2 (도 1)을 포함하는 TLR 작용제의 합성: 코어 2

[1148] 

[1149] 일부 구체예들에서, R_1 또는 R_2는 각각 연결되어 C_4 ~ C_8 시클로 알킬을 형성하거나, 또는 독립적으로 -H, C_1 ~ C_{12} 알킬, 니트로 함유하는 알킬, 방향족 환 또는-C(NH)NH_2이며;

[1150] R_3은 C_1 ~ C_{12} 알킬, 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬, 산소 함유하는 C_1 ~ C_{12} 알킬, 헤테로사이클 치환된 헤테로사이클, 또는 H이다.

[1151] 코어 2 구조를 갖는 TLR-작용제는 하기 도식에서 공개된 바와 같이 합성되었다.

[1152] 

[1153] **tert-부틸 2-(5,6-디아미노피리미딘-4-일아미노)-2-옥소에틸카르바마이트 (167):** DCM (50ml)중 피리미딘-4,5,6-트리아민 (2050 mg, 16.383 mmol) 및 Boc-Gly-OH(2880, 16.440 mmol)의 용액에 23℃에서 DCC (3800 mg, 18.417 mmol) 및 DMAP (80 mg, 0.655 mmol)를 추가하였다. 3h 후, 침전물을 여과에 의해 제거하였다. 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 표적 화합물 **167** (2458 mg, 8.707 mmol, 53%)을 획득하였다, MS m/z 283 $(M+H)^+$.

[1154] **tert-부틸 (6-아미노-9H-푸린-8-일)메틸카르바마이트 (168):** n-BuOH (20 ml)중 화합물 **167** (620 mg, 2.196 mmol)의 용액에 23℃에서 NaOMe 25%/MeOH (2500ul, 11.570 mmol)를 추가하였다. 온도를 70 ℃로 올렸다. 1h 후, 6N HCl (1.83 ml. 11 mmol)을 얼음조 안에 혼합물로 추가하였고, 이 혼합물을 EtOAc (50ml)로 희석시켰다. 이 혼합물을 포화 중탄산 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시키고, $MgSO_4$에서 건조시키고 그리고 여과시켰다. 이 혼합물을 섬광 크로마토그래피에 의해 정제시켜, 표적 화합물 **168** (250 mg, 0.946 mmol, 43%)을 획득하였다, MS m/z 265 $(M+H)^+$.

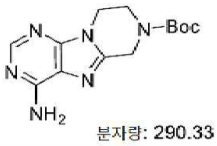
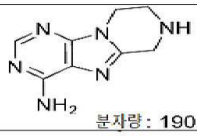
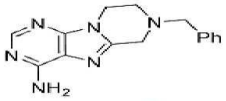
[1155] **tert-부틸 (6-아미노-9-(2-브로모에틸)-9H-푸린-8-일)메틸카르바마이트 (169):** DMF (5 ml)중 화합물 **168** (250 mg, 0.946 mmol)의 용액에 23℃에서 디브로모에탄 (2100 mg, 2.795 mmol) 및 $CsCO_3$ (2400 mg, 1.842 mmol)을 추가하였다. 2.5h 후, 이 혼합물을 20 ml DCM로 희석시키고, 포화 중탄산 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 m)로 세척시켰다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시켰다. 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 화합물 **169** (144 mg, 0.545 mmol, 58 %)를 획득하였다, MS m/z 372 $(M+H)^+$.

[1156] **tert-부틸 4-아미노-8,9-디히드로피라지노[1,2-e]푸린-7(6H)-카르복실레이트 (170):** 수소화나트륨 (미네랄 오일에 60% 분산액, 51.4 mg, 1.286 mmol), 5 mL의 헥산을 추가하였다. 이 용액은 휘젓고, 이어서 헥산을 제거하여 미네랄 오일를 씻어내었다. DMF (2.9 mL)중 화합물 **169** (159.2 mg, 0.429 mmol)를 23 ℃에서 교반시키면서 이 용액에 추가하였다. 1 h 후, LCMS에서 이 반응이 완료됨을 확인하였다. 이 혼합물을 5 % ~ 60%의 물/90% ACN 0.05%의 TFA 구배를 이용하여 20 분 동안 Gemini NX, 150X30 C18 컬럼에서 Prep-LC로 정제시켰다. 생성물이 함유된 분액을 복합시키고, 회전 증발기에 의해 증발시켰다. 잔유물을 고압 펌프 하에서 건조시켜, 표적 화합물 **170** (36.7 mg, 0.05 mmol, 11%)을 얻었다, MS m/z 291 $(M+H)^+$.

[1157] **6,7,8,9-테트라히드로피라지노[1,2-e]푸린-4-아민 (171):** 화합물 **170** (35.7 mg, 0.123 mmol)의 용액에 1.2 mL의 DCM을 추가하였다. 트리플루오르아세트산 (45.7 uL, 0.615 mmol)을 23 ℃에서 교반시키면서 점적 추가하였다. 1 h 후, LCMS에서 이 반응이 완료됨을 확인하였다. 이 혼합물을 회전 증발기로 증발시키고, PhMe를 이용한 추가 공비혼합(azeotroping)에 의해, 화합물 **171**(38.5 mg, 0.05 mmol, 41%)을 획득하였다, MS m/z 191 $(M+H)^+$.

[1158] **7-벤질-6,7,8,9-테트라히드로피라지노[1,2-e]푸린-4-아민 (172):** DMF (1.1 mL)중 화합물 **171** (10 mg, 0.053 mmol)/의 용액에 벤즈알데히드 (6.7 uL, 0.066 mmol)를 추가하였다. DIEA (18.3 uL, 0.105 mmol)를 추가하고, 반응물을 15 분 동안 교반시켰다. 그 다음, Borone-피리딘 복합체 (6.7 uL, 0.067 mmol)를 추가하고, 반응물을 23 ℃에서 하룻밤 동안 교반시켰다. 이 혼합물을 5 % ~ 60%의 물/90% ACN 0.05%의 TFA 구배를 이용하여 20 분 동안 Gemini NX, 150X30 C18 컬럼에서 Prep-LC로 정제시켰다. 생성물이 함유된 분액을 복합시키고, 회전 증발기에 의해 증발시켰다. 잔유물을 고압 펌프 하에서 건조시켜, 화합물 **172** (1.3 mg, 0.002 mmol, 3%)을 획득하였다, MS m/z 281 $(M+H)^+$.

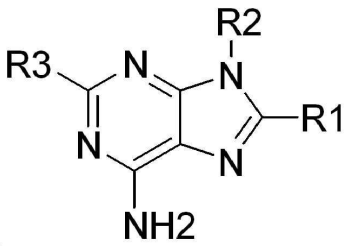
[1159] 표 6-TLR 작용제-코어 2 화합물들

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 2 화합물들
170	AXC-745	 분자량: 290.33
171	AXC-746	 분자량: 190.21
172	AXC-753	 분자량: 280.34

[1160]

[1161] 실시예 6: 다음의 대표적 구조-코어 4 (도 1)을 포함하는 TLR 작용제의 합성:

[1162] 코어 4



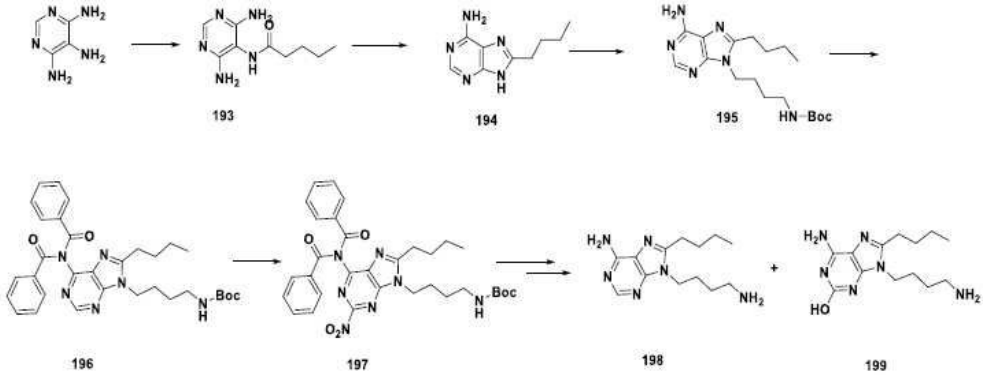
[1163]

[1164] 일부 구체예들에서, R_1은 C_1 ~ C_{12} 알킬, 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬, 산소 함유하는 C_1 ~ C_{12} 알킬, C_3 ~ C_8 시클로알킬, 헤테로사이클, 치환된 헤테로사이클, 할로겐 또는 H이며;

[1165] R_2는 C_1 ~ C_{12} 알킬, C_1 ~ C_{12} 치환된 알킬, C_4 ~ C_8 사이클로알킬, 방향족 환, 치환된 방향족 환, 방향족 헤테로사이클, 치환된 방향족 헤테로사이클,-ONH_2 말단 C_1 ~ C_{12} 알킬, 또는 H이며;

[1166] R_3은 C_1 ~ C_{12} 알킬, 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬, 산소/질소/황 함유하는 C_1 ~ C_{12} 알킬, 헤테로사이클, 치환된 헤테로사이클, 사이클로 알킬, 치환된 사이클로 알킬,-N_3, 말단 C_1 ~ C_{12} 알킬, 말단 치환된 C_1 ~ C_{12} 알킬이거나, 또는 존재하지 않는다.

[1167] 코어 4 구조를 갖는 TLR-작용제는 하기 도식에서 공개된 바와 같이 합성되었다.



[1168]

[1169] **N-(4,6-디아미노피리미딘-5-일)펜탄아미드 (193):** 피리미딘-4,5,6-트리아민 (1015 mg, 8.112 mmol)을 70 ℃에서 N-메틸-2-피롤리돈 (10 mL)에 용해시켰다. 용액이 맑게 바뀐 후, 이 용액을 23℃로 냉각시켰다. 이 혼합물에 발레릴 클로라이드 (980 ul, 8.127mmol)을 추가하였고, 온도를 50 ℃로 상승시켰다. 20h 후, 온도를 23 ℃로 냉

각시키고, EtOAc (50ml, 침전물)을 이 혼합물에 추가하고, 그리고 침전물을 여과에 의해 분리시켰다. 고체를 EtOAc (10 ml) 및 아세톤 (10 ml)으로 세척시키고, 건조시켜, 밝은 갈색 고체의 화합물 **193** (1780 mg, 7.237 mmol, 90%)을 획득하였다. 이 산물을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. MS m/z 210 $(M+H)^+$.

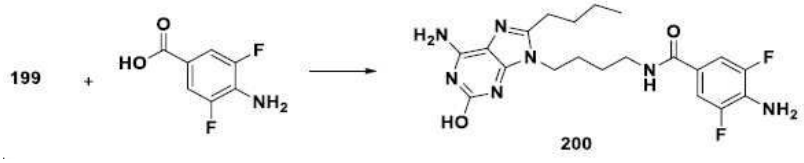
[1170] **8-부틸-9H-푸린-6-아민 (194):** n-BuOH (30 mL)중 미정제 화합물 **193** (1780 mg, 7.273 mmol)의 용액에 23℃에서 메톡시드 나트륨 (1570 mg, 29.063 mmol)를 추가하고, 가열시켜 환류되도록 하였다. 1h 후, 이 용액을 실온으로 냉각시키고, 6 M HCl (3.2 ml)로 중화시킨 후, 염수 (20 ml)를 추가하여 이중 상(biphasic) 혼합물을 획득하였다. 유기 층을 분리시키고, $MgSO_4$로 건조시킨 후, 진공에서 농축시켜, 밝은 갈색 고체의 표적 화합물 **194** (1148 mg 6.003 mmol, 83%)를 획득하였다. MS m/z 192 $(M+H)^+$.

[1171] **tert-부틸 4-(6-아미노-8-부틸-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (195):** THF (20 ml)중 N-Boc-아미노-부탄올 (1520 mg, 8.032 mmol) 및 화합물 **194** (1420 mg, 7.426 mmol)의 용액에 0℃에서 PPh_3 (2080 mg, 7.930 mmol)을 추가하였다. 30 분 후, 이 혼합물에 0℃에서 5분에 걸쳐 DIAD (2200 ul, 11.174 mmol)를 추가하였다. 3 h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물을 DCM (100 ml)로 희석시키고, 절반-포화된 중탄산 나트륨 (100 ml) 및 염수 (20 ml)로 세척하였다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 밝은 갈색 고체의 화합물 **195** (1064 mg, 2.935 mmol, 37 %)을 획득하였다. MS m/z 363 $(M+H)^+$.

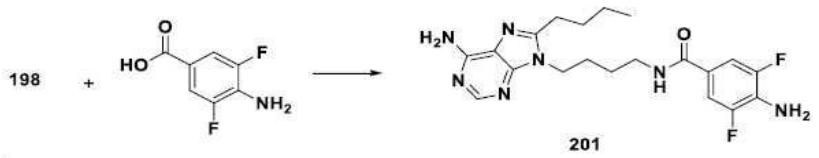
[1172] **tert-부틸 4-(6-(N-벤조일벤즈아미도)-8-부틸-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (196):** DCM (10 ml)중 화합물 **195** (1064 mg, 2.935 mmol)의 용액에 0℃에서 벤조일클로라이드 (700 ul, 4.980 mmol) 및 TEA (900 ul, 17.788 mmol)을 추가하고, 온도를 20℃로 상승시켰다. 2.5 h 후, 이 혼합물을 포화 중탄산 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시키고, $MgSO_4$에서 건조시키고 그리고 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었고, 잔유물은 섬광 크로마토그래피에 의해 정제되어, 밝은 갈색 오일의 화합물 **196** (1650 mg, 2.891 mmol, 98%)을 획득하였다. MS m/z 571 $(M+H)^+$.

[1173] **tert-부틸 4-(6-(N-벤조일벤즈아미도)-8-부틸-2-니트로-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (197):** DCM (10 ml)중 테트라메틸 암모니움 질산염 (780 mg, 5.729 mmol)의 용액에 23℃에서 트리플루오르아세트 무수물 (1200 ul, 17.118 mmol)을 추가하였다. 1h 후, 이 혼합물을 0℃로 식히고, DCM (20 ml) 중 화합물 **196** (1650 mg, 2.891 mmol)의 용액을 추가하였다. 온도를 23 ℃로 올렸다. 2h 후, 이 혼합물을 DCM (20 ml)로 희석시키고, 절반-포화된 중탄산 나트륨 (20 ml) 및 염수 (20 ml)로 세척시키고, $MgSO_4$에서 건조시키고, 그리고 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 하에서 제거되었고, 잔유물은 섬광 크로마토그래피에 의해 정제되어, 밝은 유리질 황색 고체의 화합물 **197** (1067 mg, 1.733 mmol, 60%)을 획득하였다. MS m/z 616 $(M+H)^+$.

[1174] **9-(4-아미노부틸)-8-부틸-9H-푸린-6-아민 (198)** 및 **6-아미노-9-(4-아미노부틸)-8-부틸-9H-푸린-2-올 (199):** EtOH (20 ml)중 화합물 **197** (220 mg, 0.357 mmol)의 용액에 23℃에서 Pd/C (10%, 0.1g)를 추가하였고, 그리고 수소 가스 기포를 일으켰다. 18 h 후, LCMS에서 탈-질산염화된(denitrated) 화합물이 생성됨을 확인하였다. NaOMe (30 mg, 0.6 mmol)가 추가되었고, 그리고 이 혼합물을 4 h 동안 교반시켰다. 그 다음, TFA (3ml)를 추가하였다. 20 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었고, 이 혼합물을 Prep-LC로 정제시켜, 갈색 고체의 화합물 **198** (94 mg, 0.156 mmo, 44%), MS m/z 263 $(M+H)^+$, 그리고 밝은 갈색 고체의 화합물 **199** (0.024 mmol, 7%), MS m/z 279 $(M+H)^+$을 획득하였다.

[1175] 

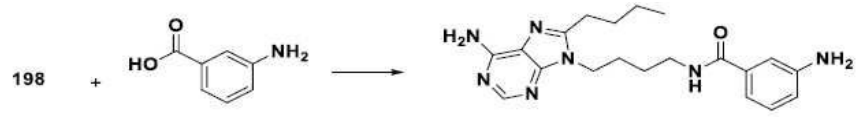
[1176] **4-아미노-N-(4-(6-아미노-8-부틸-2-히드록시-9H-푸린-9-일)부틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (200):** 화합물 **200**은 출발 물질로 화합물 **199** 및 4-아미노-3,5-디플루오르-벤조산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 밝은 갈색 고체의 표적 화합물 **200** (14 mg, 0.018 mmol, 61 %)을 획득하였다, MS m/z 434 $(M+H)^+$.



201

[1177]

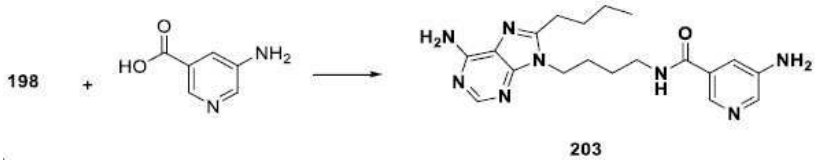
[1178] **4-아미노-N-(4-(6-아미노-8-부틸-9H-푸린-9-일)부틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (201):** 화합물 **201**은 출발 물질로 화합물 **198** 및 4-아미노-3,5-디플루오르-벤조산을 이용하고, 화합물 **105**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 밝은 갈색 고체의 표적 화합물 **201** (13 mg, 0.017mmol, 93 %)을 획득하였다, MS m/z 418 $(M+H)^+$.



202

[1179]

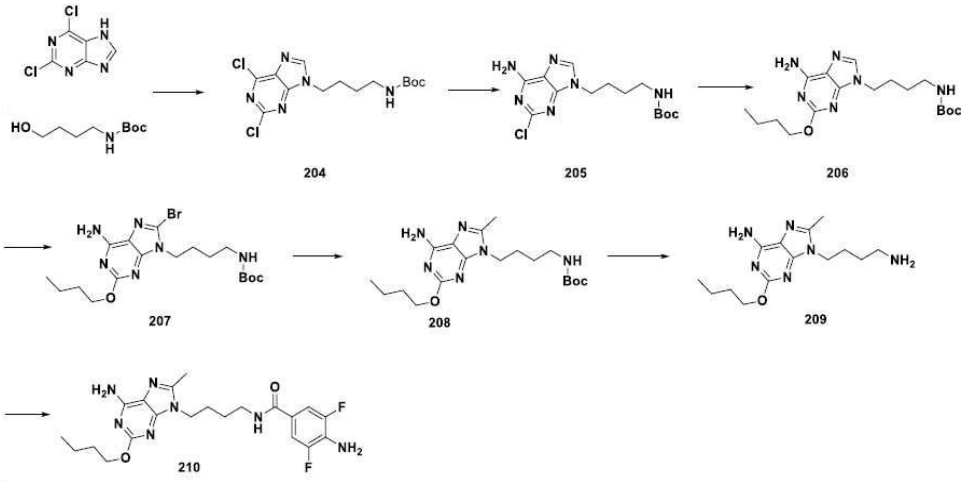
[1180] **3-아미노-N-(4-(6-아미노-8-부틸-9H-푸린-9-일)부틸)벤즈아미드 (202):** 화합물 **202**는 출발 물질로 화합물 **198** 및 3-아미노벤조산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 밝은 갈색 고체의 표적 화합물 **202** (10 mg, 0.014 mmol, 88 %)을 획득하였다, MS m/z 382 $(M+H)^+$.



203

[1181]

[1182] **5-아미노-N-(4-(6-아미노-8-부틸-9H-푸린-9-일)부틸)니코틴아미드 (203):** 화합물 **203**은 출발 물질로 화합물 **198** 및 5-아미노-니코틴산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 밝은 갈색 고체의 표적 표적 화합물 **203** (14 mg, 0.019 mmol, 정량적)을 획득하였다, MS m/z 383 $(M+H)^+$.



[1183]

[1184] **tert-부틸 4-(2,6-디클로로-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (204):** THF (10 ml)중 N-Boc-아미노-부탄올 (1620 mg, 8.560 mmol) 및 2,6-디클로로푸린 (1495 mg, 7.910 mmol)의 용액에 0℃에서 PPh_3 (2280 mg, 8.693 mmol)을 추가하였다. 30 분 후, DIAD (2300 ul, 11.681 mmol)를 0℃에서 5 분에 걸쳐 추가하였다. 이 혼합물을 50℃에서 교반시켰다. 6h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물을 EtOAC (100 mL)로 희석시키고, 절반-포화된 중탄산 나트륨 (100 ml) 및 염수 (20 ml)로 세척하였다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 황색 오일의 화합물 **204** (4500 mg, < 12.492 mmol, <100%)을 획득하였다 (불순물의 ~20 %는 PPh3임). MS m/z 361 $(M+H)^+$.

[1185] **tert-부틸 4-(6-아미노-2-클로로-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (205):** 화합물 **204** (PPh_3의 미정제 혼합물,

4500 mg, <12.492 mmol)를 교반 막대가 장착된 내압 유리 용기에 넣었다. 이 용기에 MeOH중 7N NH_3(12 mL, 84 mmol)를 추가하였다. 이 튜브를 밀봉한 다음 120℃에서 가열하였다. 30 분 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었고, 잔유물을 DCM (100 mL)에서 용해시켰다. 이 용액은 포화 중탄산 나트륨 (100 ml) 및 염수 (30 ml)로 세척하였다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 밝은 황색 고체의 화합물 **205** (1310 mg, 3.844 mmol, 37%)을 획득하였다. MS m/z 341 $(M+H)^+$.

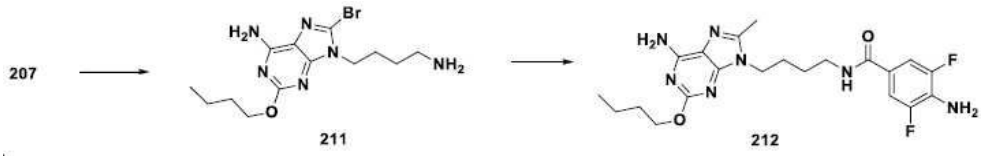
[1186] **tert-부틸 4-(6-아미노-2-부톡시-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (206):** n-부탄올 (5 ml)중 화합물 **205** (257 mg, 0.754 mmol)의 용액에 건조 질소 가스 하에서 23℃에서 금속 나트륨 (90 mg, 2.455 mmol)을 추가하였다. 온도를 100 ℃로 올렸다. 18h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 DCM (50 mL)에 용해시키고, 절반-포화된 중탄산 나트륨 (50 ml) 및 염수 (50 ml)로 세척시켰다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 밝은 갈색 미정제 고체의 화합물 **206** (310 mg, < 0.819 mmol, 정량적)이 획득되었다. MS m/z 379 $(M+H)^+$.

[1187] **tert-부틸 4-(6-아미노-8-브로모-2-부톡시-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (207):** DCM (10 ml)중 화합물 **206** (310 mg, 0.819 mmol, 미정제)의 용액에 23℃에서 브롬 (150 ul, 0.563 mmol)을 추가하였다. 1h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 이 혼합물을 섬광 크로마토그래피에 의해 정제시켜, 밝은 유리질의 황색 고체의 화합물 **207** (250 mg, 0.547 mmol, 67%)을 획득하였다. MS m/z 458 $(M+H)^+$.

[1188] **tert-부틸 4-(6-아미노-2-부톡시-8-메틸-9H-푸린-9-일)부틸카르바마이트 (208):** 건 THF (5 ml)중 화합물 **207** (82 mg, 0.179 mmol)의 용액에 23℃에서 THF중 트리메틸알루미늄, 1 M (360 ul, 0.36 mmol)/ 및 $PdCl_2(PPh_3)_2$ (44 mg, 0.063 mmol)를 추가하였다. 이 혼합물을 역류시켰다. 20h 후, 이 혼합물을 20 ml DCM로 희석시키고, 절반-포화된 중탄산 나트륨 (20 ml) 및 염수 (20 m)로 세척시켰다. 유기 층은 $MgSO_4$로 건조시켰고, 여과시켰다. 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물은 섬광 크로마토그래피로 정제하여, 밝은 갈색 고체의 화합물 **208** (12 mg, 0.031 mmol, 17%)을 획득하였다. MS m/z 393 $(M+H)^+$.

[1189] **9-(4-아미노부틸)-2-부톡시-8-메틸-9H-푸린-6-아민 (209):** 화합물 **208** (12 mg, 0.031 mmol)/DCM (0.5 ml) 용액에 23℃에서 트리플루오르아세트산 (0.5 ml)을 추가하였다. 1h 후, 이 용매는 진공 하에서 제거되었다. 잔유물을 고압 펌프 하에서 하룻밤 동안 건조시켜, 밝은 갈색 고체의 화합물 **209** (15 mg, 0.02 mmol, 정량적)를 획득하였다. MS m/z 293 $(M+H)^+$.

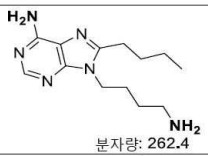
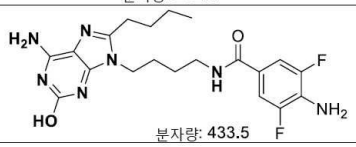
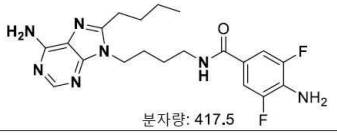
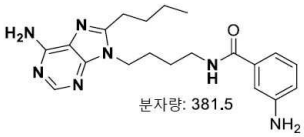
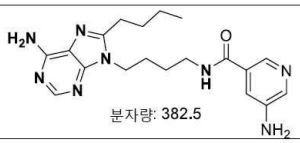
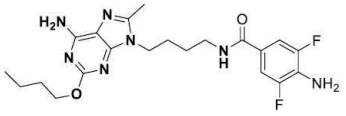
[1190] **4-아미노-N-(4-(6-아미노-2-부톡시-8-메틸-9H-푸린-9-일)부틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (210):** 화합물 **210**은 출발 물질로 화합물 **209** 및 4-아미노-3,5-디플루오르-벤조산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 밝은 갈색 고체의 표적 화합물 **210** (3.5 mg, 0.004mmol, 22 %)을 획득하였다, MS m/z 469 $(M+H)^+$.

[1191] 

[1192] **9-(4-아미노부틸)-8-브로모-2-부톡시-9H-푸린-6-아민 (211):** 화합물 **211**은 출발 물질로 화합물 **207**을 이용하고, 화합물 **209**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 밝은 갈색 고체의 표적 화합물 **211** (8 mg, 0.011 mmol, 정량적)을 획득하였다, MS m/z 358 $(M+H)^+$.

[1193] **4-아미노-N-(4-(6-아미노-8-브로모-2-부톡시-9H-푸린-9-일)부틸)-3,5-디플루오르벤즈아미드 (212):** 화합물 **212**는 출발 물질로 화합물 **211** 및 4-아미노-3,5-디플루오르-벤조산을 이용하고, 화합물 **150**에서 기술된 유사한 과정을 이용하여 준비함으로써, 밝은 갈색 고체의 표적 화합물 **212** (8 mg, 0.009mmol, 82 %)를 획득하였다, MS m/z 513 $(M+H)^+$.

[1194] 표 7-TLR 작용제-코어 4 화합물들

화합물 번호.	화합물 이름	구조 - 코어 4 화합물들
198	AXC-844	 분자량: 262.4
200	AXC-842	 분자량: 433.5
201	AXC-843	 분자량: 417.5
202	AXC-845	 분자량: 381.5
203	AXC-846	 분자량: 382.5
210	AXC-836	 분자량: 447.5
212	AXC-841	분자량: 512.4

[1195]

[1196] **실시예 7:** 이 실시예는 본 발명에 사용된 다양한 방법론 및 기술을 개시한다.

[1197] **분자 클로닝-**CHO 세포 코돈-최적화된 항체 중쇄 및 경쇄 cDNA 서열은 상업적인 DNA 합성 서비스 (IDT, San Diego, CA)로부터 구하였다. 합성된 DNA 단편들을 Hind III 및 EcoR I (이 둘 모두 New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA에서 구입)으로 절단하였고, PCR 정제 키트(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 정제시켰다. 절단된 항체 유전자 단편들을 퀵 결찰 키트 (NEB)를 통하여 발현 벡터에 결찰시켜, 야생형 항체 중쇄 및 경쇄 발현용 구조체를 만들었다. 생성된 플라스미드를 대장균(*E. coli*)에서 증식시키고, DNA 시퀀싱 서비스(Eton)로 검증했다.

[1198] **암버 코돈-함유하는 돌연변이체 생성-**항-HER2 Fab의 결정 구조를 기초로 하여, 비-자연적 아미노산 (예를 들면, 파라-아세틸-페닐알라닌 (pAF), 또는 파라-아지도-페닐알라닌)을 유전적으로 통합시키기 위하여, 경쇄 불변 영역에 위치한 10가지 상이한 표면-접근가능한 부위를 선택하였다. 이들 부위는 항원-항체 결합에 결정적인 부위는 아니다. 선택 부위의 각 유전자 코돈은 항체 돌연변이체를 위한 발현 플라스미드를 만들기 위해 부위-지향된 돌연변이생성을 통하여 암버 코돈 (TAG)으로 돌연변이되었다. 프라이머는 IDT에서 구입하였다. 지침 메뉴얼 (NEB)에 따라 Q5 부위-지향된 돌연변이생성 키트를 이용하여 모든 부위-지향된 돌연변이생성 실험을 실시하였다. 돌연변이체용 발현 플라스미드는 대장균(*E. coli*)에서 증식되었고, DNA 시퀀싱 서비스(Eton)로 검증했다. 표 8 는 항-HER2 Fab의 중쇄 또는 경쇄 불변 영역에서 암버 돌연변이들 부위, 이들의 Kabat 번호매김 및 대응하는 아미노산 서열, 서열 식별 번호: 2, 및 4 ~ 11을 제공한다. 서열 식별 번호: 1 및 3은 차례로 항-HER2 Fab의 야생형 중쇄와 경쇄를 나타낸다. 항-HER2 Fabs에는 다음의 중쇄 서열 및 경쇄 서열이 내포된다: 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:4; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:5; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:6; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:7; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:8; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:9; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:10; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:11; 서열 식

별 번호:2 및 서열 식별 번호:12; 서열 식별 번호:2 및 서열 식별 번호:13.

[1199] 표 8. 비-자연적 아미노산 통합을 위한 암버 부위를 갖는, 항-HER2 Fab 중쇄 (HC) 아미노산 서열 및 경쇄 (LC) 아미노산 서열. 하기 표에서 pAF가 임의의 다른 비-자연적 아미노산에 의해 대체된 모든 서열이 또한 기재된다.

서열 식별 번호.	설명	서열
1	중쇄 야생형	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGF NIKDTYIHWVRQPGKGLEWVRIYPTN GYTRYDSVKGRFTISDTSKNTYLQMNS LREDTVYYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLPSSKSTSG GTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGLTSG VHTFPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKL PPIEKTISKKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHELHNHYT QKSLSLSPG

[1200]

서열 식별 번호.	설명	서열
2	중쇄 A114 돌연변이	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S CA S G F N I K D T Y I H W V R QP G K G L E W VR I Y P T N G Y T R YD S V K G R F T I SD T S K N TY L Q M N S L RE D TV Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S **X** S T K G P S V F P LP S S K S T S G G TA L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S GL T S G V H T F PV L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C PP E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H NK T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N KL PP I E K T I S KK G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D IV E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H EL H N H Y T Q K S L S L S P G
3	경쇄 야생형	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

[1201]

서열 식별 번호.	설명	서열
4	경쇄 V110 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T **X**A P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
5	경쇄 A112 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V**X** P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
6	경쇄 S114 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P **X** V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

[1202]

[1203]

서열 식별 번호.	설명	서열
7	경쇄 S121 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P **X** D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
8	경쇄 S127 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P S D E Q L K **X** G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
9	경쇄 K149 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W **X** V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

서열 식별 번호.	설명	서열
10	경쇄 S156 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q **X** G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
11	경쇄 S168 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D **X** K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
12	경쇄 S202 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L **X** S P V T K S F N R G E C

[1204]

서열 식별 번호.	설명	서열
13	경쇄 V205 돌연변이	D I Q M T Q S P S S L SS V G D R V T I T C RS Q D V N TVW Y Q Q K P G KP K L L I Y SS F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D FT Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T VA P S V F I F P P S D E Q L K S G TS V V C L L N N F Y P R EK V Q W K V D NL Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S KD Y E K H K V YC E V T H Q G L S S P **X** T K S F N R G E C

[1205]

[1206] **X**는 비-자연적 아미노산 (nnAA)이며; 밑줄은 표 7에서 Fc 돌연변이를 나타낸다.

[1207] 중쇄의 위치 114에서 암버 돌연변이에 추가로, 약물동력학을 개선시키거나 및/또는 항체 의존적 세포성 식작용 (ADCP) 및/또는 항체 의존적 세포성 세포독성 ADCC 활성을 강화시키기 위해, 항-HER2 항체 또는 항체 단편의 다

양한 위치에서 Fc 돌연변이가 또한 생성되었다 (표 9).

[1208] 표 9-항-HER2 Fc 돌연변이들

Fc 돌연변이들	표적화 Fc 수용체	목적
WT	N/A	대조군
E233P/L234V/L235A	FcγRIII	ADCC 무효화
N434A	FcRn	개선된 PK
M252Y/S254T/T256E	FcRn	개선된 PK
M252Y/S254T/T256E G236A/S239D/I332E	FcRn/FcγRII/FcγRIII	PK 및 ADCP 향상
G236A/S239D/I332E	FcγRII/RIII	ADCP/ADCC 향상
G236A	FcγRII	ADCP 향상
D270E	FcγRII	ADCP 향상
Y300L	FcγRII	ADCP 향상

[1209]

[1210] **일시적 발현-**플렛폼 세포주 301-14는 3 mM L-글루타민 (Gibco) 및 3 mM GlutaMAX (Gibco)이 보충된 EX-Cell 302 (Sigma)에서 유지되었다. 세포는 ml당 40만개 세포의 밀도로 접종된 3-4일마다 계대되었다. 형질감염 하루 전, 세포를 ml당 60만개의 세포로 씨딩하였다. 0일 차에, 사용 설명서에 따라 MaxCyte 전기천공 플랫폼을 사용하여, 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 항체 발현 플라스미드로 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포를 빈 125ml 진탕 플라스크에 넣고, 37℃ 정적(static) 인큐베이터에서 30분 동안 항온처리하였다. 그런 다음, 형질감염된 세포를 진탕 플라스크에서 3x 10^6/ml의 밀도로 기본 발현 배지(50% Dynamis-50μM MSX가 보충된 50% ExCell 302)에 접종했다. 형질감염된 세포를 140rpm으로 설정된 오비탈 쉐이커 상에서 37℃, 5% CO_2에서 항온처리하였다. 1일 차에, 1mM pAF를 7g/L의 Cell Boost 5(GE Healthcare), 120μg/L의 Long R3 IGF-1(sigma) 및 2mM GlutaMAX와 함께 배양물에 첨가했다. 인큐베이터 내부의 온도를 37℃에서 32℃로 변위시켰다. 3일 차에, 또 다른 7g/L의 Cell Boost 5 및 2mM GlutaMAX첨가하고, 5일 차에 상청액을 수거했다. 글루코스 수준을 글루코스 측정기를 사용하여 모니터링하고, 글루코스 수준이 배양 배지에서 2g/L 미만인 경우, 배양물에 추가 글루코스를 첨가했다. Vi-Cell 기기로 생존 세포 수 및 생존 능력을 측정하였다. 생산성은 단백질 G 센서를 사용하여 Octet에 의해 측정되었다.

[1211] **안정적인 벌크 풀(bulk pool) 생성-**발현 플라스미드는 6시간 동안 Pvu I(NEB) 절단을 사용하여 선형화되었다. 선형화 후, DNA를 페놀 추출을 사용하여 정제하고, 2.5μg/μl 농도의 엔도톡신-없는 물에 용해시켰다. 플렛폼 세포주 BB-117는 3 mM L-글루타민 및 3 mM GlutaMAX이 보충된 EX-Cell 302 (Sigma)에서 유지되었다. 세포는 0.4 x 10^6/ml의 밀도로 접종된 3-4일마다 계대되었다. 형질감염 하루 전, 세포를 0.6 x 10^6/ml로 씨딩하였다. 0일 차에, 사용 설명서에 따라 MaxCyte 전기천공 플랫폼을 사용하여, 선형화된 체 발현 플라스미드로 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포를 빈 125ml 진탕 플라스크에 넣고, 37℃ 정적 인큐베이터에서 30분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 30 ml 회수 배지 (50% Ex-302-50% CD-CHO-3mM 글루타민 및 3mM GlutaMAX이 보충됨)를 플라스크에 추가하고, 하룻밤 동안 진탕시켰다. 매일, 형질감염된 세포를 카운트하고, 스핀 다운시키고, 안정적인 벌크 풀 생성을 위해 선별 배지(50% Ex-302-50% CD-CHO 및 50-100 μM MSX)에 재-현탁시켰다. 생존 가능한 세포 수와 생존력을 모니터링하고, 안정한 벌크 풀의 생존력이 90%로 돌아갈 때까지 배지를 3-4일마다 교체했다. 선택이 끝나면, 동결된 세포 스톡이 만들어지고, 생성된 안정한 벌크 풀을 사용하여 유가식(fed-batch) 발현을 위한 물질을 생성했다.

[1212] **유가식(Fed-batch) 발현-**이전에 생성된 항체 안정 벌크 풀을 0일 차에 진탕 플라스크에서 0.5 x 10^6/ml의 밀도로 기본 발현 배지(50% Dynamis-50% ExCell 302, 50μM MSX 보충)에 접종했다. 형질감염된 세포를 140rpm으로 설정된 오비탈 쉐이커 상에서 37℃, 5% CO_2에서 항온처리하였다. 0.5mM pAF를 10g/L의 Cell Boost 4(GE health care) 및 0.52g/L Cell Boost 7b(GE health care)와 함께 3일째 배양물에 첨가했다. 120 μg/L의 Long R3 IGF-1을 5일째 배양물에 첨가했다. 글루코스 수준을 글루코스 측정기를 사용하여 모니터링하고, 글루코스 수준이 배양 배지에서 2g/L 미만인 경우, 배양물에 추가 글루코스를 첨가했다. Vi-Cell 기기로 생존 세포 수 및 생존 능력을 측정하였다. 7일 차에 정제를 위해 상청액을 수집하였다. 생산성은 단백질 G 센서를 사용하여 Octet에 의

해 측정되었다.

[1213] **EuCODE 발현 시스템에서 nnAAs 함유하는 항체 정제**-nnAA를 함유하는 표적 항체를 함유하는 정화된 세포 배양 배지를 20mM 인산나트륨, 100mM 염화나트륨, pH 7.5에서 평형화된 단백질 A ProSep Ultra 컬럼(EMD Millipore) 위에 로딩했다. 로딩 후, 컬럼을 완충액 A (20mM 인산나트륨, 100mM 염화나트륨, pH 7.5)로 세척한 후, 세척 완충액 B (5mM 숙신산, pH 5.8)로 세척하여, 숙주 세포 오염물질을 제거했다. 용출 완충액 C (50mM 글리신, 10mM 숙신산, pH 3.2)를 사용하여 컬럼으로부터 표적 항체를 용리시켰다. 표적 항체를 풀링하고, pH를 2.0M 트리스 염기로 pH 5.0으로 조정하였다. 표적 항체는 30mM 아세트산나트륨, pH 5.0에서 평형화된 Capto SP Impres 컬럼(GE Healthcare) 위에 조절된 단백질 A 풀을 로딩하여 추가로 정제되었다. 100% 완충액 B (30mM 아세트산나트륨, 0.5M 염화나트륨, pH 5.0)에 대한 선형 구배를 사용하여 컬럼으로부터 표적 항체를 용리시키고, 단량체 항체를 함유하는 분획을 풀링하고, 0.22μM로 여과시켜, ≤65℃에서 추가 사용할 때 까지 보관하였다.

[1214] **TLR 작용제 링커 페이로드의 부위 특이적 콘쥬게이션**-nnAA, 예를 들면 파라-아세틸 페닐알라닌을 함유하는 항체는 콘쥬게이션 완충액 (30 mM 아세테이트 나트륨, pH 4.0)으로 완충액 교환시켜, 10-20 mg/mL로 농축시켰다. 최종 100mM 아세트산 히드라지드를 항체에 첨가한 다음, 10몰 당량의 히드록실-아민 작용화된 TLR 작용제 약물-링커를 첨가하였다. 콘쥬게이션 반응물을 25-30℃에서 18-20시간 동안 항온처리한 후, Capto SP Impres 컬럼(GE Healthcare)을 통해 정제하여 과량의 시약을 제거했다. 정제된 ADCs를 제형 완충액(50mM 히스티딘, 100mM NaCl, 5% 트레할로스, pH 6.0)으로 완충액 교환하고, 추가 사용 시까지 ≤65℃에서 보관하였다. 도 2 및 3은 본 발명의 TCs의 부위-특이적 콘쥬게이션을 도시한다. TLR 작용제 약물-링커 항체 콘쥬게이션은 다양한 TLR-작용제를 이용하여 도시된다. 도 3에 나타낸 것과 같이, AA는 절단가능한 아미노산 링커를 나타내고; 그리고 L은 절단-불가능한 링커를 나타낸다.

[1215] **실시예 8: 작은 분자 TLR 작용제를 위한 시험관내 기능 분석**

[1216] HEK-Blue™hTLR7 세포를 HEK-Blue™ 검출 배지에서 배양하고, TLR7 또는 TLR8 또는 TLR7/8 작용제의 농도를 증가시키면서 자극했다. 항온처리 24h 후, NF-kB-유도 SEAP의 수준을 Quanti-Blue 검출 시약(Invivogen, San Diego, CA)에 의해 결정하였고, 판독값은 655 nm의 OD에서 얻었다. EC_{50}은 Prism Software를 사용하여 용량-반응 곡선에서 결정되었다. 하기 표 및 도면은 본원의 실시예 1 내지 6에 기재된 본 발명의 예시적인 TLR-작용제의 활성을 나타낸다. 500 nM 미만의 EC_{50} 값은 EC_{50} 값이 50 nM에서 1 uM, 또는 1 uM 초과 ~ 3 uM인 화합물보다 효능이 더 높은 화합물을 나타낸다.

[1217] 도 4는 2.08 uM의 EC_{50}을 갖는 상업용 TLR7 효능제 레시퀴모드(R848), 0.435 uM의 EC_{50}을 갖는 화합물 1, 0.153 uM의 EC_{50}을 갖는 화합물 2를 갖는 사용하여 HEK-블루 hTLR7 리포터 세포주에서의 TLR7 효능제 자극을 나타낸다.

[1218] 상기 실시예 1 내지 6에 개시된 예시적인 TLR-작용제의 활성을 분석하였다. 도 5A, 표 10은 상업적 대조군 DSR-6434, Resiquimod 및 Motolimod와 비교한 EC_{50} 값을 보여준다.

[1219] 표 10-예시적인 TLR 작용제의 활성

화합물 번호	화합물	TLR7 EC_{50} (nM)
N/A	대조군 - DSR-6434	9.203
N/A	R848 - Resiquimod	519.7
88	AXC-779	242.1
60	AXC-738	11.08
49	AXC-725	249.4
54	AXC-732	255.5
58	AXC-736	213.4
62	AXC-740	115.6
86	AXC-777	910.4
87	AXC-778	83.34
89	AXC-789	71.34
109	AXC-800	>5000
106	AXC-801	>5000
112	AXC-802	>5000
93	AXC-803	331.5
94	AXC-804	260.3
97	AXC-807	412.6
61	AXC-739	28.17
59	AXC-737	18.7
64	AXC-743	56.11

[1220]

[1221] 도 5B 및 표 11은 선택된 TLR7 작용제의 TLR7 활성을 나타낸다. AXC-887 및 AXC-877은 10nM 미만의 EC_{50} 값을 보임으로써, 이러한 화합물이 매우 강력한 TLR7 작용제임을 시사한다. TLR8 리포터 분석에서, AXC-887은 EC_{50}이 1427nM인 상업용 화합물 Motolimod와 비교하여, EC_{50}이 3733nM인 측정 가능한 활성을 보여주었다. 이것은 ACX-887이 TLR7/8 듀얼 작용제임을 암시하였다.

[1222] 표 11-예시적인 TLR 작용제의 활성

화합물	EC_{50} (nM)
DSR-6434	15.8
AXC-886	16.7
AXC-887	4.6
AXC-890	15.3
AXC-885	11.3
AXC-888	467.9
AXC-878	50.4
AXC-877	5.5
AXC-881	87.3
AXC-883	19.3
AXC-884	71.3

[1223]

[1224] 도 6 및 표 12는 링커에 부착된 선택된 TLR7 작용제의 TLR7 활성을 나타낸다. AXC-879는 상이한 TLR-작용제 (페이로드) 링커들중에 최고의 효능을 갖는다는 것을 입증하였다.

[1225] 표 12-예시적인 TLR 작용제 및 링커의 활성

화합물	TLR 작용제 페이로드 + 링커
	EC_{50} (nM)
DSR-6434	14.8
AXC-876	362.4
AXC-879	151.2
AXC-880	409.5
AXC-882	550.8
AXC-874	> 10,000
AXC-875	> 10,000
AXC-862	400.1
AXC-863	864.2
AXC-867	829.0
AXC-868	> 5,000
AXC-869	> 10,000
AXC-889	696.5

[1226]

[1227] 도 7 및 표 13은 링커에 부착된 TLR7 작용제 및 추가적으로 TLR7 작용제의 TLR7의 활성을 보여준다. AXC-895는 테스트된 상이한 여러 페이로드 중에서 가장 높은 효능을 보여주었고, AXC-901은 상이한 여러 페이로드 링커 중에서 가장 높은 효능을 보였다. (DL)은 링커에 부착된 약물 링커 또는 TLR-작용제, 또는 링커에 부착된 TLR 작용제 (페이로드)를 나타낸다.

[1228] 표 13-예시적인 TLR 작용제 및 링커의 활성

화합물	EC_{50} (nM)
DSR-6434	9
AXC-901 (DL)	48
AXC-900 (DL)	615
AXC-899	1302
AXC-895	11
AXC-891	47
AXC-896 (DL)	325
AXC-897 (DL)	330
AXC-898	50
AXC-892	73
AXC-893 (DL)	3120
AXC-894	1672

[1229]

[1230] 도 8 및 표 14는 링커에 부착된 TLR7 작용제 및 추가적으로 TLR7 작용제의 TLR7의 활성을 보여준다. 테스트된 모든 화합물은 TLR7 작용제 활성을 갖는다. AXC-894, AXC-903, AXC-904, AXC905, 그리고 AXC-906은 10nM 미만의 EC_{50} 값을 가지며, 테스트된 상이한 여러 페이로드중 최고의 효능을 실증하였다.

[1231] 표 14-예시적인 TLR 작용제 및 링커의 활성

화합물	TLR7 EC_{50} (nM)
DSR-6434	10.5
AXC-903	4.3
AXC-907 (DL)	51.8
AXC-894	2.1
AXC-909 (DL)	71.9
AXC-904	8.1
AXC-905	2.6
AXC-906	5.4
AXC-908	11.5
AXC-860	119.5
AXC-910	2591.1

[1232]

[1233] 도 9 및 표 15는 링커(약물 링커 또는 DL)에 부착된 상이한 TLR7 작용제, 및 최종 대사산물(DL-pAF)을 함유하는 비천연 아미노산, 예를 들어, pAF의 TLR7 활성을 비교하였다. 모든 경우에, 최종 대사 산물을 포함하는 pAF는 약물 링커가 있는 각각의 페이로드보다 더 높은 효능을 나타냈다. AXC-879는 상이한 TLR 페이로드 링커들중에 최고의 효능을 갖는다는 것을 입증하였다.

[1234] 표 15-비-자연적 아미노산 (nnAA)의 존재 또는 부재 하에서 예시적인 TLR 작용제 + 링커의 활성

화합물	TLR 작용제 + 링커 (DL) - EC_{50} (nM)	TLR 작용제 + 링커 + nnAA (DL-pAF) - EC_{50} (nM)
AXC-879	151.2	90
AXC-880	409.5	167
AXC-882	550.8	343
AXC-876	362.4	245
AXC-863	864.2	287
AXC-862	400.1	121
AXC-867	829	283
DSR6434	15	11

DL = 약물 링커; DL-pAF = pAF 함유하는 최종 대사물질

[1235] .

[1236] **실시예 9:** TCs의 부위-특이적 콘쥬게이션

[1237] TCs의우ㅏ 부위-특이적 콘쥬게이션은 분석적 역-상 HPLC를 사용하여 실시예 7에 기재된 바와 같이 수행하였다. 도 10A는 환원 조건 하에 아미노산 위치 HA114에서 비천연 아미노산, 예를 들어 pAF를 갖는 콘쥬게이트안된 항-HER2 항체의 분석적 역상 HPLC 크로마토그램을 보여준다. 도 10B 및 도 10C는 각각 TLR 작용제 AXC-875 및 AXC-880과 아미노산 위치 HA114에서 콘쥬게이트된 항-HER2 항체를 나타낸다. 표 16은 상기 기재된 표준 콘쥬게이트 조건으로부터의 TLR 콘쥬게이트에 대한 약물-항체 비율 (DAR)를 나타낸다. 다양한 DAR 수준(0.3-2.0)은 주로 연관된 TLR 링커-페이로드의 다른 속성으로 인해 TLR 콘쥬게이트 간에서 볼 수 있다.

[1238] 표 16 . RP-HPLC에 의해 결정된 TLR 콘쥬게이트의 약물-항체 비율 (DAR).

콘쥬게이트	약물 항체 비율 (DAR)
HER2-HA114-AXC638	1.7
HER2-HA114-AXC800	1.7
HER2-HA114-AXC801	1.9
HER2-HA114-AXC802	1.5
HER2-HA114-AXC874	2.0
HER2-HA114-AXC875	1.9
HER2-HA114-AXC862	0.8
HER2-HA114-AXC863	1.8
HER2-HA114-AXC867	1.5
HER2-HA114-AXC868	1.2
HER2-HA114-AXC869	0.3

[1239]

[1240] **실시예 10: 다양한 종양 세포를 이용한 시험관내 공동-배양 분석**

[1241] RAW-Blue™ 세포 (Invivogen, San Diego, CA)는 96-웰 플레이트에서 웰당 총 1백만 세포 수와 함께, 1:1의 E:T 비율에서 다양한 상이한 수준의 HER2 발현 수준을 갖는 인간 종양 세포와 공동-배양되었다. 상이한 농도의 작은 분자 TLR7 작용제 및 콘쥬게이트된 ISACs, (면역 자극 항체 콘쥬게이트)를 상기 공동-배양 세포 배지에 추가하였다. 항온처리 24h 후, RAW-Blue™ 세포로부터 NF-kB-유도 SEAP의 수준을 Quanti-Blue 검출 시약(Invivogen, San Diego, CA)에 의해 결정하였고, OD 655 nm에서 판독하였다. 용량-반응 곡선은 Prism Software를 사용하여, 만들었다.

[1242] 도 11A-11C는 항-HER2 항체에 콘쥬게이트될 때 선택된 페이로드 링커의 종양 의존성 ISAC 활성을 비교한 것들이다. SKOV3은 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이며 (도 11A); JIMT-1은 HER2를 중등/낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이며 (도 11B); 그리고 A431 HER2를 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이다 (도

11C). 작은 분자 TLR7 작용제는 모든 종양 세포주 존재 하에서 강력한 TLR7 활성을 보인다. 모든 TLR7 ISACS는 HER2를 낮은-발현 또는 중간-발현 종양 세포주의 존재 하에서 활성을 나타내지 않는다. 페이로드 약물 링커 AXC-863을 갖는 ISAC는 오로지 HER2를 높은-발현 종양 세포주의 존재에서만 강력한 용량 의존적 활성을 나타낸다.

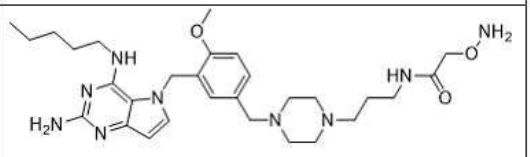
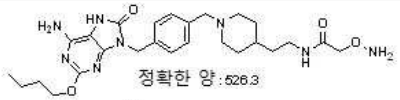
[1243] 도 12A 및 12B는 항-HER2 항체에 콘쥬게이트될 때 추가 페이로드 링커의 종양 의존성 ISAC 활성을 비교한 것들이다. SKBR3은 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이며, (도 12A), 그리고 HCC1806은 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이다 (도 12B). 작은 분자 TLR7 작용제는 모든 종양 세포주 존재 하에서 강력한 TLR7 활성을 보인다. 모든 TLR7 ISACS 및 콘쥬게이트안된 항-HER2 항체는 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 존재 하에서 활성을 나타내지 않는다. 페이로드 약물 링커 AXC-863을 갖는 ISAC는 오로지 HER2를 높은-발현 종양 세포주의 존재에서만 강력한 용량 의존적 활성을 나타낸다.

[1244] 도 13A 및 13B는 항-HER2 항체에 콘쥬게이트될 때 추가 페이로드 링커의 종양 의존성 ISAC 활성을 비교한 것들이다. SKBR3은 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이며(도 13A), 그리고 HCC1806은 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이다(도 13B). 작은 분자 TLR7 작용제는 모든 종양 세포주 존재 하에서 강력한 TLR7 활성을 보인다. 모든 TLR7 ISACS 및 콘쥬게이트안된 항-HER2 항체는 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 존재 하에서 활성을 나타내지 않는다. 모든 ISACs는 오로지 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주의 존재 하에서만 강력한 용량 의존적 활성을 나타낸다 (도 13A). 페이로드 약물 링커 AXC-879를 갖는 ISACS는 최고의 HER2 의존적 TLR7 활성을 나타낸다.

[1245] 도 14A 및 14B는 항-HER2 항체에 콘쥬게이트될 때 추가 페이로드 링커의 종양-의존성 ISAC 활성을 비교한 것들이다. SKBR3은 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이며(도 14A), 그리고 HCC1806은 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주이다(도 14B). 작은 분자 TLR7 작용제는 모든 종양 세포주 존재 하에서 강력한 TLR7 활성을 보인다. 모든 TLR7 ISACS 및 콘쥬게이트안된 항-HER2 항체는 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 존재 하에서 활성을 나타내지 않았다. 모든 ISACs는 오로지 HER2를 높은 종양 세포주의 존재 하에서만 강력한 용량 의존적 활성을 나타낸다. 페이로드 약물 링커 AXC-901을 갖는 ISACS는 최고의 HER2 의존적 TLR7 활성을 나타낸다.

[1246] 도 15A 및 15B는 SKBR3 HER2를 높은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 15A), 그리고 HCC1806 HER2를 매우 낮은 수준으로 발현시키는 종양 세포주 (도 15B)에서 항-HER2 항체에 콘쥬게이트된 세 개(3)의 페이로드 링커의 종양-의존적 ISAC 활성을 비교하는데, 여기에서 HER2-AXC-879는 공지의 ISACs의 대표적인 HER2-AXC-860 및 HER2-AXC-910과 비교하여, 최고의 ISAC 활성을 갖는다는 것을 보여준다. 표 17은 비교된 HER2-AXC ISAC를 생성하는데 사용된 TLR-작용제-링커 구조를 도시한다.

[1247] 표 17-도 15A-15B에 관련된 TLR-작용제 구조

화합물 이름	구조
AXC-860	
AXC-879	 정확한 양: 526.3
AXC-910	분자량: 384.5

[1248]

[1249] **실시예 11: 유방암의 치료**

[1250] 유방암 치료법을 위한 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체의 인간에서의 안전성 및/또는 효능에 대한 임상 시험.

[1251] 목적: 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체를 포함하는 투여 조성물의 안전성 및 약물동력학의 비교.

[1252] 연구 기획: 이 연구는 유방암 환자를 대상으로 하는, 임상 1상, 단일-센터, 공개-라벨, 무작위화된 용량 증량 연구에 이어, 임상 2상 연구가 될 것이다. 환자들은 본 연구에 참여하기 전, 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체에 노출되어서는 안된다. 환자는 임상시험 시작 후 2주 이내에 암 치료를 받은 적이 없어야 한다. 치료에는 화학요법, 조혈 성장 인자, 생물학적 요법, 이를 테면, 단일클론 항체의 사용이 내포된다. 환자들은 기존 치료와 관련된 모든 독성으로부터 회복되어야 한다(등급 0 또는 1로). 모든 대상체들을 안전성에 대해 평가되고, 약물동력학 분석을 위한 모든 혈액 수집은 예정대로 수집한다. 모든 연구는 기관 윤리 위원회 승인 및 환자 동의 하에 수행된다.

[1253] I 상: 환자는 28-일 주기로 1일차, 8일차 및 15일차에 각각 i.v.를 통하여 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체를 제공받는다. 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체의 용량은 하기에 제시된 바와 같은 평가에 근거하여 독성에 대해 유지 또는 변형될 수 있다. 수용불가한 독성이 없으면, 이 치료를 28일마다 반복한다. 3-6명의 환자로 구성된 코호트는 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체에 대한 최대 허용 용량(MTD)이 결정될 때까지, 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체의 증량-용량을 제공받는다. MTD란 환자 3명 중 2명, 또는 6명 중 2명이 용량-제한 독성을 경험하게 되는 용량보다 앞선 용량으로 정의된다. 용량 제한 독성은 National Cancer Institute(NCI)의 CTCAE(Common Terminology for Adverse Events) 버전 3.0 (August 9, 2006)에서 설정한 정의 및 표준에 따라 결정된다.

[1254] II 상: 환자들는 I상에서 결정된 MTD에서 I상과 같이 트라스투주맙-연계된 TLR-작용체 유도체를 제공받는다. 치료는 질환 진행이 없거나, 또는 수용불가한 독성이 없는 경우, 2-6 과정 동안 4주마다 반복된다. 연구 치료요법의 2차례 과정을 마친 후, 완전 또는 부분 반응을 달성한 환자들은 추가로 4회 과정을 받을 수 있다. 6차례 연구 치료 과정을 마친 후, 2개월 이상 질환을 안정적으로 유지하는 환자들은 이들이 원래 자격 기준을 충족하는 경우, 질환 진행 시점에 추가로 6차례 과정을 받을 수 있다.

[1255] 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체의 투여 전과 투여 후, 정맥 천자로 직접 혈약 샘플링 연속 채혈을 실시한다. 혈청 농도 측정을 위한 정맥혈 샘플(5mL)은 투약-전 약 10분 시점과 투약-후 대략 1일, 8일, 15일에 채취된다. 각 혈청 샘플은 2개의 분취량으로 나눈다. 모든 혈청 샘플은 -20℃에서 보관된다. 혈청 샘플은 드라이아이스를 이용하여 운반된다.

[1256] 약물동력학: 치료 시작 전과 1, 8, 15일 차 시점에 약물동력학 평가를 위해 환자의 혈장/혈청 샘플을 수집한다. 약물동력학 매개변수는 최신 버전의 BIOAVL 소프트웨어를 사용하여, Digital Equipment Corporation VAX 8600 컴퓨터 시스템에서 모델 독립 방법으로 계산된다. 다음의 약물동력학 매개변수들이 측정된다: 피크 혈청 농도(C_{max}); 피크 혈청 농도에 이르는 시간 (t_{max}); 선형 사다리꼴 규칙을 사용하여 계산된 시간 0부터 마지막 혈액 샘플링 시간(AUC_{0-72})까지의 농도-시간 곡선 아래 면적(AUC); 그리고 제거율 상수에서 계산된 최종 제거 반감기 ($t_{1/2}$). 제거율 상수는 로그-선형 농도-시간 플롯의 말단 선형 영역에서 연속 데이터 포인트의 선형 회귀에 의해 측정된다. 약동학적 매개변수의 평균, 표준 편차(SD) 및 변동 계수(CV)는 각 치료에 대해 계산된다. 매개변수 평균의 비율 (보존 제형/비-보존 제형)이 계산된다.

[1257] 병용 요법에 대한 환자 반응: 환자 반응은 X-선, CT 스캔 및 MRI를 사용한 영상화를 통해 평가되며, 연구 시작 전과 첫 번째 주기가 끝날 때 영상촬영을 수행하고, 그리고 매 4주마다 또는 후속 주기가 끝날 때 추가 영상촬영을 수행한다. 영상촬영 방식은 암 유형 및 타당성/가용성에 따라 선택되며, 각 환자의 연구 과정 전반에 걸쳐 유사한 암 유형에 대해 동일한 영상촬영 방식이 사용된다. 응답률은 RECIST 기준을 사용하여 결정된다. (Therasse et al, J. Natl. Cancer Inst. 2000 Feb 2; 92(3):205-16; http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf). 환자들을 또한 암/종양 생검을 통해, 유동세포 분석, 웨스턴 블롯팅 및 IHC에 의한 전구 암 세포 표현형 및 클론 생성 성장의 변화를 평가하고, FISH에 의한 세포 유전학의 변화를 평가한다. 연구 치료 완료 후, 4주 동안 주기적으로 환자를 추적-관찰한다.

[1258] **실시예 12: 유방암의 치료**

[1259] 유방암 치료법을 위한 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체의 인간에서의 안전성 및 효능에 대한 임상 시험.

[1260] 목적: HER2-과다발현시키는 전이성 유방암 여성에서 트라스투주맙-연계된 TLR 작용제 유도체의 단독 투여 후, 트라스투주맙 및 파클리탁셀 병용 요법 대비 1-선(first-line) 병용 요법 트라스투주맙 및 파클리탁셀 병용 요법의 효능 및 독성을 비교한다.

[1261] 연구 기획: 상기 연구는 무작위, 다중-센터 시험이다. HER2/neu-과다발현 정도(2+ 대비(vs) 3+), 안트라사이클린-함유하는 어쥬버트 치료 전 (선행 치료가 없는 경우 대비(vs) 좌측 흉벽에 방사능 요법 없이 선행 치료 경우), 에스트로겐-수용체 상태 (양성 대비(vs) 음성 대비(vs) 모름), 선행 치료 (1-선 대비(vs) 차선/3-선), 그리고 중심에 따라 환자들을 계층화되었다. 2개의 치료군 중 하나로 환자를 무작위 배정한다. I 군: 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 IV를 매주 30-90 분에 걸쳐 환자에게 제공한다. 질환 진행 시, 환자들에게 II군에서와 같이 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 IV 및 파클리탁셀 IV의 조합을 제공한다. II 군: 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 IV를 매주 30-90 분에 걸쳐 환자에게 제공한다. 파클리탁셀은 3주간 매주 1시간씩 IV 주사 후 1주간 휴약한다.

[1262] 질환 진행이나 또는 허용할 수 없는 독성이 없는 경우, 두 군에서 치료는 계속된다. 삶의 질은 기선 시점과 과정 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12의 첫째 날에 평가된다. 1, 3, 6개월 시점에 환자들을 추적 관찰하고, 그 이후에는 6개월마다 추적 관찰한다.

[1263] **실시예 13: 방광암 치료**

[1264] 목적: 방광의 근육-침습성 이행 세포 암종에 대해 이전에 경-요도 방광 절제술을 받은 환자에서 여기에 설명된 TLR-작용제 유도체 존재 하에, 또는 부재 하에 파클리탁셀 및 방사선 요법의 급성 독성을 결정한다.

[1265] 질환 특징: 조직학적 또는 세포학적으로 방광의 원발성 전이 세포 암종(TCC)으로 확인됨; 고유근층 침범의 조직학적 증거; 다음 단계 기준 중 1개 충족: 단계 T2-4a; NX, N0, 또는 N1; 그리고 M0 질환 또는 임상 단계 T1, 등급 3/3 질환 AND는 확실한 국소 치료가 필요하다; 다음 기준이 충족되는 경우, 전립선 요도의 종양 관련성이 허용된다: 종양이 시각적으로 완전하게 절제됨; 전립선의 기질 침범의 증거 없음, 흉부 x-선 또는 CT 스캔 및 복부/골반 CT 스캔에 의해 원거리 전이의 증거가 없음; 지난 3-8주 이내에 경-요도 방광 절제술(안전하다고 판단되는 한, 철저하게)을 받았으며, 여기에는 종양 매핑을 통한 쌍합진(bimanual examination)이 내포됨; HER2/neu 분석에 사용할 수 있는 충분한 종양 조직; 근치 방광 절제술의 대상이 아님.

[1266] 연구 기획: 상기 연구는 비-무작위화된, 다중-센터 시험이다. 환자들은 HER2/neu 상태에 따라 2개 치료 그룹중 하나에 할당된다 (HER2/neu 2+ 또는 3+ 착색 [그룹 1] 대비(vs) HER2/neu 0 또는 1+ 착색 [그룹 2]).

[1267] 그룹 1: 환자들에게 1일, 8일, 15일, 22일, 29일, 36일, 및 43일차 시점에 1 시간에 걸쳐 파클리탁셀을 IV로 투여하고, 그리고 본원에서 기술된트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체를 1일차에 90분에 걸쳐 IV로 투여하고, 그 다음 8일, 15일, 22일, 29일, 36일, 및 43일차 시점에 30분에 걸쳐 제공한다. 환자들은 1-5, 8-12, 15-19, 22-26, 29-33, 36-40, 43-47, 그리고 50일차에 하루에 한번씩 방사선 요법을 또한 받는다. 질환 진행이나 또는 허용할 수 없는 독성이 없는 경우, 치료는 계속된다.

[1268] 그룹 2: 환자는 그룹 1에서와 같이, 파클리탁셀을 받고 방사선 요법을 받는다. 연구 치료 완료 후, 환자들을 매 4-5주, 1년 동안 매 3개월마다, 1년 동안 매 4개월마다, 3년 동안 매 6개월마다, 그 후 매년 추적 관찰한다.

[1269] **실시예 14: 난소암의 치료**

[1270] 난소암 치료법을 위한, 본원에서 기술된트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체의 인간에서의 안전성 및 효능에 대한 임상 시험.

[1271] 목적: HER2-과다발현시키는 난소암에 걸린 여성에서 매주 일회 IV로 본원에서 기술된트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체를 포함하는 조성물의 용량을 투여한 결과 4주차 시점에서 안전성 및 효능을 평가한다.

[1272] 연구 기획: 상기 연구는 비-무작위화된, 오픈-라벨, 11-주, 다중-센터 시험이다. 본 연구는 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체를 매주 한 번씩 IV로 투여된 용량의 안전성 프로파일, MTD, PK 및 면역원성을 평가하는 것이다. 환자들은 단일 그룹으로 할당된다. 환자들은 4주 동안 주당 일회 1 용량의 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체를 제공받는다. 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체 은 연구 1일, 8일, 15일, 및 22일차에 IV-주입을 통하여 투여될 것이다. 소변 샘플을 1일차 및 22일차에 취할 것이다.

[1273] 트라스투주맙-연계된 TLR-작용제 유도체의 투여 전과 투여 후, 정맥 천자로 직접 혈약 샘플링 연속 채혈을 실시한다. 혈청 농도 측정을 위한 정맥혈 샘플(5mL)은 투약-전 약 10분 시점과 투약-후 대략 1, 2, 4, 5, 8, 15, 22, 36, 43 및 50일차에 채취된다. 각 혈청 샘플은 2개의 분취량으로 나눈다. 모든 혈청 샘플은 -20℃에서 보관된다. 혈청 샘플은 드라이아이스를 이용하여 운반된다.

[1274] 질환 진행이나 또는 허용할 수 없는 독성이 없는 경우, 치료는 계속된다. 삶의 질은 기선 시점과 과정 2, 3, 4,

5, 6, 8, 10, 12의 첫째 날에 평가된다. 29일차, 36일차, 43일차, 그리고 50일차에 환자를 추적관찰한다. 환자들에게 부작용에 대해 질문할 것이다.종양 크기와 심장 기능을 평가하기 위해, 환자들을 영상 스캔과 ECG를 받게한다(43일차 시점). 연구 종료 시, 환자는 신체 검사를 받게 된다(50일차 시점). 질환 퇴행의 증거가 있는 환자들은 질환 진행의 증거가 기록으로 입증될 때까지, 계속 치료를 받을 수 있다.

[1275] 본 발명은 다음의 구체예들에 의해 추가 설명된다.

[1276] 1.본원에 따른 하나 또는 그 이상의 비-자연적으로 인코드된 아미노산이 통합된 하나 또는 그 이상의 종양-표적화 폴리펩티드를 포함하는 조성물, 이때 전술한 폴리펩티드는 상기 종양-표적화 폴리펩티드의 비-자연적 아미노산에 공유적으로 결합된 링커를 통하여 TLR 작용제 분자에 연계된다.

[1277] 2. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 종양-표적화 폴리펩티드는 HER2에 결합된 항체다.

[1278] 3. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 종양-표적화 폴리펩티드는 트라스투주맙이다.

[1279] 4. 구체예 1, 2, 또는 3의 조성물, 이때 상기 TLR 작용제는 TLR7 또는 TLR8 작용제다.

[1280] 5. 구체예 1, 2, 또는 3의 조성물, 이때 상기 TLR 작용제는 도 4의 TLR7 또는 TLR8 작용제다.

[1281] 6. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 종양-표적화 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 수용성 중합체에 콘쥬게이트된다.

[1282] 7. 구체예 6의 조성물, 이때 상기 수용성 중합체중 적어도 하나는 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산중 적어도 하나에 연계된다.

[1283] 8. 구체예 7의 조성물, 이때 상기 수용성 중합체는 PEG이다.

[1284] 9. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 링커는 분자량이 10 ~ 50의 PEG이다.

[1285] 10. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 조성물은 상기 조성물의 안정성 또는 용해도를 증가시킬 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함한다.

[1286] 13. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 조성물은 재조합 숙주 세포에서 또는 시험관에서 합성된 종양-표적화 폴리펩티드의 발현을 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결손을 포함한다.

[1287] 14. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 상기 폴리펩티드 안의 20개의 일반 아미노산중 임의의 것에 대해 비반응성인 링커, 중합체, 또는 생물학적으로 활성 분자에 대해 반응성이 있다.

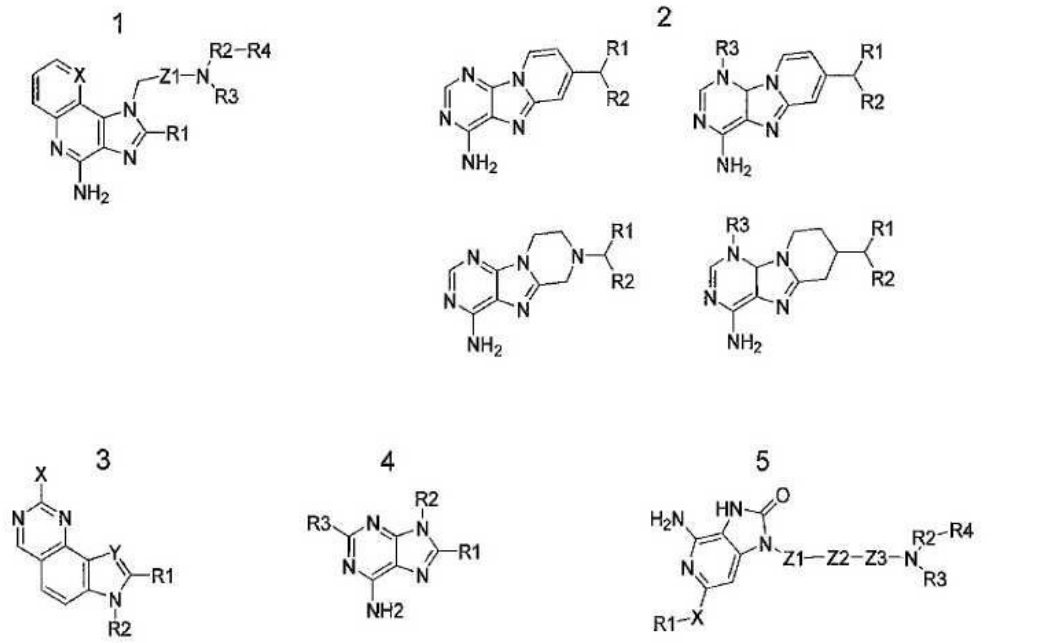
[1288] 15. 구체예 14의 조성물, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 그룹, 아미노옥시 그룹, 하이드라진 그룹, 하이드라지드 그룹, 세미카르바자이드 그룹, 아지드 그룹, 또는 알킨 그룹을 포함한다.

[1289] 16. 구체예 14의 조성물, 이때 상기 비-자연적으로 인코드된 아미노산은 카르보닐 그룹을 포함한다.

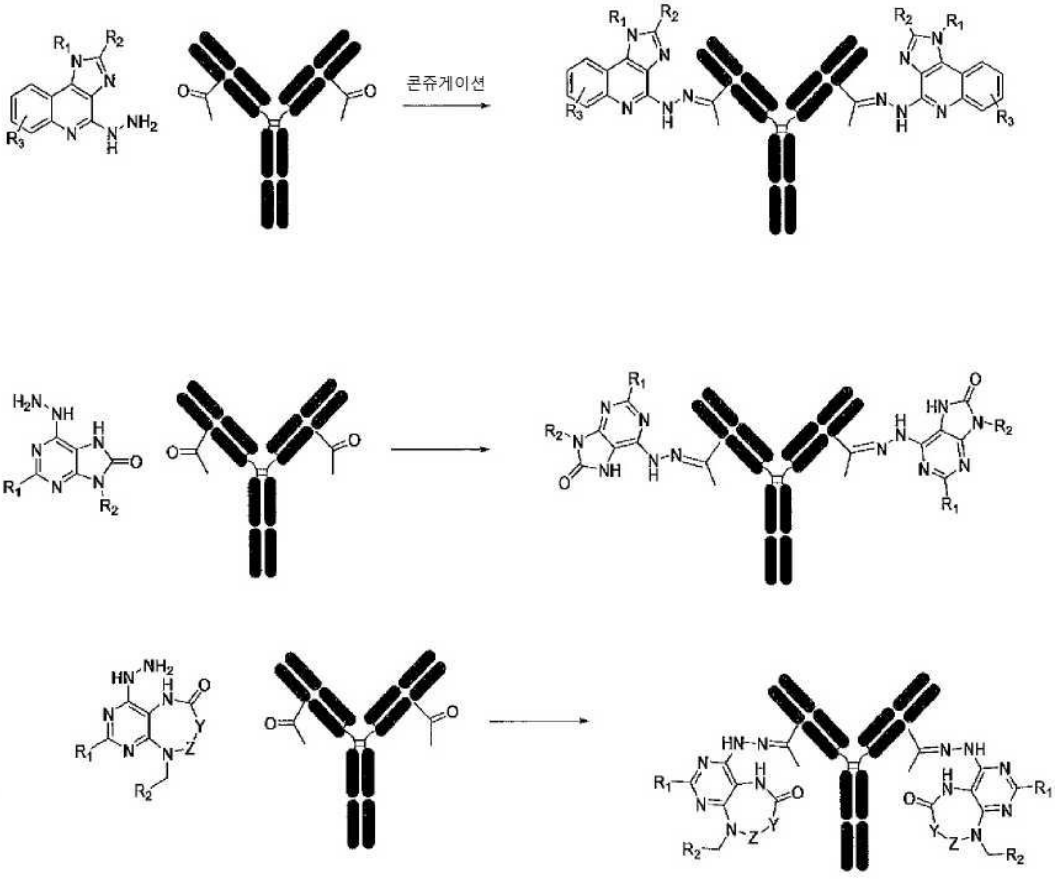
[1290] 17. 구체예 1의 조성물, 이때 상기 종양-표적화 폴리펩티드는 생물학적으로 활성 분자, 세포독성제, 수용성 중합체, 또는 면역자극제에 연계된다.

도면

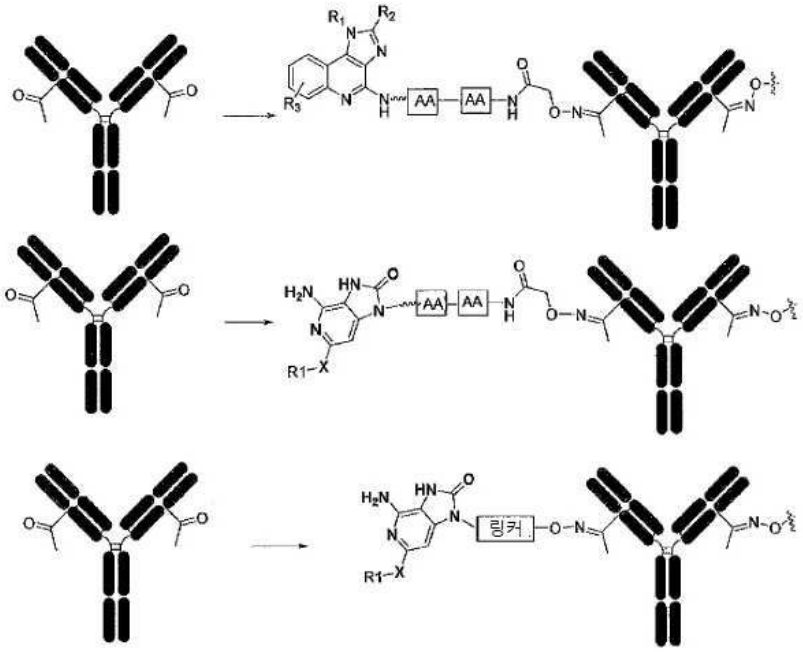
도면1



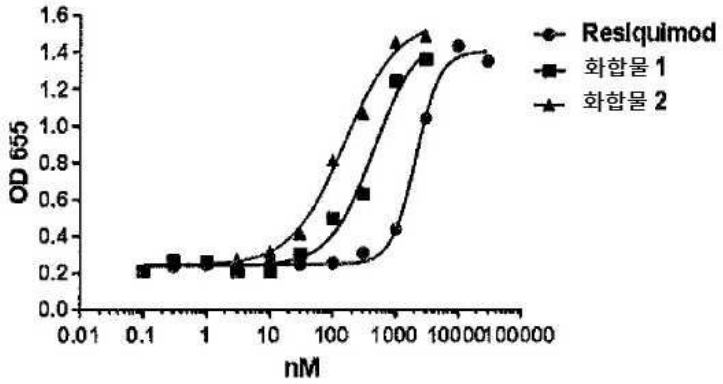
도면2

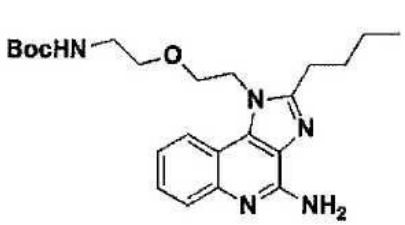


도면3

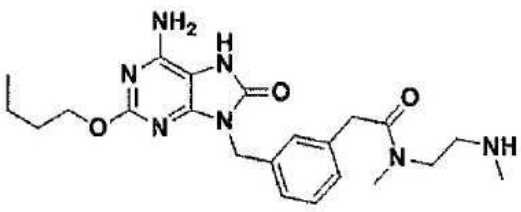


도면4



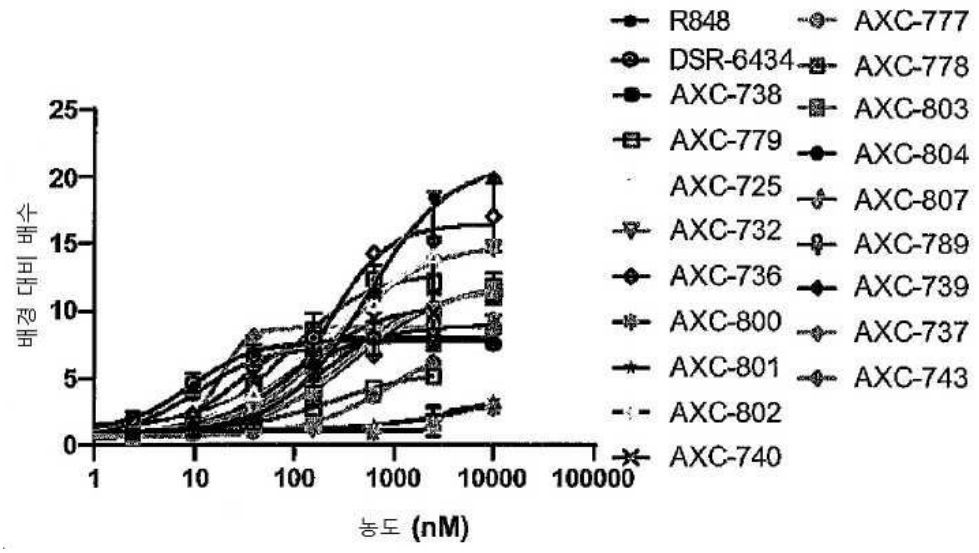


화합물 1

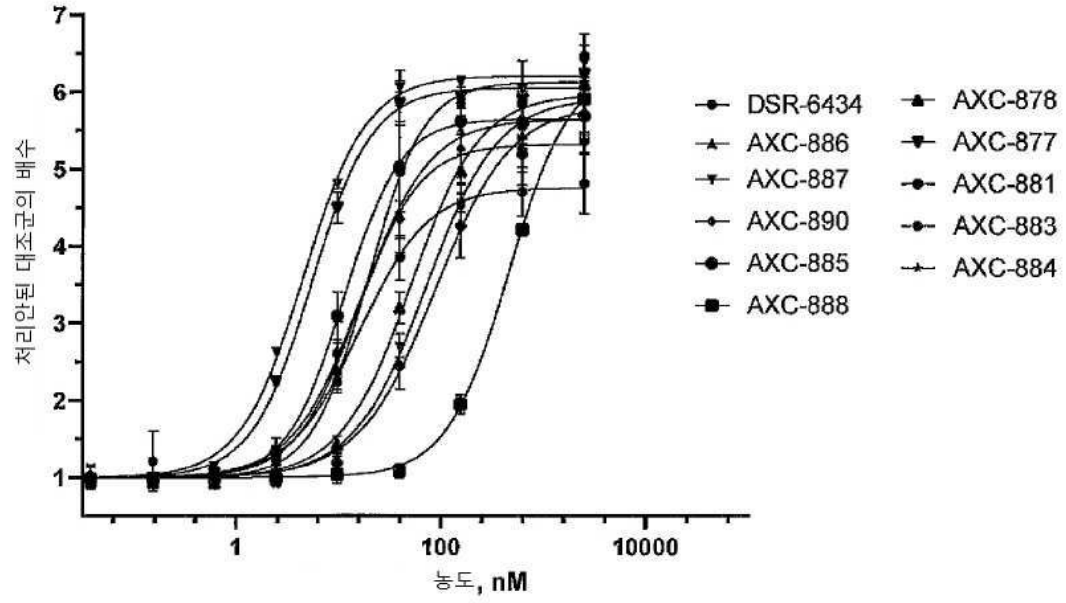


화합물 2

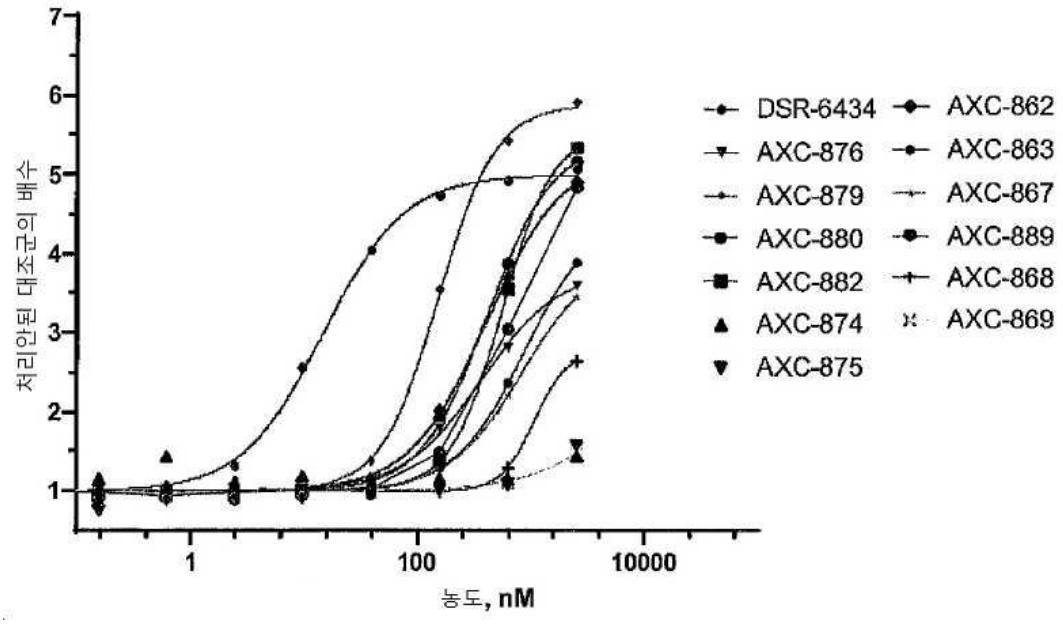
도면5a


R848
DSR-6434
AXC-738
AXC-779
AXC-725
AXC-732
AXC-736
AXC-800
AXC-801
AXC-802
AXC-740
AXC-777
AXC-778
AXC-803
AXC-804
AXC-807
AXC-789
AXC-739
AXC-737
AXC-743
배경 대비 배수
농도 (nM)

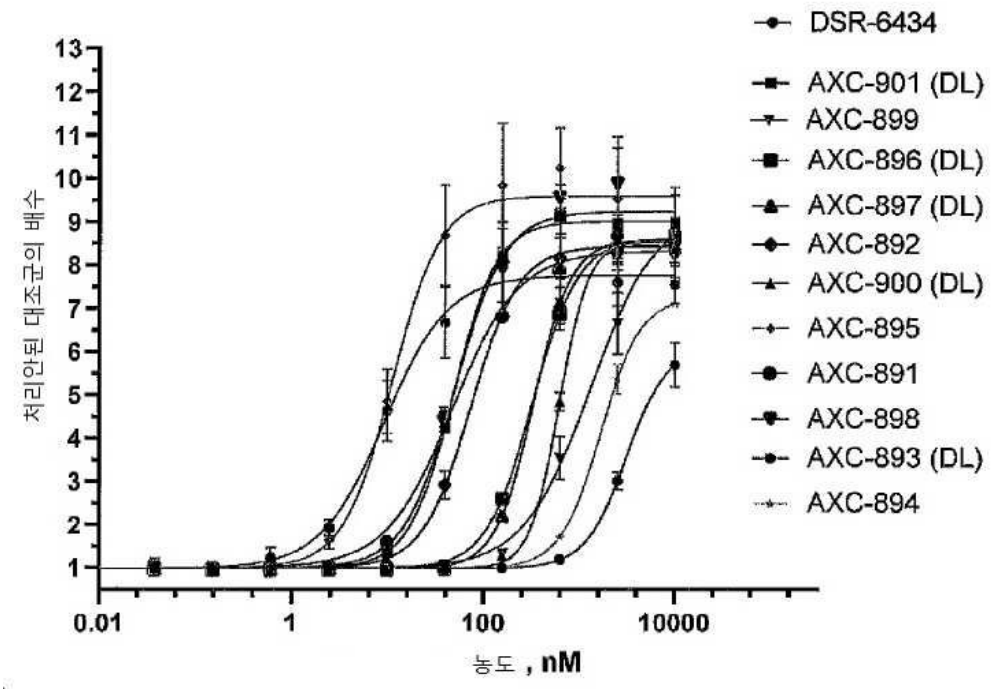
도면5b


DSR-6434
AXC-886
AXC-887
AXC-890
AXC-885
AXC-888
AXC-878
AXC-877
AXC-881
AXC-883
AXC-884
처리안된 대조군의 배수
농도, nM

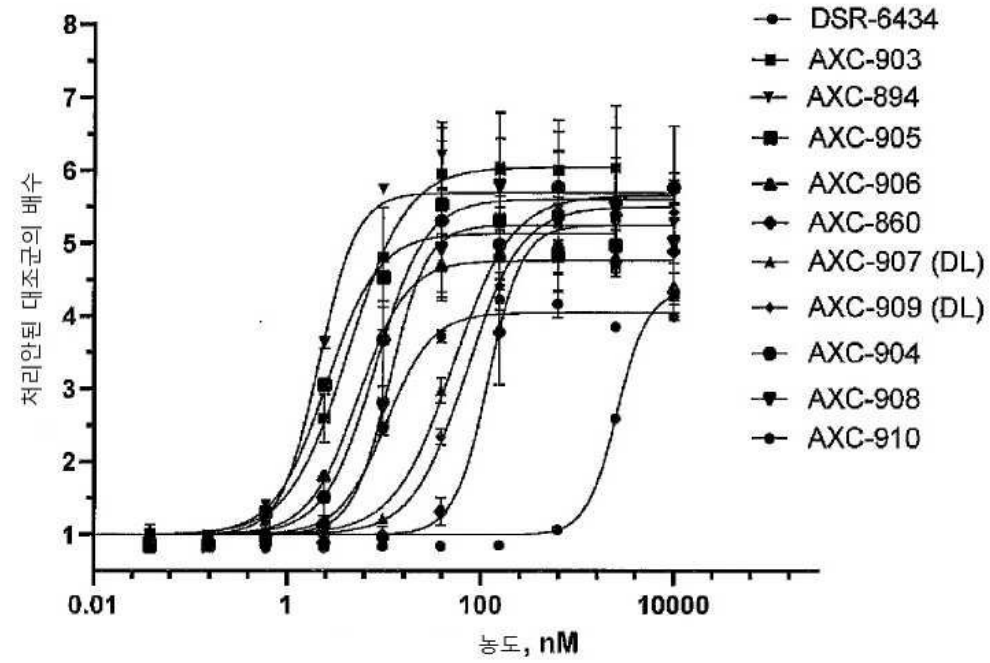
도면6


처리안된 대조군의 배수
농도, nM
DSR-6434
AXC-876
AXC-879
AXC-880
AXC-882
AXC-874
AXC-875
AXC-862
AXC-863
AXC-867
AXC-889
AXC-868
AXC-869

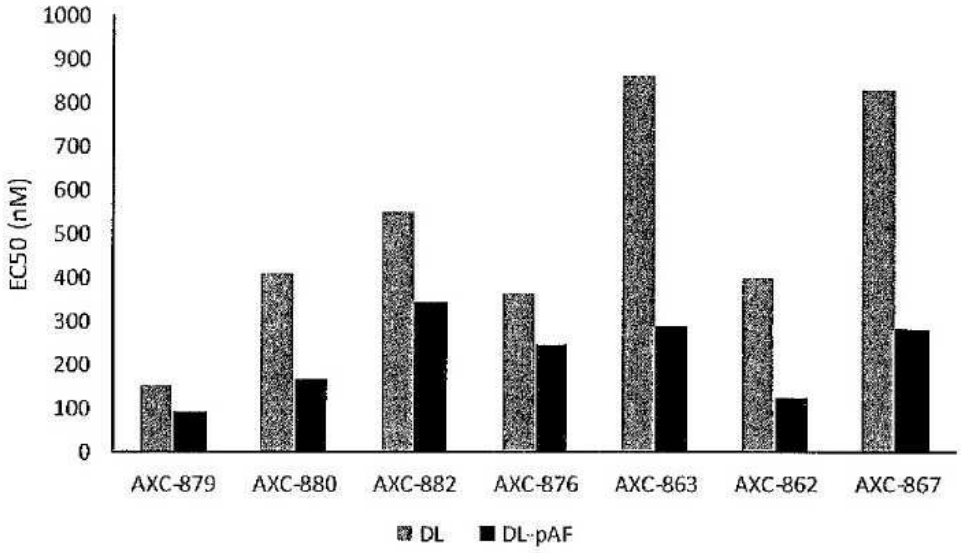
도면7

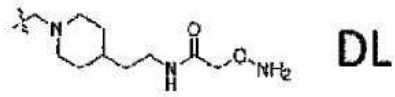

처리안된 대조군의 배수
농도 , nM
DSR-6434
AXC-901 (DL)
AXC-899
AXC-896 (DL)
AXC-897 (DL)
AXC-892
AXC-900 (DL)
AXC-895
AXC-891
AXC-898
AXC-893 (DL)
AXC-894

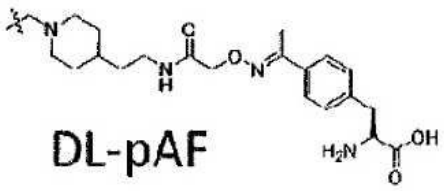
도면8


DSR-6434
AXC-903
AXC-894
AXC-905
AXC-906
AXC-860
AXC-907 (DL)
AXC-909 (DL)
AXC-904
AXC-908
AXC-910
처리안된 대조군의 배수
농도, nM
0.01
1
100
10000
1
2
3
4
5
6
7
8

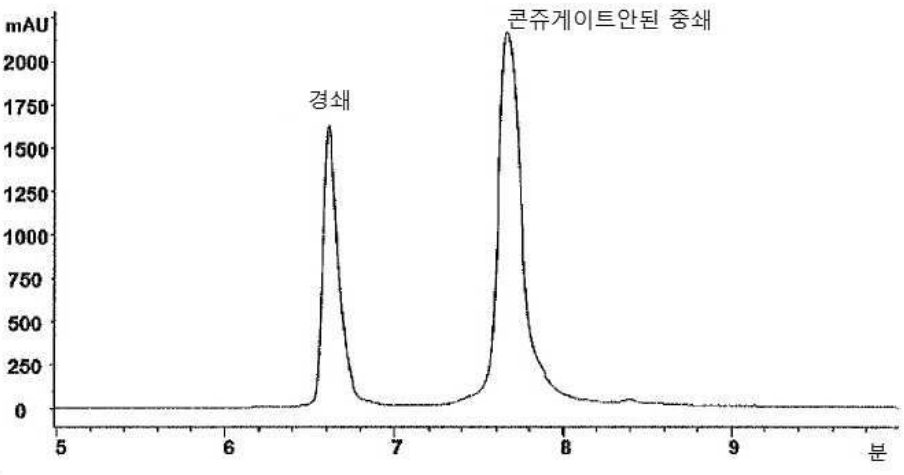
도면9


1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
EC50 (nM)
AXC-879
AXC-880
AXC-882
AXC-876
AXC-863
AXC-862
AXC-867
DL
DL-pAF

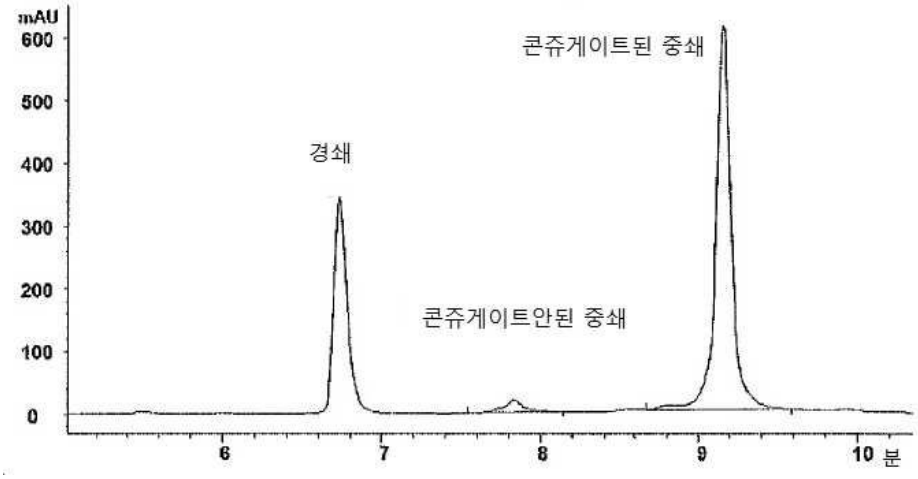

DL


DL-pAF

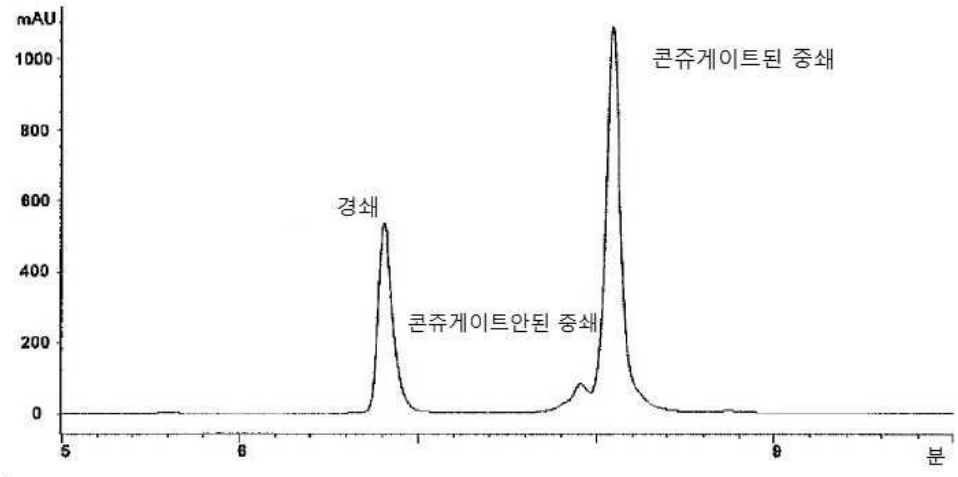
도면10a


mAU
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
경쇄
콘쥬게이트안된 중쇄
5
6
7
8
9
분

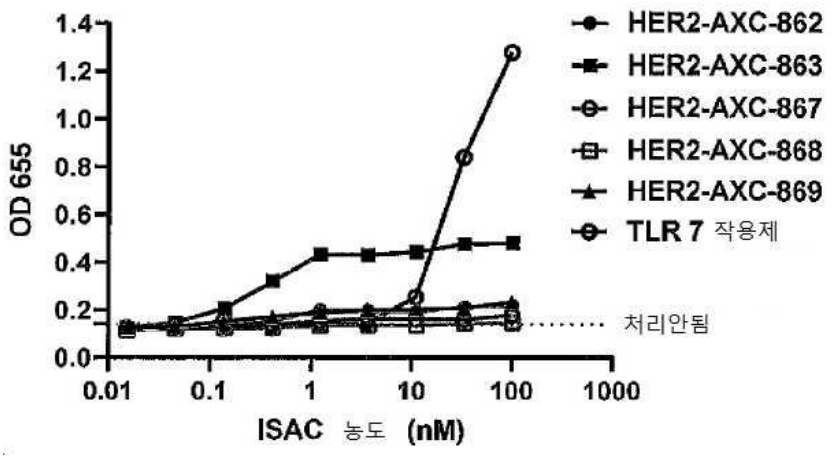
도면10b



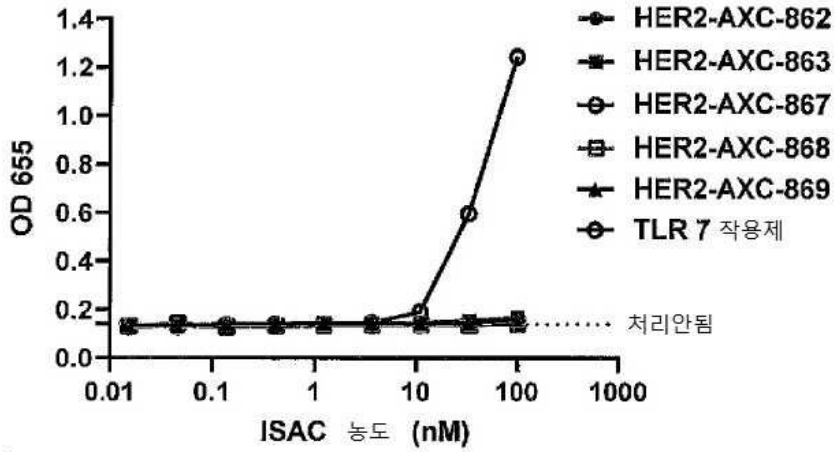
도면10c



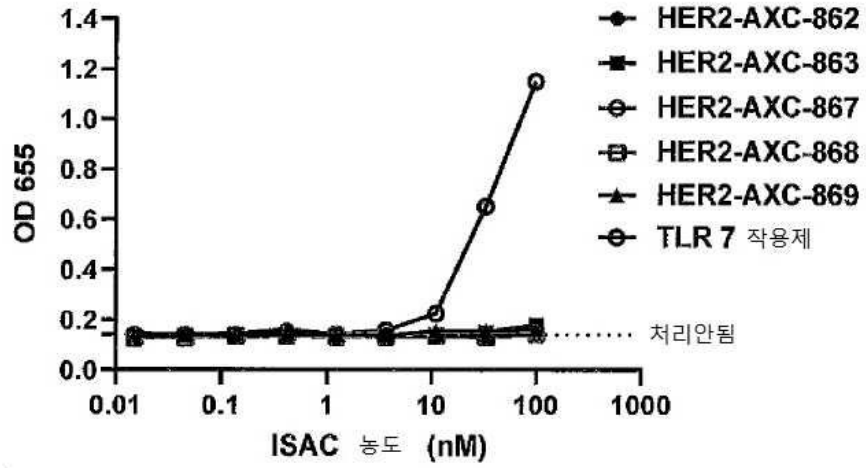
도면11a



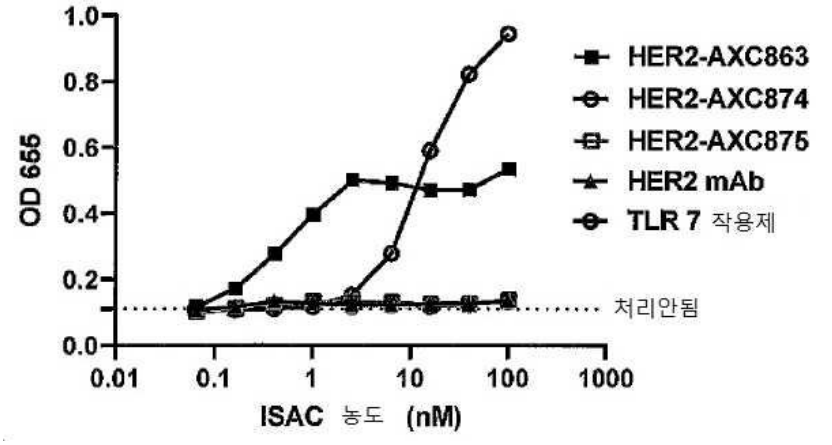
도면11b



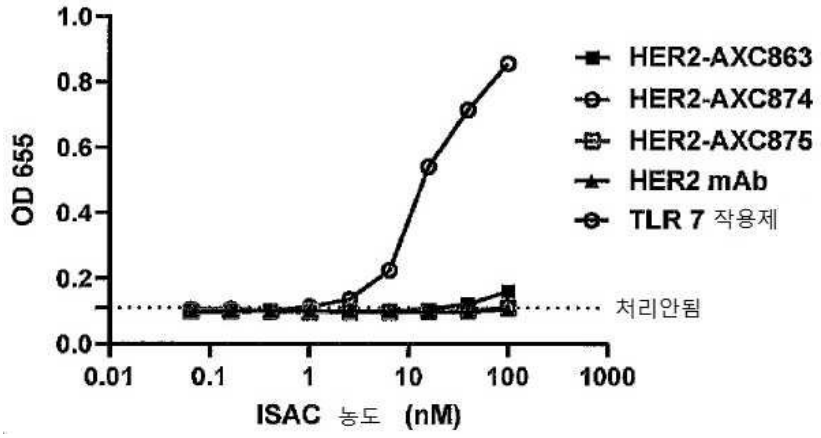
도면11c



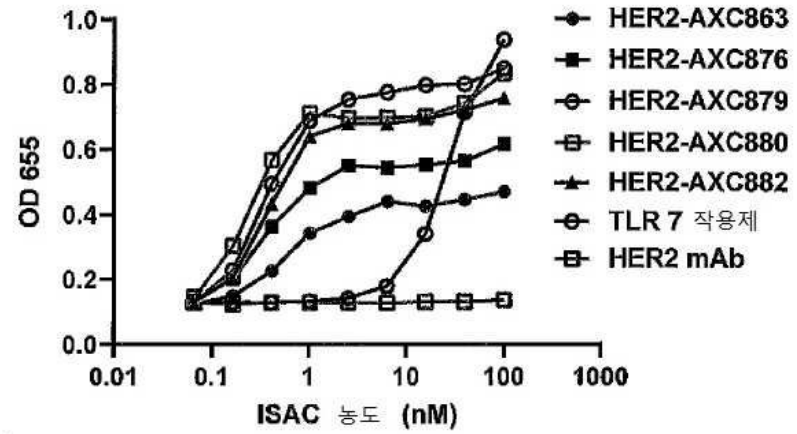
도면12a



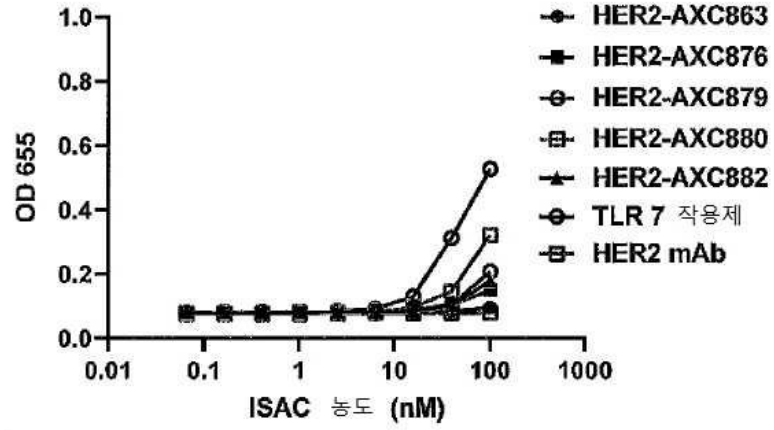
도면12b



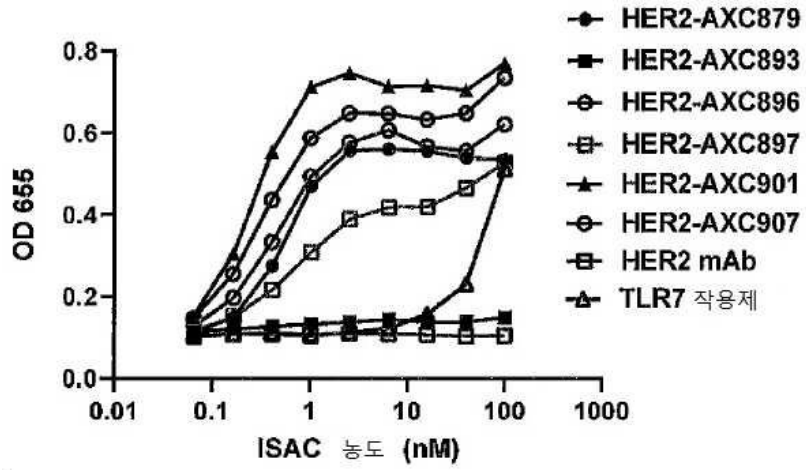
도면13a



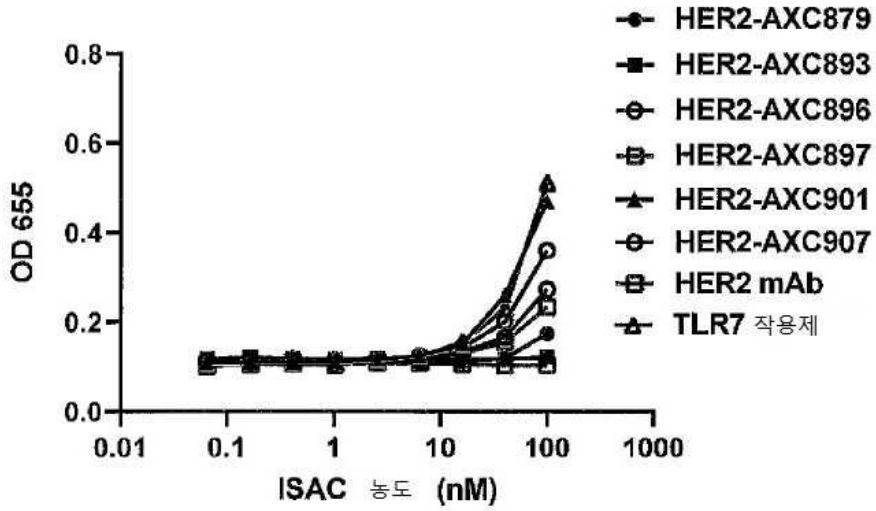
도면13b



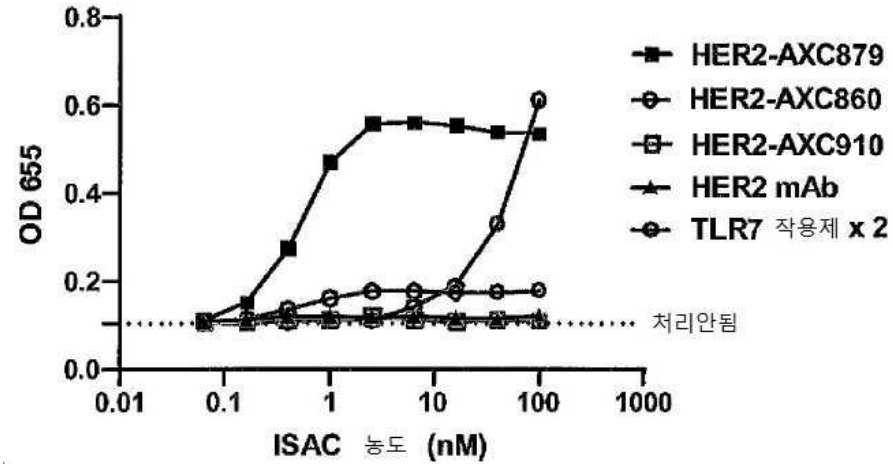
도면14a



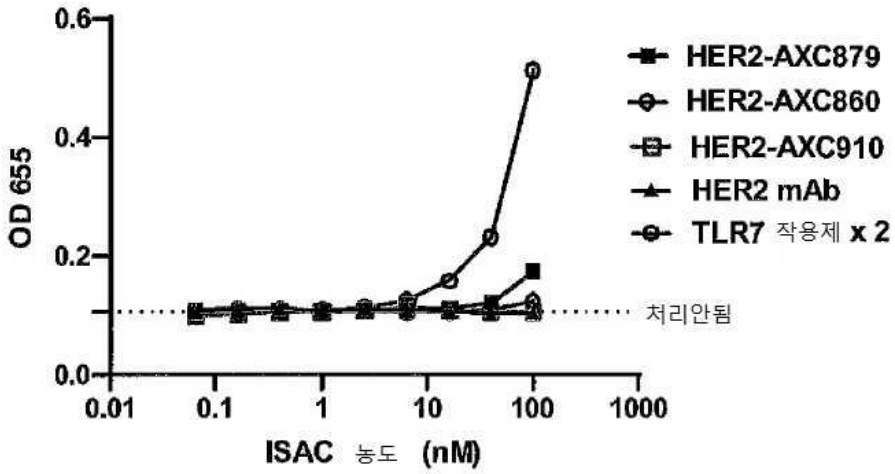
도면14b



도면15a



도면15b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Ambrx, Inc.

<120> COMPOSITIONS CONTAINING, METHODS AND USES OF ANTIBODY-TLR AGONIST CONJUGATES

<130> AMBX-0230.00PCT

<150> 62/804,742

<151> 2019-02-12

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain wild type

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain A114 mutation

<220><221> misc_feature

<222> (121)..(121)

<223> Xaa = non-natural amino acid

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

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

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain wild type

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain V110 mutation

<220><221> misc_feature

<222> (110)..(110)

<223> Xaa = non-natural amino acid

<

400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Xaa Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain A112 mutation

<220><221> misc_feature

<222> (112)..(112)

<223> Xaa = non-natural amino acid

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Xaa
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Light Chain S114 mutation
<220><221> misc_feature
<222> (114)..(114)
<223> Xaa = non-natural amino acid
<400> 6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Xaa Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain S121 mutation

<220><221> misc_feature

<222> (121)..(121)

<223> Xaa = non-natural amino acid

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Xaa Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 8
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Light Chain S127 mutation
<220><221> misc_feature
<222> (127)..(127)
<223> Xaa = non-natural amino acid
<
400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Light Chain K149 mutation
<220><221> misc_feature
<222> (149)..(149)
<223> Xaa = non-natural amino acid
<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Xaa Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain S156 mutation

<220><221> misc_feature

<222> (156)..(156)

<223> Xaa = non-natural amino acid

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Xaa Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain S168 mutation

<220><221> misc_feature

<222> (168)..(168)

<223> Xaa = non-natural amino acid

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Xaa Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Light Chain S202 mutation
<220><221> misc_feature
<222> (202)..(202)
<223> Xaa = non-natural amino acid

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Xaa Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Light Chain V205 mutation
<220><221> misc_feature
<222> (205)..(205)
<223> Xaa = non-natural amino acid
<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Xaa Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210