(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0074897
(43) 공개일자 2022년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 207/40 (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)
A61K 47/60 (2017.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 207/40 (2013.01)
A61K 47/545 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2022-7012420
(22) 출원일자(국제) 2020년09월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년04월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/053572
(87) 국제공개번호 WO 2021/067458
국제공개일자 2021년04월08일
(30) 우선권주장
62/908,435 2019년09월30일 미국(US)

(71) 출원인
베이징 슈안이 파마사이언시스 컴퍼니, 리미티드
중국 101113 베이징 통저우 디스트릭트 광위안 웨스트 스트리트 빌딩 비2 넘버 13
(72) 발명자
송, 윈타오
미국 94306 캘리포니아주 팔로 알토 웰스버리 웨이 620
리, 후이
미국 95051 캘리포니아주 산타 클라라 애머시스트 드라이브 2576
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 131 항

(54) 발명의 명칭 **단백질-거대분자 접합체 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 본 명세서에 정의된 바와 같은 단백질-거대분자 접합체, 방출 가능한 링커 및 거대분자를 제공한다. 개시된 접합체는 적어도 링커의 특성 및 링커-거대분자 모이어티의 수에 기초한 고유한 특성을 제공한다. 본 명세서에는 또한 접합체의 합성 방법 및 질환 및 장애의 치료에서의 접합체의 용도가 제공된다

대 표 도 - 도1

```
1     ATGCCAACCTCCTCCTCTACCAAGAAAACTCAACTGCAACTGGAACACCTGCTGCTGGAT
1      M  P  T  S  S  S  T  K  K  T  Q  L  Q  L  E  H  L  L  L  D

61    CTGCAAATGATTCTGAACGGCATTAACAACTACAAGAACCCGAAACTGACCCGTATGCTG
21     L  Q  M  I  L  N  G  I  N  N  Y  K  N  P  K  L  T  R  M  L

121   ACCTTCAAATTCTATATGCCGAAGAAAGCTACCGAACTGAAACACCTGCAATGCCTGGAA
41     T  F  K  F  Y  M  P  K  K  A  T  E  L  K  H  L  Q  C  L  E

181   GAGGAGCTGAAACCGCTGGAGGAGGTTCTGAACCTGGCTCAGAGCAAGAACTTTCATCTG
61     E  E  L  K  P  L  E  E  V  L  N  L  A  Q  S  K  N  F  H  L

241   CGTCCACGTGACCTGATTTCCAACATCAACGTTATCGTTCTGGAACTGAAAGGTAGCGAA
81     R  P  R  D  L  I  S  N  I  N  V  I  V  L  E  L  K  G  S  E

301   ACCACTTTCATGTGCGAGTACGCTGACGAAACCGCTACCATCGTTGAATTTCTGAACCGC
       T  T  F  M  C  E  Y  A  D  E  T  A  T  I  V  E  F  L  N  R
101
361   TGGATCACCTTCTCTCAGTCCATTATCTCTACTCTGACCTAA ( 서열번호 2)
121    W  I  T  F  S  Q  S  I  I  S  T  L  T  *  ( 서열번호 3)
```

서열번호1:

PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA

TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE

TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT

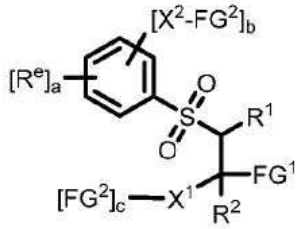
(52) CPC특허분류
A61K 47/60 (2017.08)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
(72) 발명자
조우, 하이핑
중국 101113 베이징 퉁저우 디스트릭트 광위안 웨스트 스트리트 넘버 13 베이징 슈안이 파마사이언시스 컴퍼니, 리미티드 내
랴오, 추안
중국 101113 베이징 퉁저우 디스트릭트 광위안 웨스트 스트리트 넘버 13 베이징 슈안이 파마사이언시스 컴퍼니, 리미티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 (I)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 갖는 방출 가능한 링커(releasable linker):



(I)

식 중,

X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기(electron altering group)이고;

a는 0 내지 4의 정수이고;

b는 1 내지 3의 정수이고;

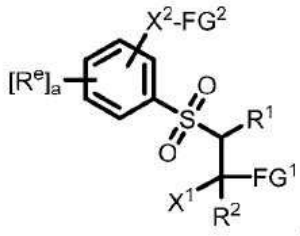
c는 0 내지 1의 정수이며;

FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

FG^2는 클릭 화학(click chemistry)을 통해서 반응할 수 있는 작용기이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 하기 화학식 (I-B)에 따른 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:



(I-B)

청구항 3

제2항에 있어서,

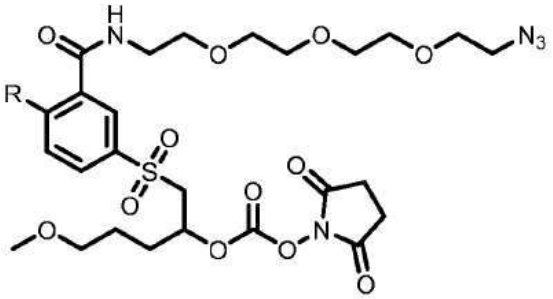
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 방출 가능한 링커.

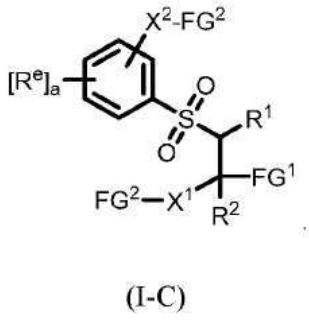
청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:



청구항 5

제1항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 하기 화학식 (I-C)에 따른 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:



청구항 6

제5항에 있어서,

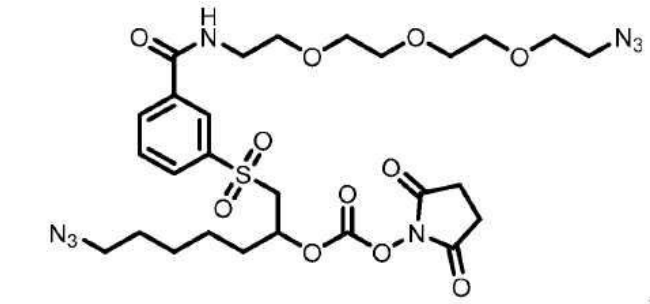
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 방출 가능한 링커.

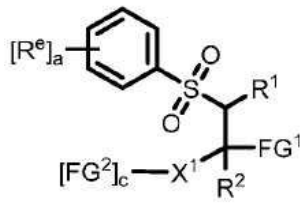
청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:



청구항 8

하기 화학식 (XVIII)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 갖는 방출 가능한 링커:



(XVIII)

식 중,

X^1은 스페이서 모이어티이고;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기이고;

a는 0 내지 4의 정수이고;

c는 2이고;

FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

FG^2는 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이다.

청구항 9

제8항에 있어서,

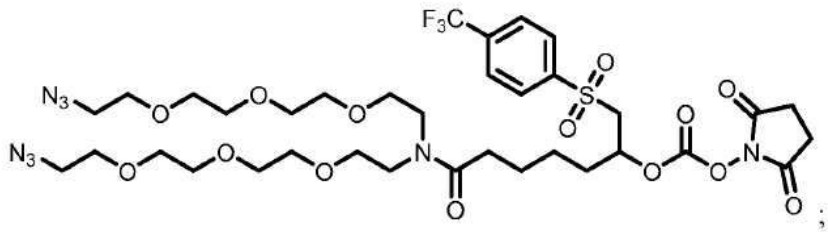
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

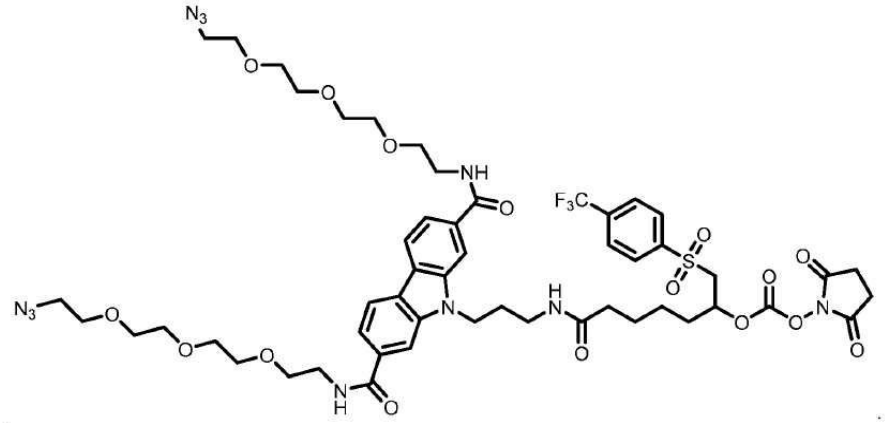
R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 방출 가능한 링커.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:

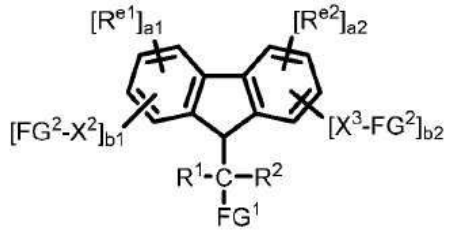


; 또는



청구항 11

하기 화학식 (II)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 갖는 방출 가능한 링커:



(II)

식 중,

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

FG^2는 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이다.

청구항 12

제11항에 있어서,

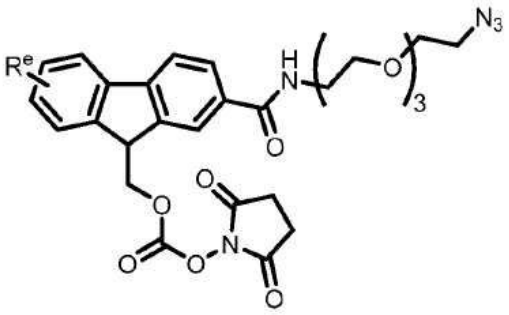
a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 방출 가능한 링커.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 하기 화학식 (II-A)에 따른 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:

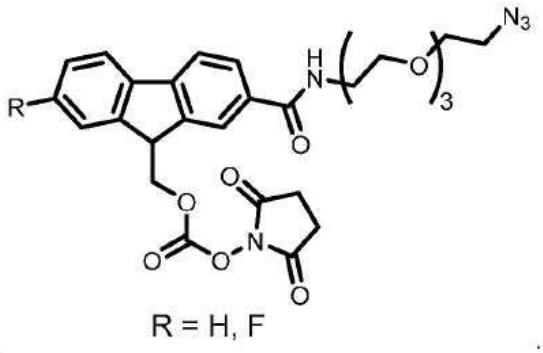


(II-A)

식 중, R^e는 수소 또는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기이다.

청구항 14

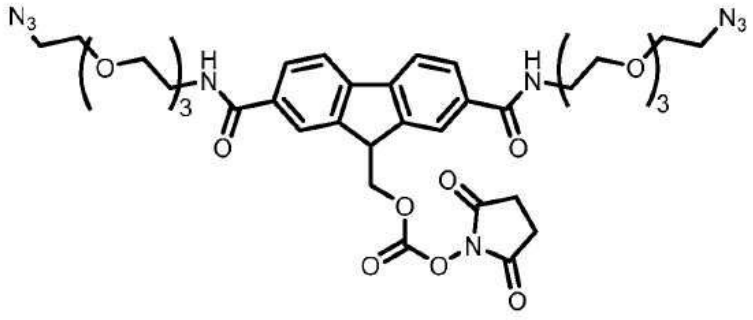
제13항에 있어서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:



R = H, F

청구항 15

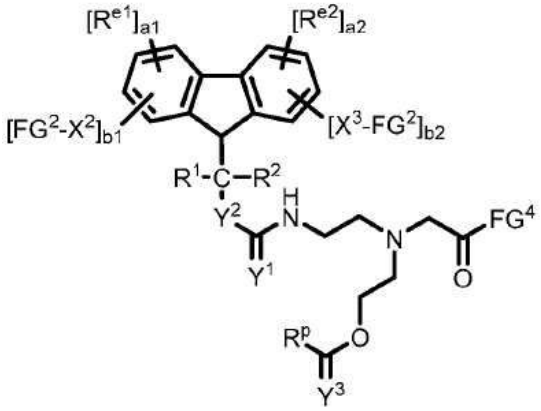
제12항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 하기 화학식 (II-B)에 따른 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:



(II-B)

청구항 16

하기 화학식 (III)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 갖는 방출 가능한 링커:



(III)

식 중,

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^p는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

Y^3은 O 또는 S이며;

FG^4는 활성제의 아미노기와 반응하여 아마이드 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

FG^2는 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이다.

청구항 17

제16항에 있어서,

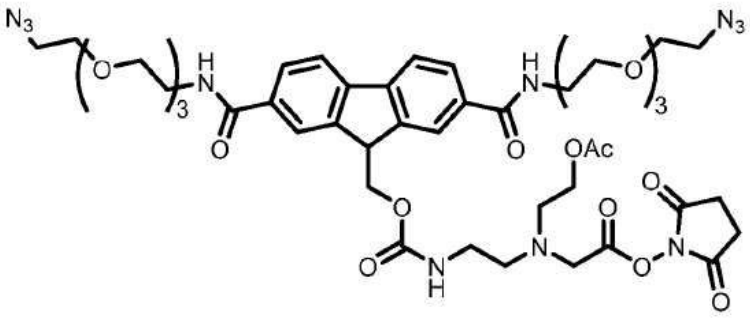
a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 방출 가능한 링커.

청구항 18

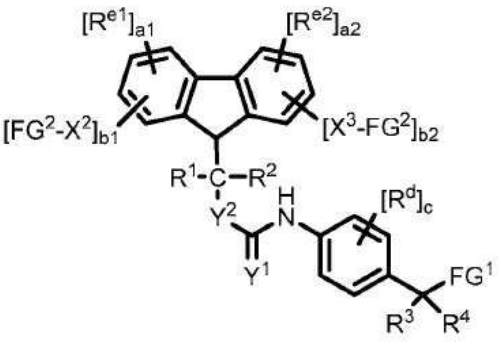
제17항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 하기 화학식 (III-A)에 따른 구조를 갖는, 방출 가능한 링커:



(III-A)

청구항 19

하기 화학식 (IV)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 갖는 방출 가능한 링커:



(IV)

식 중,

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

c는 0 내지 4의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

FG^2는 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이다.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 카바메이트 링키지를 형성할 수 있는 작용기인, 방출 가능한 링커.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, FG^2는 아자이드, 알킨일 또는 사이클로알킨일기인, 방출 가능한 링커.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이클로알킨일기는 다이벤조사이클로옥틴(DBCO)인, 방출 가능한 링커.

청구항 23

적어도 하나의 링커에 공유 부착된 단백질을 포함하는 접합체로서; 상기 접합체는 하기 화학식 (XIX)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 위치이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이의 전구약물을 포함하는, 접합체:

단백질-$(L)_z$

(XIX)

식 중,

z는 1 내지 25의 정수이며;

L은 링커이고;

단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

청구항 24

제23항에 있어서, 적어도 하나의 링커는 방출 가능한 링커인, 접합체.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 방출 가능한 링커인, 접합체.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 링커는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기에 공유 부착된, 접합체.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 잔기는 라이신인, 접합체.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 링커가 상기 단백질에 부착된, 접합체.

청구항 29

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항의 접합체의 혼합물을 포함하는 조성물.

청구항 30

접합체로서, 단백질, 적어도 하나의 링커 및 적어도 하나의 수용해성 중합체를 포함하되, 상기 단백질은 링커를 통해 각각의 수용해성 중합체에 공유 부착되고, 상기 수용해성 중합체는 직선형 또는 분지형인, 접합체.

청구항 31

제30항에 있어서, 2개 이상의 링커를 포함하는 접합체.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 2개 이상의 링커는 적어도 하나의 방출 가능하지 않은 링커를 포함하는, 접합체.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 상기 2개 이상의 링커는 적어도 하나의 방출 가능한 링커를 포함하는, 접합체.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개 이상의 링커는 적어도 하나의 방출 가능한 링커 및 적어도 하나의 방출 가능하지 않은 링커를 포함하는, 접합체.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개 이상의 링커는 1 내지 8개의 방출 가능한 링커 및 1 내지 2개의 방출 가능하지 않은 링커를 포함하는, 접합체.

청구항 36

제30항에 있어서, 적어도 하나의 링커는 방출 가능한 링커인, 접합체.

청구항 37

제30항 또는 제36항에 있어서, 링커 각각은 방출 가능한 링커인, 접합체.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 방출 가능한 링커인, 접합체.

청구항 39

제30항에 있어서, 상기 적어도 하나의 링커는 방출 가능하지 않은 링커를 포함하는, 접합체.

청구항 40

제30항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용해성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)의 중합체인, 접합체.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜)은 하이드록시, 알콕시, 치환된 알콕시, 알켄옥시, 치환된 알켄옥시, 알킨옥시, 치환된 알킨옥시, 아릴옥시 및 치환된 아릴옥시로 이루어진 군으로부터 선택된 단부-캡핑 모이어티로 말단 캡핑된, 접합체.

청구항 42

제30항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용해성 중합체는 약 500달톤 내지 약 100,000달톤 범위의 중량-평균 분자량을 갖는, 접합체.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 수용해성 중합체는 약 500달톤 내지 20,000달톤 미만 범위의 중량-평균 분자량을 갖는, 접합체.

청구항 44

제42항에 있어서, 상기 수용해성 중합체는 약 20,000달톤 내지 85,000달톤 미만 범위의 중량-평균 분자량을 갖는, 접합체.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 수용해성 중합체는 약 85,000달톤 내지 약 100,000달톤 범위의 중량-평균 분자량을 갖는, 접합체.

청구항 46

제30항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 상기 링커를 통해 상기 단백질 내의 잔기의 아민기에서 공유 부착된, 접합체.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 잔기는 라이신인, 접합체.

청구항 48

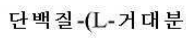
제30항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 수용해성 중합체가 하나 이상의 링커를 통해 상기 단백질에 부착된, 접합체.

청구항 49

제30항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 8개 이상의 수용해성 중합체가 8개 이상의 링커를 통해 상기 단백질에 부착된, 접합체.

청구항 50

제30항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XX)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 위치이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이의 전구약물을 포함하는, 접합체:



(XX)

식 중,

z는 1 내지 25의 정수이며;

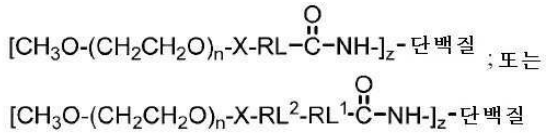
L은 링커이고;

단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이고;

거대분자는 수용해성 중합체, 지질, 단백질 또는 폴리펩타이드이다.

청구항 51

제30항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



식 중,

n은 2 내지 4000의 값을 갖는 정수이고;

X는 스페이서 모이어티이며;

RL, RL^1 및 RL^2는 독립적으로 방출 가능한 링커이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

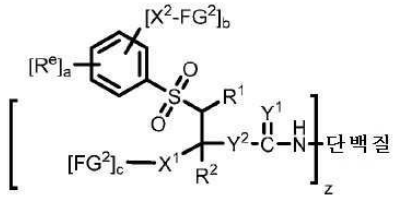
-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 52

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항의 접합체의 혼합물을 포함하는 조성물.

청구항 53

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VII)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(VII)

식 중,

X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

X^2는, 존재하는 경우, 제2 스페이서 모이어티이며;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기)이고;

a는 0 내지 5의 정수이고;

b는 0 내지 3의 정수이고;

c는 0 내지 2의 정수이며;

z는 1 내지 25의 정수이며;

Y^1은 O 또는 S이며;

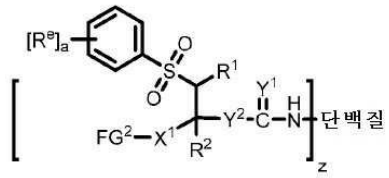
Y^2는 O 또는 S이고;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VII-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(VII-A)

.

청구항 55

제54항에 있어서,

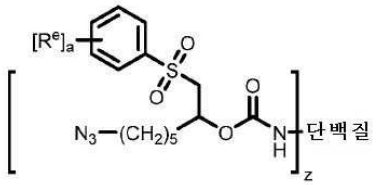
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VII-A1)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:

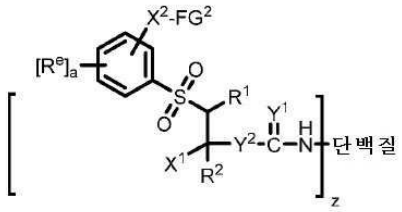


(VII-A1)

식 중, a는 1 내지 2의 정수이고; R^e는 4-F, 4-Cl, $4-CF_3$, 2,4-다이플루오로 또는 $2-CF_3-4-F$ 치환이다.

청구항 57

제53항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VII-B)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(VII-B)

.

청구항 58

제57항에 있어서,

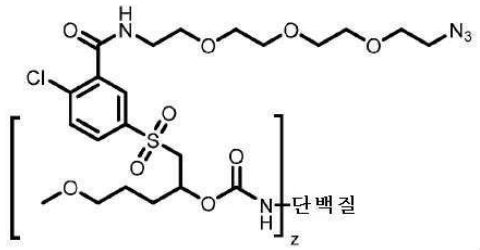
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

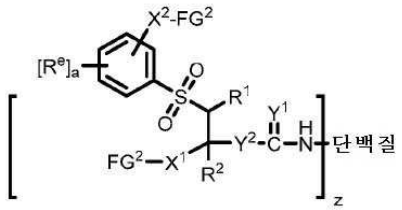
청구항 59

제58항에 있어서, 상기 접합체는 하기 구조를 갖는, 접합체:



청구항 60

제53항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VII-C)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(VII-C)

청구항 61

제60항에 있어서,

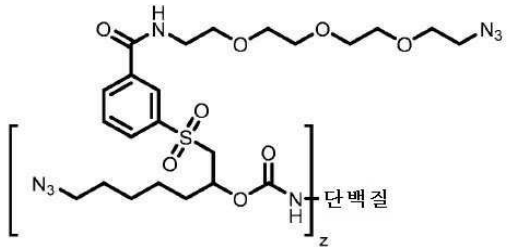
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

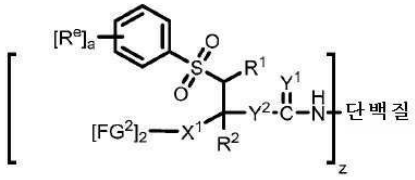
청구항 62

제61항에 있어서, 상기 접합체는 하기 구조를 갖는, 접합체:



청구항 63

제53항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VII-D)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(VII-D)

.

청구항 64

제63항에 있어서,

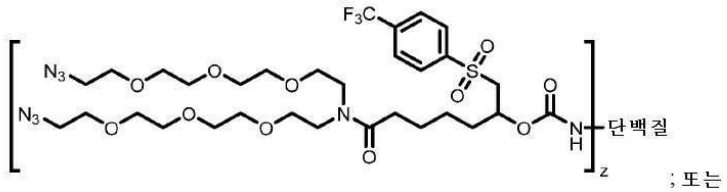
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

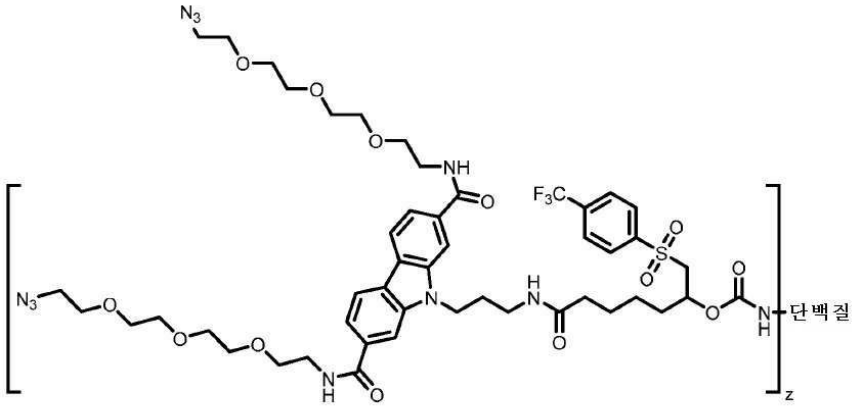
R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 접합체는 하기 구조를 갖는, 접합체:



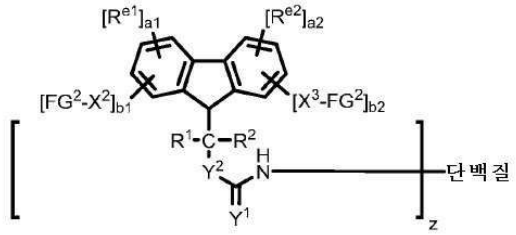
;또는



.

청구항 66

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VIII)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(VIII)

식 중,

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는 , 존재하는 경우,제2 전자 변경기이고;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 67

제66항에 있어서,

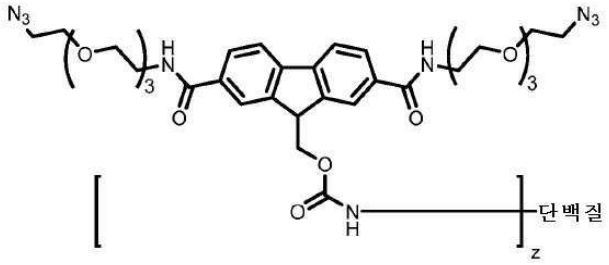
a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 68

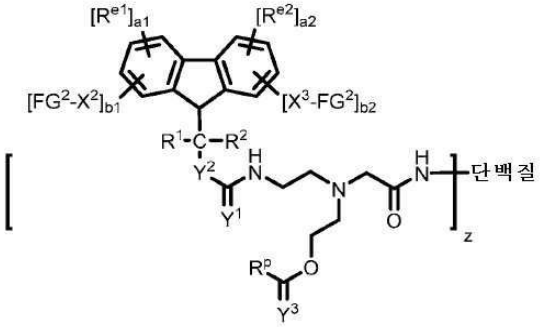
제67항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (VIII-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(VIII-A).

청구항 69

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (IX)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(IX)

식 중,

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^p는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

Y^3은 O 또는 S이며;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 70

제69항에 있어서,

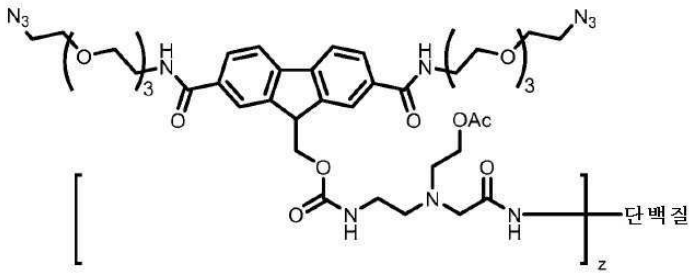
a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (IX-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:

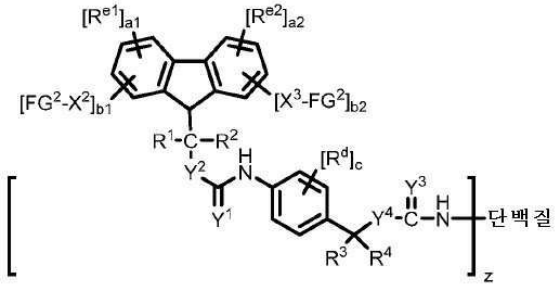


(IX-A)

.

청구항 72

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (X)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(X)

식 중,

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

c는 0 내지 4의 정수이며;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^{d}는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

X^{2}는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^{3}은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

Y^{1}은 O 또는 S이며;

Y^{2}는 O 또는 S이고;

Y^{3}은 O 또는 S이며;

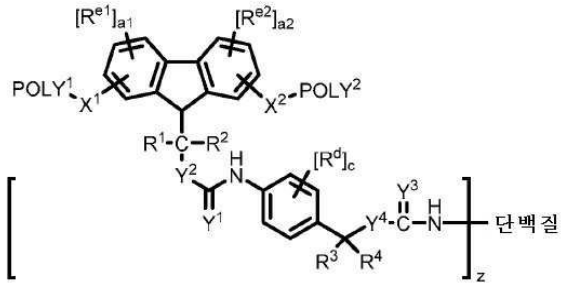
Y^{4}는 O 또는 S이고;

FG^{2}는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 73

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XI)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XI)

식 중,

$POLY^{1}$은 제1 수용해성 중합체이고;

$POLY^{2}$는 제2 수용해성 중합체이고;

X^{1}은 제1 스페이서 모이어티이고;

X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

Y^3은 O 또는 S이며;

Y^4는 O 또는 S이고;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1은 0 내지 3의 정수이고;

a2는 0 내지 3의 정수이고;

c는 0 내지 4의 정수이며;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

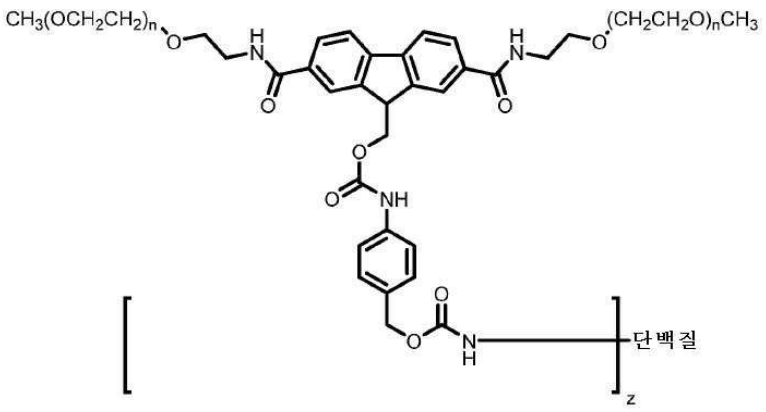
R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XI-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:

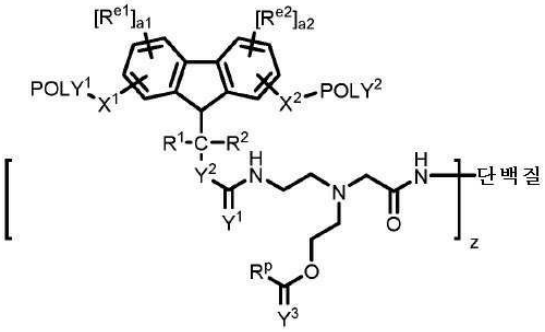


(XI-A)

식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이다.

청구항 75

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XII)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XII)

식 중,

$POLY^1$은 제1 수용해성 중합체이고;

$POLY^2$는 제2 수용해성 중합체이고;

X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

Y^3은 O 또는 S이며;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1은 0 내지 3의 정수이고;

a2는 0 내지 3의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

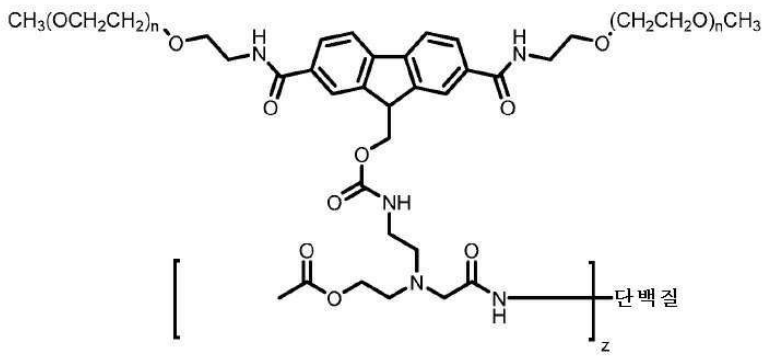
R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^p는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XII-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:

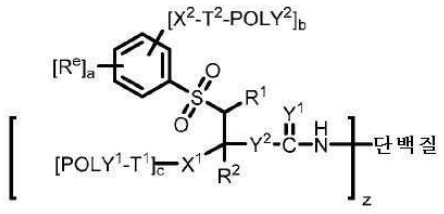


(XII-A)

식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이다.

청구항 77

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII)

식 중,

$POLY^1$은 제1 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

$POLY^2$는 제2 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

X^1은 제1 스페이서 모이어티; 또는 $-X-FG^2$이고;

X^2는, 존재하는 경우, 제2 스페이서 모이어티이며;

T^1은 제1 트라이아졸 작용기이고;

T^2는 제2 트라이아졸 작용기이고;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된

아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기; 및 -X-FG^2이고;

X는 스페이서 모이어티이며;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

a는 0 내지 5의 정수이고;

b는 0 내지 3의 정수이고;

c는 0 내지 2의 정수이며;

z는 1 내지 25의 정수이며;

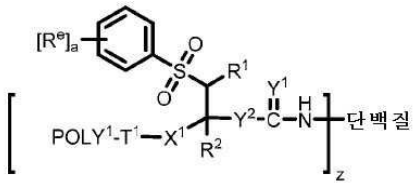
Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-A)

.

청구항 79

제78항에 있어서,

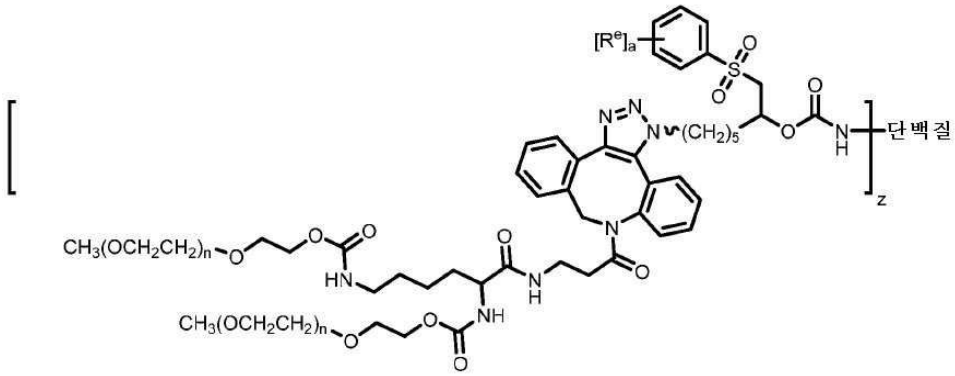
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-A1)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-A1)

식 중,

a는 1 내지 2의 정수이고;

R^e는 4-F, 4-Cl, 4-CF_3, 2,4-다이플루오로 또는 2-CF_3-4-F 치환이며;

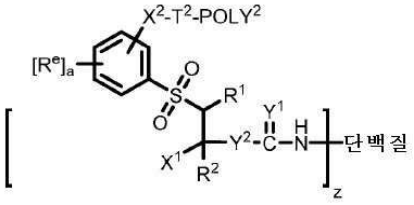
n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 81

제77항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-B)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-B)

.

청구항 82

제81항에 있어서,

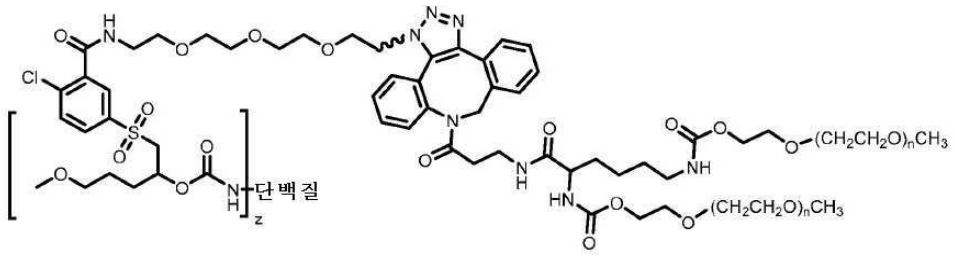
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, -CF_3, -CONHMe, -SO_2NHMe, -OMe, -NHMe, -NHAc, -$NHSO_2$Me 또는 -OCF_3인, 접합체.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-B1)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-B1)

식 중,

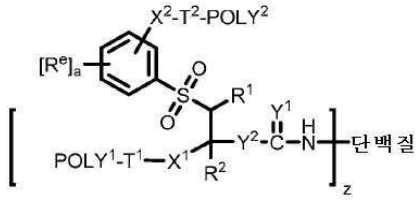
n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 84

제77항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-C)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-C)

.

청구항 85

제84항에 있어서,

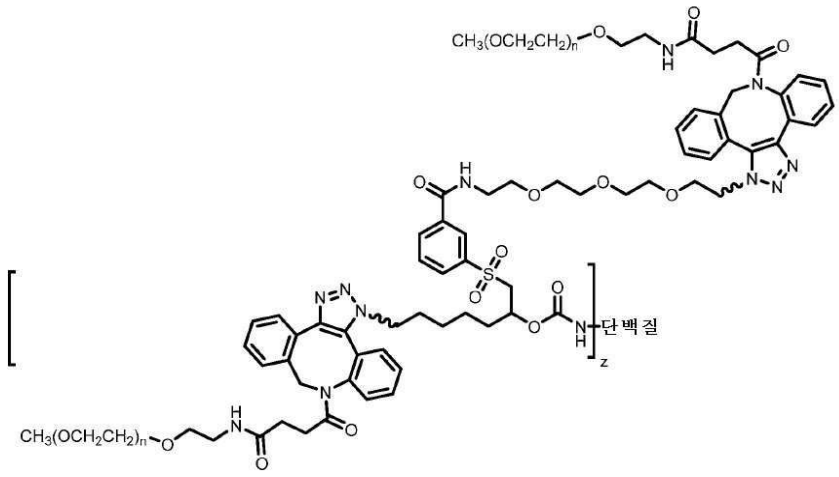
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-C1)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-C1)

식 중,

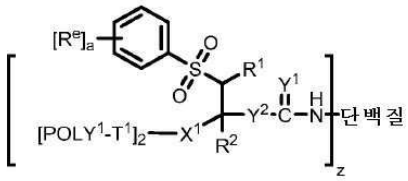
n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 87

제77항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-D)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-D)

.

청구항 88

제87항에 있어서,

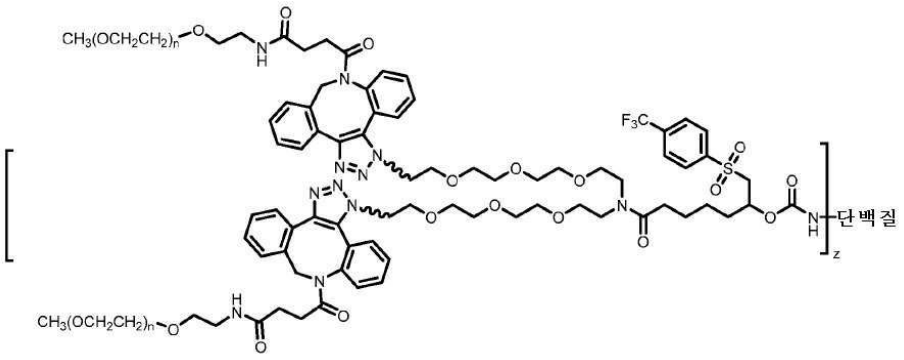
a는 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

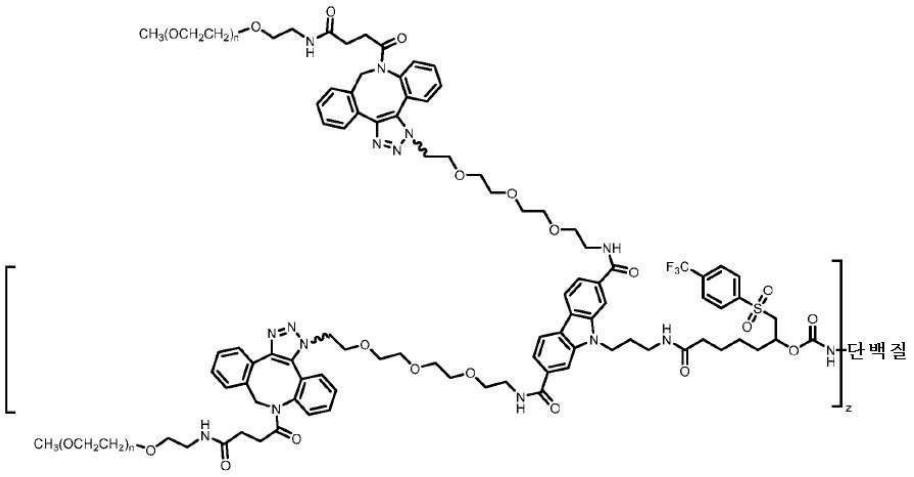
R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIII-D1) 또는 (XIII-D2)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIII-D1); 또는



(XIII-D2)

식 중,

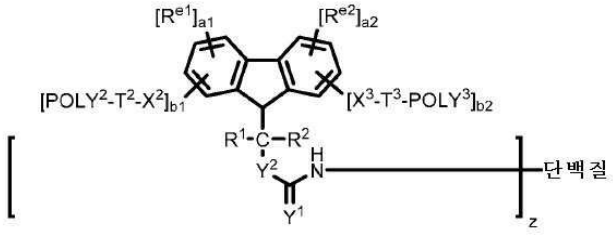
n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 90

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIV)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIV)

식 중,

$POLY^2$는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

$POLY^3$은 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기; 또는 $-X-FG^2$이고;

X는 스페이서 모이어티이며;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

T^2는 트라이아졸 작용기이고;

T^3은 트라이아졸 작용기이고;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 91

제90항에 있어서,

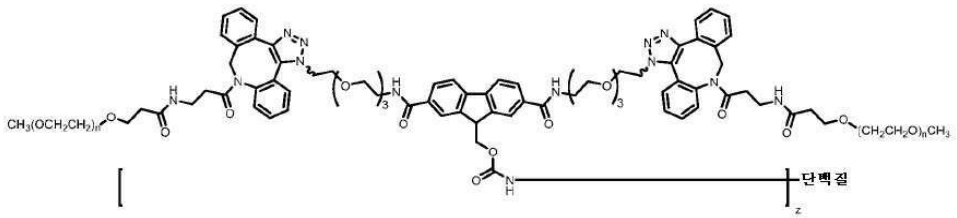
a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XIV-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XIV-A)

식 중,

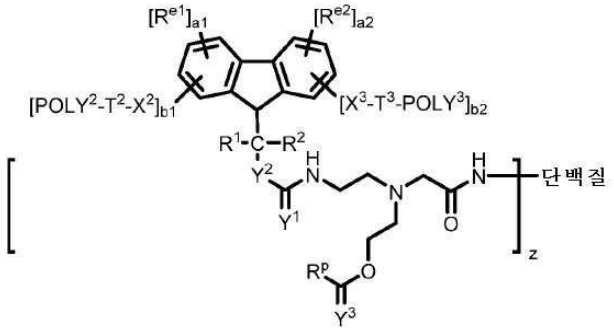
n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 93

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XV)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XV)

식 중,

$POLY^2$는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

$POLY^3$은 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기; 또는 $-X-FG^2$이고;

X는 스페이서 모이어티이며;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

R^p는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

T^2는 트라이아졸 작용기이고;

T^3은 트라이아졸 작용기이고;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

Y^3은 O 또는 S이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 94

제93항에 있어서,

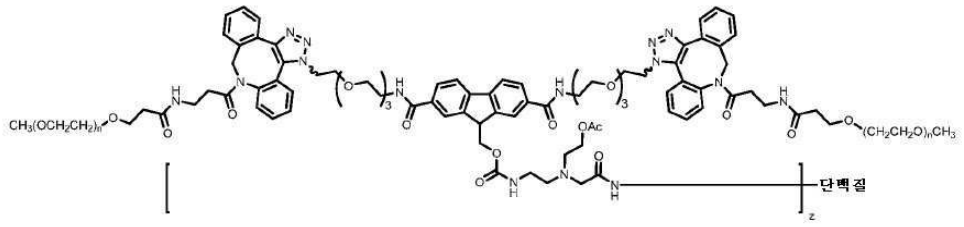
a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고;

R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며;

R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$인, 접합체.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XV-A)에 따른 구조를 포함하는, 접합체:



(XV-A)

식 중,

n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고;

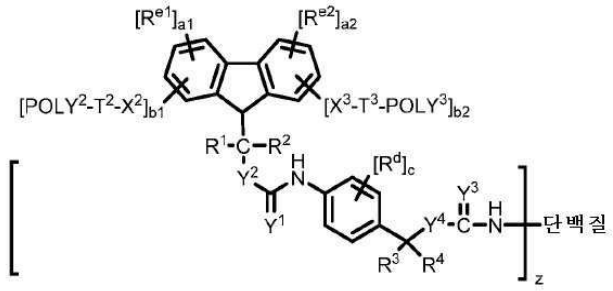
z는 1 내지 25의 정수이며;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 96

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XVI)에 따른 구조를 포함하는, 접합

체:



(XVI)

식 중,

$POLY^2$는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

$POLY^3$은 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

b1은 1이며;

b2는 0 내지 1의 정수이고;

c는 0 내지 4의 정수이며;

z는 1 내지 25의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기; 또는 $-X-FG^2$이고;

X는 스페이서 모이어티이며;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

T^2는 트라이아졸 작용기이고;

T^3은 트라이아졸 작용기이고;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

Y^3은 O 또는 S이며;

Y^4는 O 또는 S이고;

-NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

청구항 97

제53항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이클로알킨일은 다이벤조사이클로옥틴(DBCO)인, 접합체.

청구항 98

제23항 내지 제28항, 제30항 내지 제51항 및 제53항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드인, 접합체.

청구항 99

제98항에 있어서, 상기 사이토카인은 GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-ɣ, MIP-1α, MIP-1β, TGF-β, TNF-α 또는 TNF-β인, 접합체.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-2인, 접합체.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 IL-2는 서열번호 1과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 포함하는, 접합체.

청구항 102

제98항에 있어서, 상기 케모카인은 MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-24, MCP-5, CXCL76, I-309(CCL1), BCA1(CXCL13), MIG, SDF-1/PBSF, IP-10, I-TAC, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, 에오탁신(eotaxin)-1, 에오탁신-2, GCP-2, Gro-α, Gro-β, Gro-ɣ, LARC(CCL20), ELC(CCL19), SLC(CCL21), ENA-78, PBP, TECK(CCL25), CTACK(CCL27), MEC, XCL1, XCL2, HCC-1, HCC-2, HCC-3 또는 HCC-4인, 접합체.

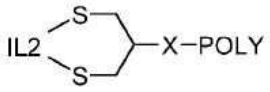
청구항 103

제98항에 있어서, 상기 항체는 앤지오포이에틴 2, AXL, ACVR2B, 앤지오포이에틴 3, 액티빈 수용체-유사 키나제 1, 아밀로이드 A 단백질, β-아밀로이드, AOC3, BAFF, BAFF-R, B7-H3, BCMAC, A-125(이미테이션(imitation)), C5, CA-125, CCL11(에오탁신-1), CEA, CSF1R, CD2, CD3, CD4, CD6, CD15, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD54, CD56, CD70, CD74, CD97B, CD125, D134, CD147, CD152, CD154, CD279, CD221, C242 항원, CD276, CD278, CD319, 클로스트리디엄 디피실, 클라우딘 18 아이소폼 2, CSF1R, CEACAM5, CSF2, 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 9, CLDN18.2, 심장 마이오신, CCR4, CGRP, 응고 인자 III, c-Met, CTLA-4, DPP4, DR5, DLL3, DLL4, 다비가트란(dabigatran), EpCAM, 에볼라 바이러스 당단백질, 엔도글린, 에피시알린, EPHA3, c-Met, FGFR2, 피브린 II 베타 쇄, FGF 23, 폴레이트 수용체 1, GMCSF, GD2 강글리오사이드, GDF-8, GCGR, 젤라티나제 B, 글리피칸 3, GPNMB, GMCSF 수용체 α-쇄, 칼리크레인, KIR2D, ICAM-1, ICOS, IGF1, IGF2, IGF-1 수용체, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4Rα, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-9, IL-12, IL-13, IL17A, IL17F, IL-20, IL-22, IL-23, IL-31, IFN-α, IFN- β, IFN-ɣ, 인테그린 α4β7, 인터페론 α/β 수용체, 인플루엔자 A 헤마글루티닌, ILGF2, HER1, HER2, HER3, HHGFR, HGF, HLA-DR, B형 간염 표면 항원, HNGF, Hsp90, HGFR, L-셀렉틴, 루이스-Y 항원, LYPD3, LOXL2, LIV-1, MUC1, MCP-1, MSLN, 메소텔린, MIF, MCAM, NCA-90, NCA-90노치 1, 넥틴-4, PCDP1, PD-L1, PD-1, PCSK9, PTK7, PCDC1, 포스파티딜세린, RANKL, RTN4, 레서스 인자(Rhesus factor), ROR1, SLAMF7, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 알파 독소, 스타필로코커스 아우레우스 2성분 류코시딘, SOST, 셀렉틴 P, SLITRK6,

SDC1, TFPI, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, TNF-α, TWEAK 수용체, TNFRSF8, TYRP1, 타우 단백질, TAG-72, TSLP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TGF-β, TAG-72, TRAP, TIGIT, 테나신 C, OX-40, VEGF-A, VWF, VEGFR1 또는 VEGFR2 중 하나 이상을 표적으로 하는, 접합체.

청구항 104

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 하기 화학식 (XVII)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물, 위치이성질체 또는 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이의 전구약물을 포함하는, 접합체:



(XVII)

식 중,

X는 스페이서 모이어티이며;

POLY는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

"-S-"는 상기 IL-2 모이어티 내의 잔기의 황기이다.

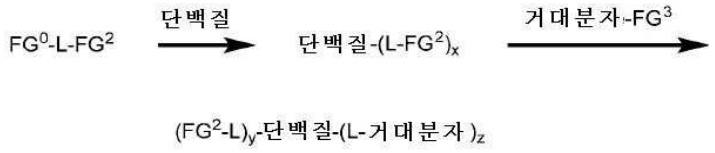
청구항 105

제104항에 있어서, 상기 수용해성 중합체는 중합체 폴리(에틸렌 글리콜)인, 접합체.

청구항 106

하기 반응식 (I)에 따른 단백질-거대분자 접합체의 제조 방법:

[반응식 I]



식 중, x는 1 내지 25의 정수이며;

y는 0 내지 24의 정수이며;

z는 1 내지 25의 정수이되, x = y + z이고;

L은 링커이고;

FG^0은 활성 단백질 작용제의 친핵성기와 반응하여 카바메이트 링키지, 티올 브릿지 등을 포함하는 링키지를 형성할 수 있는 작용기이며;

FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 FG^3과 반응할 수 있는 작용기이고;

FG^3은 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기로 이루어진 군으로부터 선택된 클릭 화학을 통해서 FG^2와 반응할 수 있는 작용기이고;

단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이고;

거대분자는 수용해성 중합체, 지질, 단백질 또는 폴리펩타이드이며; 이것은 하기 중 임의의 하나를 포함할 수 있다: 약 6 내지 약 26개 탄소 원자를 포함하는 지방산, 2-메타크릴로일-옥시에틸 포스포릴 콜린, 폴리(아크릴

산), 폴리(아크릴레이트), 폴리(아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일몰폴린), 폴리(알킬옥시) 중합체, 폴리(아마이드), 폴리(아미도아민), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(아스파트아마이드), 폴리(부티르산), 폴리(글리콜산), 폴리부틸렌 테레프탈레이트, 폴리(카프로락톤), 폴리(카보네이트), 폴리(사이아노아크릴레이트), 폴리(다이메틸아크릴아마이드), 폴리(에스터), 폴리(에틸렌), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸 포스페이트), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(글리콜산), 폴리(알파-하이드록시산), 폴리(하이드록시에틸 아크릴레이트), 폴리(하이드록시에틸옥사졸린), 폴리(하이드록시메타크릴레이트), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아마이드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(하이드록시프로필옥사졸린), 폴리(이미노카보네이트), 폴리(락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(메타크릴아마이드), 폴리(메타크릴레이트), 폴리(메틸옥사졸린), 폴리(오가노포스파젠), 폴리(오쏘 에스터), 폴리(옥사졸린), 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알코올), 폴리포스파젠, 폴리(프로필렌 글리콜), 폴리(당류), 폴리(실록산), 폴리(우레탄), 폴리(바이닐 알코올), 폴리(바이닐 아민), 폴리(바이닐메틸에터), 폴리(바이닐피롤리돈), 실리콘, 아밀로스, 셀룰로스, 카보메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 키틴, 키토산, 덱스트란, 덱스트린, 젤라틴, 히알루론산(HA) 및 유도체, 작용화된 히알루론산, 만난, 펙틴, 헤파린, 헤파란 설페이트(HS), 람노갈락투로난, 전분, 하이드록시알킬 전분, 하이드록시에틸 전분(HES), 폴리시알산(PSA) 및 다른 탄수화물계 중합체, 자일란 및 알부민의 공중합체, 트랜스페린, 트랜스티레틴, 면역글로불린, XTEN 펩타이드, 글리신-풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩타이드, 엘라스틴-유사 폴리펩타이드(ELP), CTP 펩타이드 또는 젤라틴-유사 단백질(GLK) 중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 중합체 중 하나.

청구항 107

제106항에 있어서, x 또는 z는 2 내지 25의 정수인, 제조 방법.

청구항 108

제106항에 있어서, x 또는 z는 3 내지 25의 정수인, 제조 방법.

청구항 109

제106항에 있어서, x 또는 z는 4 내지 25의 정수인, 제조 방법.

청구항 110

제106항에 있어서, x 또는 z는 5 내지 25의 정수인, 제조 방법.

청구항 111

제106항에 있어서, x 또는 z는 6 내지 25의 정수인, 제조 방법.

청구항 112

제106항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, L은 방출 가능한 링커인, 제조 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 방출 가능한 링커는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 방출 가능한 링커인, 제조 방법.

청구항 114

제106항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드인, 제조 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 사이토카인은 GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, MIP-1α, MIP-1β, TGF-β, TNF-α 또는 TNF-β인, 제조 방법.

청구항 116

제114항 또는 제115항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-2인, 제조 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 IL-2는 서열번호 1과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 포함하는, 제조 방법.

청구항 118

제114항에 있어서, 상기 케모카인은 MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-24, MCP-5, CXCL76, I-309(CCL1), BCA1(CXCL13), MIG, SDF-1/PBSF, IP-10, I-TAC, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, 에오탁신-1, 에오탁신-2, GCP-2, Gro-α, Gro-β, Gro-ɣ, LARC(CCL20), ELC(CCL19), SLC(CCL21), ENA-78, PBP, TECK(CCL25), CTACK(CCL27), MEC, XCL1, XCL2, HCC-1, HCC-2, HCC-3 또는 HCC-4인, 방법.

청구항 119

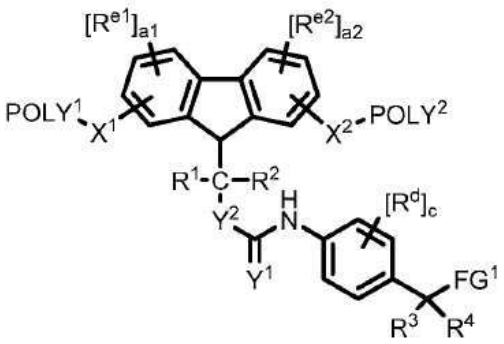
제114항에 있어서, 상기 항체는 앤지오포이에틴 2, AXL, ACVR2B, 앤지오포이에틴 3, 액티빈 수용체-유사 키나제 1, 아밀로이드 A 단백질, β-아밀로이드, AOC3, BAFF, BAFF-R, B7-H3, BCMAC, A-125(이미테이션), C5, CA-125, CCL11(에오탁신-1), CEA, CSF1R, CD2, CD3, CD4, CD6, CD15, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD54, CD56, CD70, CD74, CD97B, CD125, D134, CD147, CD152, CD154, CD279, CD221, C242 항원, CD276, CD278, CD319, 클로스트리디엄 디피실, 클라우딘 18 아이소폼 2, CSF1R, CEACAM5, CSF2, 탄산무수화효소 9, CLDN18.2, 심장 마이오신, CCR4, CGRP, 응고 인자 III, c-Met, CTLA-4, DPP4, DR5, DLL3, DLL4, 다비가트란, EpCAM, 에볼라바이러스 당단백질, 엔도글린, 에피시알린, EPHA3, c-Met, FGFR2, 피브린 II 베타 쇄, FGF 23, 폴레이트 수용체 1, GMCSF, GD2 강글리오사이드, GDF-8, GCGR, 젤라티나제 B, 글리피칸 3, GPNMB, GMCSF 수용체 α-쇄, 칼리크레인, KIR2D, ICAM-1, ICOS, IGF1, IGF2, IGF-1 수용체, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4Rα, IL-5, IL-6, IL-6 R, IL-9, IL-12, IL-13, IL17A, IL17F, IL-20, IL-22, IL-23, IL-31, IFN-α, IFN- β, IFN-ɣ, 인테그린 α4β7, 인터페론 α/β 수용체, 인플루엔자 A 헤마글루티닌, ILGF2, HER1, HER2, HER3, HHGFR, HGF, HLA-DR, B형 간염 표면 항원, HNGF, Hsp90, HGFR, L-셀렉틴, 루이스-Y 항원, LYPD3, LOXL2, LIV-1, MUC1, MCP-1, MSLN, 메소텔린, MIF, MCAM, NCA-90, NCA-90노치 1, 넥틴-4, PCDP1, PD-L1, PD-1, PCSK9, PTK7, PCDC1, 포스파티딜세린, RANKL, RTN4, 레서스 인자, ROR1, SLAMF7, 스타필로코커스 아우레우스 알파 독소, 스타필로코커스 아우레우스 2성분 류코시딘, SOST, 셀렉틴 P, SLITRK6, SDC1, TFPI, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, TNF-α, TWEAK 수용체, TNFRSF8, TYRP1, 타우 단백질, TAG-72, TSLP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TGF-β, TAG-72, TRAP, TIGIT, 테나신 C, OX-40, VEGF-A, VWF, VEGFR1 또는 VEGFR2 중 하나 이상을 표적으로 하는, 제조 방법.

청구항 120

제106항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이클로알킨일은 다이벤조사이클로옥틴(DBCO)인, 제조 방법.

청구항 121

중합체 시약으로서, 상기 중합체 시약은 하기 화학식 (V)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 갖는, 중합체 시약:



(V)

식 중,

$POLY^1$은 제1 수용해성 중합체이고;

$POLY^2$는 제2 수용해성 중합체이고;

X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1은 0 내지 3의 정수이고;

a2는 0 내지 3의 정수이고;

c는 0 내지 4의 정수이며;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

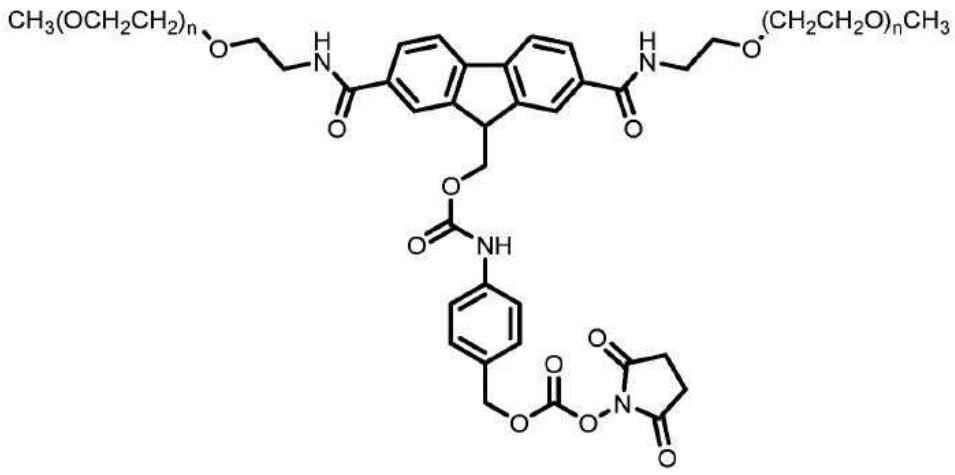
R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지, 예컨대, 카바메이트 링키지를 형성할 수 있는 작용기이다.

청구항 122

제121항에 있어서, 상기 중합체 시약은 하기 화학식 (V-A)에 따른 구조를 갖는, 중합체 시약:

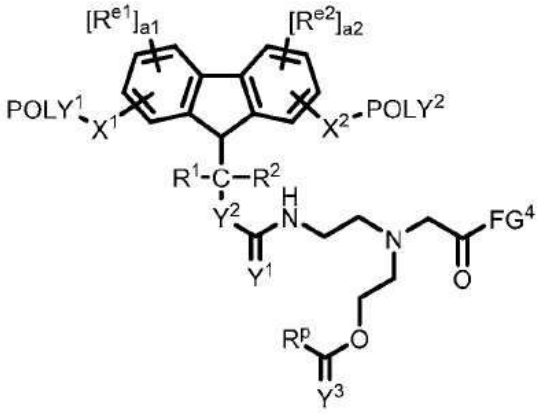


(V-A)

식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이다.

청구항 123

중합체 시약으로서, 상기 중합체 시약은 하기 화학식 (VI)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 갖는, 중합체 시약:



(VI)

식 중,

$POLY^1$은 제1 수용해성 중합체이고;

$POLY^2$는 제2 수용해성 중합체이고;

X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

Y^1은 O 또는 S이며;

Y^2는 O 또는 S이고;

Y^3은 O 또는 S이며;

R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

a1은 0 내지 3의 정수이고;

a2는 0 내지 3의 정수이고;

R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

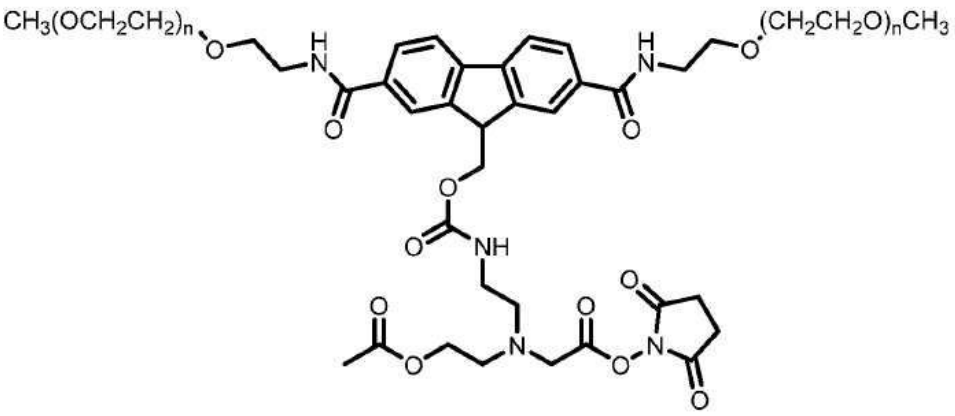
R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

R^p는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

FG^4는 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지, 예컨대, 아마이드 링키지를 형성할 수 있는 작용기이다.

청구항 124

제123항에 있어서, 상기 중합체 시약은 하기 화학식 (VI-A)에 따른 구조를 갖는, 중합체 시약:



(VI-A)

식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이다.

청구항 125

제23항 내지 제28항, 제30항 내지 제51항 및 제53항 내지 제105항 중 어느 한 항의 접합체 및 1종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 126

치료를 필요로 하는 대상체에게 제125항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 127

제126항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 암, 감염 또는 자가면역 질환의 치료를 위해서 투여되는, 치료 방법.

청구항 128

치료를 필요로 하는 대상체에게 다른 적합한 치료제와 조합하여 제125항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 129

제128항에 있어서, 상기 치료제는 항체인, 치료 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 항체는 항-종양 항원 항체인, 치료 방법.

청구항 131

제130항에 있어서, 상기 항-종양 항원 항체는 ADCC 기능을 통해 활성을 갖는, 치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제62/908,435호(출원일: 2019년 9월 30일)의 이익 및 우선권을 주장하며, 상기 기초출원은 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해서 전자적으로 제출되고, .txt 형식의 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함한다. .txt 파일은 2020년 9월 29일에 작성되고, 크기가 약 3.71킬로바이트인 "CSPL_008_01WO_SeqList_ST25.txt"라는 파일명의 서열 목록을 포함한다. 이 서열 목록은 이러한 .txt 파일에 포함되고, 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시내용은 이작용성 링커를 사용하여 단백질-거대분자 접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 개시내용은 생물학적 기능을 갖는 단백질을 전달하는 데 있어서 약동학을 제어하도록 설계된 신규한 접합체에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 목적하는 단백질 방출 속도를 갖는 단백질-거대분자 접합체에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시내용은 하나 이상의 링커와 함께 IL-2 모이어티(즉, 인간 IL-2와 유사한 적어도 일부의 활성을 갖는 모이어티) 및 거대분자를 갖는 접합체에 관한 것이다. 또한, 본 개시내용은 접합체 조성물, 접합체의 제조 방법, 접합체의 투여 방법 및 암 요법 분야에서의 접합체의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 많은 약물이 이의 효과를 제한하는 바람직하지 않은 약동학 파라미터로 인해 어려움을 겪는다. 대사 또는 배설을 통해 생리학적 구획으로부터 이러한 약물을 신속하게 제거하는 것은 짧은 반감기 및 표적에 대한 감소된 노출을 초래한다. 예를 들어, 자연 단백질을 기반으로 하는 치료 효능제는 효과적인 지속적인 항종양 반응을 일으키는 데 도움이 될 수 있는 매력적인 면역 조절제이지만; 이들은 불량한 약동학(PK), 불량한 내약성 및 빈번한 용량 투여에 의해 악화될 수 있는 다면발현성 활성(pleiotropic activity)으로 인해 이상적인 약제가 아니다.

[0008] 사이토카인 인터류킨-2(IL-2)는 IL-2 경로의 내인성 효능제이고, 양호하게 설명된 $CD8^+$ T 세포(CD8 T) 및 NK 세포의 자극제이다. '알데스류킨(aldesleukin)'으로 알려진 IL-2 변이체를 사용하여 병원 환경에서 8시간마다 투여되는 고용량 IL-2 요법은 전이성 흑색종 및 신장 세포 암종의 치료를 위해 미국 식품의약국(United States Food and Drug Administration: FDA)에 의해 1990년대에 승인되었고, 최대 25%의 지속적인 반응을 제공한다. 저친화도 IL-2 수용체 베타 감마 소단위(IL-2Rβγ)를 발현하는 경향이 있는 CD8 T 세포 및 NK 세포를 활성화하기 위해서는 고용량의 IL-2가 필요하다. 고용량의 IL-2에 대한 컴파운딩 필요성은 이 단백질의 불량한 PK 프로파일로 인한 것이다. 고용량 알데스류킨은 면역계의 과활성화와 연관된 심각한 독성으로 인해 널리 사용되지 않는다. 이러한 독성 외에도, IL-2는 또한 조절 T 세포(Treg)의 증식 및 활성화를 자극한다. 이러한 세포는 고친화도 이종삼량체 IL-2 수용체 알파 베타 감마 소단위(IL-2Rαβγ)를 구성적으로 발현한다. Treg 활성화는 면역 억제를 악화시켜, 의도된 항종양 반응을 잠재적으로 손상시킬 수 있다.

[0009] 중합체 전구약물 및 중합체-약물 접합체는 치료 적용을 위한 약물의 효과를 개선할 수 있다. 고분자 접합된 약물은 일반적으로 연장된 반감기, 더 높은 안정성, 수 용해성, 더 낮은 면역원성 및 항원성 및 조직 또는 세포에 대한 특이적 표적화를 나타낸다. 중합체는 약물, 단백질, 표적화 모이어티 및 영상화제의 전달을 위한 중합체 전구약물/거대분자 전구약물의 담체로 사용된다. 중합체 전구약물은 연장된 시간 기간 동안 중합체 쇄 분자로부터 더 작은 치료 약물 분자를 방출함으로써 치료 활성을 나타내는 약물 전달 시스템으로 간주될 수 있고, 이는 반감기, 생체이용률 및 따라서 연장된 약리학적 작용을 증가시킴으로써 약동학적 거동을 향상시킨다.

[0010] IL-2의 독성 문제 및 불량한 PK 특성을 해결하려는 시도에서, IL-2의 특정 접합체가 제안되었다. 예를 들어, 미국 특허 제4,766,106호, 제5,206,344호, 제5,089,261호, 제4,902,502호, 제9,861,705호 및 국제 특허 제WO 2019/028419호 참조.

[0011] 혈장 반감기를 연장시키고, 면역원성을 감소시키는 것 외에도, 페길화는 단백질 결합의 선택성을 제어할 수 있는 기회를 제공한다. 예를 들어, 페길화된 IL2 임상 후보인 NKTR-214는 IL-2-IL-2Rα 계면의 라이신 잔기에서 방출 가능한 링커(releasable linker)를 사용한 부위-특이적 페길화로 인해 IL-2 수용체 α-소단위(IL-2Rα)에 대한 감소된 결합을 나타낸다. IL-2 수용체 β-소단위(IL-2Rβ)에 대한 결합은 최소한의 영향을 받는다. 결과적으로, NKTR-214는 전임상 평가에서 IL2에 비해 CD8+ 종양-사멸 기억 효과기 T 세포의 증식을 증가시키고, 면역억제 조절 T 세포의 증식을 감소시키며, 항종양 효능을 향상시킨다. 예를 들어, 미국 특허 제9,861,705호, 문헌 [Clin. Cancer Res. 22, 680-690 (2016); PLOS ONE 12, e0179431 (2017)] 참조.

[0012] 링커 화학의 선택은, 이것이 활성제의 절단 및 후속 방출에 대한 시공간 제어를 부여하기 때문에, 중합체-약물 접합체 치료제의 설계에서 중요하다. 링커 안정성이 충분하지 않으면, 접합된 약물은 조기 방출을 나타내어, 거대분자 담체의 이점을 무효화할 수 있다. 그러나, 불활성 중합체 전구약물의 경우, 불충분한 약물 방출은 치료 약물 수준보다 낮고, 결국은 최적보다 낮은 치료 효능을 초래할 수 있다. 따라서, 연장된 치료 효능을 제공하는 지속적인 약물 방출 프로파일이 매우 바람직하다.

[0013] 일부 전구약물 분자는 pH-의존적 베타 제거에 의해서 생리 조건에서 활성 약물을 방출한다. 이러한 접근법은 접합체가 생리 pH에 노출될 때 개시되는 PEG 담체로부터 약물의 자발적인 1차 절단 속도를 활용한다. 이들의 절단 속도는 링커 상의 C-H 결합의 산성도에 의해 미리 결정되고; 산성도는 이온화 가능한 C-H에 부착된 전자-끌기기에 의해 차례로 제어된다. 예를 들어, 미국 특허 제6,504,005호, 제8,680,315호 및 국제 특허 제WO 2004/089279호 참조.

[0014] 이들의 광범위한 사용에도 불구하고, PEG 및 치료제에서의 후속 유용성의 상당한 제한은 이의 비-생분해성이다. 현재, 승인된 페길화된 단백질 치료제는 대략 50kDa의 사구체 여과 역치에 가까운, 40kDa 이하의 분자량의 PEG를 사용한다. 증가된 분자 질량은 일반적으로 연장된 순환 시간을 제공하지만, 비-생분해성 PEG의 축적에 대한 우려는 중합체 분자 질량 및 결과적인 약동학의 최적화를 제한한다.

발명의 내용

[0015] 본 명세서에는 다중 링커를 갖는 단백질-[거대분자]z 접합체의 일반적인 설계가 기재되어 있다. 본 개시내용의 고유한 링커는 예측 가능하고, 조정가능한 방출 동역학을 갖는 약물 접합체의 작제를 가능하게 한다. 또한, 각각의 거대분자의 분자 질량은 신장 청소를 위해서 바람직한 질량 하에서 제어될 수 있으며, 이는 일부 실시형태에서는 40 내지 50kDa 미만이다. 단백질 상의 거대분자(z)의 수를 증가시킴으로써, 접합체의 총 분자량이 증가될 수 있고, 그 다음 접합체의 순환 시간이 연장될 수 있다. 방출 가능한 링커 상에 조정 가능한 전자 끌기기를 사용하는 것 외에도, 활성 단백질의 방출 속도는 단백질 상의 거대분자(z) 수를 변화시킴으로써 추가로 제어되고, 최적화될 수 있다.

[0016] 일반적으로, 하나의 단백질에 다수의 거대분자를 접합시키는 것은 어렵고, 효율적이지 않다. 본 발명자들은 다수의 이작용성 링커를 갖는 단백질의 접합에 대한 일반적인 접근법을 구상하고, 그 다음 링커와 거대분자를 반응시켜 단백질-[거대 분자]z 접합체를 제공하였다. 이 기술은 입체 장애를 최소화하는 이점을 제공하고, 따라서 반응 효율이 향상된다. 또한, 합성 단계 및 정제 단계가 단순화되고, 비용이 적게 든다. 따라서, 이 기술은 중합체-단백질 치료제의 대규모 생산 및 제조에 상당한 이점을 제공한다.

[0017] 본 개시내용은 예측 가능하고, 제어 가능한 방출 속도의 방출 가능한 링커를 갖는 단백질-[거대분자]z 접합체를 제공하기 위한 이러한 일반적인 전략을 기재한다. 이러한 제어 가능한 방출 속도를 갖는 접합체는 질환의 치료를 위한 가치있는 치료 도구를 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 방출 가능하지 않은 링커 및 방출 가능한 링커를 갖는 단백질-[거대분자]z 접합체를 기재한다. 따라서, 본 개시내용의 실시형태는 당업계에

서 신규하고, 완전히 제안되지 않은 이러한 접합체의 제조 방법, 접합체를 포함하는 조성물 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0018] 따라서, 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, 본 개시내용은 링커로 연결된 관련 생물학적 기능을 갖는 단백질 및 다중 거대분자를 갖는 접합체를 제조하기 위한 접합 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 접합 방법은 이작용성 링커를 사용한 단백질의 작용화, 그 다음 거대분자에 대한 접합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질은 사이토카인, 케모카인, 항체 및 펩타이드를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 거대분자는 수용해성 중합체, PEG, 지질, 폴리시알산, 알부민 및 Fc를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0019] 본 개시내용은 또한 신규한 이작용성 방출 가능한 링커 및 이의 조성물, 치료 적용에서의 신규한 이작용성 방출 가능한 링커의 이용 및 제조 방법에 관한 것이다. 개시된 기술의 이점 중에는 본 명세서에 제공된 복수의 이작용성 방출 가능한 링커로 단백질을 효율적으로 작용화시키는 능력이 있다. 거대분자에 대한 접합을 사용하여 고도로 작용화된 단백질의 약동학적 특성을 개선시킬 수 있다.

[0020] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, 접합체가 제공되는데, 접합체는 방출 가능한 링커를 통해 하나 이상의 수용해성 중합체에 공유 부착된 IL-2 모이어티의 잔기를 포함한다.

[0021] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, 접합체가 제공되는데, 접합체는 방출 가능하지 않은 링커를 통해 하나 이상의 수용해성 중합체에 공유 부착된 IL-2 모이어티의 잔기를 포함한다.

[0022] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, 접합체가 제공되는데, 접합체는 방출 가능하지 않은 링커 및 방출 가능한 링커를 통해 하나 이상의 수용해성 중합체에 공유 부착된 IL-2 모이어티의 잔기를 포함한다.

[0023] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, 접합체의 전달 방법이 제공되며, 이 방법은 환자에게 IL-2의 잔기 및 수용해성 중합체의 접합체로 구성된 조성물을 정맥내 또는 피하로 투여하는 단계를 포함한다.

[0024] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, 접합체의 전달 방법이 제공되며, 이 방법은 암 환자에게 (a) IL-2의 잔기 및 하나 이상의 수용해성 중합체의 접합체를 포함하는 조성물; 및 (b) 유효량의 항-CTLA-4 항체 또는 유효량의 항-PD-1/PD-L1 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 유효량의 항-CTLA-4 항체는 CTLA-4 경로를 저해하는 양이다. 일부 실시형태에서, 유효량의 항-PD-1/PD-L1 항체는 PD-1/PD-L1 경로를 저해하는 양이다. 명확성의 방식으로, 본 방법에 따른 단계의 순서와 관련하에, 달리 제시되지 않는 한, 방법은 단계의 순서에 제한되지 않으며, 단계 (a)는 단계 (b)를 수행하기 전에, 후에 또는 동시에 수행될 수 있다.

[0025] 본 개시내용은 본 명세서에 정의된 바와 같은 단백질-거대분자 접합체, 방출 가능한 링커 및 거대분자를 제공한다. 개시된 접합체는 적어도 링커의 특성 및 링커-거대분자 모이어티의 수에 기초한 고유한 특성을 제공한다. 본 명세서에는 또한 접합체의 고유한 합성 방법 및 질환 및 장애의 치료에서의 접합체의 용도가 제공된다.

[0026] 본 개시내용의 추가 실시형태는 하기 상세한 설명 및 청구범위에 제시되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 rIL-2의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열(서열번호 1 내지 3)을 도시한 도면.

도 2는 LC-MS에 의해서 실시예 14, 실시예 16, 실시예 18 및 실시예 22에 대해서 결정된 IL-2-$(N_3)z$ 분포를 도시한 도면.

도 3은 실시예 15, 실시예 17, 실시예 19 및 실시예 22에 대한 클릭-페길화 산물 rIL-2-$(PEG)_z$의 SDS-PAGE(트리스 아세테이트) 분석을 도시한 도면.

도 4A 내지 도 4E는 실시예 15(4A), 실시예 17(4B), 실시예 19(4C), 실시예 22(4D) 및 실시예 27(4E)로부터의 IL-2, 방출되지 않은 접합체 및 방출된 접합체의 CTLL-2 세포 증식 검정을 비교한 용량-반응 곡선을 도시한 도면. Y-축은 표지된 A_{450}-A_{630}이다.

도 5, 도 6, 도 7, 도 8 및 도 9는 상이한 투여 방식으로 rIL-2 및 rIL-2-중합체 접합체를 투여한 후 종양 성장 저해를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] *정의:*

[0029] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태를 기재하고 청구하는 데 있어서, 하기 용어를 하기에 기재된 정의에 따라서 사용할 것이다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특별한 실시형태를 기술하려는 목적이며, 제한이도록 의도되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

[0031] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 출원이 속한 기술 분야의 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 출원의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있고, 대표적인 방법 및 물질을 본 명세서에 기재한다.

[0032] 오래된 특허 법 규약에 따라서, 단수 용어는 청구범위를 비롯한, 본 출원에서 사용되는 경우 "하나 이상"을 지칭한다. 따라서, 예를 들어, "담체"에 대한 언급은 1종 이상의 담체, 2종 이상의 담체 등의 혼합물을 포함한다.

[0033] 달리 지시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위 내에서 사용된 성분, 반응 조건 등의 양을 표시하는 모든 수치는 모든 경우에서 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 지시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에서 언급된 수치 파라미터는 본 발명 출원에 의해 획득되려는 목적하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다.

[0034] 용어 "본 개시내용의 화합물(들)" 또는 "본 개시내용의 화합물(들)"은 본 명세서에 개시된 화학식의 화합물, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 이의 임의의 하위부류, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 입체이성질체, 용매화물 또는 수화물을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 중간체는 본 개시내용의 화합물로서 고려된다.

[0035] 본 개시내용의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 하나 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있고, 따라서 절대 입체화학과 관련하여, (*R*)- 또는 (*S*)-로서 또는 아미노산의 경우 (D)- 또는 (L)-로서 정의될 수 있는 거울상이성질체, 부분입체이성질체 및 다른 입체이성질체 형태를 생성시킬 수 있다. 본 개시내용은 본 명세서에 구체적으로 도시되든 그렇지 않든 간에, 이러한 모든 가능한 이성질체, 뿐만 아니라 이의 라세미체 및 광학적으로 순수한 형태를 포함하는 것을 의미한다. 광학 활성 (+) 및 (-), (*R*)- 및 (*S*)-, 또는 (D)- 및 (L)-이성질체는 카이럴 합성단위체(chiral synthon) 또는 카이럴 시약을 사용하여 제조될 수 있거나 또는 종래의 기술, 예를 들어, 크로마토그래피 및 분별 결정화를 사용하여 분할될 수 있다. 개별 거울상이성질체의 제조/단리를 위한 종래의 기술은 적합한 광학적으로 순수한 전구체로부터의 카이럴 합성 또는 예를 들어, 카이럴 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용한 라세메이트(또는 염 또는 유도체의 라세메이트)의 분할을 포함한다. 본 명세서에 기재된 화합물이 올레핀 이중 결합 또는 기하 비대칭인 다른 중심을 함유하는 경우, 달리 명시되지 않는 한, 그러한 화합물은 E 및 Z 기하 이성질체 둘 다를 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, 모든 호변이성질체 형태가 또한 포함되도록 의도된다.

[0036] "입체이성질체"는 동일한 결합에 의해서 결합된 동일한 원자로 구성되지만 서로 교환 가능하지 않은 상이한 3차원 구조를 갖는 화합물을 지칭한다. 본 개시내용은 이의 다양한 입체이성질체 및 혼합물을 고려한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 사용된 바와 같은 "입체이성질체"는 거울상이성질체, 거울상이성질체의 혼합물, 부분입체이성질체 또는 2개 이상의 부분입체이성질체의 혼합물을 지칭한다.

[0037] "거울상이성질체"는 서로의 포개어지지 않는 거울상인 화합물의 2개의 입체이성질체를 지칭한다. 이러한 이성질체의 혼합물을 거울상이성질체 혼합물이라고 부를 수 있다.

[0038] 거울상이성질체의 50:50 혼합물은 라세미 혼합물 또는 라세미체로서 지칭되며, 이것은 화학 반응 또는 공정에서 입체선택성 또는 입체특이성이 없는 경우 일어날 수 있다. 용어 "라세미 혼합물" 및 "라세미체"는 광학 활성이 없는 2개의 거울상이성질체 종의 동일몰량의 혼합물을 지칭한다. 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 화합물의 모든 입체이성질체를 포함한다.

[0039] "부분입체이성질체"는 2개 이상의 카이럴 중심을 갖고, 분자들이 서로의 거울상이 아닌 입체이성질체를 지칭한다. 부분입체이성질체는 상이한 물성, 예를 들어, 융점, 비등점, 스펙트럼 특성 및 반응성을 갖는다. 부분입체이성질체의 혼합물은 고 분해능 분석 절차, 예컨대, 전기영동법 및 크로마토그래피 하에서 분리될 수 있다.

[0040] 용어 "위치이성질체"는 당업계에 인식되어 있으며, 동일한 분자식을 갖지만 원자 연결 정도가 상이한 화합물을 지칭한다. 따라서, "위치선택적 공정"은 특정 위치이성질체의 형성이 다른 것보다 선호되는 것, 예를 들어, 반응이 특정 위치이성질체의 수율을 상당히 증가시키는 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "위치이성질체"는 단일 위치이성질체 또는 둘 이상의 위치이성질체의 혼합물을 지칭할 수 있다.

[0041] "호변이성질체"는 분자의 하나의 원자로부터 동일한 분자의 또 다른 원자로의 양성자 이동을 지칭한다. 본 개시내용은 임의의 상기 화합물의 호변이성질체를 포함한다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적 조합물", "치료 조합물" 또는 "조합물"은 병용 요법에 사용하기 위해서 적어도 2종의 치료 활성제를 포함하는 단일 투여 형태 또는 적어도 2종의 치료 활성제를 함께 또는 별개로 포함하는 투여 형태를 지칭한다. 예를 들어, 하나의 치료 활성제는 하나의 투여 형태로 제형화될 수 있고, 나머지 치료 활성제는 단일 또는 상이한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 하나의 치료 활성제는 고체 경구 투여 형태로 제형회될 수 있는 반면, 제2 활성 치료제는 비경구 투여를 위한 용액 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는 화학 명명 프로토콜 및 구조 다이어그램은 ACD/Name Version 9.07 소프트웨어 프로그램, ChemDraw Ultra Version 11.0.1 및/또는 ChemDraw Ultra Version 14.0 소프트웨어 명명 프로그램(CambridgeSoft)를 사용한, I.U.P.A.C. 명명 시스템의 변형된 형태이다. 본 명세서에서 사용된 복잡한 화학 명칭의 경우, 치환기는 그것이 부착되는 기 앞에 명명된다. 예를 들어, 사이클로프로필에틸은 사이클로프로필 치환체를 갖는 에틸 골격을 포함한다. 하기에 기재된 것을 제외하고, 모든 결합은 본 명세서에서 화학 구조 다이어그램에서 식별되며, 일부 탄소 원자를 제외하고, 이것은 원자가를 완결하기에 충분한 수소 원자에 결합된 것으로 가정된다.

[0044] 용어 "조성물" 또는 "제형"은 물리적인 형태, 예컨대, 고체, 액체, 기체 또는 이들의 혼합물의 1종 이상의 물질을 나타낸다. 조성물의 일례는 약제학적 조성물, 즉, 의학적 치료와 관련되거나, 이를 위해서 제조되거나 또는 이것에서 사용되는 조성물이다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "약제학적으로 허용 가능한"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등이 없이 타당한 유익/유해비에 비례하는 인간 및 동물의 조직과 접촉되어 사용하기에 적합하고, 타당한 의학적 판단의 범주 내에서의 의도된 사용에 효과적이라는 것을 의미한다.

[0046] "염"은 활성제의 유도체를 포함하고, 여기서 활성제는 산 또는 염기 부가염을 제조함으로써 개질된다. 바람직하게는, 염은 약제학적으로 허용 가능한 염이다. 이러한 염은 약제학적으로 허용 가능한 산 부가염, 약제학적으로 허용 가능한 염기 부가염, 약제학적으로 허용 가능한 금속염, 암모늄 및 알킬화 암모늄염을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 산 부가염은 무기산뿐만 아니라 유기산의 염을 포함한다. 적합한 무기산의 예는 염산, 브롬민화수소산, 아이오딘화수소산, 인산, 황산, 질산 등을 포함한다. 적합한 유기산의 대표적인 예는 폼산, 아세트산, 트라이클로로아세트산, 트라이플루오로아세트산, 프로피온산, 벤조산, 신남산, 시트르산, 퓨마르산, 글리콜산, 락트산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 옥살산, 피크르산, 살리실산, 석신산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 아스파트산, 스테아르산, 팔미트산, EDTA, 글리콜산, p-아미노벤조산, 글루탐산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산, 설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 퍼클로레이트, 보레이트, 아세테이트, 벤조에이트, 하이드록시나프토에이트, 글리세로포스페이트, 케토글루타레이트 등을 포함한다. 염기 부가염은 에틸렌다이아민, N-메틸-글루카민, 라이신, 아르기닌, 오르니틴, 콜린, N,N'-다이벤질에틸렌다이아민, 클로로프로카인, 다이에탄올아민, 프로카인, N-벤질펜에틸아민, 다이에틸아민, 피페라진, 트리스-(하이드록시메틸)-아미노메탄, 테트라메틸수산화암모늄, 트라이에틸아민, 다이벤질아민, 에펜아민, 데하이드로아비에틸아민, N-에틸피페리딘, 벤질아민, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 다이메틸아민, 트라이메틸아민, 에틸아민, 염기성 아미노산, 예를 들어, 라이신 및 아르기닌 다이사이클로헥실아민 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 금속염의 예는 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘염 등을 포함한다. 암모늄 및 알킬화된 암모늄염의 예는 암모늄, 메틸암모늄, 다이메틸암모늄, 트라이메틸암모늄, 에틸암모늄, 하이드록시에틸암모늄, 다이에틸암모늄, 부틸암모늄, 테트라메틸암모늄염 등을 포함한다. 유기 염기의 예는 라이신, 아르기닌, 구아니딘, 다이에탄올아민, 콜린 등을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 염 및 이의 제형의 제조를 위한 표준 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌["Remington: The Science and Practice of Pharmacy", A. Gennaro, ed., 20th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA]을 비롯한 다양한 참고문헌에 개시되어 있다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "용매화물"은 용매화에 의해서 형성된 착물(용매 분자와 본 개시내용의 활성제의 분자 또는 이온의 조합물), 또는 용질 이온 또는 분자(본 개시내용의 활성제)와 하나 이상의 용매 분자로 이루어진 응집체를 의미한다. 본 개시내용에서, 바람직한 용매화물은 수화물이다. 수화물의 예는 반수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물, 육수화물 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 당업자는, 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 또한 용매화물 형태로 존재할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 용매화물은 전형적으로 본 발명의 화합물의 제조의 부분인 수화를 통해서 또는 본 개시내용의 무수 화합물에 의한 수분의

자연적인 흡수를 통해서 형성된다. 수화물을 비롯한 용매화물은 화학량론적 비로, 예를 들어, 용매화물당 또는 수화물 분자당 2개, 3개, 4개의 염 분자로 이루어질 수 있다. 또 다른 가능성은, 예를 들어, 2개의 염 분자가 3개, 5개, 7개의 용매 또는 수화물 분자에 관련된 화학량론적이다. 결정화를 위해서 사용되는 용매, 예컨대, 알코올, 특히 메탄올 및 에탄올; 알데하이드; 케톤, 특히 아세톤; 에스터, 예를 들어, 에틸 아세테이트가 결정 격자 내에 포함될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 용매가 바람직하다.

[0048] 용어 "부형제", "담체", 및 "비히클"은 본 출원 전체에서 상호 교환 가능하게 사용되고, 본 개시내용의 화합물과 함께 투여되는 물질을 나타낸다.

[0049] "치료적 유효량"은, 질환 또는 다른 바람직하지 않은 의학적 병태를 치료하기 위해서 환자에게 투여되는 경우, 질환 또는 병태와 관련하여 이러한 효과를 갖기에 충분한 화합물 또는 치료 활성제의 양을 의미한다. 치료적 유효량은 선택된 화합물 또는 치료 활성제의 유형, 질환 또는 병태 및 이의 중증도 및 치료하고자 하는 환자의 연령, 체중 등에 따라서 달라질 것이다. 주어진 화합물 또는 치료 활성제의 치료적 유효량을 결정하는 것은 당업자의 통상의 기술 범위에 포함되고, 일상적인 실험을 넘어서는 것을 필요로 하지 않는다.

[0050] "치료하는" 또는 "치료"는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 포유동물, 바람직하게는 관심대상 질환 또는 병태를 갖는 인간에서의 관심대상 질환 또는 병태의 치료를 포괄하고, 특히, 포유동물이 이러한 병태에 취약하지만 아직 이러한 병태를 갖는 것으로 진단되지 않은 경우 이러한 포유동물에서 질환 또는 병태가 발생하는 것을 예방하는 것; 질환 또는 병태를 저해하는 것, 즉, 이의 발달을 중단시키는 것; 질환 또는 병태를 완화시키는 것, 즉 질환 또는 병태의 퇴행을 유발하는 것; 또는 질환 또는 병태로부터 생성되는 증상을 완화시키는 것, 즉, 근원적인 질환 또는 병태를 해결하지 않고 통증을 완화시키는 것을 포함한다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "질환" 및 "병태"는 상호 교환 가능하게 사용될 수 있거나 또는 특정 고질병 또는 병태가 공지된 원인 인자를 가질 수 없기 때문에(따라서 병인이 아직 해결되지 않았기 때문에), 아직 질환 및 바람직하지 않은 병태 또는 증후군(여기서, 증상의 다소 특별한 세트는 의사에 의해서 식별됨)인 것으로 인식되지 않았다는 점에서 상이할 수 있다.

[0052] 본 개시내용은 또한 개시된 화합물의 생체내 대사 산물을 포함하는 것을 의미한다. 이러한 산물은 주로, 호소 과정으로 인한, 예를 들어, 투여된 화합물의 산화, 환원, 가수분해, 아마이드화, 에스터화 등으로부터 유래될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 본 개시내용의 화합물을 이의 대사 산물을 수득하기에 충분한 시간 동안 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의해서 생성된 화합물을 포함한다. 이러한 생성물은 전형적으로는 방사성동위원소 표지된 본 개시내용의 화합물을 검출 가능한 용량으로 포유동물, 예컨대, 래트, 마우스, 기니피그, 원숭이에게 또는 인간에게 투여하여, 대사가 일어나기 위한 충분한 시간을 허용하고, 소변, 혈액 또는 다른 생물학적 샘플로부터 이의 전환 생성물을 단리시킴으로써 식별된다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "대상체"는 인간, 비인간 영장류, 포유동물, 래트, 마우스, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 등일 수 있다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 본 명세서에서 예를 들어, 포유동물 대상체, 예컨대, 인간 대상체와 관련하여 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0054] 대상체는 암, 예컨대, 전립선암, 유방암, 난소암, 침샘 암종 또는 자궁내막암을 갖거나 이를 가질 위험이 있는 것으로 의심될 수 있거나 또는 여드름, 다모증, 탈모, 전립선 비대증, 난소 낭종, 다낭성 난소 질환, 성조숙증, 척추 및 숨뇌근육 위축(spinal and bulbar muscular atrophy) 또는 노화 관련 황반 변성을 갖거나 이를 가질 위험이 있는 것으로 의심될 수 있다. 다양한 암, 예컨대, 전립선암, 유방암, 난소암, 방광암, 췌장암, 간세포암, 침샘 암종 또는 자궁내막암에 대한 진단 방법 및 여드름, 다모증, 탈모, 전립선 비대증, 난소 낭종, 다낭성 난소 질환, 성조숙증, 척추와 숨뇌근육 위축 또는 노화 관련 황반 변성에 대한 진단 방법 및 암, 예컨대, 전립선 암, 유방암, 난소 암, 방광 암, 췌장 암, 간세포암, 침샘 암종 또는 자궁내막 암에 대한 의학적 설명, 여드름, 다모증, 탈모, 전립선 비대증, 난소 낭종, 다낭성 난소 질환, 성조숙증, 척추와 숨뇌근육 위축 또는 노화 관련 황반 변성의 진단 및 의학적 설명은 당업자에게 공지되어 있다.

[0055] "포유동물"은 인간 및 모든 가축, 예컨대, 실험 동물 및 애완 동물(예를 들어, 고양이, 개, 돼지, 소, 양, 염소, 말, 토끼) 및 비가축, 예컨대, 야생동물 등을 포함한다.

[0056] "선택적인" 또는 "선택적으로"는 이후에 기재되는 상황의 사건이 일어날 수 있거나 일어나지 않을 수 있고, 그러한 기재는 상기 사건 또는 상황이 일어나는 예 및 일어나지 않는 예를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, "선택적으로 치환된 아릴"은 아릴 라디칼이 치환될 수 있거나 치환되지 않을 수 있고, 그러한 기재는 치환된 아릴 라디칼 및 치환되지 않은 아릴 라디칼 둘 다를 포함한다는 것을 의미한다.

[0057] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "PEG", "폴리에틸렌 글리콜" 및 "폴리(에틸렌 글리콜)"은 상호 호환적으로 사용되고, 임의의 비펩타이드 수용해성 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함한다. 전형적으로, 본 개시내용에 따라서 사용하기 위한 PEG는 하기 구조 "-(OCH_2CH_2)$_n$-"을 포함하고, 식 중, (n)은 2 내지 4000이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, PEG는 또한 예를 들어, 합성 변형 동안 말단 산소가 대체되는 지의 여부에 관계 없이 "-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)$_n$-CH_2CH_2-" 및 "-(OCH_2CH_2)$_n$O-"를 포함한다. 본 명세서 및 청구범위 전체에서, 용어 "PEG"는 다양한 말단 또는 "단부 캡핑"기 등을 갖는 구조를 포함한다. 용어 "PEG"는 또한 대다수, 즉 50% 초과의 -OCH_2CH_2- 반복 소단위를 함유하는 중합체를 의미한다. 특정 형태와 관련하여, PEG는 설명될 "분지형", "선형", "갈래형(forked)", "다작용성" 등과 같은 구조 또는 기하학적 형상뿐만 아니라 임의의 수의 다양한 분자량을 가질 수 있고, 하기에 상세하게 기재될 수 있다.

[0058] 용어 "단부-캡핑된" 및 "말단 캡핑된"은 단부-캡핑 모이어티를 갖는 중합체의 말단 또는 종점을 지칭하도록 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다. 전형적으로, 필수적이지는 않지만, 단부-캡핑 모이어티는 하이드록시 또는 C_{1-20} 알콕시기, 보다 바람직하게는 C_{1-10} 알콕시기, 보다 더 바람직하게는 C_{1-5} 알콕시기를 포함한다. 따라서, 단부-캡핑 모이어티의 예는 알콕시(예를 들어, 메톡시, 에톡시 및 벤질옥시)뿐만 아니라 아릴, 헤테로아릴, 사이클로, 헤테로사이클로 등을 포함한다. 단부-캡핑 모이어티가 중합체 내의 말단 단량체[예를 들어, $CH_3O(CH_2CH_2O)_n$- 및 $CH_3(OCH_2CH_2)_n$- 내의 단부-캡핑 모이어티 "메톡시"]의 하나 이상의 원자를 포함할 수 있다는 것을 기억해야 한다. 또한, 상기 각각의 포화, 불포화, 치환 및 비치환 형태가 고려된다. 더욱이, 단부-캡핑기는 또한 실란일 수 있다. 단부-캡핑기는 또한 이롭게는 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 중합체가 검출 가능한 표지를 포함하는 단부-캡핑기를 갖는 경우, 중합체 및/또는 중합체가 커플링된 모이어티(예를 들어, 활성제)의 양 또는 위치는 적합한 검출기를 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 표지는 비제한적으로 형광체, 화학발광체, 효소 표지에 사용되는 모이어티, 비색(예를 들어, 염료), 금속 이온, 방사성 모이어티 등을 포함한다. 적합한 검출기는 광도계, 필름, 분광계 등을 포함한다. 단부-캡핑기는 또한 이롭게는 인지질을 포함할 수 있다. 중합체가 인지질을 포함하는 단부-캡핑기를 갖는 경우, 중합체 및 생성된 접합체에 고유한 특성이 부여된다. 예시적인 인지질은 비제한적으로 포스파티딜콜린이라고 불리는 인지질의 부류로부터 선택된 것을 포함한다. 구체적인 인지질은 비제한적으로 다이라우로일포스파티딜콜린, 다이올레일포스파티딜콜린, 다이팔미토일포스파티딜콜린, 다이스테로일포스파티딜콜린, 베헨오일포스파티딜콜린, 아라키도일포스파티딜콜린 및 레시틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함한다. 단부-캡핑기는 표적화 모이어티를 또한 포함하여, 이러한 중합체-뿐만 아니라 이에 부착된 어느 것, 예를 들어, IL-2 모이어티-는 관심 영역에 우선적으로 국지화될 수 있다.

[0059] 본 명세서에 기재된 바와 같은 중합체와 관련하여 "비-자연 발생"은 전체가 자연에서 발견되지 않는 중합체를 의미한다. 그러나 비-자연 발생 중합체는, 전체 중합체 구조가 자연에서 발견되지 않는 한, 자연 발생적인 하나 이상의 단량체 또는 단량체의 분절을 함유할 수 있다.

[0060] "수용해성 중합체"에서의 같이 용어 "수용해성" 중합체는 실온에서 물 중에 가용성인 임의의 중합체이다. 전형적으로, 수용해성 중합체는 여과 후 동일한 용액에 의해서 투과된 광의 적어도 약 75%, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%를 투과시킬 것이다. 중량에 기초하여, 수용해성 중합체는 바람직하게는 수 중에 적어도 약 35%(중량 기준) 용해성, 보다 바람직하게는 수 중에 적어도 약 50%(중량 기준) 용해성, 보다 더 바람직하게는 수 중에 약 70%(중량 기준) 용해성, 보다 더 바람직하게는 수 중에 약 85%(중량 기준) 용해성일 것이다. 그러나, 수용해성 중합체는 수 중에 약 95%(중량 기준) 용해성이거나 수 중에 완전히 용해성인 것이 가장 바람직하다.

[0061] 수용해성 중합체, 예컨대, PEG와 관련하여 분자량은 수 평균 분자량 또는 중량 평균 분자량으로 표현될 수 있다. 달리 제시되지 않는 한, 본 명세서에서 분자량에 대한 모든 언급은 중량 평균 분자량을 지칭한다. 분자량 결정, 수 평균 및 중량 평균 모두 겔 투과 크로마토그래피 또는 기타 액체 크로마토그래피 기술을 사용하여 측정할 수 있다. 분자량 값을 측정하는 다른 방법, 예컨대, 단부-기 분석을 사용하거나 집합적 특성(예를 들어, 빙점 내림, 비등점 상승 또는 삼투압)을 측정하여 수 평균 분자량을 결정하는 방법 또는 광산란 기술, 초원심분리 또는 점도계를 사용하여 중량 평균 분자량을 결정하는 것과 방법이 사용될 수 있다. 본 개시내용의 중합체는 전형적으로 다분산성(즉, 중합체의 수 평균 분자량 및 중량 평균 분자량이 동일하지 않음)이며, 바람직하게는 약 1.2 미만, 보다 바람직하게는 약 1.15 미만, 보다 더 바람직하게는 약 1.10 미만, 보다 더 바람직하게는 약 1.05 미만, 가장 바람직하게는 약 1.03 미만의 낮은 다분산성 값을 갖는다.

[0062] 특정 작용기와 함께 사용될 때 용어 "활성", "반응성" 또는 "활성화된"은 또 다른 분자 상의 친전자체 또는 친핵체와 쉽게 반응하는 반응성 작용기를 지칭한다. 이것은 반응하기 위해 강한 촉매가 필요하거나 매우 비실용적

인 반응 조건이 필요한 기(즉, "비반응성" 또는 "불활성"기)와 대조적이다.

[0063] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "작용기" 또는 이의 임의의 동의어는 이의 보호된 형태뿐만 아니라 비보호된 형태를 포함하는 것을 의미한다.

[0064] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "전자 변경기(electron altering group)"는 그것이 부착된 모이어티의 전자 밀도를 변형시키는 임의의 원자 또는 작용기를 포함하는 것을 의미한다. 전자 변경기는 전자 밀도를 공여하는 전자 공여기(예를 들어, 아민, 하이드록시, 알콕실, 알킬) 및 전자 끌기기(예를 들어, 나이트로, 사이아노, 트라이플루오로메틸)를 포함한다.

[0065] 용어 "스페이서 모이어티", "링키지" 및 "링커"는 상호연결 모이어티, 예컨대, 거대분자 분절 및 단백질의 말단 또는 단백질의 친전자체 또는 친핵체를 연결하는 데 선택적으로 사용되는 결합 또는 원자 또는 원자의 집합을 지칭하도록 본 명세서에서 사용된다. 스페이서 모이어티는 가수분해적으로 안정적일 수 있거나 생리학적으로 가수 분해성 또는 효소적으로 분해 가능한 링키지를 포함할 수 있다. 문맥상 명백하게 달리 명시되지 않는 한, 스페이서 모이어티는 화합물의 임의의 두 원소 사이에 선택적으로 존재한다(예를 들어, 단백질 및 거대분자의 잔기를 포함하는 제공된 접합체는 스페이서 모이어티를 통해 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다).

[0066] 본 개시내용의 적합한 스페이서는 탄소 원자, 질소 원자, 황 원자, 인 원자, 산소 원자 및 이들의 조합물 중 하나 이상을 포함할 수 있는 링커를 포함하는 스페이서를 포함한다. 적합한 스페이서 모이어티는 아마이드, 2차 아민, 카바메이트, 티오에터, 포스페이트, 포스포로티오에이트, 다이설파이드기 및/또는 클릭 화학 생성물기를 포함할 수 있다. 구체적인 스페이서 모이어티의 비제한적인 예는 -O-, -S-, -S-S-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -OP(O)(OH)-, -OP(S)(OH)-, -C(S)-, $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $O-CH_2-$, $-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, -C(O)-NH-CH_2-, -C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-, -C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-, -C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-$C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-, -C(O)-O-CH_2-, $-CH_2-$C(O)-O-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-O-CH_2-, -C(O)-O-CH_2-CH_2-, -NH-C(O)-CH_2-, $-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-, -NH-C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-CH_2-, -C(O)-NH-CH_2-, -C(O)-NH-CH_2-CH_2-, -O-C(O)-NH-CH_2-, -O-C(O)-NH-CH_2-CH_2-, -NH-CH_2-, -NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$NH-CH_2-, -C(O)-CH_2-, -C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-, -O-C(O)-NH-$[CH_2]_1-(OCH_2CH_2)_m-$, 2가 사이클로알킬기, 2가 아릴, -O-, -S-, 2가 아미노산 잔기, $-N(R^3)-$ 및 이들 중 임의의 것 중 2개 이상의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함하고, 식 중, R^3은 H 또는 치환된 또는 비치환된 알킬, 치환된 또는 비치환된 알켄일, 치환된 또는 비치환된 알킨일, 치환된 또는 비치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 유기 라디칼이고, (l)은 0 내지 6이며, (m)은 0 내지 20이다. 다른 구체적인 스페이서 모이어티는 하기 구조를 갖고: $-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$, $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ 및 $-O-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$, 식 중, 각각의 메틸렌 이후의 아래 첨자 값은 구조에 함유된 메틸렌의 수를 나타내고, 예를 들어, $(CH_2)_{1-6}$은 구조가 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 메틸렌을 함유할 수 있다는 것을 의미한다.

[0067] 용어 "이작용성 링커"는 2개의 반응성 원자 또는 작용기를 갖는, 상기에 정의된 바와 같은 링커를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 2개의 반응성 기는 상이한 반응성 모드를 갖는 직교 작용기이므로, 목적하는 경우, 각각의 작용기는 서로 독립적으로 그리고 특정 순서로 반응할 수 있다. 당업자가 이해할 바와 같이, 본 명세서에 개시된 이작용성 링커를 사용하여 부위-특이적 반응을 수행하여 단백질-거대분자 접합체를 조립할 수 있다.

[0068] "아실"은 -C(=O)-알킬 라디칼을 지칭한다.

[0069] "아미노"는 $-NH_2$ 라디칼을 지칭한다.

[0070] "사이아노"는 -CN 라디칼을 지칭한다.

[0071] "할로" "할라이드" 또는 "할로겐"은 브로모, 클로로, 플루오로 또는 아이오도 라디칼을 지칭한다.

[0072] "하이드록시" 또는 "하이드록실"은 -OH 라디칼을 지칭한다.

[0073] "이미노"는 =NH 치환체를 지칭한다.

[0074] "나이트로"는 $-NO_2$ 라디칼을 지칭한다.

[0075] "옥소"는 =O 치환체를 지칭한다.

[0076] "티옥소"는 =S 치환체를 지칭한다.

[0077] "설프하이드릴" 및 "머캅토"는 -SH 라디칼을 지칭한다.

[0078] 수소는 H 또는 D이다.

[0079] "알킬" 또는 "알킬기"는 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 단일 결합에 의해서 분자 중 나머지에 부착된 완전히 포화된 직선형(선형) 또는 분지형 탄화수소 쇄 라디칼을 지칭한다. 1 내지 20개의 임의의 수의 탄소 원자를 포함하는 알킬이 포함된다. 20개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킬은 C_1-C_{20} 알킬이고, 10개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킬은 C_1-C_{10} 알킬이며, 6개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킬은 C_1-C_6 알킬이고, 5개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킬은 C_1-C_5 알킬이다. C_1-C_5 알킬은 C_5 알킬, C_4 알킬, C_3 알킬, C_2 알킬 및 C_1 알킬(즉, 메틸)을 포함한다. C_1-C_6 알킬은 C_1-C_5 알킬에 대해서 상기에 기재된 모든 모이어티를 포함하지만, 또한 C_6 알킬을 포함한다. C_1-C_{10} 알킬은 C_1-C_5 알킬 및 C_1-C_6 알킬에 대해서 상기에 기재된 모든 모이어티를 포함하지만, 또한 C_7, C_8, C_9 및 C_{10} 알킬을 포함한다. 유사하게, C_1-C_{12} 알킬은 모든 상기 모이어티를 포함하지만, 또한 C_{11} 및 C_{12} 알킬을 포함한다. C_1-C_{12} 알킬의 비제한적인 예는 메틸, 에틸, *n*-프로필, *i*-프로필, *sec*-프로필, *n*-부틸, *i*-부틸, *sec*-부틸, *t*-부틸, *n*-펜틸, *t*-아밀, *n*-헥실, *n*-헵틸, *n*-옥틸, *n*-노닐, *n*-데실, *n*-운데실 및 *n*-도데실을 포함한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다. 용어 "저급 알킬"은 선형 또는 분지형일 수 있는 C_1-C_6 알킬, 예를 들어, 분지형 C_3-C_6 알킬을 지칭한다. 예시적인 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 1-메틸부틸, 1-에틸프로필, 3-메틸펜틸 등을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "알킬"은 사이클로알킬뿐만 아니라 사이클로알킬렌-함유 알킬을 포함한다.

[0080] "알킬렌", "-알킬-" 또는 "알킬렌 쇄" 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 완전히 포화된 직선형 또는 분지형의 2가 탄화수소 쇄 라디칼을 지칭한다. C_1-C_{20} 알킬렌의 비제한적인 예는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, *n*-부틸렌, 에텐일렌, 프로펜일렌, *n*-부텐일렌, 프로핀일렌, *n*-부틴일렌 등을 포함한다. 알킬렌 쇄는 단일 결합을 통해서 분자의 나머지에 그리고 단일 결합을 통해서 라디칼기에 부착된다. 분자의 나머지 및 라디칼기에 대한 알킬렌 쇄의 부착점은 쇄 내의 하나의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통과할 수 있다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알킬렌 쇄는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0081] "알켄일" 또는 "알켄일기"는 2개의 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 직선형 또는 분지형 탄화수소 쇄 라디칼을 지칭한다. 각각의 알켄일기는 단일 결합에 의해서 분자의 나머지에 부착된다. 2 내지 20개의 임의의 수의 탄소 원자를 포함하는 알켄일기가 포함된다. 20개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알켄일기는 C_2-C_{20} 알켄일이고, 10개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알켄일은 C_2-C_{10} 알켄일이며, 6개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알켄일기는 C_2-C_6 알켄일이고, 5개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알켄일은 C_2-C_5 알켄일이다. C_2-C_5 알켄일은 C_5 알켄일, C_4 알켄일, C_3 알켄일 및 C_2 알켄일을 포함한다. C_2-C_6 알켄일은 C_2-C_5 알켄일에 대해서 상기에 기재된 모든 모이어티를 포함하지만, 또한 C_6 알켄일을 포함한다. C_2-C_{10} 알켄일은 C_2-C_5 알켄일 및 C_2-C_6 알켄일에 대해서 상기에 기재된 모든 모이어티를 포함하지만, 또한 C_7, C_8, C_9 및 C_{10} 알켄일을 포함한다. 유사하게, C_2-C_{12} 알켄일은 상기 모이어티 모두를 포함하지만, 또한 C_{11} 및 C_{12} 알켄일을 포함한다. C_2-C_{12} 알켄일의 비제한적인 예는 에텐일(바이닐), 1-프로펜일, 2-프로펜일 (알릴), iso-프로펜일, 2-메틸-1-프로펜일, 1-부텐일, 2-부텐일, 3-부텐일, 1-펜텐일, 2-펜텐일, 3-펜텐일, 4-펜텐일, 1-헥센일, 2-헥센일, 3-헥센일, 4-헥

센일, 5-헥센일, 1-헵텐일, 2-헵텐일, 3-헵텐일, 4-헵텐일, 5-헵텐일, 6-헵텐일, 1-옥텐일, 2-옥텐일, 3-옥텐일, 4-옥텐일, 5-옥텐일, 6-옥텐일, 7-옥텐일, 1-노넨일, 2-노넨일, 3-노넨일, 4-노넨일, 5-노넨일, 6-노넨일, 7-노넨일, 8-노넨일, 1-데센일, 2-데센일, 3-데센일, 4-데센일, 5-데센일, 6-데센일, 7-데센일, 8-데센일, 9-데센일, 1-운데센일, 2-운데센일, 3-운데센일, 4-운데센일, 5-운데센일, 6-운데센일, 7-운데센일, 8-운데센일, 9-운데센일, 10-운데센일, 1-도데센일, 2-도데센일, 3-도데센일, 4-도데센일, 5-도데센일, 6-도데센일, 7-도데센일, 8-도데센일, 9-도데센일, 10-도데센일 및 11-도데센일을 포함한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0082] "알켄일렌" 또는 "알켄일렌 쇄"는 2개의 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 직선형 또는 분지형의 2가 탄화수소 쇄 라디칼을 지칭한다. C_2-C_{20} 알켄일렌의 비제한적인 예는 에텐, 프로펜, 부텐 등을 포함한다. 알켄일렌 쇄는 단일 결합을 통해서 분자의 나머지에 그리고 단일 결합을 통해서 라디칼기에 부착된다. 분자의 나머지 및 라디칼기에 대한 알켄일렌 쇄의 부착점은 쇄 내의 하나의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통과할 수 있다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알켄일렌 쇄는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0083] "알킨일" 또는 "알킨일기"는 2개의 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 직선형 또는 분지형 탄화수소 쇄 라디칼을 지칭한다. 각각 알킨일기는 단일 결합에 의해서 분자의 나머지에 부착된다. 2 내지 20개의 임의의 수의 탄소 원자를 포함하는 알킨일기가 포함된다. 20개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킨일기는 C_2-C_{20} 알킨일이고, 10개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킨일은 C_2-C_{10} 알킨일이며, 6개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킨일기는 C_2-C_6 알킨일이고, 5개 이하의 탄소 원자를 포함하는 알킨일은 C_2-C_5 알킨일이다. C_2-C_5 알킨일은 C_5 알킨일, C_4 알킨일, C_3 알킨일 및 C_2 알킨일을 포함한다. C_2-C_6 알킨일은 C_2-C_5 알킨일에 대해서 상기에 기재된 모든 모이어티를 포함하지만, 또한 C_6 알킨일을 포함한다. C_2-C_{10} 알킨일은 C_2-C_5 알킨일 및 C_2-C_6 알킨일에 대해서 상기에 기재된 모든 모이어티를 포함하지만, 또한 C_7, C_8, C_9 및 C_{10} 알킨일을 포함한다. 유사하게, C_2-C_{12} 알킨일은 상기 모이어티 모두를 포함하지만, 또한 C_{11} 및 C_{12} 알킨일을 포함한다. C_2-C_{12} 알켄일의 비제한적인 예는 에틴일, 프로핀일, 부틴일, 펜틴일 등을 포함한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0084] "알킨일렌" 또는 "알킨일렌 쇄"는 2개의 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 직선형 또는 분지형의 탄화수소 쇄 라디칼을 지칭한다. C_2-C_{20} 알킨일렌의 비제한적인 예는 에틴일렌, 프로파길렌 등을 포함한다. 알킨일렌 쇄는 단일 결합을 통해서 분자의 나머지에 그리고 단일 결합을 통해서 라디칼기에 부착된다. 분자의 나머지 및 라디칼기에 대한 알킨일렌 쇄의 부착점은 쇄 내의 하나의 탄소 또는 임의의 2개의 탄소를 통과할 수 있다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알킨일렌 쇄는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0085] "알콕시" 또는 "-O-알킬"은 화학식 $-OR_a$의 라디칼을 지칭하며, 여기서 R_a는 1 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는 상기에 정의된 바와 같은 알킬, 알켄일 또는 알킨일 라디칼을 지칭한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알콕시기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0086] "알킬아미노"는 화학식 $-NHR_a$ 또는 $-NR_aR_a$의 라디칼을 지칭하며, 여기서 각각의 R_a는 독립적으로, 1 내지 12개의 탄소 원자를 함유하는 상기에 정의된 바와 같은 알킬, 알켄일 또는 알킨일 라디칼이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알킬아미노기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0087] "알킬카보닐"은 $-C(=O)R_a$ 모이어티를 지칭하며, 여기서 R_a는 알킬, 상기에 정의된 바와 같은 알켄일 또는 알킨일 라디칼이다. 알킬 카보닐의 비제한적인 예는 메틸 카보닐("아세탈") 모이어티이다. 알킬카보닐기는 또한 "Cw-Cz 아실"로 지칭될 수 있고, 여기서 w 및 z는 상기에 정의된 바와 같은 R_a 내의 탄소의 수의 범위를 나타낸다. 예를 들어, "C1-C_{10} 아실"은 상기에 정의된 바와 같은 알킬카보닐기를 지칭하며, 여기서 R_a는 상기에 정의된 바와 같은 C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_{10} 알켄일 또는 C_1-C_{10} 알킨일 라디칼이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 알킬 카보닐기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0088] 용어 "아미노알킬"은 하나 이상의 $-NH_2$기로 치환된 알킬기를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 아미노알킬기는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 초과의 $-NH_2$기로 치환된다. 아미노알킬기는 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이

상의 추가 치환체로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0089] "아릴"은 수소, 6 내지 18개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 방향족 고리를 포함하는 탄화수소 고리 시스템 라디칼을 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해서, 아릴 라디칼은 단환식, 이환식, 삼환식 또는 사환식 고리 시스템일 수 있고, 이것은 융합된 또는 브릿지된 고리 시스템을 포함할 수 있다. 아릴 라디칼은 아세안트릴렌, 아세나프틸렌, 아세펜안트릴렌, 안트라센, 아줄렌, 벤젠, 크리센, 플루오르안텐, 플루오렌, *as*-인다센, *s*-인다센, 인단, 인덴, 나프탈렌, 펜알렌, 펜안트렌, 플레이아덴, 피렌 및 트라이페닐렌으로부터 유래된 아릴 라디칼을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 용어 "아릴"은 선택적으로 치환된 아릴 라디칼을 포함하는 것을 의미한다. 아릴은 나프틸에서와 같이 융합될 수 있거나 바이페닐에서와 같이 비융합될 수 있는 다수의 아릴 고리를 포함한다. 아릴 고리는 또한 하나 이상의 환식 탄화수소, 헤테로아릴 또는 복소환식 고리와 융합되거나 융합되지 않을 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "아릴"은 헤테로아릴을 포함한다.

[0090] "아르알킬", "아릴알킬" 또는 "-알킬아릴"은 화학식 $-R_b-R_c$의 라디칼을 지칭하고, 여기서 R_b는 상기에 정의된 바와 같은 알킬렌, 알켄일렌 또는 알킨일렌기이고, R_c는 상기에 정의된 바와 같은 하나 이상의 아릴 라디칼, 예를 들어, 벤질, 다이페닐메틸 등이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 아르알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0091] "알콕시"는 -OR기를 지칭하되, 식 중 R은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는 C_{1-6} 알킬(예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로필옥시 등)이다.

[0092] "카보사이클릴", "탄소환식 고리" 또는 "카보사이클"은 고리 구조를 지칭하고, 여기서 고리를 형성하는 원자는 각각 탄소이다. 탄소환식 고리는 고리 내에 3 내지 20개의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 탄소환식 고리는 아릴 및 사이클로알킬을 포함한다. 사이클로알켄일 및 사이클로알킨일은 본 명세서에 정의된 바와 같다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 카보사이클릴기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0093] "사이클로알킬"은 탄소 및 수소 원자 만으로 이루어진 안정적인 비방향족 단환식 또는 다환식의 완전히 포화된 탄화수소 라디칼을 지칭하고, 이것은 3 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 바람직하게는 3 내지 약 12개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 3 내지 약 8개의 탄소 원자를 갖고, 단일 결합에 의해서 분자의 나머지에 부착된 융합된 또는 브릿지된 고리 시스템을 포함할 수 있다. 단환식 사이클로알킬 라디칼은 예를 들어, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸을 포함한다. 다환식 사이클로알킬 라디칼은 예를 들어, 아다만틸, 노보닐, 데칼린일, 7,7-다이메틸-바이사이클로[2.2.1]헵탄일, 바이사이클로[3.1.0]헥산, 옥타하이드로펜탈렌, 바이사이클로[1.1.1]펜탄, 쿠반 등을 포함한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 사이클로알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다. "사이클로알킬렌"은 환식 고리 시스템 내의 임의의 2개의 탄소에서의 쇄의 결합에 의해서 알킬 쇄 내에 삽입된 사이클로알킬기를 지칭한다.

[0094] "사이클로알켄일"은 탄소 및 수소 원자 만으로 이루어지고, 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 안정적인 비방향족 단환식 또는 다환식 탄화수소 라디칼을 지칭하고, 이것은 3 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 바람직하게는 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖고, 단일 결합에 의해서 분자의 나머지에 부착된 융합된 또는 브릿지된 고리 시스템을 포함할 수 있다. 단환식 사이클로알켄일 라디칼은 예를 들어, 사이클로펜텐일, 사이클로헥센일, 사이클로헵텐일, 사이클로세텐일 등을 포함한다. 다환식 사이클로알켄일 라디칼은 예를 들어, 바이사이클로[2.2.1]헵트-2-엔일 등을 포함한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 사이클로알켄일기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0095] "사이클로알킨일"은 탄소 및 수소 원자 만으로 이루어지고, 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 안정적인 비방향족 단환식 또는 다환식 탄화수소 라디칼을 지칭하고, 이것은 3 내지 20개의 탄소 원자를 갖고, 바람직하게는 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖고, 단일 결합에 의해서 분자의 나머지에 부착된 융합된 또는 브릿지된 고리 시스템을 포함할 수 있다. 단환식 사이클로알킨일 라디칼은 예를 들어, 사이클로헵틴일, 사이클로옥틴일 등을 포함한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 사이클로알킨일기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0096] "사이클로알킬알킬" 또는 "-알킬사이클로알킬"은 화학식 $-R_b-R_d$의 라디칼을 지칭하고, 여기서 R_b는 상기에 정의된 바와 같은 알킬렌, 알켄일렌, 또는 알킨일렌기이고, R_d는 상기에 정의된 바와 같은 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 사이클로알킨일 라디칼이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 사이클로알킬알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0097] "할로알킬"은 상기에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 그 초과의 할로 라디칼에 의해서 치환된 상기에 정의된 바와 같은 알킬 라디칼, 예를 들어, 트라이플루오로메틸, 다이플루오로메틸, 트라이클로로메틸, 2,2,2-트라이플루오로에틸, 1,2-다이플루오로에틸, 3-브로모-2-플루오로프로필, 1,2-다이브로모에틸 등을 지칭한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 할로알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0098] "할로알켄일"은 상기에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 그 초과의 할로 라디칼에 의해서 치환된 상기에 정의된 바와 같은 알켄일 라디칼, 예를 들어, 1-플루오로프로펜일, 1,1-다이플루오로부텐일 등을 지칭한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 할로알켄일기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0099] "할로알킨일"은 상기에 정의된 바와 같은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 그 초과의 할로 라디칼에 의해서 치환된 상기에 정의된 바와 같은 알킨일 라디칼, 예를 들어, 1-플루오로프로핀일, 1-다이플루오로부틴일 등을 지칭한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 할로알켄일기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0100] 예를 들어, "치환된 알킬"에서와 같이 용어 "치환된"은 하나 이상의 비간섭 치환체로 치환된 모이어티(예를 들어, 알킬기)를 지칭하며, 이러한 치환체는 알킬, C_{3-8} 사이클로알킬, 예를 들어, 사이클로프로필, 사이클로부틸 등; 할로, 예를 들어, 플루오로, 클로로, 브로모 및 아이오도; 사이아노; 나이트로; 알콕시, 저급 페닐; 치환된 페닐; 등을 비제한적으로 포함한다. "치환된 아릴"은 치환체로서 하나 이상의 비간섭기를 갖는 아릴이다. 페닐 고리 상의 치환을 위해서, 치환체는 임의의 배향(즉, 오쏘, 메타 또는 파라)으로 존재할 수 있다.

[0101] "비간섭 치환체"는 분자 내에 존재하는 경우 전형적으로 분자 내에 함유된 다른 작용기와 비반응성인 기이다. 비제한적인 예는 할로겐(F, Br, Cl, I), 알킬(예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, *s*-부틸, 펜틸, 네오펜틸, 헥실, 아이소아밀 등), 할로알킬(예를 들어, CF_3, CHF_2, CH_2F 등), 사이클로알킬(사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등), 알콕시(-OR), 할로알콕시(예를 들어, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, $-OCH_2F$ 등), 아미노(예를 들어, -N(H)알킬, -N(알킬)$_2$, -NH(사이클로알킬), -NH(아릴) 등), 아미도(예를 들어, -NH(COR), 설폰일(예를 들어, $-SO_2R$), 아실(예를 들어, -C(O)R, 사이아노, 나이트로, 페닐 및 헤테로아릴(예를 들어, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 피리딜, 피리미딘일 등)을 포함하고, 식 중, R은 독립적으로 H, 알킬, 알킬옥시, 아미노 또는 아릴(예를 들어, 페닐)이다.

[0102] "헤테로사이클릴", "헤테로환식 고리" 또는 "헤테로사이클"은 2개 내지 12개의 탄소 원자 및 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자로 이루어진 안정적인 3- 내지 20-원의 비방향족 고리 라디칼을 지칭한다. 헤테로사이클릴 또는 헤테로환식 고리는 하기에 정의된 바와 같은 헤테로아릴을 포함한다. 본 명세서에 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 헤테로사이클릴 라디칼은 단환식, 이환식, 삼환식 또는 사환식 고리 시스템일 수 있고, 이것은 융합된 또는 브릿지된 고리 시스템을 포함할 수 있고; 헤테로사이클릴 라디칼 내의 질소, 탄소 또는 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고; 질소 원자는 선택적으로 4차화될 수 있고; 헤테로사이클릴 라디칼은 부분적으로 또는 완전히 포화될 수 있다. 이러한 헤테로사이클릴 라디칼의 예는 다이옥솔란일, 티엔일[1,3]다이티안일, 데카하이드로아이소퀴놀릴, 이미다졸린일, 이미다졸린다이닐, 아이소티아졸리딘일, 아이속사졸리딘일, 몰폴린일, 옥타하이드로인돌릴, 옥타하이드로아이소인돌릴, 2-옥소피페라진일, 2-옥소피페리딘일, 2-옥소피롤리딘일, 옥사졸리딘일, 피페리딘일, 피페라진일, 4-피페리돈일, 피롤리딘일, 피라졸리딘일, 퀴뉴클리딘일, 티아졸리딘일, 테트라하이드로퓨릴, 트라이티안일, 테트라하이드로피란일, 티오몰폴린일, 티아몰폴린일, 1-옥소-티오몰폴린일 및 1,1-다이옥소-티오몰폴린일을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 헤테로사이클릴기는 선택적으로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, "치환된 헤테로사이클"은 비간섭 치환체로부터 형성된 하나 이상의 측쇄를 갖는 헤테로사이클이다.

[0103] 용어 "하이드록시알킬" 또는 "하이드록실알킬"은 하나 이상의 하이드록실(-OH)기로 치환된 알킬기를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 하이드록시알킬기는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 초과의 -OH기로 치환된다. 하이드록시알킬기는 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가 치환체로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0104] 용어 "하이드로카빌"은 지방족이든, 부분적으로 또는 완전히 불포화되든, 비환식이든, 환식이든 또는 방향족이든 또는 이들의 임의의 조합물이든 1가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 하이드로카빌기는 1 내지 40개 이상, 1 내지 30개 이상, 1 내지 20개 이상 또는 1 내지 10개 이상의 탄소 원자를 갖는다. 용어 "하이드로카빌렌"은 2가 하이드로카빌기를 지칭한다. 하이드로카빌 또는 하이드로카빌렌기는 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 치환체로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0105] 용어 "헤테로하이드로카빌"은 탄소 원자 중 하나 이상이 산소, 황, 질소 및 인으로부터 선택된 헤테로원자에 의해서 각각 독립적으로 대체된 하이드로카빌기를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 헤테로하이드로카빌기는 1 내지 40개 이상, 1 내지 30개 이상, 1 내지 20개 이상 또는 1 내지 10개 이상의 탄소 원자 및 1 내지 10개 이상 또는 1 내지 5개 이상의 헤테로원자를 갖는다. 용어 "헤테로하이드로카빌렌"은 2가 하이드로카빌기를 지칭한다. 헤테로하이드로카빌 및 헤테로하이드로카빌렌기의 예는 비제한적으로 에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 모이어티, 예컨대, $(-CH_2CH_2O-)_nH$(1가 헤테로하이드로카빌기) 및 $(-CH_2CH_2O-)_n$(2가 헤테로하이드로카빌렌기)(여기서 n은 1 내지 12 이상의 정수임), 프로필렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜 모이어티, 예컨대, $(-CH_2CH_2CH_2O-)_nH$ 및 $(-CH_2CH(CH_3)O-)_nH$(1가 헤테로하이드로카빌기) 및 $(-CH_2CH_2CH_2O-)_n$ 및 $(-CH_2CH(CH_3)O-)_n$(2가 헤테로하이드로카빌렌기)(여기서 n은 1 내지 12 이상의 정수임)을 포함한다. 헤테로하이드로카빌 또는 헤테로하이드로카빌렌기는 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 치환체로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0106] "*N*-헤테로사이클릴"은 적어도 하나의 질소를 함유하는 상기에 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴 라디칼을 지칭하고, 여기서 분자의 나머지에 대한 헤테로사이클릴 라디칼의 부착점은 헤테로사이클릴 라디칼 내의 질소 원자를 통과한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, *N*-헤테로사이클릴기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0107] "헤테로사이클릴알킬" 또는 "-알킬헤테로사이클릴"은 화학식 $-R_b-R_e$의 라디칼을 지칭하고, 여기서 R_b는 상기에 정의된 바와 같은 알킬렌, 알켄일렌 또는 알킨일렌쇄이고, R_e는 상기에 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴 라디칼이고, 헤테로사이클릴이 질소-함유 헤테로사이클릴인 경우, 헤테로사이클릴은 질소 원자에서 알킬, 알켄일, 알킨일 라디칼에 부착될 수 있다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 헤테로사이클릴기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0108] "헤테로아릴"은 수소 원자, 1 내지 13개의 탄소 원자, 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 바람직하게 선택된 1 내지 6개의 헤테로원자 및 적어도 하나의 방향족 고리를 포함하는 5- 내지 20-원의 고리 시스템 라디칼을 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해서, 헤테로아릴 라디칼은 단환식, 이환식, 삼환식 또는 사환식 고리 시스템일 수 있고, 이것은 융합된 또는 브릿지된 고리 시스템을 포함할 수 있고; 헤테로아릴 라디칼 내의 질소, 탄소 또는 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고; 질소 원자는 선택적으로 4차화될 수 있다. 예는 아제핀일, 아크리딘일, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤즈인돌릴, 벤조다이옥솔릴, 벤조퓨란일, 벤조옥사졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티아다이아졸릴, 벤조[*b*][1,4]다이옥세핀일, 1,4-벤조다이옥산일, 벤조나프토퓨란일, 벤족사졸릴, 벤조다이옥솔릴, 벤조다이옥신일, 벤조피란일, 벤조피라노닐, 벤조퓨란일, 벤조퓨란오닐, 벤조티엔일(벤조티오페닐), 벤조트라이아졸릴, 벤조[4,6]이미다조[1,2-a]피리딘일, 카바졸릴, 신놀린일, 다이벤조퓨란일, 다이벤조티오페닐, 퓨란일, 퓨라노닐, 아이소티아졸릴, 이미다졸릴, 인다졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 아이소인돌릴, 인돌린일, 아이소인돌린일, 아이소퀴놀릴, 인돌리진일, 아이속사졸릴, 나프티리딘일, 옥사다이아졸릴, 2-옥소아제핀일, 옥사졸릴, 옥시란일, 1-옥사이도피리딘일, 1-옥사이도피리미딘일, 1-옥사이도피라진일, 1-옥사이도피리다진일, 1-페닐-1*H*-피롤릴, 펜아진일, 페노티아진일, 펜옥사진일, 프탈라진일, 프테리딘일, 퓨린일, 피롤릴, 피라졸릴, 피리딘일, 피라진일, 피리미딘일, 피리다진일, 퀴나졸린일, 퀴녹살린일, 퀴놀린일, 퀴뉴클리딘일, 아이소퀴놀린일, 테트라하이드로퀴놀린일, 티아졸릴, 티아다이아졸릴, 트라이아졸릴, 테트라졸릴, 트라이아진일 및 티오페닐(즉, 티엔일)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 헤테로아릴기는 선택적으로 치환될 수 있다. 일부 실시형태에서, "치환된 헤테로아릴"은 친환체로서 하나 이상의 비간섭기를 갖는 헤테로아릴이다.

[0109] "*N*-헤테로아릴"은 적어도 하나의 질소를 함유하는 상기에 정의된 바와 같은 헤테로아릴 라디칼을 지칭하고, 여기서 분자의 나머지에 대한 헤테로아릴 라디칼의 부착점은 헤테로아릴 라디칼 내의 질소 원자를 통과한다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, *N*-헤테로아릴기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0110] "헤테로아릴알킬" 또는 "-알킬헤테로아릴"은 화학식 $-R_b-R_f$의 라디칼을 지칭하고, 여기서 R_b는 상기에 정의된 바와 같은 알킬렌, 알켄일렌 또는 알킨일렌 쇄이고, R_f는 상기에 정의된 바와 같은 헤테로아릴 라디칼이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 헤테로아릴알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0111] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치환된"은 적어도 하나의 수소 원자가 비수소 원자에 대한 결합에 의해서 본 명세서에 제공된 목록으로 대체된 상기 기 중 임의의 것(즉, 알킬, 알킬렌, 알켄일, 알켄일렌, 알킨일, 알킨일렌, 알콕시, 알킬아미노, 알킬카보닐, 티오알킬, 아릴, 아르알킬, 카보사이클릴, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 사

이클로알킨일, 사이클로알킬알킬, 할로알킬, 헤테로사이클릴, *N*-헤테로사이클릴, 헤테로사이클릴알킬, 헤테로아릴, *N*-헤테로아릴 및/또는 헤테로아릴알킬)을 의미한다. 치환체 목록이 포함되지 않은 경우, 치환체는 비제한적으로 할로겐 원자, 예컨대, F, Cl, Br 및 I; 기 내의 산소 원자, 예컨대, 하이드록실기, 알콕시기 및 에스터기; 기 내의 황 원자, 예컨대, 티올기, 티오알킬기, 설폰기, 설폰일기 및 설폭사이드기; 기 내의 질소 원자, 예컨대, 아민, 아마이드, 알킬아민, 다이알킬아민, 아릴아민, 알킬아릴아민, 다이아릴아민, N-옥사이드, 이미드 및 엔아민; 기 내의 규소 원자, 트라이알킬실릴기, 다이알킬아릴실릴기, 알킬다이아릴실릴기 및 트라이아릴실릴기; 및 다양한 다른 기 내의 다른 헤테로원자일 수 있다. "치환된"은 또한 하나 이상의 수소 원자가 헤테로원자, 예컨대, 옥소, 카보닐, 카복실 및 에스터 기 내의 산소; 및 기, 예컨대, 이민, 옥심, 하이드라존 및 나이트릴 내의 질소에 대한 더 고차의 결합(예를 들어, 이중- 또는 삼중-결합)에 의해서 대체된 상기 기 중 임의의 것을 의미한다. 예를 들어, "치환된"은 하나 이상의 수소 원자가 할라이드, 사이아노, 나이트로, 하이드록실, 설프하이드릴, 아미노, $-OR_g$, $-SR_g$, $-NR_hR_i$, 알킬, 알켄일, 알킨일, 할로알킬, 하이드록시알킬, 아미노알킬, -알킬사이클로알킬, -알킬헤테로사이클릴, -알킬아릴, -알킬헤테로아릴, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴, $-C(=O)R_g$, $-C(=NR_j)R_g$, $-S(=O)R_g$, $-S(=O)_2R_g$, $-S(=O)_2OR_k$, $-C(=O)OR_k$, $-OC(=O)R_g$, $-C(=O)NR_hR_i$, $-NR_gC(=O)R_g$, $-S(=O)_2NR_hR_i$, $-NR_gS(=O)_2R_g$, $-OC(=O)OR_g$, $-OC(=O)NR_hR_i$, $-NR_gC(=O)OR_g$, $-NR_gC(=O)NR_hR_i$, $-NR_gC(=NR_j)NR_hR_i$, $-P(=O)(R_g)_2$, $-P(=O)(OR_k)R_g$, $-P(=O)(OR_k)_2$, $-OP(=O)(R_g)_2$, $-OP(=O)(OR_k)R_g$, 및 $-OP(=O)(OR_k)_2$로 대체된 상기 기 중 임의의 것을 포함하고, 여기서 R_g의 각각의 존재는 수소, 알킬, 할로알킬, 하이드록시알킬, 아미노알킬, -알킬사이클로알킬, -알킬헤테로사이클릴, -알킬아릴, -알킬헤테로아릴, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴부터 독립적으로 선택되고; R_h 및 R_i의 각각의 존재는 수소, 알킬, 할로알킬, 하이드록시알킬, 아미노알킬, -알킬사이클로알킬, -알킬헤테로사이클릴, -알킬아릴, -알킬헤테로아릴, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택되거나 또는 R_h과 R_i는 이들이 부착되는 질소 원자와 함께 취해져서 헤테로환식 또는 헤테로아릴 고리를 형성하고; R_j의 각각의 존재는 독립적으로 수소, $-OR_g$, 알킬, 할로알킬, 하이드록시알킬, 아미노알킬, -알킬사이클로알킬, -알킬헤테로사이클릴, -알킬아릴, -알킬헤테로아릴, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴이고; R_k의 각각의 존재는 독립적으로 수소, W, 알킬, 할로알킬, 하이드록시알킬, 아미노알킬, -알킬사이클로알킬, -알킬헤테로사이클릴, -알킬아릴, -알킬헤테로아릴, 사이클로알킬, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴이며, 여기서 W의 각각의 존재는 독립적으로 H^+, Li^+, Na^+, K^+, Cs^+, Mg^{+2}, Ca^{+2} 또는 $^+N(R_g)_2R_hR_i$이다.

[0112] "티오알킬"은 화학식 $-SR_a$의 라디칼을 지칭하며, 여기서 R_a는 1 내지 12개의 탄소 원자를 함유하는 상기에 정의된 바와 같은 알킬, 알켄일 또는 알킨일 라디칼이다. 본 명세서에서 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 티오알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0113] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "유기 라디칼"은 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 및 치환된 아릴을 포함해야 한다.

[0114] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 상징 " "(이하 "부착 결합 지점"으로 지칭될 수 있음)은 2개의 화학 엔티티 사이의 부착 지점인 결합을 나타내고, 이들 중 하나는 부착 결합 지점에 부착된 것으로 도시되어 있고, 이들 중 나머지는 부착 결합 지점에 부착되는 것으로 도시되어 있지 않다. 예를 들어, " "는 화학 엔티티 "XY"가 부착 결합 지점을 통해서 또 다른 화학 엔티티에 결합되는 것을 나타낸다. 추가로, 도시되지 않은 화학 엔티티에 대한 구체적인 부착 지점은 추론에 의해서 명시될 수 있다. 예를 들어, 화합물 CH_3-R^3(여기서 R^3은 H 또는 " "임)은 R^3이 "XY"인 경우, 부착 결합 지점은 R^3이 CH_3에 결합되는 것으로서 도시된 결합과 동일한 결합이라는 것을 암시한다.

[0115] "융합된"은 본 개시내용의 화합물 내의 존재하는 고리 구조에 융합된 본 명세서에 기재된 임의의 고리 구조를 지칭한다. 융합된 고리가 헤테로사이클릴 고리 또는 헤테로아릴 고리인 경우, 융합된 헤테로사이클릴 고리 또는 융합된 헤테로아릴 고리의 부분이 되는 존재하는 고리 구조 상의 임의의 탄소 원자는 질소 원자로 대체될 수 있

다.

[0116] "친전자체" 및 "친전자성 기"는 친전자성 중심, 즉, 친핵체와 반응할 수 있는 전자 추구 중심을 갖는 이온성일 수 있는 이온 또는 원자 또는 원자 집합을 지칭한다.

[0117] "친핵체" 및 "친핵성 기"는 친핵성 중심, 즉, 친전자성 중심을 추구하거나 친전자체를 갖는 중심을 갖는 이온성일 수 있는 이온 또는 원자 또는 원자 집합을 지칭한다.

[0118] "생리학적으로 절단 가능한" 또는 "가수분해 가능한" 또는 "분해 가능한" 결합은 생리 조건 하에서 물과 반응하는(즉, 가수분해되는) 결합이다. 수 중에서 가수분해되는 결합의 경향은 2개의 중심 원자를 연결하는 일반적인 유형의 링키지뿐만 아니라 이러한 중심 원자에 부착된 치환체에 따라 달라진다. 적절한 가수분해적으로 불안정적이거나 약한 링키지는 카바메이트, 카복실레이트 에스터, 포스페이트 에스터, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에터, 이민, 오쏘에스터, 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0119] "방출 가능한 링커"는 단백질을 거대분자와 연결하는 링커를 지칭한다. 가수분해, 효소적 과정, 촉매적 과정 또는 다른 것을 통해 거대분자가 방출되어 접합되지 않은 단백질 모이어티가 생성된다. 특정 실시형태에서, 방출 가능한 링커는 생체내에서 일어나는 전술한 과정에 의해 거대분자를 방출한다.

[0120] "효소적으로 분해 가능한 링키지"는 하나 이상의 효소에 의해 분해되는 링키지를 의미한다.

[0121] "가수분해적으로 안정적인" 링키지 또는 결합은 화학 결합, 전형적으로 공유 결합을 지칭하며, 이는 수 중에서 실질적으로 안정적이고, 즉, 생리 조건 하에서 연장된 시간 기간에 걸쳐 임의의 인지 가능한 정도로 가수분해를 겪지 않는다. 가수분해적으로 안정적인 링키지의 예는 탄소-탄소 결합(예를 들어, 지방족 쇄), 탄소-황 결합, 에터, 아마이드, 우레탄 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 일반적으로, 가수분해적으로 안정적인 링키지는 생리 조건 하에서 하루에 약 1 내지 2% 미만의 가수분해 속도를 나타내는 것이다. 대표적인 화학 결합의 가수분해 속도는 대부분의 표준 화학 교과서에서 찾을 수 있다.

[0122] "약제학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체"는 본 개시내용의 조성물에 선택적으로 포함될 수 있고, 환자에게 유의한 유해한 독성 효과를 유발하지 않는 부형제를 지칭한다. "약리학적 유효량", "생리학적 유효량" 및 "치료적 유효량"은 혈류 또는 표적 조직에서 목적하는 수준의 접합체(또는 상응하는 비접합된 단백질)를 제공하는 데 필요한 단백질-거대분자 접합체의 양을 의미하도록 상호 호환적으로 사용된다. 정확한 양은 다양한 인자, 예를 들어, 특정 단백질, 치료용 조성물의 성분 및 물성, 의도된 환자 집단, 개별 환자 고려 사항 등에 의존할 것이며, 본 명세서에 제공된 정보에 기초하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0123] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "IL-2 모이어티"는 인간 IL-2 활성을 갖는 모이어티를 지칭한다. IL-2 모이어티는 또한 중합체 시약과의 반응에 적합한 하나 이상의 친전자성 기 또는 친핵성 기를 가질 것이다. 또한, "IL-2 모이어티"라는 용어는 접합 전의 IL-2 모이어티 및 접합 후의 IL-2 모이어티 잔기를 둘 다를 포함한다. 하기에 더 상세히 설명되는 바와 같이, 당업자는 임의의 주어진 모이어티가 IL-2 활성을 갖는지 여부를 결정할 수 있다. 도 1의 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 IL-2 모이어티뿐만 아니라 이에 실질적으로 상동성인 임의의 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-2 모이어티"는 예를 들어, 부위 지향 돌연변이유발에 의해 또는 돌연변이를 통해 우연히 의도적으로 변형된 이러한 단백질을 포함한다. 이들 용어는 또한 1 내지 6개의 추가 글리코실화 부위를 갖는 유사체, 단백질의 카복시 단부에 적어도 하나의 추가 아미노산을 갖는 유사체(여기서 추가 아미노산(들)은 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함함), 및 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체를 포함한다. 이 용어는 자연 및 재조합 방식으로 생성된 모이어티 둘 다를 포함한다.

[0124] "실질적으로 상동성"이라는 용어는 특정 대상 서열, 예를 들어, 돌연변이체 서열이 하나 이상의 치환, 결실 또는 추가에 의해 참조 서열과 달라지는 것을 의미하며, 이의 순 효과는 참조 서열과 대상 서열 사이의 부정적인 기능성 비유사성을 초래하지 않는다. 본 개시내용의 목적을 위해, 80% 초과(더 바람직하게는 85% 초과, 보다 더 바람직하게는 90% 초과, 가장 바람직하게는 95% 초과)의 상동성, 동등한 생물학적 활성(반드시 동등한 강도의 생물학적 활성은 아닐 수 있음) 및 동등한 발현 특성을 갖는 서열은 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 상동성을 결정하기 위해, 성숙한 서열의 절단은 무시되어야 한다.

[0125] "단편"이라는 용어는 IL-2 모이어티의 일부 또는 단편의 아미노산 서열을 갖고, IL-2의 생물학적 활성을 갖는 임의의 단백질 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 단편은 IL-2 모이어티의 단백질 분해에 의해 생산된 단백질 또는 폴리펩타이드뿐만 아니라 당업계에서 일상적인 방법에 의한 화학적 합성에 의해 생산된 단백질 또는 폴리펩타이

드를 포함한다.

[0126] 용어 "환자"는 활성제(예를 들어, 접합체)의 투여에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 병태를 앓고 있거나 이러한 병태에 취약한 살아있는 유기체를 지칭하며, 인간 및 동물 둘 다를 포함한다.

[0127] "선택적인" 또는 "선택적으로"는 이후에 기재되는 상황이 일어날 수 있거나 일어나지 않을 수 있어서, 이러한 기재는 이러한 상황이 일어나는 예 및 일어나지 않는 예를 포함한다는 것을 의미한다.

[0128] "실질적으로"는 거의 전체적으로 또는 완전히를 의미하고, 예를 들어, 조건의 50% 초과, 51% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상 및 95% 이상 중 하나 이상을 충족한다.

[0129] 펩타이드 내의 아미노산 잔기는 다음과 같이 약칭된다: 페닐알라닌은 Phe 또는 F이고; 류신은 Leu 또는 L이고; 아이소류신은 lie 또는 I이고; 메티오닌은 Met 또는 M이고; 발린은 Val 또는 V이고; 세린은 Ser 또는 S이고; 프롤린은 Pro 또는 P이고; 트레오닌은 Thr 또는 T이고; 알라닌은 Ala 또는 A이고; 타이로신은 Tyr 또는 Y이고; 히스티딘은 His 또는 H이고; 글루타민은 Gln 또는 Q이고; 아스파라긴은 Asn 또는 N이고; 라이신은 Lys 또는 K이고; 아스파트산은 Asp 또는 D이고; 글루탐산은 Glu 또는 E이고; 시스테인은 Cys 또는 C이고; 트립토판은 Trp 또는 W이고; 아르기닌은 Arg 또는 R이고; 글리신은 Gly 또는 G이다.

[0130] 본 개시내용은 하나 이상의 원자가 동일한 원자 번호를 갖지만 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 본 개시내용의 모든 약제학적으로 허용 가능한 동위원소 표지된 화합물을 포함한다. 본 개시내용의 화합물에 포함되기에 적합한 동위원소의 예는 수소의 동위원소, 예컨대, ^{2}H 및 ^{3}H, 탄소의 동위원소, 예컨대, ^{11}C, ^{13}C 및 ^{14}C, 염소의 동위원소, 예컨대, ^{36}Cl, 플루오린의 동위원소, 예컨대, ^{18}F, 아이오딘의 동위원소, 예컨대, ^{123}I 및 ^{125}I, 질소의 동위원소, 예컨대, ^{13}N 및 ^{15}N, 산소의 동위원소, 예컨대, ^{15}O, ^{17}O 및 ^{18}O, 인의 동위원소, 예컨대, ^{32}P, 및 황의 동위원소, 예컨대, ^{35}S를 포함한다.

[0131] 본 개시내용의 특정 동위원소 표지된 화합물, 예를 들어, 방사성 동위원소를 혼입한 것은 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구에 유용하다. 방사성 동위원소 삼중수소, 즉, ^{3}H 및 탄소-14, 즉, ^{14}C는 혼입이 용이하고 감지 수단이 존재한다는 점에서 이러한 목적에 특히 유용하다.

[0132] 더 무거운 동위원소, 예컨대, 중수소, 즉, ^{2}H로의 치환은 더 큰 대사 안정성, 예를 들어, 생체내 반감기 증가 또는 투여 요구 사항 감소로 인한 특정 치료 이점을 제공할 수 있으므로, 일부 상황에서는 바람직할 수 있다.

[0133] 양전자 방출 동위원소, 예컨대, ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O 및 ^{13}N으로의 치환은 기질 수용체 점유를 조사하기 위한 양전자 방출 단층촬영(Positron Emission Topography: PET) 연구에서 유용할 수 있다.

[0134] 본 개시내용의 동위원소-표지된 화합물은 일반적으로 당업자에게 공지된 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다.

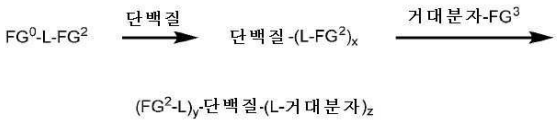
[0135] "거울상이성질체, 거울상이성질체의 혼합물, 2종 이상의 부분입체이성질체의 혼합물, 호변이성질체, 2종 이상의 호변이성질체의 혼합물, 위치이성질체, 2종 이상의 위치이성질체의 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 전구약물"은 "(i) 그곳에 언급된 화합물의 거울상이성질체, 거울상이성질체의 혼합물, 2종 이상의 부분입체이성질체의 혼합물, 호변이성질체, 2종 이상의 호변이성질체의 혼합물, 위치이성질체, 2종 이상의 위치이성질체의 혼합물 또는 동위원소 변이체; (ii) 그곳에 언급된 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 전구약물; 또는 (iii) 그곳에 언급된 화합물의 거울상이성질체, 거울상이성질체의 혼합물, 2종 이상의 부분입체이성질체의 혼합물, 호변이성질체, 2종 이상의 호변이성질체의 혼합물, 위치이성질체, 2종 이상의 위치이성질체의 혼합물 또는 동위원소 변이체의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물"이라는 어구와 동일한 의미를 갖는다.

[0136] *제조 방법*

[0137] 본 개시내용은 치료제로의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여되는 경우 치료용 단백질 작용제의 전달 속도를 제어하기 위한 단백질-[거대분자]z 접합체의 제조 방법을 제공한다. 본 개시내용의 방법을 통해 제조된 접합체는 링커의 방출 속도 및 거대분자의 수에 의해 제어되는, 지속된 기간에 걸쳐 치료제를 전달하는 수단을 제공한다.

[0138] 일 양상에서, 본 개시내용은 하기 반응식 (I)을 사용하여 단백질-거대분자 접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다:

[0139] [반응식 I]



[0140]

[0141] 식 중, x는 1 내지 25의 정수이고;

[0142] y는 0 내지 24의 정수이며;

[0143] z는 1 내지 25의 정수이고;

[0144] x = y + z이며;

[0145] L은 링커이고;

[0146] FG^0은 활성 단백질 작용제의 친핵성기와 반응하여 카바메이트 링키지, 티올 브릿지 등을 포함하는 링키지를 형성할 수 있는 작용기이며;

[0147] FG^2는 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 FG^3과 반응할 수 있는 작용기이고;

[0148] FG^3은 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 FG^2와 반응할 수 있는 작용기이고;

[0149] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이고;

[0150] 사이토카인은 GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-ɣ, MIP-1α, MIP-1β, TGF-β, TNF-α 또는 TNF-β를 포함한다.

[0151] 특정 실시형태에서, 사이토카인은 IL-2이다.

[0152] 특정 실시형태에서, IL-2는 서열번호 1과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 포함한다.

[0153] 케모카인은 MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-24, MCP-5, CXCL76, I-309(CCL1), BCA1(CXCL13), MIG, SDF-1/PBSF, IP-10, I-TAC, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, 에오탁신(eotaxin)-1, 에오탁신-2, GCP-2, Gro-α, Gro-β, Gro-ɣ, LARC(CCL20), ELC (CCL19), SLC(CCL21), ENA-78, PBP, TECK(CCL25), CTACK (CCL27), MEC, XCL1, XCL2, HCC-1, HCC-2, HCC-3 또는 HCC-4를 포함한다.

[0154] 항체는 앤지오포이에틴 2, AXL, ACVR2B, 앤지오포이에틴 3, 액티빈 수용체-유사 키나제 1, 아밀로이드 A 단백질, β-아밀로이드, AOC3, BAFF, BAFF-R, B7-H3, BCMAC, A-125(이미테이션(imitation)), C5, CA-125, CCL11(에오탁신-1), CEA, CSF1R, CD2, CD3, CD4, CD6, CD15, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD54, CD56, CD70, CD74, CD97B, CD125, D134, CD147, CD152, CD154, CD279, CD221, C242 항원, CD276, CD278, CD319, 클로스트리디엄 디피실(clostridium difficile), 클라우딘 18 아이소폼 2, CSF1R, CEACAM5, CSF2, 탄산무수화효소(carbonic anhydrase) 9, CLDN18.2, 심장 마이오신, CCR4, CGRP, 응고 인자 III, c-Met, CTLA-4, DPP4, DR5, DLL3, DLL4, 다비가트란(dabigatran), EpCAM, 에볼라바이러스 당단백질, 엔도글린, 에피시알린, EPHA3, c-Met, FGFR2, 피브린 II 베타 쇄, FGF 23, 폴레이트 수용체 1, GMCSF, GD2 강글리오사이드, GDF-8, GCGR, 젤라티나제 B, 글리피칸 3, GPNMB, GMCSF 수용체 α-쇄, 칼리크레인, KIR2D, ICAM-1, ICOS, IGF1, IGF2, IGF-1 수용체, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4Rα, IL-5, IL-6, IL-6 R, IL-9, IL-12, IL-13, IL17A, IL17F, IL-20, IL-22, IL-23, IL-31, IFN-α, IFN- β, IFN-ɣ, 인테그린 α4β7, 인터페론 α/β 수용체, 인플루엔자 A 헤마글루티닌, ILGF2, HER1, HER2, HER3, HHGFR, HGF, HLA-DR, B형 간염 표면 항원, HNGF, Hsp90, HGFR, L-셀렉틴, 루이스-Y 항원, LYPD3, LOXL2, LIV-1, MUC1, MCP-1, MSLN, 메소텔린, MIF, MCAM, NCA-90, NCA-90노치 1, 넥틴-4, PCDP1, PD-L1, PD-1, PCSK9, PTK7, PCDC1, 포스파티딜세린, RANKL, RTN4, 레서스 인자(Rhesus factor), ROR1, SLAMF7, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 알파 독소, 스타필로코커스 아우레우스 2성분 류코시딘, SOST, 셀렉틴

P, SLITRK6, SDC1, TFPI, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, TNF-α, TWEAK 수용체, TNFRSF8, TYRP1, 타우 단백질, TAG-72, TSLP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TGF-β, TAG-72, TRAP, TIGIT, 테나신 C, OX-40, VEGF-A, VWF, VEGFR1 또는 VEGFR2 중 하나 이상을 표적으로 한다.

[0155] 펩타이드는 하기를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다: 글루카곤-유사 펩타이드 1(GLP-1), 엑센딘-2, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 심방 나트륨이뇨 인자(atrial natriuretic factor: ANF), 그렐린, 바소프레신, 성장 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬(GHRH), RC-3095, 소마토스타틴, 봄베신, PCK-3145, Phe-His-Ser-Cys-Asn(PHSCN), IGF1, B형 나트륨뇨 펩타이드, 펩타이드 YY(PYY), 인터페론, 트롬보스폰딘, 앤지오포이에틴, 칼시토닌, 성선자극호르몬 방출호르몬, 히루딘, 글루카곤, 항-TNF-알파, 섬유아세포 성장인자, 과립구 집락 자극 인자, 오비네피타이드, 뇌하수체 갑상선 호르몬(pituitary thyroid hormone: PTH), 류프롤라이드, 세르모렐린, 프라모렐린, 네시리타이드, 로티갑타이드, 실렌기타이드, MBP-8298, AL-108, 엔푸비르타이드, 티말파신, 답타마이신, HLFI-II, 락토페린, 델미타이드, 글루타티온, T-세포 에피토프 PR1, 프로테아제-3 펩타이드 1-11, B-세포 에피토프 P3, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬(lutenizing hormone-releasing hormone: LHRH), 물질 P, 뉴로키닌 A, 뉴로키닌 B, CCK-8, 엔케팔린, 예컨대, 류신 엔케팔린 및 메티오닌 엔케팔린, 더마셉틴, [des-Ala20, Gln34]-더마셉틴, 계면활성제-연관 항미생물성 음이온성 펩타이드, 아피다에신 IA; 아피다에신 IB; OV-2; 1025, 아세틸-접착소 펩타이드(1025-1044) 아마이드; 테로마신(49-63); 펙시가난(MSI-78); 인돌리시딘; 아펠린-15(63-77); CFPIO(71-85); 치사 인자(LF) 저해제 탄저병 관련; 박텐신; C형 간염 바이러스 NS3 프로테아제 저해제 2; C형 간염 바이러스 NS3 프로테아제 저해제 3; 간염 바이러스 NS3 프로테아제 저해제 4; NS4A-NS4B C형 간염 바이러스(NS3 프로테아제 저해제 I); HIV-1, HIV-2 프로테아제 기질; 항-FM 펩타이드; Bak-BH3; Bax BH3 펩타이드(55-74)(야생형); Bid BH3-r8; CTT(젤라티나제 저해제); E75(Her-2/neu)(369-377); GRP78 결합 키메라. 펩타이드 모티프; p53(17-26); EGFR2/KDR 길항제; 콜리벨린 AGA-(C8R) HNGl 7(휴마닌 유도체); 활성-의존성 신경영양 인자(Activity-Dependent Neurotrophic Factor: ADNF); 베타-분비효소 저해제 I; 베타-분비효소 저해제 2; ch[베타]-아밀로이드(30-16); 휴마넌(Humanun: HN) sHNG, [Gly14]-HN, [Glyl 4]-휴마닌; 안지오텐신 전환 효소 저해제(Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor: BPP); 레닌 저해제 III; 아넥신 I(ANXA-I; Ac2-12); 항염증성 펩타이드 I; 항염증 펩타이드 2; 항염증성 아펠린 12; [D-Phel2, Leul4]-봄베신; 안테나페디아(Antennapedia) 펩타이드(산)(페네트라틴); 안테네페디아(Antennepedia) 리더 펩타이드(CT); 마스토파란(Mastoparan); [Thr28, Nle31]-콜레시스토키닌(25-33) 설페이트화; 노시셉틴(1-13)(아마이드); 섬유소용해 저해 인자; 감마 피브리노겐(377-395); 제닌; 오베스타틴(인간); [His1, Lys6]-GHRP(GHRP-6); [Ala5[베타]-Ala8]-뉴로키닌 A(4-10); 뉴로메딘 B; 뉴로메딘 C; 뉴로메딘 N; 활성-의존성 신경영양 인자(ADNF-14); 아세탈린 I(오피오이드 수용체 길항제 I); 아세탈린 2(오피오이드 수용체 길항제 2); 아세탈린 3(아편유사제 수용체 길항제 3); ACTH(1-39)(인간); ACTH(7-38)(인간); 소바진; 지질동성 호르몬(Adipokinetic Hormone)(풀무치(Locusta Migratoria)); 미리스토일화된 ADP-리보실화 인자 6, myr-ARF6(2-13); PAMP(1-20)(프로아드레노메둘린(1-20) 인간); AGRP(25-51); 아밀린(8-37)(인간); 앤지오텐신 I(인간); 앤지오텐신 II(인간); 압스타틴(아미노펩티다제 P 저해제); 브레비닌-I; 마가이닌 I; RL-37; LL-37(항미생물 펩타이드)(인간); 세크로핀 A; 항산화제 펩타이드 A; 항산화제 펩타이드 B; L-카모신; BcI 9-2; NPVF; 신경펩타이드AF(hNPAF)(인간); Bax BH3 펩타이드(55-74); bFGF 저해성 펩타이드; bFGF 저해성 펩타이드 II; 브래디키닌; [Des-Argl OJ-HOE 140; 카스파제 I 저해제 II; 카스파제 I 저해제 VIII; Smac N7 단백질(MEKl 유래 펩타이드 저해제 I; hBD-1([베타]-데펜신-1)(인간); hBD-3([베타]-데펜신-3)(인간); hBD-4([베타]-데펜신-4)(인간); HNP-I(데펜신 인간 호중구 펩타이드 I); HNP-2(데펜신 인간 호중구 펩타이드-2 디노핀 A(1-17)); 엔도몰핀-I; [베타]-엔돌핀(인간 포신(돼지)); 엔도텔린 2(인간); 피브리노겐 결합 저해제 펩타이드; 사이클로(-GRGDSP); TP508(트롬빈-유래 펩타이드); 갈라닌(인간); GIP(인간); 가스트린 방출 펩타이드(인간); 가스트린-1(인간); 그렐린(인간); PDGF-BB 펩타이드; [D-Lys3]-GHRP-6; HCV 코어 단백질(1-20); a3Bl 인테그린 펩타이드 단편(325)(아마이드); 라미닌 펜타펩타이드(아마이드) Mel-아노트로핀-증강 인자(Mel-anotropin-Potentiating Factor: MPF); VA-[베타]-MSH, 리포트로핀-Y(프로오피오멜라노코르틴(Proopiomelanocortin)-유래); 심방 나트륨이뇨 펩타이드(1-28)(인간); 바소나트린 펩타이드(1-27); [Ala5, B-Ala8]-뉴로키닌 A(4-10); 뉴로메딘 L(NKA); Ac-(Leu28, 31)-신경펩타이드 Y(24-26); 알리테신; 뇌 신경펩타이드 II; [D-tyrll]-뉴로텐신; IKKy NEMO 결합 도메인(NBD) 저해성 펩타이드; PTD-p50(NLS) 저해성 펩타이드; 오렉신 A(소, 인간, 마우스, 래트); 오렉신 B(인간); 아쿠아포린-2(254-267)(인간 판크레아스타틴(Pancreastatin))(37-52); 췌장 폴리펩타이드(인간); 신경펩타이드; 펩타이드 YY(3-36)(인간); 하이드록시메틸-피토켈라틴 2; PACAP(I -27)(아마이드, 인간, 소, 래트); 프로락틴 방출 펩타이드(1-31)(인간); 살루신-알파; 살루신-베타; 사포신 C22; 세크레틴(인간); L-셀렉틴; 엔도키닌 A/B; 엔도키닌 C(인간); 엔도키닌 D(인간); 트롬빈 수용체(42-48) 효능제(인간); LSKL(트롬보스폰딘의 저해제); 티로트로핀 방출 호르몬(Thyrotropin

Releasing Hormone: TRH); P55-TNFR 단편; 유로텐신 II(인간); VIP(인간, 돼지, 래트); VIP 길항제; 헬로더민; 엑세나타이드; ZP10(AVE0010O); 프람리니타이드; AC162352(PYY)(3-36); PYY; 오비네피타이드; 글루카곤; GRP; 그렐린(GHRP6); 류프롤라이드; 히스트렐린; 옥시토신; 아토시반(RWJ22164); 서모렐린; 네시리타이드; 비발리루딘(Hirulog); 이카티반트; 아비프타딘; 로티갭타이드(ZP123, GAP486); 실렌지타이드(EMD-121924, RGD 펩타이드); AlbuBNP; BN-054; 앤지오텐신 II; MBP-8298; 펩타이드 류신 아르기닌; 지코노타이드; AL-208; AL-108; 카베티콘; 트라이펩타이드; SAL; 콜리벤; 휴마닌; ADNF-14; VIP(혈관작용 장 펩타이드); 티말파신; 바시트라신; 그라미디신; 펙시가난(MSI-78); P1 13; PAC-113; SCV-07; HLF1-11(락토페린); DAPTA; TRI-1144; 트리트릅티신(Tritrpticin); 항-플라민 2; 가텍스(테두글루타이드, ALX-0600); 스티무박스(L-BLP25); 크리살린(TP508); 멜라노난 II; 스판타이드 II; 세룰레타이드; 신칼라이드; 펜타가스틴; 세크레틴; 엔도스타틴 펩타이드; E-셀렉틴; HER2; IL-6; IL-8; IL-10; PDGF; 트롬보스폰딘; uPA (I); uPA (2); VEGF; VEGF (2); 펜타펩타이드-3; XXLRR; 베타-아밀로이드 원섬유발생(Beta-Amyloid Fibrillogenesis); 엔도몰핀-2; TIP 39(결절누두(Tuberoinfundibular) 신경펩타이드); PACAP (1-38)(아마이드, 인간, 소, 래트); TGFB 활성화 펩타이드; 인슐린 감작 인자(ISF402); 전환 성장 인자 BI 펩타이드(TGF-B1); 캐룰레인 방출 인자; IELLQAR(8-branchMAPS); 티가포타이드 PK3145; 고세렐린; 아바렐릭스; 세트로렐릭스; 가니렐릭스; 데가렐릭스(트립토렐린); 바루시반(FE 200440); 프랄모렐린; 옥트레오타이드; 엡티피바타이드; 네타미프타이드(INN-00835); 압타마이신; 스판타이드 II; 델미타이드(RDP-58); AL-209; 엔푸버타이드; IDR-I; 헥사펩타이드-6; 인슐린-A 쇄; 란레오타이드; 헥사[rho]엡타이드-3; 인슐린 B-쇄; 글라긴-A 쇄; 글라긴-B 쇄; 인슐린-LisPro B-쇄 유사체; 인슐린-아스파트 B-쇄 유사체; 인슐린-글루리신 B 쇄 유사체; 인슐린-데터머(Determir) B 쇄 유사체; 소마토스타틴 종양 저해 유사체; 판크레아스타틴(37-52); 혈관작용 장 펩타이드 단편(KKYL-NH2); 및 디놀핀 A. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 단백질의 예는 면역독소 SS1P, 아데노신 데아미나제, 아르기니나제 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0156] 거대분자는 수용해성 중합체, 지질, 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 거대분자는 약 6 내지 약 26개 탄소 원자를 포함하는 지방산, 2-메타크릴로일-옥시에틸 포스포릴 콜린, 폴리(아크릴산), 폴리(아크릴레이트), 폴리(아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일몰폴린), 폴리(알킬옥시) 중합체, 폴리(아마이드), 폴리(아미도아민), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(아스파트아마이드), 폴리(부티르산), 폴리(글리콜산), 폴리부틸렌 테레프탈레이트, 폴리(카프로락톤), 폴리(카보네이트), 폴리(사이아노아크릴레이트), 폴리(다이메틸아크릴아마이드), 폴리(에스터), 폴리(에틸렌), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸 포스페이트), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(글리콜산), 폴리(??알파-하이드록시산), 폴리(하이드록시에틸 아크릴레이트), 폴리(하이드록시에틸옥사졸린), 폴리(하이드록시메타크릴레이트), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아마이드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(하이드록시프로필옥사졸린), 폴리(이미노카보네이트), 폴리(락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(메타크릴아마이드), 폴리(메타크릴레이트), 폴리(메틸옥사졸린), 폴리(오가노포스파젠), 폴리(오쏘 에스터), 폴리(옥사졸린), 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알코올), 폴리포스파젠, 폴리(프로필렌 글리콜), 폴리(당류), 폴리(실록산), 폴리(우레탄), 폴리(바이닐 알코올), 폴리(바이닐 아민), 폴리(바이닐메틸에터), 폴리(바이닐피롤리돈), 실리콘, 아밀로스, 셀룰로스, 카보메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 키틴, 키토산, 덱스트란, 덱스트린, 젤라틴, 히알루론산(HA) 및 유도체, 작용화된 히알루론산, 만난, 펙틴, 헤파린, 헤파란 설페이트(HS), 람노갈락투로난, 전분, 하이드록시알킬 전분, 하이드록시에틸 전분(HES), 폴리시알산(PSA) 및 다른 탄수화물계 중합체, 자일란 및 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 중합체.

[0157] 거대분자는 또한 알부민, 트랜스페린, 트랜스티레틴, 면역글로불린, XTEN 펩타이드, 글리신-풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩타이드, 엘라스틴-유사 폴리펩타이드 (ELP), CTP 펩타이드 또는 젤라틴-유사 단백질(GLK) 중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다.

[0158] 특정 실시형태에서, 링커 L은 방출 가능한 링커(RL)의 잔기이다.

[0159] 특정 실시형태에서, x 또는 z는 2 이상이다. 특정 실시형태에서, x 또는 z는 3 이상이다. 특정 실시형태에서, x 또는 z는 4 이상이다. 특정 실시형태에서, x 또는 z는 5 이상이다. 특정 실시형태에서, x 또는 z는 6 이상이다. 특정 실시형태에서, x 또는 z는 6 초과이다.

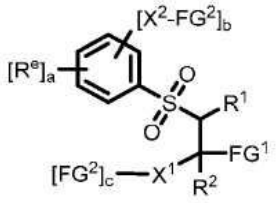
[0160] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 제조 방법은 단백질과 다중 이작용성 링커의 접합을 포함하는 제1 단계에 관한 것이다. 링커의 작은 크기로 인해서, 단백질과 거대분자를 직접 접합시키는 것에 비해서, 접합 과정이 더 효율적이고 더 많은 경우의 접합을 달성할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 명세서에 기재된 바와 같이, 개시된 방법의 제2 단계는 링커를 거대분자와 높은 효율로 연결하도록 설계된 클릭 화학 반응을 수반할 수 있다. 특정 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 이 방법은 입체 장애를 최소화하여 반응 효율을 향상시킬 수 있

는 이점을 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 합성 및 정제 단계가 간단하고, 저비용이기 때문에, 이 방법은 중합체-단백질 치료제의 대규모 생산 및 제조에 상당한 이점을 제공한다.

[0161] *이작용성 방출 가능한 링커*

[0162] 본 개시내용의 접합체는 이작용성 방출 가능한 링커로부터 유래될 수 있다.

[0163] 일부 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (I) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체의 이작용성 방출 가능한 링커에 관한 것이다:



(I)

[0164]

[0165] 식 중,

[0166] X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

[0167] X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

[0168] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0169] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0170] R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기(electron altering group)이고;

[0171] a는 0 내지 4의 정수이고;

[0172] b는 1 내지 3의 정수이고;

[0173] c는 0 내지 1의 정수이며;

[0174] FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지, 예컨대, 카바메이트 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

[0175] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이다.

[0176] 화학식 (I)의 일부 실시형태에서, R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬, C_{2-6} 알켄일, 치환된 C_{2-6} 알켄일, C_2-$_6$ 알킨일, 치환된 C_2-$_6$ 알킨일, 페닐 또는 치환된 페닐이다. 특정 실시형태에서, R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬 또는 치환된 C_{1-5} 알킬이다.

[0177] 화학식 (I)의 일부 실시형태에서, R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, -CONH(C_{1-5} 알킬) 또는 -CONH(페닐), 치환된 -CONH(C_{1-5} 알킬) 또는 -CONH(페닐), - SO_2NH(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2NH(페닐), 치환된 - SO_2NH(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2NH(페닐), - SO_2(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2(페닐), 치환된 - SO_2(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2(페닐), C_{1-5} 알콕시, 치환된 C_{1-5} 알콕시, C_{1-5} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬, 페닐 또는 5- 내지 6-원 헤테로아릴 또는 치환된 페닐 또는 5- 내지 6-원 헤테로아릴이다.

[0178] 화학식 (I)의 일부 실시형태에서, a는 0 내지 3의 정수이다. 일부 실시형태에서, a는 0 내지 2의 정수이다. 일

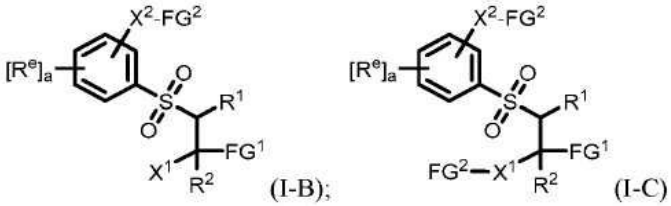
부 실시형태에서, a는 0이다. 일부 실시형태에서, a는 1이다. 일부 실시형태에서, a는 2이다. 일부 실시형태에서, a는 3이다. 일부 실시형태에서, a는 4이다.

[0179] 화학식 (I)의 일부 실시형태에서, b는 1 또는 2의 정수이다. 일부 실시형태에서, b는 1이다. 일부 실시형태에서, b는 2이다. 일부 실시형태에서, b는 3이다.

[0180] 화학식 (I)의 일부 실시형태에서, 일부 실시형태에서, c는 0이다. 일부 실시형태에서, c는 1이다.

[0181] 화학식 (I)의 일부 실시형태에서, X^1 및 X^2는 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 상이한 스페이서 모이어티이다.

[0182] 화학식 (I) 내에서, 보다 정의된 구조를 갖는 이작용성 방출 가능한 링커가 제공된다:

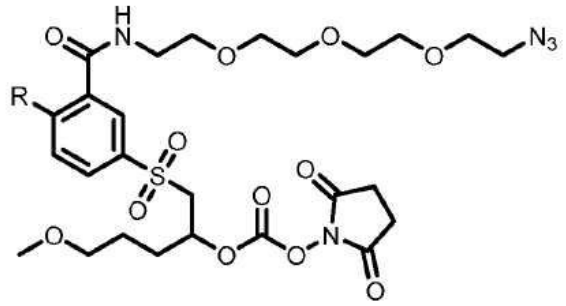


[0183]

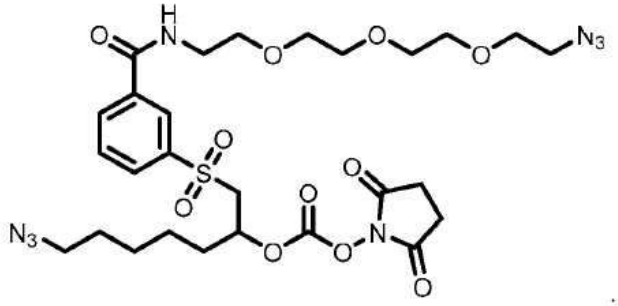
[0184] 식 중, X^1 각각은 제1 스페이서 모이어티이고; X^2는 제2 스페이서 모이어티이며; R^1, R^2, $[R^e]_a$, FG^1 및 FG^2는 상기에 정의된 바와 같다.

[0185] 화학식 (I), (I-B) 또는 (I-C)의 특정 실시형태에서, a는 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 H, Me 또는 Et이며; R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0186] 화학식 (I), (I-B) 또는 (I-C)의 특정 실시형태에서, 이작용성 방출 가능한 링커는 하기 구조를 갖는다:

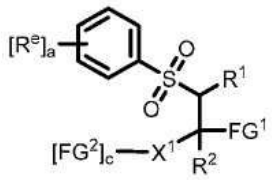


R = H, CF_3, Cl ; 또는



[0187]

[0188] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (XVIII) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체의 이작용성 방출 가능한 링커에 관한 것이다:



(XVIII)

[0189]

[0190] 식 중,

[0191] X^1은 스페이서 모이어티이고;

[0192] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0193] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0194] R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기이고;

[0195] a는 0 내지 4의 정수이고;

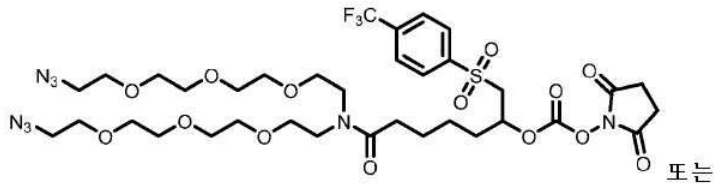
[0196] c는 2이고;

[0197] FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

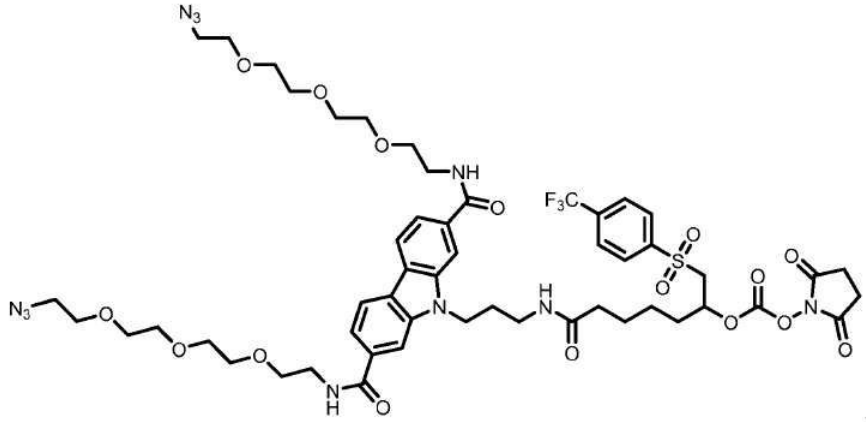
[0198] FG^2는 클릭 화학(click chemistry)을 통해서 반응할 수 있는 작용기이다.

[0199] 화학식 (XVIII)의 특정 실시형태에서, a는 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며; R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0200] 화학식 (XVIII)의 특정 실시형태에서, 이작용성 방출 가능한 링커는 하기 구조 중 하나를 갖는다:

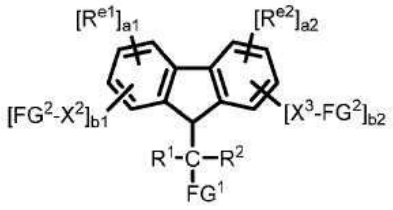


또는



[0201]

[0202] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (II) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체의 이작용성 방출 가능한 링커에 관한 것이다:



(II)

[0203]

[0204] 식 중,

[0205] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0206] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0207] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0208] b1은 1이며;

[0209] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0210] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0211] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0212] X^2는, 존재하는 경우, 제2 스페이서 모이어티이며;

[0213] X^3은, 존재하는 경우, 제3 스페이서 모이어티이며;

[0214] FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지, 예컨대, 카바메이트 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

[0215] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

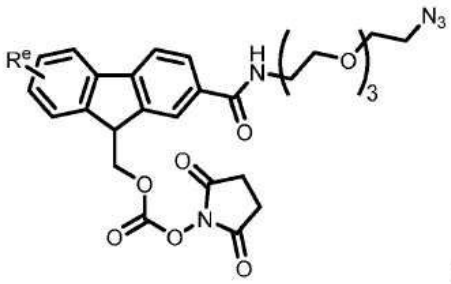
[0216] 화학식 (II)의 일부 실시형태에서, R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬, C_{2-6} 알켄일, 치환된 C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, 치환된 C_{2-6} 알킨일, 페닐 또는 치환된 페닐이다. 특정 실시형태에서, R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬 또는 치환된 C_{1-5} 알킬이다.

[0217] 화학식 (II)의 일부 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로 나이트로, 사이아노, 할로겐, 할로알킬(예를 들어, $-CF_3$, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2F$), $-OC_{1-5}$ 알킬, -O-할로알킬(예를 들어, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, $-OCH_2F$, $-OCH_2F$), $-NH(C_{1-5}$ 알킬), $-NHCO(C_{1-5}$ 알킬), $-NHSO_2(C_{1-5}$ 알킬), $-CONH(C_{1-5}$ 알킬) 또는 $-SO_2NH(C_{1-5}$ 알킬)이다. 특정 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0218] 화학식 (II)의 일부 실시형태에서, X^2 및 X^3은 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 상이한 스페이서 모이어티이다.

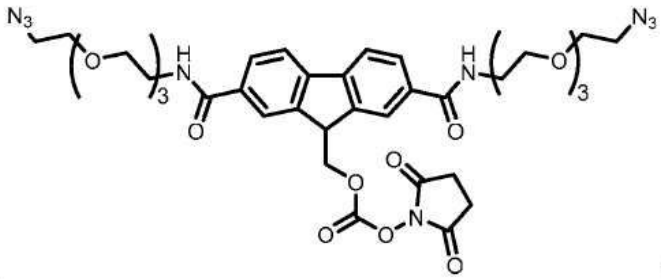
[0219] 화학식 (II)의 특정 실시형태에서, a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 H, Me 또는 Et이며; R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0220] 추가의 예시적인 이작용성 링커는 하기 화학식 (II-A) 또는 (II-B)에 포함된다:



[0221] (II-A);

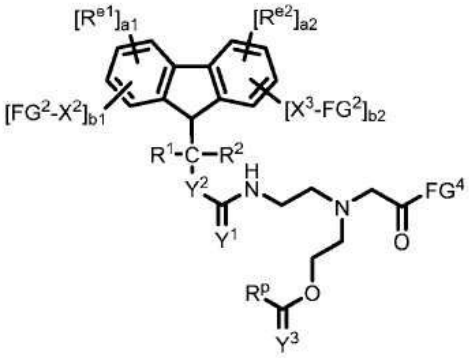
[0222] 식 중, R^e는 수소 또는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기이다. 특정 실시형태에서, R^e는 수소 또는 플루오로이다.



[0223] (II-B)

[0224] 이들 방출 가능한 링키지-제공 시약은 미국 특허 제20060293499A1호에 제시된 절차에 따라서 제조될 수 있다.

[0225] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (III) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체의 이작용성 방출 가능한 링커에 관한 것이다:



[0226] (III)

[0227] 식 중,

[0228] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0229] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0230] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0231] b1은 1이며;

[0232] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0233] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0234] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0235] R^{p}는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0236] X^{2}는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0237] X^{3}은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0238] Y^{1}은 O 또는 S이며;

[0239] Y^{2}는 O 또는 S이고;

[0240] Y^{3}은 O 또는 S이며;

[0241] FG^{2}는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0242] FG^{4}는 활성제의 아미노기와 반응하여 아마이드 링키지를 형성할 수 있는 작용기이다.

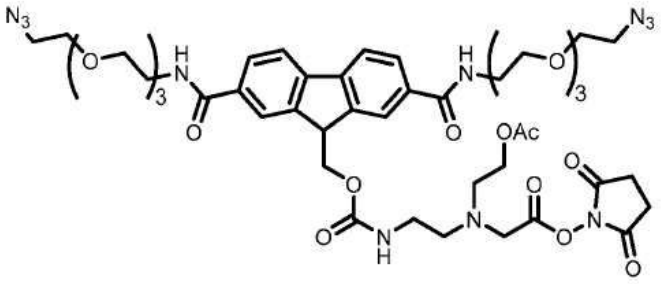
[0243] 화학식 (III)의 일부 실시형태에서, R^{1}, R^{2} 및 R^{p}는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬, C_{2-6} 알켄일, 치환된 C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, 치환된 C_{2-6} 알킨일, 페닐 또는 치환된 페닐이다. 특정 실시형태에서, R^{1} 및 R^{2}는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬 또는 치환된 C_{1-5} 알킬이다.

[0244] 화학식 (III)의 일부 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로 나이트로, 사이아노, 할로겐, 할로알킬(예를 들어, $-CF_3$, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2F$), $-OC_{1-5}$ 알킬, -O-할로알킬(예를 들어, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, $-OCH_2F$, $-OCH_2F$), $-NH(C_{1-5}$ 알킬), $-NHCO(C_{1-5}$ 알킬), $-NHSO_2(C_{1-5}$ 알킬), $-CONH(C_{1-5}$ 알킬) 또는 $-SO_2NH(C_{1-5}$ 알킬)이다. 특정 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0245] 화학식 (III)의 일부 실시형태에서, X^{2} 및 X^{3}은 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^{2}와 X^{3}은 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^{2}와 X^{3}은 상이한 스페이서 모이어티이다.

[0246] 화학식 (III)의 특정 실시형태에서, a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고; R^{1} 및 R^{2}는 각각 독립적으로 H, Me 또는 Et이며; R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

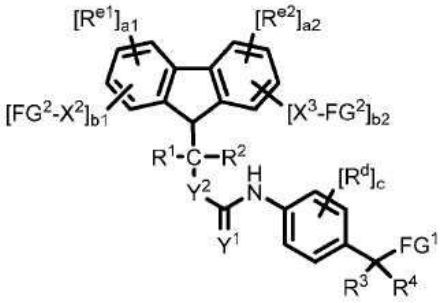
[0247] 예시적인 이작용성 방출 가능한 링커는 하기 화학식 (III-A)에 포함된다:



(III-A)

[0248]

[0249] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (IV) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체의 이작용성 방출 가능한 링커에 관한 것이다:



(IV)

[0250]

[0251] 식 중,

[0252] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알케일, 치환된 알케일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0253] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알케일, 치환된 알케일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0254] R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알케일, 치환된 알케일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0255] R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알케일, 치환된 알케일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0256] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0257] b1은 1이며;

[0258] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0259] c는 0 내지 4의 정수이며;

[0260] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0261] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0262] R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴 또는 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

[0263] X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0264] X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0265] Y^1은 O 또는 S이며;

[0266] Y^2는 O 또는 S이고;

[0267] FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지, 예컨대, 카바메이트 링키지를 형성할 수 있는 작용기이고;

[0268] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0269] 화학식 (IV)의 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^3 및 R^4는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬, C_{2-6} 알켄일, 치환된 C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, 치환된 C_{2-6} 알킨일, 페닐 또는 치환된 페닐이다. 특정 실시형태에서, R^1, R^2, R^3 및 R^4는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬 또는 치환된 C_{1-5} 알킬이다.

[0270] 화학식 (IV)의 일부 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로 나이트로, 사이아노, 할로겐, 할로알킬(예를 들어, $-CF_3$, $-CHF_2$, $-CH_2F$, $-CH_2F$), $-OC_{1-5}$ 알킬, -O-할로알킬(예를 들어, $-OCF_3$, $-OCHF_2$, $-OCH_2F$, $-OCH_2F$), $-NH(C_{1-5}$ 알킬), $-NHCO(C_{1-5}$ 알킬), $-NHSO_2(C_{1-5}$ 알킬), $-CONH(C_{1-5}$ 알킬) 또는 $-SO_2NH(C_{1-5}$ 알킬)이다. 특정 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0271] 화학식 (IV)의 일부 실시형태에서, R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CONH(C_{1-5}$ 알킬) 또는 -CONH(페닐), 치환된 $-CONH(C_{1-5}$ 알킬) 또는 -CONH(페닐), - $SO_2NH(C_{1-5}$ 알킬) 또는 - SO_2NH(페닐), 치환된 - $SO_2NH(C_{1-5}$ 알킬) 또는 - SO_2NH(페닐), - $SO_2(C_{1-5}$ 알킬) 또는 - SO_2(페닐), 치환된 - $SO_2(C_{1-5}$ 알킬) 또는 - SO_2(페닐), C_{1-5} 알콕시, 치환된 C_{1-5} 알콕시, C_{1-5} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬, 페닐 또는 5- 내지 6-원 헤테로아릴 또는 치환된 페닐 또는 5- 내지 6-원 헤테로아릴이다.

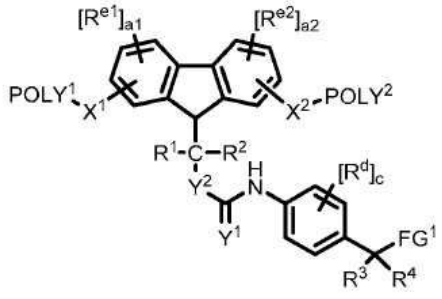
[0272] 화학식 (IV)의 일부 실시형태에서, X^2 및 X^3은 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 상이한 스페이서 모이어티이다.

[0273] 방출 가능한 링커, 예컨대, 화학식 (III) 및 화학식 (IV)의 링커를 사용하는 것의 이점은 안정성을 개선시킬 가능성이며, 이는 지속적인 약물 방출을 제공하여 궁극적으로는 연장된 치료 효능을 제공한다. 따라서, 본 개시내용의 링커는 선행 기술의 중합체-단백질 치료제보다 중합체-단백질 치료제의 안정성 및 저장성에 대한 이점을 제공한다.

[0274] *방출 가능한 링커를 갖는 중합체 시약*

[0275] 본 개시내용은 또한 방출 가능한 링커를 갖는 중합체 시약으로부터 유래될 수 있는 접합체에 관한 것이다.

[0276] 일부 양상에서, 본 개시내용은 하기 화학식 (V) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체의 방출 가능한 링커를 갖는 중합체 시약에 관한 것이다:

[0277] 

(V)

[0278] 식 중,

[0279] $POLY^1$은 제1 수용해성 중합체이고;

[0280] $POLY^2$는 제2 수용해성 중합체이고;

[0281] X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

[0282] X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

[0283] Y^1은 O 또는 S이며;

[0284] Y^2는 O 또는 S이고;

[0285] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0286] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0287] R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0288] R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0289] a1은 0 내지 3의 정수이고;

[0290] a2는 0 내지 3의 정수이고;

[0291] c는 0 내지 4의 정수이며;

[0292] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0293] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0294] R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

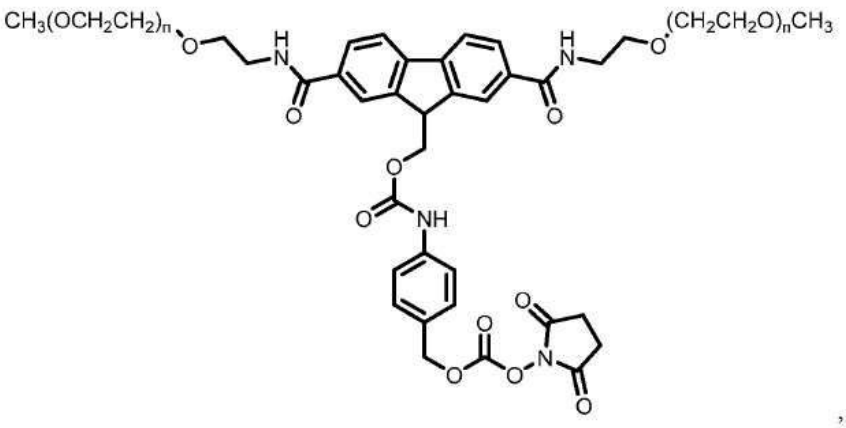
[0295] FG^1은 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지, 예컨대, 카바메이트 링키지를 형성할 수 있는 작용기이다.

[0296] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^3, R^4, R^{e1}, R^{e2} 및 R^d는 화학식 (IV)에서 상기와 같이 정의된다.

[0297] 화학식 (V)의 일부 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 동일한 전자 변경기이다. 일부 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 상이한 전자 변경기이다.

[0298] 화학식 (V)의 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 상이한 수용해성 중합체이다.

[0299] 화학식 (V)의 일부 실시형태에서, X^1 및 X^2는 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 상이한 스페이서 모이어티이다. 예시적인 중합체 시약은 하기 화학식 (V-A)에 포함된다:

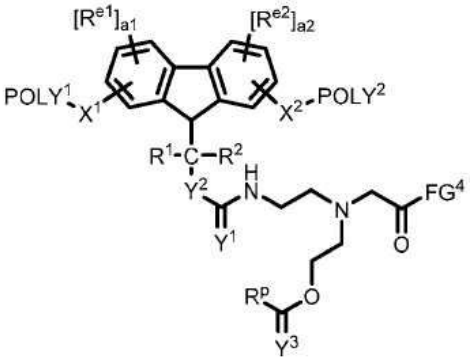


(V-A)

[0300]

[0301] 식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500, 예를 들어, 4, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500(이들 사이의 모든 범위 및 값 포함)이다.

[0302] 2개의 방출 가능한 링키지를 갖는 다른 중합체 시약은 하기 화학식 (VI) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물 또는 이의 동위원소 변이체를 포함한다:



(VI)

[0303]

[0304] 식 중,

[0305] $POLY^1$은 제1 수용해성 중합체이고;

[0306] $POLY^2$는 제2 수용해성 중합체이고;

[0307] X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

[0308] X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

[0309] Y^1은 O 또는 S이며;

[0310] Y^2는 O 또는 S이고;

[0311] Y^3은 O 또는 S이며;

[0312] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알케일, 치환된 알케일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0313] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알케일, 치환된 알케일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0314] a1은 0 내지 3의 정수이고;

[0315] a2는 0 내지 3의 정수이고;

[0316] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0317] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0318] R^{p}는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0319] FG^{4}는 활성제의 아미노기와 반응하여 방출 가능한 링키지, 예컨대, 아마이드 링키지를 형성할 수 있는 작용기이다.

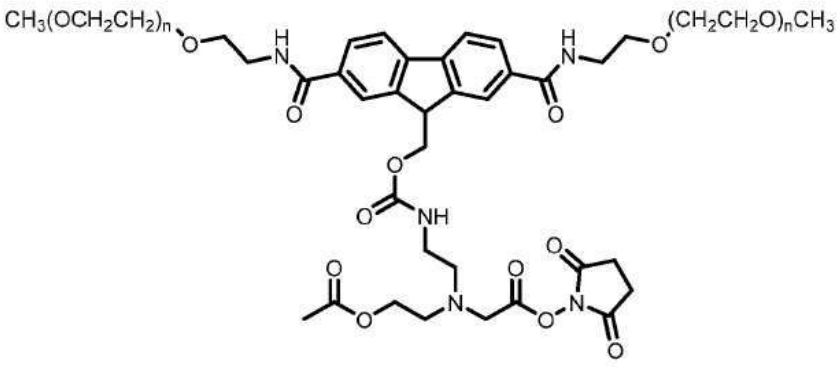
[0320] 화학식 (VI)의 일부 실시형태에서, R^{1}, R^{2} 및 R^{p}는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬, C_{2-6} 알켄일, 치환된 C_{2-6} 알켄일, C_{2-6} 알킨일, 치환된 C_{2-6} 알킨일, 페닐 또는 치환된 페닐이다. 특정 실시형태에서, R^{1}, R^{2}, R^{3} 및 R^{4}는 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬 또는 치환된 C_{1-5} 알킬이다.

[0321] 화학식 (VI)의 일부 실시형태에서, R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, -CONH(C_{1-5} 알킬) 또는 -CONH(페닐), 치환된 -CONH(C_{1-5} 알킬) 또는 -CONH(페닐), - SO_2NH(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2NH(페닐), 치환된 - SO_2NH(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2NH(페닐), - SO_2(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2(페닐), 치환된 - SO_2(C_{1-5} 알킬) 또는 - SO_2(페닐), C_{1-5} 알콕시, 치환된 C_{1-5} 알콕시, C_{1-5} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬, 치환된 C_{1-5} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬, 페닐 또는 5- 내지 6-원 헤테로아릴 또는 치환된 페닐 또는 5- 내지 6-원 헤테로아릴이다.

[0322] 화학식 (VI)의 일부 실시형태에서, $POLY^{1}$ 및 $POLY^{2}$는 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^{1}$ 및 $POLY^{2}$는 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^{1}$ 및 $POLY^{2}$는 상이한 수용해성 중합체이다.

[0323] 화학식 (VI)의 일부 실시형태에서, X^{1} 및 X^{2}는 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^{1}과 X^{2}는 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^{1}과 X^{2}는 상이한 스페이서 모이어티이다.

[0324] 예시적인 중합체 시약은 하기 화학식 (VI-A)에 포함된다:



(VI-A)

[0325]

[0326] 식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500, 예를 들어, 4, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500(이들 사이의 모든 범위 및 값 포함)이다.

[0327] *단백질-링커 접합체*

[0328] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 링커에 공유 부착된 단백질의 잔기를 포함하는 접합체를 제공하며, 접합체는 하기 화학식 (XIX)에 따른 구조 또는 이의 입체이성질체, 위치이성질체, 호변이성질체 또는 혼합

물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이의 전구약물을 포함한다:

[0329] 단백질-$(L)_z$

[0330] (XIX)

[0331] 식 중,

[0332] z는 1 내지 25의 정수이며;

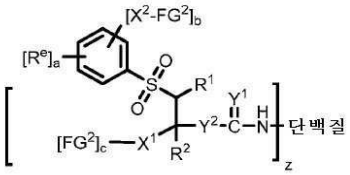
[0333] L은 링커이고;

[0334] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0335] 본 명세서에 기재된 접합체는 반응식 (I)로부터의 1단계 합성의 생성물이다. 특정 실시형태에서, 링커는 방출 가능하지 않은 링커이다. 특정 실시형태에서, 링커는 방출 가능한 링커이다. 일부 실시형태에서, 방출 가능한 링커는 본 명세서에 개시된 이작용성 방출 가능한 링커의 유도체(예를 들어, 화학식 (I), 화학식 (II), 화학식 (III) 또는 화학식 (IV)의 링커)이다.

[0336] 특정 실시형태에서, 링커는 단백질 내의 잔기의 아민기에 공유 부착된다. 특정 실시형태에서, 잔기는 라이신이다. 특정 실시형태에서, 단백질에 부착된 상이한 수의 링커를 포함하는 접합체의 혼합물을 포함하는 조성물이 제공된다.

[0337] 단백질과 접합된 이작용성 방출 가능한 링키지-제공 시약을 사용하여 형성된 예시적인 접합체는 하기 화학식 (VII)의 접합체를 포함한다:



(VII)

[0338]

[0339] 식 중,

[0340] X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

[0341] X^2는, 존재하는 경우, 제2 스페이서 모이어티이며;

[0342] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0343] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0344] R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기이고;

[0345] a는 0 내지 5의 정수이고;

[0346] b는 0 내지 3의 정수이고;

[0347] c는 0 내지 2의 정수이며;

[0348] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0349] Y^1은 O 또는 S이며;

[0350] Y^2는 O 또는 S이고;

[0351] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0352] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0353] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0354] 일부 실시형태에서, R^1, R^2 및 R^e는 화학식 (I)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0355] 화학식 (VII)의 일부 실시형태에서, a는 0 내지 4의 정수이다. 일부 실시형태에서, a는 0 내지 3의 정수이다. 일부 실시형태에서, a는 0 내지 2의 정수이다. 일부 실시형태에서, a는 0이다. 일부 실시형태에서, a는 1이다. 일부 실시형태에서, a는 2이다. 일부 실시형태에서, a는 3이다. 일부 실시형태에서, a는 4이다. 일부 실시형태에서, a는 5이다.

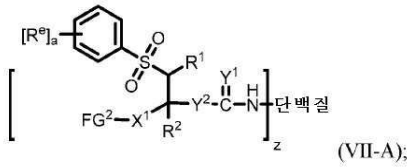
[0356] 화학식 (VII)의 일부 실시형태에서, b는 0 내지 2의 정수이다. 일부 실시형태에서, b는 0이다. 일부 실시형태에서, b는 1이다. 일부 실시형태에서, b는 2이다. 일부 실시형태에서, b는 3이다.

[0357] 화학식 (VII)의 일부 실시형태에서, c는 0 또는 1이다. 일부 실시형태에서, c는 0이다. 일부 실시형태에서, c는 1이다. 일부 실시형태에서, c는 2이다.

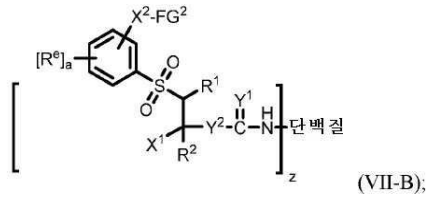
[0358] 화학식 (VII)의 일부 실시형태에서, z는 1 내지 20의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 1 내지 15의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 1 내지 10의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 1 내지 8의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 1 내지 5의 정수이다.

[0359] 당업자는 본 명세서에 기재된 a, b, c 및 z에 대한 값 및 범위가 본 개시내용의 접합체를 제공하도록 임의의 방식으로 조합될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, a는 0 내지 2의 정수이고, b는 0 또는 1이며, c는 0 또는 1이고, z는 1 내지 25의 정수이다. 일부 실시형태에서, a는 1이고, b는 1이며, c는 1이고, Z는 1 내지 25의 정수이다. 일부 실시형태에서, a는 1이고, b는 0이며, c는 1이고, z는 1 내지 25의 정수이다. 일부 실시형태에서, a는 1이고, b는 1이며, c는 0이고, z는 1 내지 25의 정수이다. 이들 및 다수의 다른 조합이 본 개시내용에서 고려된다. 일부 실시형태에서, X^1 및 X^2는 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 상이한 스페이서 모이어티이다.

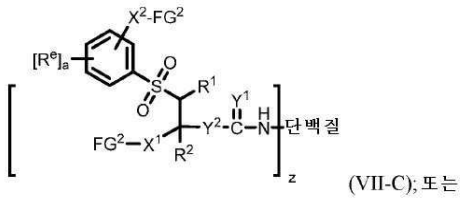
[0360] 화학식 (VII) 내에서, 보다 정의된 구조를 갖는 접합체는 하기 화학식 (VII-A), (VII-B), (VII-C), 또는 (II-D)로 고려된다:



(VII-A);

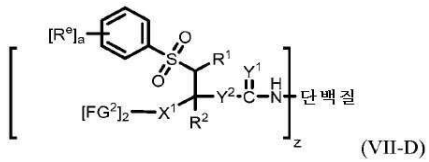


(VII-B);



(VII-C); 또는

[0361]



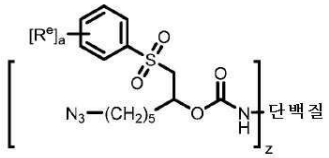
(VII-D)

[0362]

[0363] 식 중, X^1은 제1 스페이서 모이어티이고; X^2는 제2 스페이서 모이어티이며; R^1, R^2, R^e, a, z, Y^1, Y^2, FG^2 및 단백질은 화학식 (VII)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0364] 화학식 (VII), (VII-A), (VII-B), (VII-C) 또는 (VII-D)의 특정 실시형태에서, a는 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며; R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0365] 추가의 예시적인 접합체는 하기 구조 (VII-A1)을 갖는다:

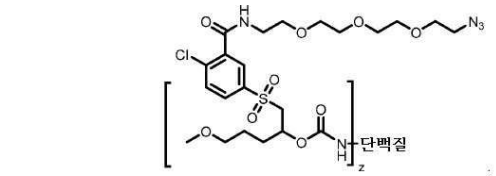


(VII-A1)

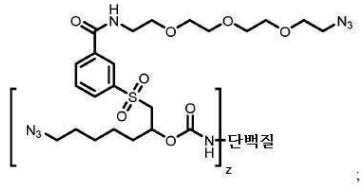
[0366]

[0367] 식 중, R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기이고; z는 1 내지 25의 정수이며; "-NH-"는 단백질 모이어티에 개별적으로 부착된 하나 이상의 링커를 나타낸다. 특정 실시형태에서, 식 중, a는 1 내지 2의 정수이고; R^e는 4-F, 4-Cl, $4-CF_3$, 2,4-다이플루오로 또는 $2-CF_3-4-F$ 치환이다.

[0368] 추가의 예시적인 접합체는 하기 구조를 갖는다:

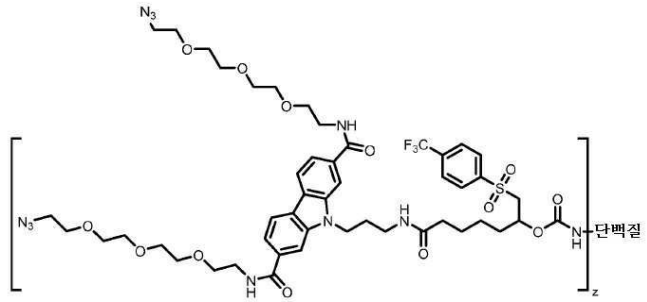


;



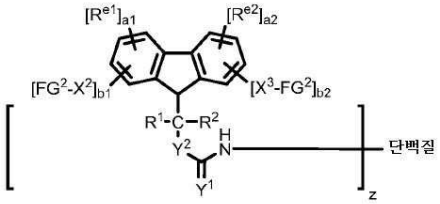
;

;또는



[0369] .

[0370] 이작용성 방출 가능한 링키지-제공 시약을 사용하여 형성된 다른 예시적인 접합체는 하기 화학식 (VIII)의 접합체를 포함한다:



(VIII)

[0371]

[0372] 식 중,

[0373] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0374] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0375] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0376] b1은 1이며;

[0377] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0378] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0379] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0380] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0381] X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0382] X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0383] Y^1은 O 또는 S이며;

[0384] Y^2는 O 또는 S이고;

[0385] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

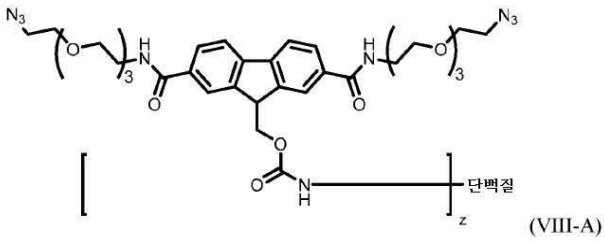
[0386] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0387] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0388] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^{e1} 및 R^{e2}는 화학식 (VI)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0389] 화학식 (VIII)의 특정 실시형태에서, a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며; R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

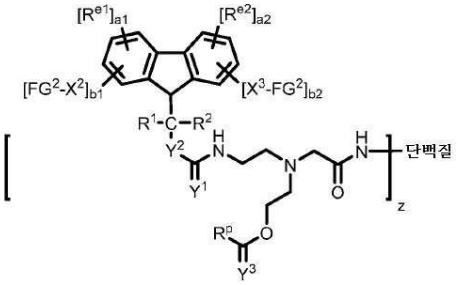
[0390] 화학식 (VIII) 내에서, 보다 정의된 구조를 갖는 접합체는 하기 화학식 (VIII-A)로 고려된다:



(VIII-A)

[0391]

[0392] 2개의 방출 가능한 링키지-제공 시약을 사용하여 형성된 다른 예시적인 접합체는 하기 화학식 (IX)의 접합체를 포함한다:



(IX)

[0393]

[0394] 식 중,

[0395] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0396] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0397] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0398] b1은 1이며;

[0399] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0400] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0401] R^{e1}은 제1 전자 변경기이며;

[0402] R^{e2}는 제2 전자 변경기이고;

[0403] R^{p}는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0404] X^{2}는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0405] X^{3}은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0406] Y^{1}은 O 또는 S이며;

[0407] Y^{2}는 O 또는 S이고;

[0408] Y^{3}은 O 또는 S이며;

[0409] FG^{2}는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

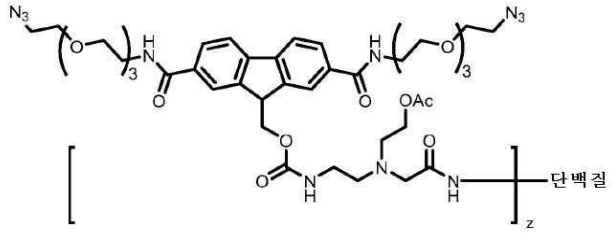
[0410] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0411] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0412] 일부 실시형태에서, R^{1}, R^{2}, R^{p}, R^{e1} 및 R^{e2}는 화학식 (VI)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0413] 화학식 (IX)의 특정 실시형태에서, 식 중, a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고; R^{1} 및 R^{2}는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며; R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

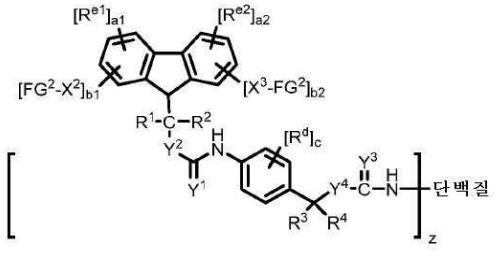
[0414] 화학식 (IX) 내에서, 보다 정의된 구조를 갖는 접합체는 하기 화학식 (IX-A)이다:



(IX-A)

[0415] .

[0416] 2개의 방출 가능한 링키지-제공 시약을 사용하여 형성된 다른 예시적인 접합체는 하기 화학식 (X)의 접합체를 포함한다:



(X)

[0417]

[0418] 식 중,

[0419] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0420] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0421] R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0422] R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0423] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0424] b1은 1이며;

[0425] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0426] c는 0 내지 4의 정수이며;

[0427] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0428] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0429] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0430] R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

[0431] X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0432] X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0433] Y^1은 O 또는 S이며;

[0434] Y^2는 O 또는 S이고;

[0435] Y^3은 O 또는 S이며;

[0436] Y^4는 O 또는 S이고;

[0437] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0438] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0439] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0440] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^3, R^4, R^d, R^{e1} 및 R^{e2}는 화학식 (IV)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0441] 본 명세서에 개시된 화학식의 특정 실시형태에서, z는 1 내지 22, 1 내지 20, 1 내지 18, 1 내지 15, 1 내지 12, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 5 또는 1 내지 3의 정수이고, z는 단백질에 접합된 방출 가능한 링커의 수를 나타낸다.

[0442] *단백질-거대분자 접합체*

[0443] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, 단백질-거대분자 접합체가 제공되며, 이 접합체는 단백질, 적어도 하나의 링커 및 적어도 하나의 수용해성 중합체를 포함하되, 단백질은 링커를 통해서 수용해성 중합체 각각에 공유 부착되고, 거대분자는 직선형 또는 분지형 수용해성 중합체이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 링커는 2개 이상의 링커이다. 특정 실시형태에서, 2개 이상의 링커는 적어도 하나의 방출 가능하지 않은 링커를 포함한다. 특정 실시형태에서, 2개 이상의 링커는 적어도 하나의 방출 가능한 링커를 포함한다. 특정 실시형태에서, 2

개 이상의 링커는 적어도 하나의 방출 가능하지 않은 링커 및 하나의 방출 가능한 링커를 포함한다. 특정 실시형태에서, 2개 이상의 링커는 적어도 하나의 방출 가능하지 않은 링커 및 1 내지 8개의 방출 가능한 링커를 포함한다.

[0444] 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 링커는 방출 가능하지 않은 링커이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 링커는 방출 가능한 링커이다. 특정 실시형태에서, 링커 각각은 방출 가능한 링커이다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 거대분자는 하나 이상의 링커를 통해 단백질에 공유 부착된다. 특정 실시형태에서, 8개 이상의 거대분자는 8개 이상의 링커를 통해 단백질에 공유 부착된다.

[0445] 특정 실시형태에서, 거대분자는 링커를 통해 단백질 내의 잔기의 아민기에 공유 부착된다. 특정 실시형태에서, 잔기는 라이신이다. 특정 실시형태에서, 접합체는 단백질에 부착된 상이한 수의 거대분자를 포함하는 접합체의 혼합물이다.

[0446] 다양한 실시형태에서, 거대분자는 수용해성 중합체, 지질, 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 이것은 하기 중 임의의 하나를 포함할 수 있다: 약 6 내지 약 26개 탄소 원자를 포함하는 지방산, 2-메타크릴로일-옥시에틸 포스포릴 콜린, 폴리(아크릴산), 폴리(아크릴레이트), 폴리(아크릴아마이드), 폴리(N-아크릴로일몰폴린), 폴리(알킬옥시) 중합체, 폴리(아마이드), 폴리(아미도아민), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(아스파트아마이드), 폴리(부티르산), 폴리(글리콜산), 폴리부틸렌 테레프탈레이트, 폴리(카프로락톤), 폴리(카보네이트), 폴리(사이아노아크릴레이트), 폴리(다이메틸아크릴아마이드), 폴리(에스터), 폴리(에틸렌), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸 포스페이트), 폴리(에틸옥사졸린), 폴리(글리콜산), 폴리(알파-하이드록시산), 폴리(하이드록시에틸 아크릴레이트), 폴리(하이드록시에틸옥사졸린), 폴리(하이드록시메타크릴레이트), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아마이드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(하이드록시프로필옥사졸린), 폴리(이미노카보네이트), 폴리(락트산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(메타크릴아마이드), 폴리(메타크릴레이트), 폴리(메틸옥사졸린), 폴리(오가노포스파젠), 폴리(오쏘 에스터), 폴리(옥사졸린), 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀 알코올), 폴리포스파젠, 폴리(프로필렌 글리콜), 폴리(당류), 폴리(실록산), 폴리(우레탄), 폴리(바이닐 알코올), 폴리(바이닐 아민), 폴리(바이닐메틸에터), 폴리(바이닐피롤리돈), 실리콘, 아밀로스, 셀룰로스, 카보메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 키틴, 키토산, 덱스트란, 덱스트린, 젤라틴, 히알루론산(HA) 및 유도체, 작용화된 히알루론산, 만난, 펙틴, 헤파린, 헤파란 설페이트(HS), 람노갈락투로난, 전분, 하이드록시알킬 전분, 하이드록시에틸 전분(HES), 폴리시알산(PSA) 및 다른 탄수화물계 중합체, 자일란 및 알부민의 공중합체, 트랜스페린, 트랜스티레틴, 면역글로불린, XTEN 펩타이드, 글리신-풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩타이드, 엘라스틴-유사 폴리펩타이드(ELP), CTP 펩타이드 또는 젤라틴-유사 단백질(GLK) 중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 중합체 중 하나.

[0447] 특정 실시형태에서, 거대분자는 수용해성 중합체이다. 특정 실시형태에서, 수용해성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)의 중합체이다. 특정 실시형태에서, 폴리(에틸렌 글리콜)은 하이드록시, 알콕시, 치환된 알콕시, 알켄옥시, 치환된 알켄옥시, 알킨옥시, 치환된 알킨옥시, 아릴옥시 및 치환된 아릴옥시로 이루어진 군으로부터 선택된 단부-캡핑 모이어티로 말단 캡핑된다.

[0448] 수용해성 중합체와 관련하여, 수용해성 중합체는 비독성, 비-자연 발생 및 생체적합성이다. 생체적합성과 관련하여, 물질은, 생체 조직(예를 들어, 환자에게 투여)과 관련하여 그 물질 단독 또는 또 다른 물질(예를 들어, 활성제, 예컨대, IL-2 모이어티)의사용과 연관된 유익한 효과가 임상의, 예를 들어, 의사가 평가한 임의의 유해한 효과보다 큰 경우에 생체적합성이라고 간주된다. 비-면역원성과 관련하여, 물질은, 생체내에서 그 물질의 의도된 사용이 바람직하지 않은 면역 반응(예를 들어, 항체의 형성)을 생성하지 않거나 또는 면역 반응이 생성되어 이러한 반응이 임상의가 평가하여 임상적으로 유의하거나 중요하다고 간주되지 않는 경우에 비-면역원성이라고 간주된다. 비펩타이드 수용해성 중합체는 생체적합성이고, 비-면역원성인 것이 특히 바람직하다.

[0449] 추가로, 중합체는 전형적으로 2 내지 약 300개의 말단을 갖는 것을 특징으로 한다. 이러한 중합체의 예는 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜("PEG"), 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체 등, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레프믹(olefmic) 알코올), 폴리바이닐피롤리돈), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아마이드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 다당류), 폴리(a-하이드록시산), 폴리(바이닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린("POZ")(이것은 국제 특허 제WO 2008/106186호에 기재됨), 폴리(N-아시일로일몰폴린(aciyloylmorpholine)) 및 상기 중 임의의 것의 조합물을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0450] 수용해성 중합체는 특정 구조에 제한되지 않고, 선형(예를 들어, 단부 캡핑된, 예를 들어, 알콕시 PEG 또는 이

작용성 PEG), 분지형 또는 다중-아암형(multi-armed)(예를 들어, 갈래형 PEG 또는 폴리올 코어에 부착된 PEG), 수지상(또는 별형) 구조일 수 있고, 각각은 하나 이상의 분해 가능한 링키지가 있거나 없다. 더욱이, 수용해성 중합체의 내부 구조는 임의의 수의 상이한 반복 패턴으로 조직화될 수 있고, 단독중합체, 교대 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교대 삼중중합체, 랜덤 삼중중합체 및 블록 삼중중합체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0451] 활성화된 PEG 및 다른 활성화된 수용해성 중합체(즉, 중합체 시약)는 단백질 상의 목적하는 부위에 커플링시키기에 적절한 적합한 활성화기로 활성화된다. 따라서, 중합체 시약은 단백질 모이어티와의 반응을 위한 반응성 기를 가질 것이다. 이들 중합체를 활성 모이어티에 접합시키기 위한 대표적인 중합체 시약 및 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 문헌[Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), and in Zalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16:157-182]에 추가로 기재되어 있다. 단백질 모이어티에 커플링시키기에 적합한 예시적인 활성화 기는 하이드록실, 말레이미드, 에스터, 아세탈, 케탈, 아민, 카복실, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 케톤, 바이닐 케톤, 티오, 티올, 바이닐 설폰, 하이드라진 등을 포함한다.

[0452] 전형적으로, 접합체 내의 수용해성 중합체의 중량 평균 분자량은 약 100달톤 내지 약 150,000달톤이다. 그러나 예시적인 범위는 약 500달톤 내지 20,000달톤 미만 범위, 약 20,000달톤 내지 85,000달톤 미만 범위, 약 85,000달톤 내지 약 100,000달톤 범위, 5,000달톤 초과 내지 약 100,000달톤 범위, 약 6,000달톤 내지 약 90,000달톤 범위, 약 10,000달톤 내지 약 85,000달톤 범위, 10,000달톤 초과 내지 약 85,000달톤 범위, 약 20,000달톤 내지 약 85,000달톤 범위, 약 53,000달톤 내지 약 85,000달톤 범위, 약 25,000달톤 내지 약 120,000달톤 범위, 약 29,000달톤 내지 약 120,000달톤 범위, 약 35,000달톤 내지 약 120,000달톤 범위 및 약 40,000달톤 내지 약 120,000달톤 범위의 중량 평균 분자량을 포함한다. 임의의 주어진 수용해성 중합체의 경우, 이들 범위 중 하나 이상의 분자량을 갖는 PEG가 바람직하다.

[0453] 수용해성 중합체에 대한 예시적인 중량 평균 분자량은 약 100달톤, 약 200달톤, 약 300달톤, 약 400달톤, 약 500달톤, 약 600달톤, 약 700달톤, 약 750달톤, 약 800달톤, 약 900달톤, 약 1,000달톤, 약 1,500달톤, 약 2,000달톤, 약 2,200달톤, 약 2,500달톤, 약 3,000달톤, 약 4,000달톤, 약 4,400달톤, 약 4,500달톤, 약 5,000달톤, 약 5,500달톤, 약 6,000달톤, 약 7,000달톤, 약 7,500달톤, 약 8,000달톤, 약 9,000달톤, 약 10,000달톤, 약 11,000달톤, 약 12,000달톤, 약 13,000달톤, 약 14,000달톤, 약 15,000달톤, 약 16,000달톤, 약 18,000달톤, 약 20,000달톤, 약 22,500달톤, 약 25,000달톤, 약 30,000달톤, 약 35,000달톤, 약 40,000달톤, 약 45,000달톤, 약 50,000달톤, 약 55,000달톤, 약 60,000달톤, 약 65,000달톤, 약 70,000달톤 및 약 75,000달톤을 포함한다. 상기 중 임의의 것의 총 분자량을 갖는 수용해성 중합체의 분지형 버전(예를 들어, 2개의 20,000달톤 중합체로 구성된 분지형의 40,000달톤의 수용해성 중합체)이 또한 사용될 수 있다.

[0454] 중합체로서 사용되는 경우, PEG는 전형적으로 다수의 (OCH_2CH_2) 단량체[또는 (CH_2CH_2O) 단량체, PEG가 정의되는 방법에 좌우됨]를 포함할 것이다. 설명 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, 반복 단위의 수는 "$(OCH_2CH_2)_n$"의 아래첨자 "n"에 의해서 확인된다. 따라서, (n)의 값은 전형적으로 다음 범위 중 하나 이상에 포함된다: 2 내지 약 3400, 약 100 내지 약 2300, 약 100 내지 약 2270, 약 136 내지 약 2050, 약 225 내지 약 1930, 약 450 내지 약 1930, 약 1200 내지 약 1930, 약 568 내지 약 2727, 약 660 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 909 내지 약 2730 및 약 1,200 내지 약 1,900. 분자량이 알려진 임의의 주어진 중합체에 대해, 중합체의 총 중량 평균 분자량을 반복 단량체의 분자량으로 나눔으로써 반복 단위의 수(즉, "n")를 결정할 수 있다.

[0455] 본 개시내용에 사용하기에 특히 바람직한 한 중합체는 단부-캡핑된 중합체, 즉, 하이드록실기가 또한 사용될 수 있기는 하지만, 비교적 불활성 기, 예컨대, 저급 C_{1-6} 알콕시기로 캡핑된 적어도 하나의 말단을 갖는 중합체이다. 예를 들어, 중합체가 PEG인 경우, 메톡시-PEG(일반적으로 mPEG라고 지칭됨)를 사용하는 것이 바람직한데, 이것은 중합체의 한 말단이 메톡시($-OCH_3$)기이고 다른 말단은 하이드록실 또는 선택적으로 화학적으로 변형될 수 있는 다른 작용기인 PEG의 선형 형태이다.

[0456] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서 유용한 일 형태에서, 유리 또는 비결합 PEG는 하이드록실기로 각각의 단부가 종결된 선형 중합체이다:

[0457] $HO-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$,

[0458] 식 중, (n)은 전형적으로 0 내지 약 4,000 범위이다.

[0459] 상기 중합체, 알파-, 오메가-다이하이드록실폴리(에틸렌 글리콜)은 HO-PEG-OH로서 간략한 형태로 표현될 수 있고, 여기서 -PEG-라는 기호는 하기 구조 단위를 표현할 수 있다:

[0460] $-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$,

[0461] 식 중, (n)은 상기에 정의된 바와 같다.

[0462] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에 유용한 PEG의 또다른 유형은 메톡시-PEG-OH 또는 간단히 mPEG-OH인데, 이것은 하나의 말단이 비교적 불활성인 메톡시기이고, 다른 말단이 하이드록실기이다. mPEG-OH의 구조는 하기에 제공되어 있다:

[0463] $CH_3O-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$

[0464] 식 중, (n)은 상기에 기재된 바와 같다.

[0465] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에 유용한 PEG의 또다른 유형은 메톡시-PEG-NH_2 또는 간단히 mPEG-NH_2인데, 이것은 하나의 말단이 비교적 불활성인 메톡시기이고, 다른 말단이 아미노기이다. mPEG-NH_2의 구조는 하기에 제공되어 있다:

[0466] $CH_3O-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-NH_2$

[0467] 식 중, (n)은 상기에 기재된 바와 같다.

[0468] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에 유용한 PEG의 또다른 유형은 메톡시-PEG-CO_2H 또는 간단히 mPEG-CO_2H인데, 이것은 하나의 말단이 비교적 불활성인 메톡시기이고, 다른 말단이 카복실산기이다. mPEG-CO_2H의 구조는 하기에 제공되어 있다:

[0469] $CH_3O-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-CO_2H$

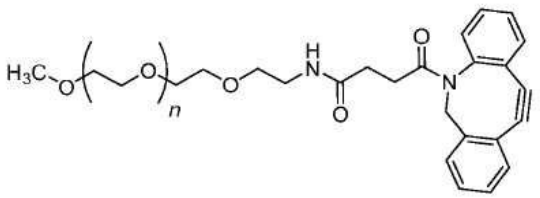
[0470] 식 중, (n)은 상기에 기재된 바와 같다.

[0471] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에 유용한 PEG의 또다른 유형은 메톡시-PEG-N_3 또는 간단히 mPEG-N_3인데, 이것은 하나의 말단이 비교적 불활성인 메톡시기이고, 다른 말단이 아자이드기이다. mPEG-N_3의 구조는 하기에 제공되어 있다:

[0472] $CH_3O-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-N_3$

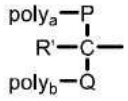
[0473] 식 중, (n)은 상기에 기재된 바와 같다.

[0474] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에 유용한 PEG의 또다른 유형은 메톡시-PEG-DBCO 또는 간단히 mPEG-DBCO인데, 이것은 하나의 말단이 비교적 불활성인 메톡시기이고, 다른 말단이 다이벤조사이클로옥틴(DBCO)기이다. mPEG-DBCO의 구조의 일례는 하기에 제공되어 있다:

[0475] 

[0476] 식 중, (n)은 상기에 기재된 바와 같다.

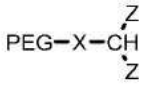
[0477] 다중-아암형 또는 분지형 PEG 분자, 예컨대, 미국 특허 제5,932,462호에 기재된 것이 또한 PEG 중합체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, PEG는 하기 구조를 가질 수 있다:

[0478] 

[0479] 식 중,

[0480] $poly_a$ 및 $poly_b$는 PEG 골격(동일하거나 상이함), 예컨대, 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜)이고; R'는 비반응성 모이어티, 예컨대, H, 메틸 또는 PEG 골격이고; P 및 Q는 비반응성 링키지이다.

[0481] 또한, PEG는 갈래형 PEG를 포함할 수 있다. 갈래형 PEG의 예는 하기 구조로 표현된다:

[0482] 

[0483] 식 중, X는 하나 이상의 원자의 스페이서 모이어티이고, 각각의 Z는 정의된 길이의 원자 쇄에 의해 CH에 연결된 활성화된 말단기이다. 국제 특허 출원 공개 제WO 99/45964호에는 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서 사용할 수 있는 다양한 갈래형 PEG 구조가 개시되어 있다. Z 작용기를 분지형 탄소 원자에 연결하는 원자 쇄는 테더링 기로서 작용하고, 예를 들어 알킬 쇄, 에터 쇄, 에스터 쇄, 아마이드 쇄 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0484] PEG 중합체는 PEG 쇄의 단부가 아니라 PEG의 길이를 따라 공유 부착된 카복실과 같은 반응성 기를 갖는 펜던트 PEG 분자를 포함할 수 있다. 펜던트 반응성 기는 알킬렌기와 같은 스페이서 모이어티를 통해 또는 직접적으로 PEG에 부착될 수 있다.

[0485] 중합체 골격 내의 분해 가능한 링키지 및/또는 단백질 모이어티에 대한 분해 가능한 링키지로서 유용한 일부 가수분해 분해 가능한 링키지는 에스터 링키지, 카보네이트 링키지; 예를 들어, 아민과 알데하이드의 반응으로부터 생성된 이민 링키지(예를 들어, 문헌[Ouchi et al. (1997) Polymer Preprints 38(1):582-3] 참조); 예를 들어, 알코올과 포스페이트기를 반응시켜 형성된 포스페이트 에스터 링키지; 하이드라자이드와 알데하이드의 반응에 의해 전형적으로 형성되는 하이드라존 링키지; 알데하이드와 알코올 사이의 반응에 의해 전형적으로 형성되는 아세탈 링키지; 예를 들어, 폼에이트와 알코올 사이의 반응에 의해 형성되는 오쏘에스터 링키지; 예를 들어, 중합체, 예컨대, PEG의 단부에서 아민기 및 또 다른 PEG 쇄의 카복실기에 의해 형성된 아미드 링키지; 예를 들어 PEG와 말단 아이소사이아네이트 및 PEG 알코올의 반응으로부터 형성된 우레탄 링키지; 예를 들어, 중합체, 예컨대, PEG의 단부에서 아민기 및 펩타이드의 카복실기에 의해 형성된 펩타이드 링키지; 및 예를 들어, 중합체의 단부에서 포스포르아미다이트기 및 올리고뉴클레오타이드의 5' 하이드록실기에 의해 형성된 올리고뉴클레오타이드 링키지를 포함한다.

[0486] 접합체의 이러한 선택적 특징, 즉, 중합체 쇄 또는 단백질 모이어티로의 하나 이상의 분해 가능한 링키지의 도입은 투여 시 접합체의 최종적인 목적하는 약리학적 특성에 대한 추가 제어를 제공할 수 있다. 예를 들어, 크고 비교적 불활성인 접합체(즉, 하나 이상의 고분자량 PEG 쇄가 부착됨, 예를 들어, 하나 이상의 PEG 쇄는 약 10,000 초과의 분자량을 가짐, 접합체는 본질적으로 생체활성(bioactivity)을 갖지 않음)가 투여될 수 있고, 이것은 방출되어 원래 PEG 쇄의 일부를 보유하는 생리활성 접합체를 생성시킨다. 이러한 방식으로, 접합체의 특성은 시간 경과에 따른 접합체의 생체활성의 균형을 맞추기 위해 보다 효과적으로 맞춤화될 수 있다.

[0487] 접합체와 회합된 수용해성 중합체는 "방출 가능"할 수 있다. 즉, 수용해성 중합체는 (가수분해, 효소적 과정, 촉매적 과정 등을 통해) 방출되어, 비접합된 단백질 모이어티를 생성시킨다. 일부 예에서, 방출 가능한 중합체는 수용해성 중합체의 어떠한 단편도 남기지 않고 생체내에서 단백질 모이어티로부터 분리된다. 다른 예에서, 방출 가능한 중합체는 생체내에서 단백질 모이어티로부터 분리되어 수용해성 중합체로부터 비교적 작은 단편(예를 들어, 석신에이트 태그)을 남긴다. 예시적인 절단 가능한 중합체는 카바메이트 링키지를 통해 단백질 모이어티에 부착되는 것을 포함한다.

[0488] 당업자는 수용해성 중합체에 관한 상기 논의가 결코 완전하지 않고, 단지 예시적이며, 상기에 기재된 품질을 갖는 모든 중합체 물질이 고려된다는 것을 인식할 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "중합체 시약"은 일반적으로 수용해성 중합체 단편 및 작용기를 포함할 수 있는 전체 분자를 지칭한다.

[0489] 상기에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 접합체는 단백질 모이어티에 공유 부착된 다수의 수용해성 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단백질 모이어티에 공유 부착된 다수의 수용해성 중합체는 동일하다. 일부

실시형태에서, 단백질 모이어티에 공유 부착된 다수의 수용해성 중합체 중 적어도 하나는 상이하다. 전형적으로, 임의의 주어진 접합체에 대해, 단백질 활성을 갖는 하나 이상의 모이어티에 공유 부착된 하나 이상의 수용해성 중합체가 존재할 것이다. 일부 예에서, 접합체는 단백질 모이어티에 개별적으로 부착된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 초과의 수용해성 중합체를 가질 수 있다. 임의의 주어진 수용해성 중합체는 단백질 모이어티의 아미노산에, 또는 단백질 모이어티가 (예를 들어) 당단백질인 경우, 단백질 모이어티의 탄수화물에 공유 부착될 수 있다. 탄수화물에 대한 부착은 예를 들어, 시알산-아자이드 화학을 사용하는 대사 작용화[문헌[Luchansky et al. (2004) Biochemistry 43(38): 12358-123661] 또는 알데하이드기의 도입을 촉진하기 위한 글리시돌의 사용과 같은 다른 적합한 접근법[문헌[Heldt et al. (2007) European Journal of Organic Chemistry 32:5429-5433]]을 사용하여 수행될 수 있다.

[0490] 단백질 모이어티 및 중합체 내의 특정 링키지는 다수의 인자에 좌우된다. 이러한 인자는 예를 들어, 사용된 특정 링키지 화학, 특정 단백질 모이어티, 단백질 모이어티 내의 사용 가능한 작용기(링커, 중합체에 대한 부착 또는 적합한 부착 부위로의 전환), 단백질 모이어티 내의 추가 반응성 작용기의 존재 등을 포함한다.

[0491] 본 개시내용의 접합체는 전구약물일 수 있으며, 이는 중합체와 단백질 모이어티 사이의 링키지가 방출 가능하여 모 모이어티가 방출될 수 있음을 의미한다. 본 개시내용에 기재된 방출 가능한 링커와는 별개로, 다른 예시적인 방출 가능한 링키지는 카바메이트, 카복실레이트 에스터, 포스페이트 에스터, 티올 에스터, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에터, 이민, 오쏘에스터, 펩타이드 및 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이러한 링키지는 단백질 모이어티(예를 들어, 단백질의 카복실기 C 말단, 또는 단백질 내에 함유된 세린 또는 트레오닌과 같은 아미노산의 측쇄 하이드록실기, 또는 탄수화물 내의 유사한 작용기)의 적절한 변형에 의해서 그리고/또는 당업계에서 일반적으로 사용되는 커플링 방법을 사용하여 중합체 시약에 의해서 쉽게 제조될 수 있다. 그러나, 가장 바람직한 것은 적합하게 활성화된 중합체와 단백질 모이어티 내에 함유된 비-변형된 작용기의 반응에 의해 쉽게 형성되는 방출 가능한 링키지이다.

[0492] 대안적으로, 가수분해적으로 안정적인 링키지, 예컨대, 아마이드, 우레탄(카바메이트로도 알려짐), 아민, 티오에터(설파이드로도 알려짐), 또는 우레아(카바마이드로도 알려짐) 링키지가 단백질 모이어트를 커플링시키기 위한 링키지로서 사용될 수 있다. 바람직한 가수분해적으로 안정적인 링키지는 아마이드이다. 한 접근법에서, 활성화된 에스터를 함유하는 수용해성 중합체는 단백질 모이어티 상의 아민기와 반응하여 아마이드 링키지를 생성할 수 있다. 또 다른 바람직한 가수분해적으로 안정적인 연결은 티올 브릿지이다.

[0493] (비접합된 단백질 모이어티와 상반되게) 접합체는 측정 가능한 단백질 활성도를 보유할 수 있거나 보유할 수 없다. 즉, 본 개시내용에 따른 중합체-단백질 접합체는 비변형된 모 단백질 모이어티의 생체활성의 약 0.1%, 약 0.5%, 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 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 55% 또는 약 100%를 포함하는, 약 0.1% 내지 약 100% 중 임의의 범위를 보유할 것이다. 일부 예에서, 중합체-단백질 접합체는 비변형된 모 단백질 모이어티의 100% 초과의 생체활성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 단백질 활성이 거의 또는 전혀 없는 접합체는 중합체를 단백질에 연결하는 가수 가능한 링키지를 함유하여, 접합체의 활성 부족(또는 상대적으로 부족)에 관계없이, 활성 모 분자(또는 이의 유도체)가 가수 분해 가능한 링키지의 수성-유도된 절단 시에 방출된다. 이러한 활성은 특정 단백질의 알려진 활성에 따라 적합한 생체내 또는 시험관내 모델을 사용하여 결정할 수 있다.

[0494] 단백질을 중합체에 커플링시키는 가수분해적으로 안정적인 링키지를 보유하는 접합체의 경우, 접합체는 전형적으로 측정 가능한 생체활성도를 보유할 것이다. 예를 들어, 이러한 접합체는 전형적으로 비접합된 단백질의 것에 대해서 하기 백분율 중 하나 이상을 충족시키는 생체활성을 갖는 것을 특징으로 한다: 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 100%, 및 105% 초과(적합한 모델, 예컨대, 당업계에 널리 공지된 것으로 측정되는 경우). 바람직하게는, 가수분해적으로 안정적인 링키지(예를 들어, 아마이드 링키지, 티올 브릿지)를 갖는 접합체는 비변형된 모 단백질의 적어도 어느 정도의 생물활성을 가질 것이다.

[0495] 링커를 통한 단백질과 수용해성 중합체 사이의 부착은 링커와 중합체 사이에 개재 원자가 위치하지 않는 직접적이거나, 링키지와 중합체 사이에 하나 이상의 원자가 위치하는 간접적일 수 있다. 간접적인 부착과 관련하여, "스페이서 모이어티"는 링키지의 잔기와 수용해성 중합체 사이의 링커 역할을 할 수 있다. 스페이서 모이어티를 구성하는 하나 이상의 원자는 탄소 원자, 질소 원자, 황 원자, 산소 원자, 및 이들의 조합 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 스페이서 모이어티는 아마이드, 2차 아민, 카바메이트, 티오에터, 다이설파이드기 및/또는 클

릭 화학 생성물기를 포함할 수 있다. 구체적인 스페이서 모이어티의 비제한적인 예는 -O-, -S-, -S-S-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $O-CH_2-$, $-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, -C(O)-NH-CH_2-, -C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$, -C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$, -C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-$, -C(O)-O-$CH_2-$, $-CH_2-C(O)-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-O-CH_2-$, -C(O)-O-CH_2-CH_2-, -NH-C(O)-CH_2-, $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$, -NH-C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$, -C(O)-NH-$CH_2-$, -C(O)-NH-$CH_2-CH_2-$, -O-C(O)-NH-$CH_2-$, -O-C(O)-NH-$CH_2-CH_2-$, -NH-$CH_2-$, -NH-$CH_2-CH_2-$, $-CH_2-NH-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$, -C(O)-CH_2-, -C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-C(O)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-$, -O-C(O)-NH-$[CH_2]_l-(OCH_2CH_2)_m-$, 2가 사이클로알킬기, -O-, -S-, 아미노산, $-N(R^3)-$ 및 이들 중 임의의 것 중 2개 이상의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함하고, 식 중, R^3은 H 또는 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 및 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 유기 라디칼이고, (l)은 0 내지 6이며, (m)은 0 내지 20이다. 다른 구체적인 스페이서 모이어티는 하기 구조를 갖고: $-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$, $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$ 및 $-O-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$, 식 중, 각각의 메틸렌 이후의 아래 첨자 값은 구조에 함유된 메틸렌의 수를 나타내고, 예를 들어, $(CH_2)_{1-6}$은 구조가 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 메틸렌을 함유할 수 있다는 것을 의미한다. 추가로, 상기 스페이서 모이어티 중 임의의 것은 1 내지 20개의 에틸렌 옥사이드 단량체 단위[즉, $-(CH_2CH_2O)_{1-20}$]를 포함하는 에틸렌 옥사이드 올리고머 쇄를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 에틸렌 옥사이드 올리고머 쇄는 스페이서 모이어티 앞에 또는 뒤에 존재할 수 있고, 선택적으로는 2개 이상의 원자로 구성된 스페이서 모이어티의 임의의 2개의 원자 사이에 존재할 수 있다. 또한, 올리고머 쇄는, 올리고머가 중합체 분절에 인접하고, 중합체 분절의 연장을 단지 나타내는 경우에 스페이서 모이어티의 부분으로 간주되지 않을 것이다.

[0496] 일반적인 단백질-거대분자 접합체는 하기 화학식 (XX)에 따른 구조를 포함한다:

[0497] 단백질-(L-거대분자)$_z$

[0498] (XX)

[0499] 또는 이의 입체이성질체, 위치이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이의 전구약물;

[0500] 식 중,

[0501] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0502] L은 링커이고;

[0503] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이고;

[0504] 거대분자는 수용해성 중합체, 지질, 단백질 또는 폴리펩타이드이다.

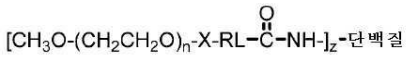
[0505] 일부 실시형태에서, 링커 L은 본 개시내용의 링커이다. 일부 실시형태에서, L은 하나 이상의 방출 가능하지 않은 링커 및/또는 하나 이상의 방출 가능한 링커이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 방출 가능한 링커는 본 개시내용의 이작용성 방출 가능한 링커(예를 들어, 화학식 (I), 화학식 (II), 화학식 (III) 또는 화학식 (IV)의 링커) 및/또는 방출 가능한 링커를 갖는 중합체 시약(예를 들어, 화학식 (V) 또는 화학식 (VI))으로부터 유래된다.

[0506] 일부 실시형태에서, z는 1 내지 20의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 1 내지 15의 정수이다. 일부 실시형태

에서, z는 1 내지 10의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 1 내지 8의 정수이다. 일부 실시형태에서, z는 1 내지 5의 정수이다.

[0507] 일부 실시형태에서, z가 2 이상인 경우, 단백질에 부착된 각각의 L-거대분자는 동일하다. 일부 실시형태에서, z가 2 이상인 경우, 단백질에 부착된 적어도 하나의 L-거대분자는 상이하다. 일부 실시형태에서, z가 2 이상인 경우, 단백질에 부착된 각각의 L-거대분자는 상이하다.

[0508] 화학식 XX의 예시적인 단백질-거대분자 접합체는 하기 구조에 포함된다:

[0509] 

[0510] 식 중,

[0511] n은 2 내지 4000의 정수이고;

[0512] X는 스페이서 모이어티이며;

[0513] RL은 방출 가능한 링커이고;

[0514] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0515] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0516] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0517] 일부 실시형태에서, RL은 본 개시내용의 방출 가능한 링커이다. 일부 실시형태에서, 방출 가능한 링커는 이작용성 방출 가능한 링커(예를 들어, 화학식 (I), 화학식 (II), 화학식 (III) 또는 화학식 (IV)의 링커) 또는 본 명세서에 개시된 방출 가능한 링커를 갖는 중합체 시약(예를 들어, 화학식 (V) 또는 화학식 (VI))으로부터 유래된다.

[0518] 또 다른 양상에서, 화학식 XX의 예시적인 단백질-거대분자 접합체는 하기 구조에 포함된다:

[0519]

[0520] 식 중,

[0521] n은 2 내지 4000의 정수이고;

[0522] X는 스페이서 모이어티이며;

[0523] RL^1은 제1 방출 가능한 링커이고;

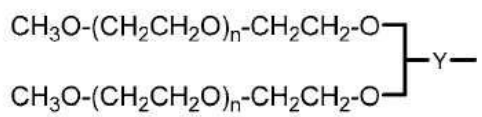
[0524] RL^2는 제2 방출 가능한 링커이고;

[0525] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0526] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0527] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

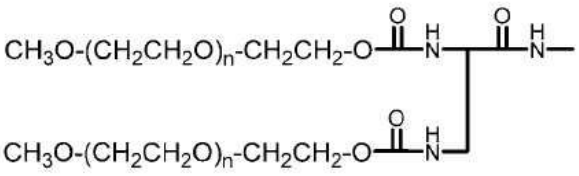
[0528] 수용해성 중합체가 분지형인 본 개시내용의 예시적인 접합체는 수용해성 중합체가 하기 구조에 포함되는 것을 포함한다:

[0529] 

[0530] 식 중, Y = O 및 NH이고; 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000, 예를 들어, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 또는

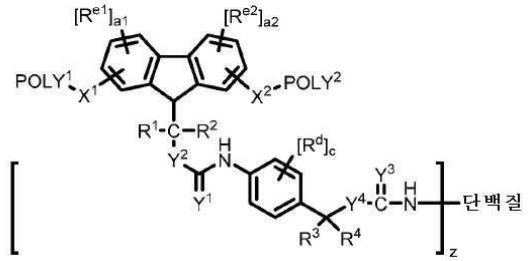
4000의 값을 갖는 정수(이들 사이의 모든 범위 및 값 포함)이다.

[0531] 수용해성 중합체가 분지형인 본 개시내용의 예시적인 접합체는 수용해성 중합체가 하기 구조에 포함되는 것을 포함한다:

[0532] 

[0533] 식 중, 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000, 예를 들어, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 또는 4000의 값을 갖는 정수(이들 사이의 모든 범위 및 값 포함)이다.

[0534] 2개의 방출 가능한 링키지-제공 시약을 사용하여 형성된 예시적인 단백질-거대분자 접합체는 하기 화학식 (XI)의 접합체를 포함한다:



(XI)

[0535]

[0536] 식 중,

[0537] $POLY^1$은 제1 수용해성 중합체이고;

[0538] $POLY^2$는 제2 수용해성 중합체이고;

[0539] X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

[0540] X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

[0541] Y^1은 O 또는 S이며;

[0542] Y^2는 O 또는 S이고;

[0543] Y^3은 O 또는 S이며;

[0544] Y^4는 O 또는 S이고;

[0545] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0546] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0547] R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0548] R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0549] a1은 0 내지 3의 정수이고;

[0550] a2는 0 내지 3의 정수이고;

[0551] c는 0 내지 4의 정수이며;

[0552] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0553] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0554] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0555] R^{d}는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

[0556] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

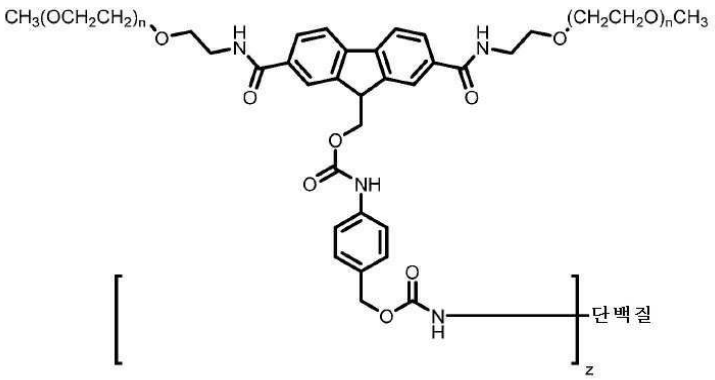
[0557] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0558] 일부 실시형태에서, R^{1}, R^{2}, R^{3}, R^{4}, R^{e1}, R^{e2} 및 R^{d}는 화학식 (IV)에서 상기와 같이 정의된다.

[0559] 화학식 (XI)의 일부 실시형태에서, $POLY^{1}$ 및 $POLY^{2}$는 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^{1}$ 및 $POLY^{2}$는 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^{1}$ 및 $POLY^{2}$는 상이한 수용해성 중합체이다.

[0560] 화학식 (XI)의 일부 실시형태에서, X^{1} 및 X^{2}는 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^{1}과 X^{2}는 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^{1}과 X^{2}는 상이한 스페이서 모이어티이다.

[0561] 예시적인 접합체는 하기 구조 (XI-A)를 갖는다:

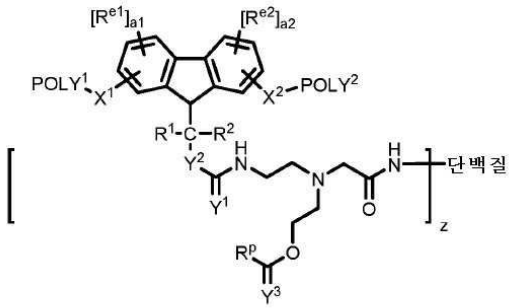


(XI-A)

[0562]

[0563] 식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고, z는 1 내지 25의 정수이다.

[0564] 2개의 방출 가능한 링키지-제공 중합체 시약을 사용하여 형성된 다른 예시적인 접합체는 하기 화학식 (XII)의 접합체를 포함한다:



(XII)

[0565]

[0566] 식 중,

[0567] $POLY^1$은 제1 수용해성 중합체이고;

[0568] $POLY^2$는 제2 수용해성 중합체이고;

[0569] X^1은 제1 스페이서 모이어티이고;

[0570] X^2는 제2 스페이서 모이어티이며;

[0571] Y^1은 O 또는 S이며;

[0572] Y^2는 O 또는 S이고;

[0573] Y^3은 O 또는 S이며;

[0574] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0575] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0576] a1은 0 내지 3의 정수이고;

[0577] a2는 0 내지 3의 정수이고;

[0578] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0579] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0580] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기이고;

[0581] R^p는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0582] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

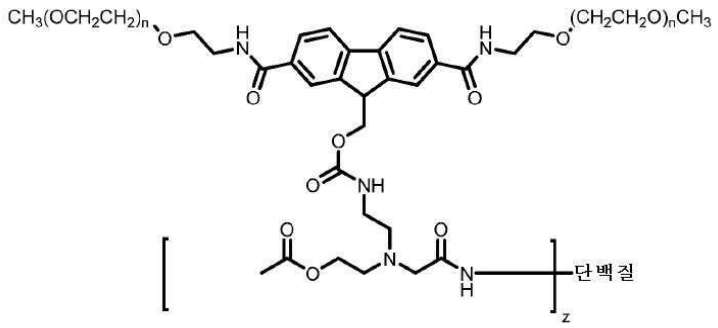
[0583] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0584] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^{e1}, R^{e2} 및 R^p는 화학식 (VI)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0585] 화학식 (XII)의 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 상이한 수용해성 중합체이다.

[0586] 화학식 (XII)의 일부 실시형태에서, X^1 및 X^2는 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 상이한 스페이서 모이어티이다.

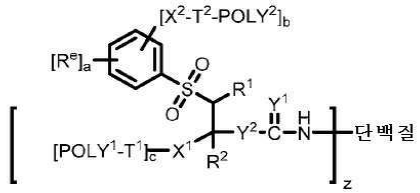
[0587] 예시적인 접합체는 하기 구조 (XII-A)를 갖는다:



[0588] (XII-A)

[0589] 식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고, z는 1 내지 25의 정수이다.

[0590] 적합한 중합체 시약과 함께 클릭 화학을 사용하여 형성되는 예시적인 접합체는 하기 화학식 (XIII)의 것을 포함한다:



[0591] (XIII)

[0592] 식 중,

[0593] $POLY^1$은 제1 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0594] $POLY^2$는 제2 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0595] X^1은 제1 스페이서 모이어티; 또는 $-X-FG^2$이고;

[0596] X^2는, 존재하는 경우, 제2 스페이서 모이어티이며;

[0597] T^1은 제1 트라이아졸 작용기이고;

[0598] T^2는 제2 트라이아졸 작용기이고;

[0599] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0600] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0601] R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기; 및 $-X-FG^2$이고;

[0602] 식 중,

[0603] X는 스페이서 모이어티이며;

[0604] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0605] a는 0 내지 5의 정수이고;

[0606] b는 0 내지 3의 정수이고;

[0607] c는 0 내지 2의 정수이며;

[0608] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0609] Y^1은 O 또는 S이며;

[0610] Y^2는 O 또는 S이고;

[0611] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

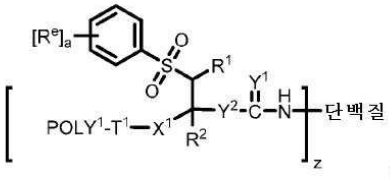
[0612] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0613] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^e, a, b, c 및 z는 화학식 (I)에서 상기에 정의된 바와 같다.

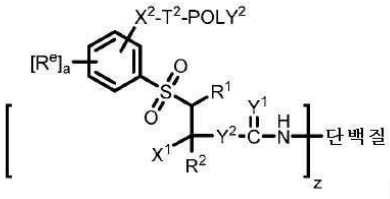
[0614] 화학식 (XIII)의 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^1$ 및 $POLY^2$는 상이한 수용해성 중합체이다.

[0615] 화학식 (XIII)의 일부 실시형태에서, X^1 및 X^2는 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^1과 X^2는 상이한 스페이서 모이어티이다.

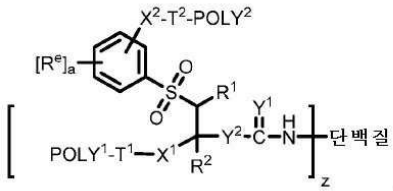
[0616] 화학식 (XIII) 내에서, 보다 정의된 구조를 갖는 접합체는 하기 화학식 (XIII-A), (XIII-B), (XIII-C) 또는 (XIII-D)로 고려된다:



(XIII-A);

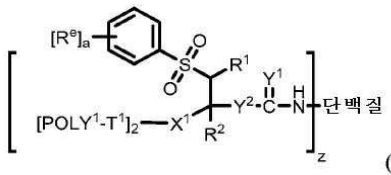


(XIII-B);



(XIII-C); 또는

[0617]



(XIII-D)

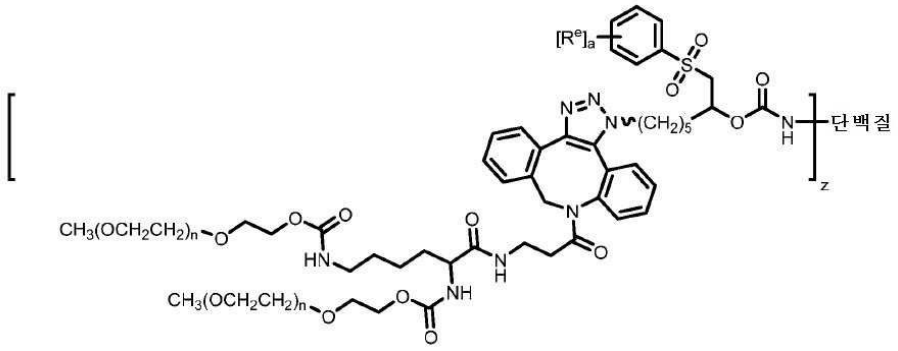
[0618]

[0619] X^1 각각은 제1 스페이서 모이어티이고; X^2는 제2 스페이서 모이어티이며; $POLY^1$, $POLY^2$, T^1, T^2, R^1, R^2, R^e, a,

z, Y^1, Y^2 및 단백질은 상기에 정의된 바와 같다.

[0620] 화학식 (XIII), (XIII-A), (XIII-B), (XIII-C) 또는 (XIII-D)의 특정 실시형태에서, a는 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며; R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0621] 추가의 예시적인 접합체는 하기 구조 (XIII-A1)을 갖는다:

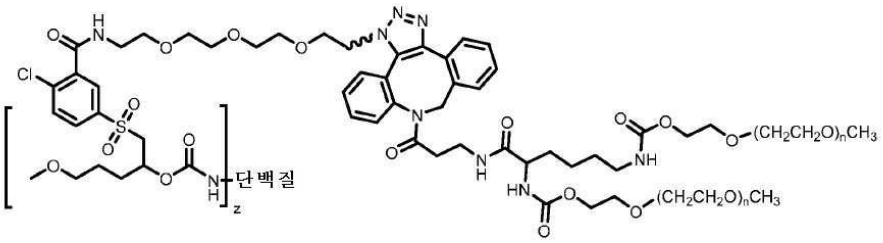


(XIII-A1)

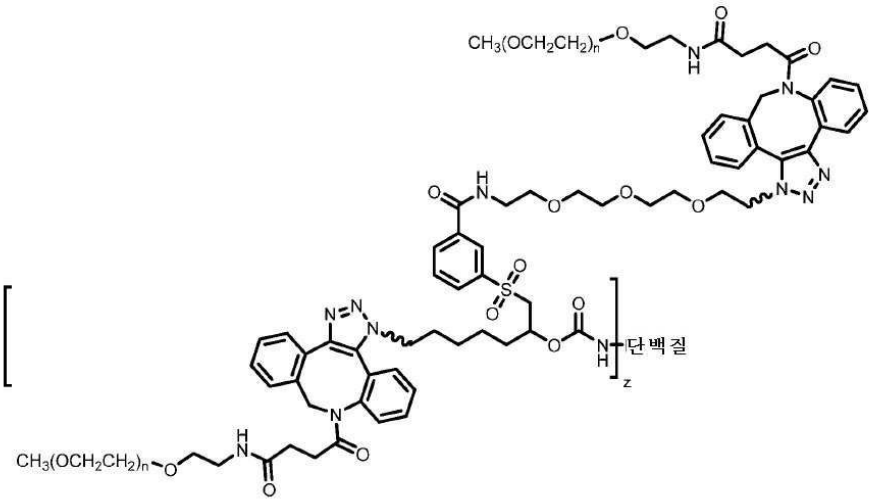
[0622]

[0623] 식 중, R^e는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴로부터 선택된 전자 변경기이고; n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이며; z는 1 내지 25의 정수이고; "-NH-"는 단백질 내의 잔기의 아민기이고, 단백질에 개별적으로 부착된 하나 이상의 중합체를 나타낸다. 특정 실시형태에서, a는 1 내지 2의 정수이고; R^e는 4-F, 4-Cl, $4-CF_3$, 2,4-다이플루오로 또는 $2-CF_3-4-F$ 치환이다.

[0624] 추가의 예시적인 접합체는 하기 구조 (XIII-B1), (XIII-C1), (XIII-D1) 또는 (XIII-D2)를 갖는다:

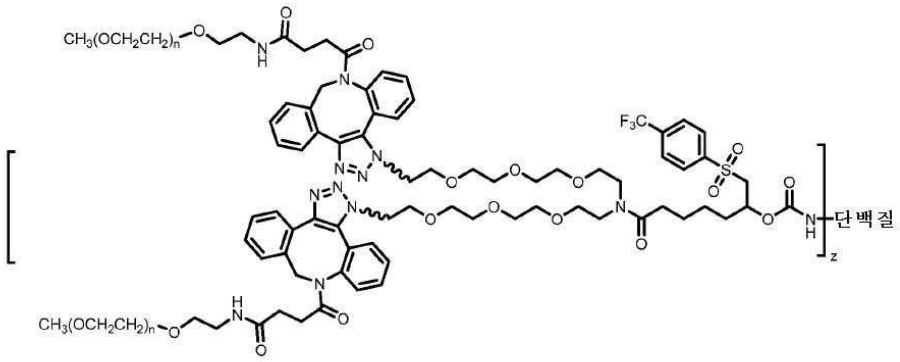


(XIII-B1);

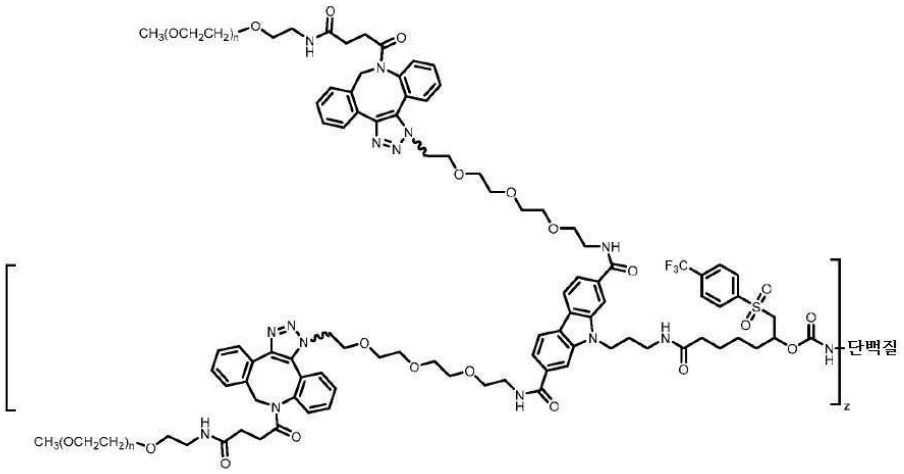


(XIII-C1);

[0625]



(XIII-D1); 또는



(XIII-D2)

[0626]

[0627] 식 중,

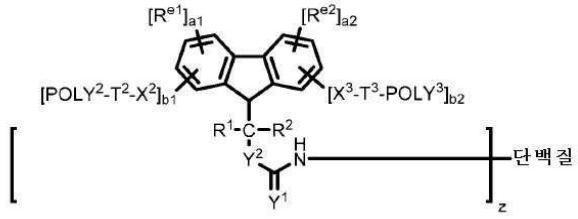
[0628] n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고;

[0629] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0630] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0631] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0632] 적합한 중합체 시약과 함께 클릭 화학을 사용하여 형성되는 다른 예시적인 접합체는 하기 화학식 (XIV)의 것을 포함한다:



(XIV)

[0633]

[0634] 식 중,

[0635] $POLY^2$는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0636] $POLY^3$은 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0637] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0638] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0639] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0640] b1은 1이며;

[0641] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0642] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0643] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0644] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기; 또는 -X-FG^2이고;

[0645] 식 중,

[0646] X는 스페이서 모이어티이며;

[0647] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0648] X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0649] X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0650] T^2는 트라이아졸 작용기이고;

[0651] T^3은 트라이아졸 작용기이고;

[0652] Y^1은 O 또는 S이며;

[0653] Y^2는 O 또는 S이고;

[0654] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0655] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

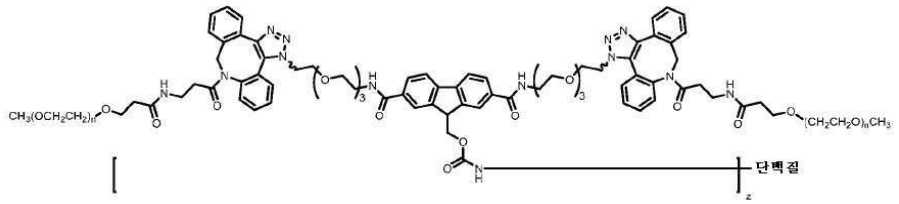
[0656] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^{e1} 및 R^{e2}는 화학식 (VI)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0657] 화학식 (XIV)의 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 상이한 수용해성 중합체이다.

[0658] 화학식 (XIV)의 일부 실시형태에서, X^2 및 X^3은 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 상이한 스페이서 모이어티이다.

[0659] 화학식 (XIV)의 특정 실시형태에서, a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며; R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0660] 화학식 (XIV) 내에서, 보다 정의된 구조를 갖는 접합체는 하기 화학식 (XIV-A)로 고려된다:

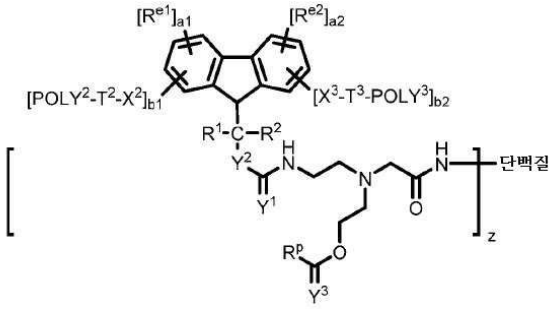


(XIV-A)

[0661]

[0662] 식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고; z는 1 내지 25의 정수이며; -NH-는 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

[0663] 적합한 중합체 시약과 함께 클릭 화학을 사용하여 형성되는 다른 예시적인 접합체는 하기 화학식 (XV)의 것을 포함한다:



(XV)

[0664]

[0665] 식 중,

[0666] $POLY^2$는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0667] $POLY^3$은 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0668] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0669] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0670] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0671] b1은 1이며;

[0672] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0673] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0674] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0675] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기; 또는 $-X-FG^2$이고;

[0676] 식 중,

[0677] X는 스페이서 모이어티이며;

[0678] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0679] R^p는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0680] X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0681] X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0682] T^2는 트라이아졸 작용기이고;

[0683] T^3은 트라이아졸 작용기이고;

[0684] Y^1은 O 또는 S이며;

[0685] Y^2는 O 또는 S이고;

[0686] Y^3은 O 또는 S이고;

[0687] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0688] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

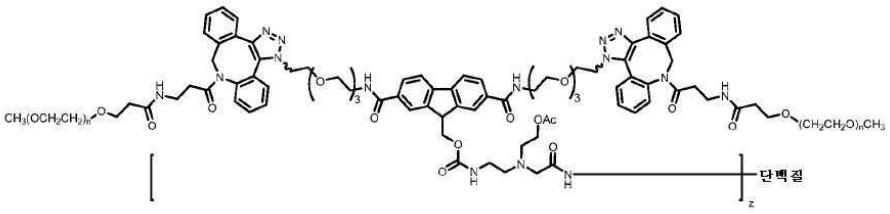
[0689] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^p, R^{e1} 및 R^{e2}는 화학식 (VI)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0690] 화학식 (XV)의 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 상이한 수용해성 중합체이다.

[0691] 화학식 (XV)의 일부 실시형태에서, X^2 및 X^3은 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 상이한 스페이서 모이어티이다.

[0692] 화학식 (XV)의 특정 실시형태에서, a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 2의 정수이고; R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 수소, Me 또는 Et이며; R^{e1} 및 R^{e2}는 각각 독립적으로는 나이트로, 사이아노, 할로겐, $-CF_3$, -CONHMe, $-SO_2NHMe$, -OMe, -NHMe, -NHAc, $-NHSO_2Me$ 또는 $-OCF_3$이다.

[0693] 화학식 (XV) 내에서, 보다 정의된 구조를 갖는 접합체는 하기 화학식 (XV-A)이다:

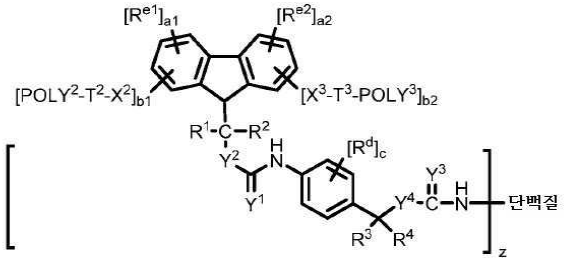


(XV-A)

[0694]

[0695] 식 중, n은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고; z는 1 내지 25의 정수이며; -NH-는 단백질 내의 잔기의 아민기이다.

[0696] 적합한 중합체 시약과 함께 클릭 화학을 사용하여 형성되는 다른 예시적인 접합체는 하기 화학식 (XVI)의 것을 포함한다:



(XVI)

[0697]

[0698] 식 중,

[0699] $POLY^2$는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0700] $POLY^3$은 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고;

[0701] R^1은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이고;

[0702] R^2는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0703] R^3은 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0704] R^4는 수소, 알킬, 치환된 알킬, 알켄일, 치환된 알켄일, 알킨일, 치환된 알킨일, 아릴 또는 치환된 아릴이며;

[0705] a1 및 a2는 각각 독립적으로 0 내지 4의 정수이고;

[0706] b1은 1이며;

[0707] b2는 0 내지 1의 정수이고;

[0708] c는 0 내지 4의 정수이며;

[0709] z는 1 내지 25의 정수이며;

[0710] R^{e1}은, 존재하는 경우, 제1 전자 변경기이며;

[0711] R^{e2}는, 존재하는 경우, 제2 전자 변경기; 또는 $-X-FG^2$이고;

[0712] 식 중,

[0713] X는 스페이서 모이어티이며;

[0714] FG^2는 독립적으로 아자이드, 알킨일 및 사이클로알킨일기(예를 들어, 다이벤조사이클로옥틴(DBCO))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 클릭 화학을 통해서 반응할 수 있는 작용기이고;

[0715] R^d는 나이트로, 사이아노, 할로겐, 아마이드, 치환된 아마이드, 설폰, 치환된 설폰, 설폰아마이드, 치환된 설폰아마이드, 알콕시, 치환된 알콕시, 알킬 또는 사이클로알킬, 치환된 알킬 또는 사이클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이며;

[0716] X^2는, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이며;

[0717] X^3은, 존재하는 경우, 스페이서 모이어티이고;

[0718] T^2는 트라이아졸 작용기이고;

[0719] T^3은 트라이아졸 작용기이고;

[0720] Y^1은 O 또는 S이며;

[0721] Y^2는 O 또는 S이고;

[0722] Y^3은 O 또는 S이며;

[0723] Y^4는 O 또는 S이고;

[0724] -NH-는 상기 단백질 내의 잔기의 아민기이며;

[0725] 단백질은 케모카인, 케모카인 길항제, 사이토카인, 사이토카인 길항제, 항체 또는 치료용 펩타이드이다.

[0726] 일부 실시형태에서, R^1, R^2, R^3, R^4, R^d, R^{e1} 및 R^{e2}는 화학식 (IV)에서 상기에 정의된 바와 같다.

[0727] 화학식 (XVI)의 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 본 명세서에 기재된 수용해성 중합체로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 동일한 수용해성 중합체이다. 일부 실시형태에서, $POLY^2$ 및 $POLY^3$은 상이한 수용해성 중합체이다.

[0728] 화학식 (XVI)의 일부 실시형태에서, X^2 및 X^3은 본 명세서에 기재된 스페이서 모이어티로부터 각각 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 동일한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, X^2와 X^3은 상이한 스페이서 모이어티이다. 일부 실시형태에서, 단백질은 사이토카인이다. 사이토카인은 GM-CSF, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, MIP-1α, MIP-1β, TGF-β, TNF-α 또는 TNF-β를 포함한다. 특정 실시형태에서, 사이토카인은 IL-2이다. 특정 실시형태에서, IL-2는 서열번호 1과 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 포함한다.

[0729] 일부 실시형태에서, 단백질은 케모카인이다. 케모카인은 MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-24, MCP-5, CXCL76, I-309(CCL1), BCA1(CXCL13), MIG, SDF-1/PBSF, IP-10, I-TAC, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, 에오탁신-1, 에오탁신-2, GCP-2, Gro-α, Gro-β, Gro-γ, LARC(CCL20), ELC (CCL19), SLC(CCL21), ENA-78, PBP, TECK(CCL25), CTACK(CCL27), MEC, XCL1, XCL2, HCC-1, HCC-2, HCC-3 또는 HCC-4를 포함한다.

[0730] 일부 실시형태에서, 단백질은 항체이다. 항체는 앤지오포이에틴 2, AXL, ACVR2B, 앤지오포이에틴 3, 액티빈 수용체-유사 키나제 1, 아밀로이드 A 단백질, β-아밀로이드, AOC3, BAFF, BAFF-R, B7-H3, BCMAC, A-125(이미테이션), C5, CA-125, CCL11(에오탁신-1), CEA, CSF1R, CD2, CD3, CD4, CD6, CD15, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD54, CD56, CD70, CD74, CD97B, CD125, D134, CD147, CD152, CD154, CD279, CD221, C242 항원, CD276, CD278, CD319, 클로스트리디엄 디피실, 클라우딘 18 아이소폼 2, CSF1R, CEACAM5, CSF2, 탄산무수화효소 9, CLDN18.2, 심장 마이오신, CCR4, CGRP, 응고 인자 III, c-Met, CTLA-4, DPP4, DR5, DLL3, DLL4, 다비가트란(다비가트란), EpCAM, 에볼라바이러스 당단백질, 엔도글린, 에피시알린, EPHA3, c-Met, FGFR2, 피브린 II 베타 쇄, FGF 23, 폴레이트 수용체 1, GMCSF, GD2 강글리오사이드, GDF-8, GCGR, 젤라티나제 B, 글리피칸 3, GPNMB, GMCSF 수용체 α-쇄, 칼리크레인, KIR2D, ICAM-1, ICOS, IGF1, IGF2, IGF-1 수용체, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4Rα, IL-5, IL-6, IL-6 R, IL-9, IL-12, IL-13, IL17A, IL17F, IL-20, IL-22, IL-23, IL-31, IFN-α, IFN- β, IFN-γ, 인테그린 α4β7, 인터페론 α/β 수용체, 인플루엔자 A 헤마글루티닌, ILGF2, HER1, HER2, HER3, HHGFR, HGF, HLA-DR, B형 간염 표면 항원, HNGF, Hsp90, HGFR, L-셀렉틴, 루이스-Y 항원, LYPD3, LOXL2, LIV-1, MUC1, MCP-1, MSLN, 메소텔린, MIF, MCAM, NCA-90, NCA-90노치 1, 넥틴-4, PCDP1, PD-L1, PD-1, PCSK9, PTK7, PCDC1, 포스파티딜세린, RANKL, RTN4, 레서스 인자, ROR1, SLAMF7, 스타필로코커스 아우레우스 알파 독소, 스타필로코커스 아우레우스 2성분 류코시딘, SOST, 셀렉틴 P, SLITRK6, SDC1, TFPI, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, TNF-α, TWEAK 수용체, TNFRSF8, TYRP1, 타우 단백질, TAG-72, TSLP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TGF-β, TAG-72, TRAP, TIGIT, 테나신 C, OX-40, VEGF-A, VWF, VEGFR1 또는 VEGFR2 중 하나 이상을 표적으로 할 수 있다.

[0731] 일부 실시형태에서, 단백질은 치료용 펩타이드이다. 펩타이드는 하기를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다: 글루카곤-유사 펩타이드 1(GLP-1), 엑센딘-2, 엑센딘-3, 엑센딘-4, 심방 나트륨이뇨 인자(ANF), 그렐린, 바소프레신, 성장 호르몬, 성장 호르몬-방출 호르몬(GHRH), RC-3095, 소마토스타틴, 봄베신, PCK-3145, Phe-His-Ser-Cys-Asn(PHSCN), IGF1, B형 나트륨뇨 펩타이드, 펩타이드 YY(PYY), 인터페론, 트롬보스폰딘, 앤지오포이에틴, 칼시토닌, 성선자극호르몬 방출호르몬, 히루딘, 글루카곤, 항-TNF-알파, 섬유아세포 성장인자, 과립구 집락 자극 인자, 오비네피타이드, 뇌하수체 갑상선 호르몬(PTH), 류프롤라이드, 세르모렐린, 프라모렐린,

네시리타이드, 로티갑타이드, 실렌기타이드, MBP-8298, AL-108, 엔푸비르타이드, 티말파신, 답타마이신, HLFI-II, 락토페린, 델미타이드, 글루타티온, T-세포 에피토프 PR1, 프로테아제-3 펩타이드 1-11, B-세포 에피토프 P3, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH), 물질 P, 뉴로키닌 A, 뉴로키닌 B, CCK-8, 엔케팔린, 예컨대, 류신 엔케팔린 및 메티오닌 엔케팔린, 더마셉틴, [des-Ala20, Gln34]-더마셉틴, 계면활성제-연관 항미생물성 음이온성 펩타이드, 아피다에신 IA; 아피다에신 IB; OV-2; 1025, 아세틸-접착소 펩타이드(1025-1044) 아마이드; 테로마신(49-63); 펙시가난(MSI-78); 인돌리시딘; 아펠린-15(63-77); CFPIO(71-85); 치사 인자(LF) 저해제 탄저병 관련; 박텐신; C형 간염 바이러스 NS3 프로테아제 저해제 2; C형 간염 바이러스 NS3 프로테아제 저해제 3; 간염 바이러스 NS3 프로테아제 저해제 4; NS4A-NS4B C형 간염 바이러스(NS3 프로테아제 저해제 I); HIV-1, HIV-2 프로테아제 기질; 항-FM 펩타이드; Bak-BH3; Bax BH3 펩타이드(55-74)(야생형); Bid BH3-r8; CTT(젤라티나제 저해제); E75(Her-2/neu)(369-377); GRP78 결합 키메라. 펩타이드 모티프; p53(17-26); EGFR2/KDR 길항제; 콜리벨린 AGA-(C8R) HNG1 7(휴마닌 유도체); 활성-의존성 신경영양 인자(ADNF); 베타-분비효소 저해제 I; 베타-분비효소 저해제 2; ch[베타]-아밀로이드(30-16); 휴마닌(HN) sHNG, [Gly14]-HN, [Gly1 4]-휴마닌; 안지오텐신 전환 효소 저해제(BPP); 레닌 저해제 III; 아넥신 I(ANXA-I; Ac2-12); 항염증성 펩타이드 I; 항염증 펩타이드 2; 항염증성 아펠린 12; [D-Phe12, Leu14]-봄베신; 안테나페디아 펩타이드(산)(페네트라틴); 안테네페디아(Antennepedia) 리더 펩타이드(CT); 마스토파란(Mastoparan); [Thr28, N1e31]-콜레시스토키닌(25-33) 설페이트화; 노시셉틴(1-13)(아마이드); 섬유소용해 저해 인자; 감마 피브리노겐(377-395); 제닌; 오베스타틴(인간); [His1, Lys6]-GHRP(GHRP-6); [A1a5[베타]-A1a8]-뉴로키닌 A(4-10); 뉴로메딘 B; 뉴로메딘 C; 뉴로메딘 N; 활성-의존성 신경영양 인자(ADNF-14); 아세탈린 I(오피오이드 수용체 길항제 I); 아세탈린 2(오피오이드 수용체 길항제 2); 아세탈린 3(아편유사제 수용체 길항제 3); ACTH(1-39)(인간); ACTH(7-38)(인간); 소바진; 지질동성 호르몬(풀무치); 미리스토일화된 ADP-리보실화 인자 6, myr-ARF6(2-13); PAMP(1-20)(프로아드레노메둘린(1-20) 인간); AGRP(25-51); 아밀린(8-37)(인간); 앤지오텐신 I(인간); 앤지오텐신 II(인간); 압스타틴(아미노펩티다제 P 저해제); 브레비닌-I; 마가이닌 I; RL-37; LL-37(항미생물 펩타이드)(인간); 세크로핀 A; 항산화제 펩타이드 A; 항산화제 펩타이드 B; L-카모신; BcI 9-2; NPVF; 신경펩타이드AF(hNPAF)(인간); Bax BH3 펩타이드(55-74); bFGF 저해성 펩타이드; bFGF 저해성 펩타이드 II; 브래디키닌; [Des-Arg1 OJ-HOE 140; 카스파제 I 저해제 II; 카스파제 I 저해제 VIII; Smac N7 단백질(MEK1 유래 펩타이드 저해제 I; hBD-1 ([베타]-데펜신-1)(인간); hBD-3([베타]-데펜신-3)(인간); hBD-4([베타]-데펜신-4)(인간); HNP-I(데펜신 인간 호중구 펩타이드 I); HNP-2(데펜신 인간 호중구 펩타이드-2 디노핀 A(1-17)); 엔도몰핀-I; [베타]-엔돌핀(인간 포신(돼지)); 엔도텔린 2(인간); 피브리노겐 결합 저해제 펩타이드; 사이클로(-GRGDSP); TP508(트롬빈-유래 펩타이드); 갈라닌(인간); GIP(인간); 가스트린 방출 펩타이드(인간); 가스트린-1(인간); 그렐린(인간); PDGF-BB 펩타이드; [D-Lys3]-GHRP-6; HCV 코어 단백질(1-20); a3B1 인테그린 펩타이드 단편(325)(아마이드); 라미닌 펜타펩타이드(아마이드) Mel-아노트로핀-증강 인자(MPF); VA-[베타]-MSH, 리포트로핀-Y(프로오피오멜라노코르틴-유래); 심방 나트륨이뇨 펩타이드(1-28)(인간); 바소나트린 펩타이드(1-27); [A1a5, B-A1a8]-뉴로키닌 A(4-10); 뉴로메딘 L(NKA); Ac-(Leu28, 31)-신경펩타이드 Y(24-26); 알리테신; 뇌 신경펩타이드 II; [D-tyr11]-뉴로텐신; IKKy NEMO 결합 도메인(NBD) 저해성 펩타이드; PTD-p50(NLS) 저해성 펩타이드; 오렉신 A(소, 인간, 마우스, 래트); 오렉신 B(인간); 아쿠아포린-2(254-267)(인간 판크레아스타틴)(37-52); 췌장 폴리펩타이드(인간); 신경펩타이드; 펩타이드 YY(3-36)(인간); 하이드록시메틸-피토켈라틴 2; PACAP(I -27)(아마이드, 인간, 소, 래트); 프로락틴 방출 펩타이드(1-31)(인간); 살루신-알파; 살루신-베타; 사포신 C22; 세크레틴(인간); L-셀렉틴; 엔도키닌 A/B; 엔도키닌 C(인간); 엔도키닌 D(인간); 트롬빈 수용체(42-48) 효능제(인간); LSKL(트롬보스폰딘의 저해제); 티로트로핀 방출 호르몬(TRH); P55-TNFR 단편; 유로텐신 II(인간); VIP(인간, 돼지, 래트); VIP 길항제; 헬로더민; 엑세나타이드; ZP10(AVEOOIOO); 프람리니타이드; AC162352(PYY)(3-36); PYY; 오비네피타이드; 글루카곤; GRP; 그렐린(GHRP6); 류프롤라이드; 히스트렐린; 옥시토신; 아토시반(RWJ22164); 서모렐린; 네시리타이드; 비발리루딘(Hirulog); 이카티반트; 아비프타딘; 로티갭타이드(ZP123, GAP486); 실렌지타이드(EMD-121924, RGD 펩타이드); AlbuBNP; BN-054; 앤지오텐신 II; MBP-8298; 펩타이드 류신 아르기닌; 지코노타이드; AL-208; AL-108; 카베티콘; 트라이펩타이드; SAL; 콜리벤; 휴마닌; ADNF-14; VIP(혈관작용 장 펩타이드); 티말파신; 바시트라신; 그라미디신; 펙시가난(MSI-78); P1 13; PAC-113; SCV-07; HLF1-I1(락토페린); DAPTA; TRI-1144; 트리트릅티신(Tritrpticin); 항-플라민 2; 가텍스(테두글루타이드, ALX-0600); 스티무박스(L-BLP25); 크리살린(TP508); 멜라노난 II; 스판타이드 II; 세룰레타이드; 신칼라이드; 펜타가스틴; 세크레틴; 엔도스타틴 펩타이드; E-셀렉틴; HER2; IL-6; IL-8; IL-10; PDGF; 트롬보스폰딘; uPA (I); uPA (2); VEGF; VEGF (2); 펜타펩타이드-3; XXLRR; 베타-아밀로이드 원섬유발생; 엔도몰핀-2; TIP 39(결절누두 신경펩타이드); PACAP (1-38)(아마이드, 인간, 소, 래트); TGFB 활성화 펩타이드; 인슐린 감작 인자(ISF402); 전환 성장 인자 BI 펩타이드(TGF-B1); 캐룰레인 방출 인자; IELLQAR(8-branchMAPS); 티가포타이드 PK3145; 고세렐린; 아바렐릭스; 세트로렐릭스; 가니렐릭스; 데가렐

릭스(트립토렐린); 바루시반(FE 200440); 프랄모렐린; 옥트레오타이드; 엡티피바타이드; 네타미프타이드(INN-00835); 압타마이신; 스판타이드 II; 델미타이드(RDP-58); AL-209; 엔푸버타이드; IDR-I; 헥사펩타이드-6; 인슐린-A 쇄; 란레오타이드; 헥사[rho]엡타이드-3; 인슐린 B-쇄; 글라긴-A 쇄; 글라긴-B 쇄; 인슐린-LisPro B-쇄 유사체; 인슐린-아스파트 B-쇄 유사체; 인슐린-글루리신 B 쇄 유사체; 인슐린-데터머 B 쇄 유사체; 소마토스타틴 종양 저해 유사체; 판크레아스타틴(37-52); 혈관작용 장 펩타이드 단편(KKYL-NH2); 및 디놀핀 A. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 단백질의 예는 면역독소 SSIP, 아데노신 데아미나제, 아르기니나제 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0732] *IL-2-거대분자 접합체*

[0733] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태로 돌아가서, 보다 구체적인 단백질-거대분자 접합체가 제공되며, 이 접합체는 링커를 통해 다중 수용해성 중합체에 공유 부착된 IL-2 모이어티의 잔기를 포함한다. 본 개시내용의 접합체는 하기 특징 중 하나 이상을 가질 것이다.

[0734] IL-2 모이어티

[0735] 상기에 언급된 바와 같이, 접합체는 일반적으로 방출 가능한 링커 또는 방출 가능하지 않은 링커를 통해 하나 이상의 수용해성 중합체에 공유 부착된 IL-2 모이어티의 잔기를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-2 모이어티"는 접합 전의 IL-2 모이어티뿐만 아니라 수용해성 중합체에 부착된 후의 IL-2 모이어티를 지칭할 것이다. 그러나, 본래 IL-2 모이어티가 수용해성 중합체에 부착되는 경우, IL-2 모이어티는 중합체(들)에 대한 링키지와 연관된 하나 이상의 공유 결합의 존재로 인해 약간 변경된다. 종종, 또 다른 분자에 부착된 IL-2 모이어티의 이러한 약간 변경된 형태를 IL-2 모이어티의 "잔기"라고 지칭한다.

[0736] IL-2 모이어티는 비-재조합 방법 및 재조합 방법으로부터 유래될 수 있고, 본 개시내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다. 또한, IL-2 모이어티는 인간 공급원, 동물 공급원 및 식물 공급원으로부터 유래될 수 있다.

[0737] 비-재조합 접근법 및 재조합 접근법으로 얻어진 임의의 IL-2 모이어티가 본 명세서에 기재된 접합체를 제조하는 데 IL-2 모이어티로서 사용될 수 있다.

[0738] IL-2 활성을 갖는 단백질을 발현하는 데 사용되는 시스템에 따라서, IL-2 모이어티는 글리코실화되지 않거나 글리코실화될 수 있고, 둘 중 하나가 사용될 수 있다. 즉, IL-2 모이어티는 글리코실화되지 않거나 IL-2 모이어티는 글리코실화될 수 있다. 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에서, IL-2 부분은 글리코실화되지 않는다.

[0739] IL-2 모이어티는 아미노산의 측쇄 내의 원자에 대한 중합체의 용이하게 부착을 제공하기 위해서, 유리하게는 하나 이상의 아미노산 잔기, 예컨대, 라이신, 시스테인, 히스티딘 및/또는 아르기닌을 포함 및/또는 치환하도록 변형될 수 있다. IL-2 모이어티의 치환의 예는 미국 특허 제5,206,344호에 기재되어 있다. 또한, IL-2 모이어티는 비-자연 발생 아미노산 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. IL-2 모이어티의 비-자연 발생 아미노산 잔기를 치환시키는 예는 국제 공개 제WO 2019/028419호에 기재되어 있다. 아미노산 잔기 및 비-자연 발생 아미노산 잔기를 부가하는 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 문헌[J. March, Advanced Organic IL-2mistry: Reactions Mechanisms and Structure, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992)] 참조.

[0740] 또한, IL-2 모이어티는 (작용기-함유 아미노산 잔기의 부가를 통한 것 제외) 작용기의 부착을 포함하도록 유리하게 변형될 수 있다. 예를 들어, IL-2 모이어티는 티올기를 포함하도록 변형될 수 있다. 또한, IL-2 모이어티는 N-말단 알파 탄소를 포함하도록 변형될 수 있다. 또한, IL-2 모이어티는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. 또한, IL-2 모이어티는 알데하이드기를 포함하도록 변형될 수 있다. 또한, IL-2 모이어티는 케톤기를 포함하도록 변형될 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시형태에서, IL-2 모이어티는 티올기, N-말단 알파 탄소, 탄수화물, 알데하이드기 및 케톤기 중 하나 이상을 포함하도록 변형되지 않는 것이 바람직하다.

[0741] 예시적인 IL-2 모이어티는 문헌 및 예를 들어, 미국 특허 제5,116,943호, 제5,153,310호, 제5,635,597호, 제7,101,965호 및 제7,567,215호 및 미국 특허 출원 공개 제2010/0036097호 및 제2004/0175337호에 기재되어 있다. 바람직한 IL-2 모이어티는 도 1에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0742] 일부 예에서, IL-2 모이어티는 "단량체" 형태일 수 있으며, 여기서 상응하는 펩타이드의 단일 발현은 구별되는 단위로 조직화된다. 다른 예에서, IL-2 모이어티는 "이량체"(예를 들어, 재조합 IL-2의 이량체)의 형태일 수 있고, 여기서 단백질의 2개의 단량체 형태는 (예를 들어, 이황화 결합에 의해) 서로 회합된다. 예를 들어, 재조합 인간 IL-2의 이량체의 맥락에서, 이량체는 각각의 단량체의 Cys 125 잔기로부터 형성된 이황화 결합에 의해 서

로 회합된 2개의 단량체 형태일 수 있다.

[0743] 또한, IL-2의 전구체 형태가 IL-2 모이어티로 사용될 수 있다. 임의의 전술한 서열의 절단된 버전, 혼성 변이체 및 펩타이드 모방체가 또한 IL-2 모이어티로 작용할 수 있다. 적어도 어느 정도의 IL-2 활성을 유지하는 전술한 것 중 임의의 것의 생물학적 활성 단편, 결실 변이체, 치환 변이체 또는 부가 변이체가 또한 IL-2 모이어티로서 작용할 수 있다.

[0744] 임의의 주어진 펩타이드 또는 단백질 모이어티에 대해, 그 모이어티가 IL-2 활성을 갖는지 여부를 결정하는 것이 가능하다. 시험관내 IL-2 활성을 결정하기 위한 다양한 방법이 당업계에 기재되어 있다. 예시적인 접근 방식은 하기 실험에서 기재된 CTLL-2 세포 증식 검정이다. 예시적인 접근 방식은 문헌[Moreau et al. (1995) Mol. Immunol. 32:1047-1056)]에 기재되어 있다. 당업계에 공지된 다른 방법론이 또한 전기측정법, 분광광도법, 크로마토그래피 및 방사측정 방법론을 비롯한 IL-2 기능을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0745] 본 개시내용에 따른 보다 구체적인 예시적인 접합체를 이제 기재할 것이다. 전형적으로, 이러한 IL-2 모이어티는 도 1에 제공된 서열과 유사한 아미노산 서열을 (적어도 부분적으로) 공유할 것으로 예상된다. 따라서, 도 1의 서열 내의 특정 위치 또는 원자에 대한 참조가 이루어지지만, 이러한 참조는 단지 편의를 위한 것이며, 당업자는 IL-2 활성을 갖는 다른 모이어티 내의 해당 위치 또는 원자를 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 특히, 천연 인간 IL-2에 대해 본 명세서에 제공된 설명은 상기 중 임의의 것의 단편, 결실 변이체, 치환 변이체 또는 부가 변이체에 종종 적용 가능하다.

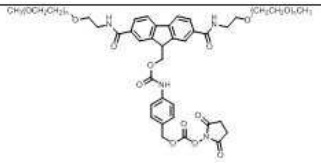
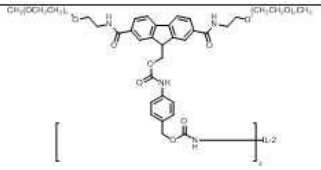
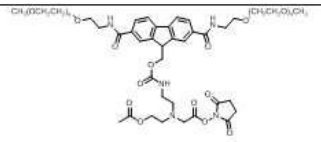
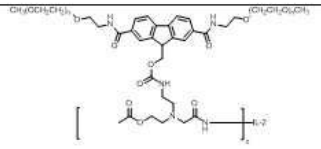
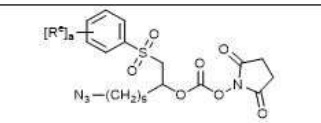
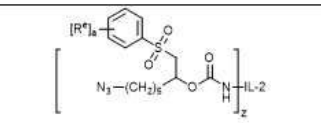
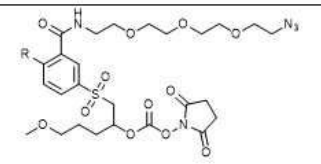
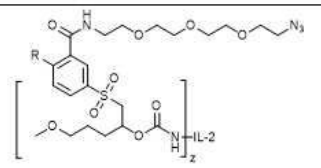
[0746] 접합체 어셈블리

[0747] IL-2 모이어티 상의 아미노기는 IL-2 모이어티와 수용해성 중합체 사이의 부착점을 제공한다. 도 1에 제공된 아미노산 서열을 사용하는 경우, 접합에 사용될 수 있는 -아미노산을 각각 갖는 여러 개의 라이신 잔기가 있음이 분명하다. 또한, 임의의 단백질의 N-말단 아민이 또한 부착점으로 작용할 수 있다.

[0748] IL-2 모이어티의 이용 가능한 아민과 공유 방출 가능한 링키지를 형성하는 데 유용한 적합한 시약의 많은 예가 있다. 상응하는 접합체와 함께 비제한적인 특정 예가 하기 표 1에 제공되어 있다. 표에서, 변수 "n"은 반복 단량체 단위의 수를 나타내고, z는 1 내지 25의 정수이며, "-NH-IL-2"는 중합체 시약 또는 링커에 접합된 후 그리고 IL-2 모이어티에 개별적으로 부착되는 하나 이상의 수용해성 중합체 또는 IL-2 모이어티에 개별적으로 부착되는 하나 이상의 링커를 형성한 후 IL-2 모이어티의 잔기를 나타낸다. 표 1에 제시된 각각의 중합체 부분[예를 들어, $(OCH_2CH_2)_n$ 또는 $(CH_2CH_2O)_n$]은 "CH_3"기로 종결되지만, 다른 기(예컨대, H 및 벤질)가 이를 대체할 수 있다.

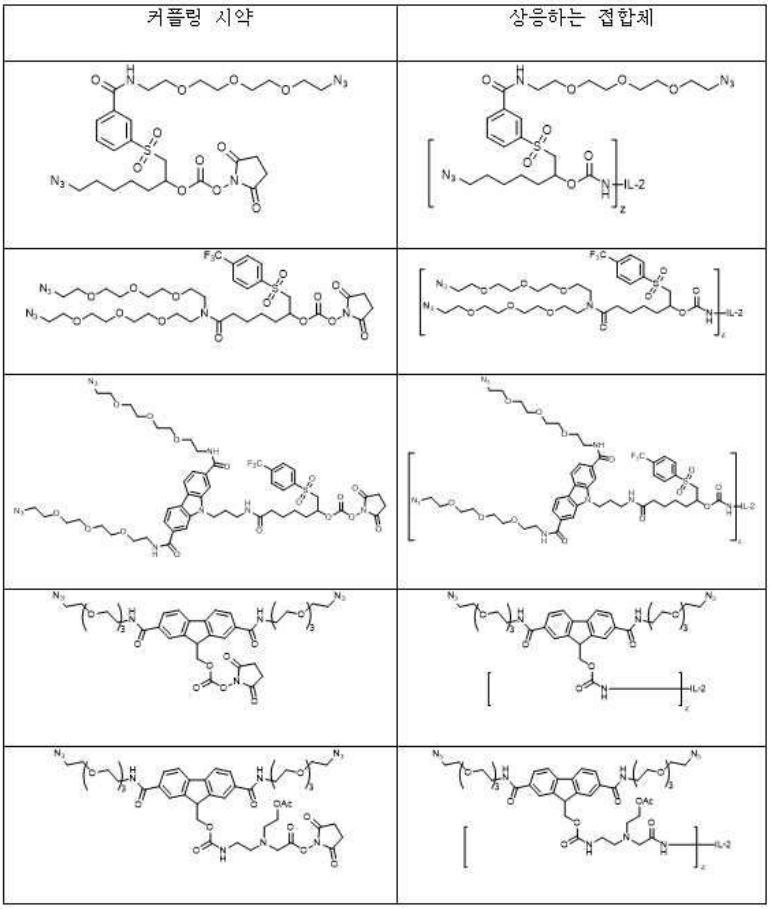
표 1

아민-선택적 커플링 시약 및 IL-2 모이어티의 예
이로부터 형성된 접합체

커플링 시약	상응하는 접합체
	
	
	
	

[0749]

[0750]



[0751] IL-2 모이어티의 아미노기에 대한 시약의 접합은 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 한 접근법에서, IL-2 모이어티는 석신이미딜 유도체(또는 다른 활성화된 에스터기, 여기서 이들 대안적인 활성화된 에스터기-함유 시약에 대해서 기재된 것과 유사한 접근법이 사용될 수 있음)로 작용화된 커플링 시약에 접합될 수 있다. 이러한 접근법에서, 석신이미딜 유도체를 보유하는 시약은 pH 7 내지 9.0의 수성 매질에서 IL-2 모이어티에 부착될 수 있지만, 상이한 반응 조건(예를 들어, 낮은 pH, 예컨대, 6 내지 7 또는 상이한 온도 및/또는 15℃ 미만)을 사용하면 IL-2 모이어티 상의 다른 위치에 시약이 부착될 수 있다.

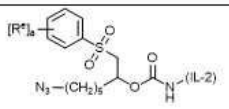
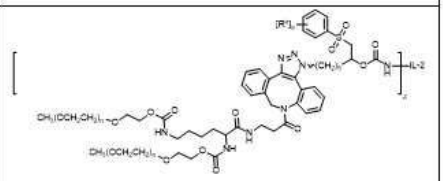
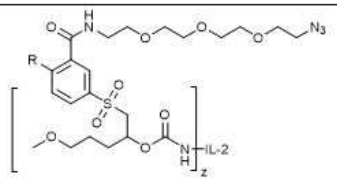
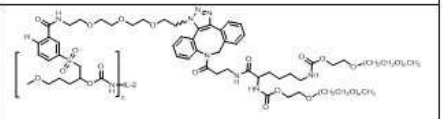
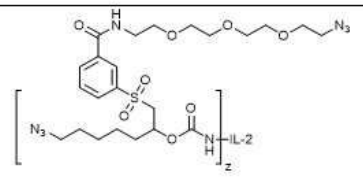
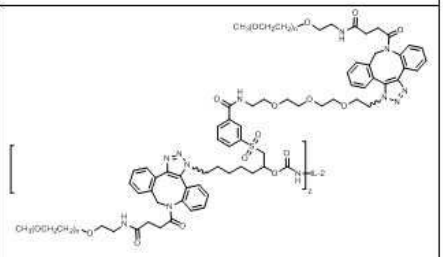
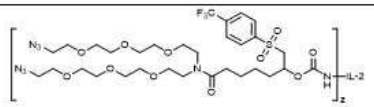
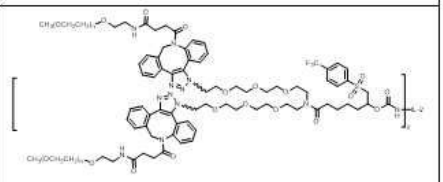
[0752] IL-2 상에 다중 아미노 부위가 존재하기 때문에, 개시된 커플링 시약을 사용한 IL-2 모이어티의 하나 초과의 작용화는 과량 당량의 시약을 사용하여 달성될 수 있다. IL-2 모이어티의 다중 아미노기와 접합시키기 위해서는 매우 높은 당량의 중합체 시약(예를 들어, 100당량)이 필요하다. 이작용성 링커 시약의 활용은 IL-2 모이어티의 높은 작용화를 보다 효율적으로 달성할 수 있다.

[0753] 이작용성 링커 시약은 일반적으로 석신이미딜 유도체 및 클릭 화학에 적합한 반응성 기를 보유할 수 있다. NHS 커플링을 통한 IL-2 모이어티의 아미노기에 대한 이작용성 시약의 접합은 IL-2 모이어티의 많은 수의 작용화를 달성할 수 있다. 그 후, 적합한 중합체 시약을 사용한 클릭 화학 반응이 고도로 중합체적으로 유도체화된 IL-2를 제공할 수 있다. 상응하는 접합체와 함께 비제한적인 특정 예가 하기 표 2에 제공되어 있다. 표에서, 변수 (n)은 반복 단량체 단위의 수를 나타내고, z는 1 내지 25의 정수이며, "-NH-IL-2"는 하나 이상의 수용해성 중합체가 개별적으로 부착된 IL-2의 잔기를 나타낸다. 표 2에 제시된 각각의 중합체 부분[예를 들어, $(OCH_2CH_2)_n$ 또는 $(CH_2CH_2O)_n$]은 "CH_3"기로 종결되지만, 다른 기(예컨대, H 및 벤질)가 이를 대체할 수 있다.

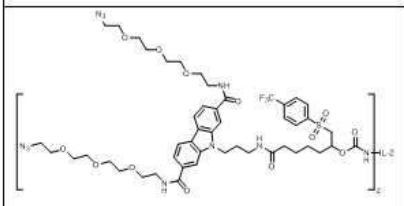
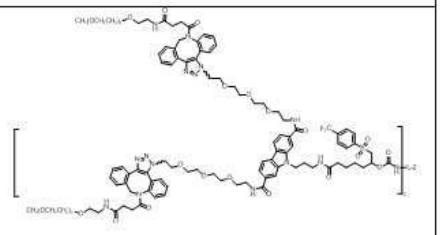
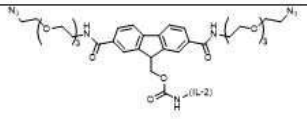
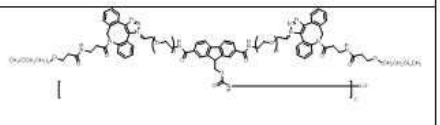
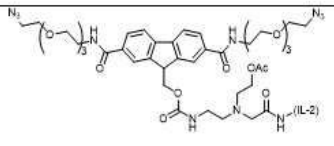
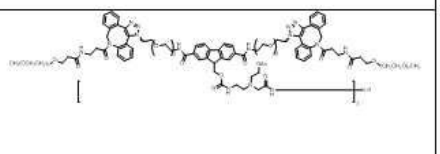
표 2

IL-2 링커 접합체 및 이로부터 형성된 IL-2 중합체 접합체

[0754]

IL-2 링커 접합체	상응하는 중합체 접합체
	
	
	
	

[0755]

IL-2 링커 접합체	상응하는 중합체 접합체
	
	
	

[0756] 클릭 화학이 부위-특이적 페길화에 사용된다. 부위-특이적 페길화는 아자이드-함유 비-자연 아미노산, 즉, 호모

아지도알라닌을 알킨-PEG 분자와의 부위-특이적 접합을 허용하는 재조합 단백질에 혼입함으로써 달성된다.

[0757] Cu-촉매 클릭 반응의 주요 단점 중 하나는 Cu(II)뿐만 아니라 고독성 Cu(I)가 필요하다는 것이다. 소량의 구리라도 단백질, 특히 GFP와 같은 형광성 단백질을 손상시킬 수 있다. 또한, 환원제, 리간드 및 무산소 조건의 존재가 필요할 수 있다.

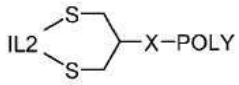
[0758] 단백질 생존력을 유지하면서 Cu-촉매 클릭 반응과 유사한 효율로 부위-특이적 페길화를 달성하는 방법은 8원 고리의 균주가 4℃ 또는 실온에서 촉매의 부재 하에 아자이드와의 반응이 일어나도록 하는 시클로옥틴의 도입이다. 소위 DBCO라고 하는 다이벤질사이클로옥틴은 반응성 사이클로옥틴 계열에 속한다.

[0759] DBCO-PEG 분자는 온화한 반응 조건 하에서 아자이드-함유 단백질의 Cu-무함유 페길화를 허용한다. 부수적으로, 아자이드 잔기에 대한 PEG 분자의 공유 부착은 클릭 화학의 유전된 선택성으로 인해 효율적이고 고도로 부위-특이적이다.

[0760] 다중 아자이드 작용화된 IL-2(IL-2-링커 접합체)를 고효율로 다중 페길화된 접합체(IL-2-고분자 접합체)로 전환하기 위해 클릭-페길화를 사용하였다. 아자이드와 비대칭 1,2-이치환된 알킨, 예컨대, DBCO 사이에 클릭 반응이 일어날 때, 당업자는 2개의 위치이성질체 화합물이 생성물로서 수득될 수 있음을 이해할 것이다. 위치 이성질체는 형성되는 C-N 결합의 위치가 다르다.

[0761] IL-2 모이어티 내에 함유된 티올기는 수용해성 중합체에 대한 효과적인 부착 부위로서 작용할 수 있다. IL-2 모이어티 내에 하나의 용매 접근 가능한 이황화물이 존재한다. 이것은 전형적으로 단백질의 구조 또는 기능보다는 단백질의 안정성에 기여한다. 문헌[Bioconjugate Chem. 2007, 18, 61-76]에 보고된 바와 같이, 접근 가능한 천연 이황화 결합을 온화하게 환원시켜 시스테인 티올을 해방시킨 후 비스(티올) 특이적 시약으로 페길화시킬 수 있다. 이것은 PEG가 부착된 2개의 시스테인 티올의 가교로 이어진다.

[0762] 티올-브리지 페길화를 사용하는 본 개시내용에 따른 대표적인 접합체는 하기 화학식 (XVII) 또는 이의 입체이성질체, 호변이성질체 또는 혼합물, 위치이성질체 또는 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이의 전구약물을 포함할 수 있다:



(XVII)

[0763]

[0764] 식 중, X는 스페이서 모이어티이고, POLY는 선형 또는 분지형 수용해성 중합체이고, "-S-"는 IL-2 모이어티 내의 잔기의 황기이다. 특정 실시형태에서, 수용해성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)이다.

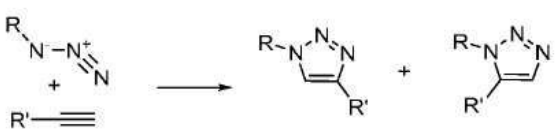
[0765] 중합체 시약과 관련하여, 본 명세서 및 다른 곳에서 기재된 것은 상업적 공급원으로부터 구입할 수 있거나 상업적으로 입수 가능한 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 또한, 중합체 시약을 제조하는 방법은 문헌에 설명되어 있다.

[0766] **클릭 화학**

[0767] 특정 실시형태에서 본 명세서에 개시된 접합체, 링커 및 화학식은 클릭 화학을 통해 반응할 수 있는 작용기를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 클릭 화학은 1,2,3-트라이아졸을 형성하기 위한 아자이드와 알킨 사이의 1,3-쌍극성 고리화첨가 또는 [3+2] 고리화첨가를 지칭한다. 용어 "1,3-쌍극성 고리화첨가" 및 "[3+2] 고리화첨가"는 또한 아자이드와 사이클로옥틴 사이의 "구리-무함유" 1,3-쌍극성 고리화첨가를 포함한다.

[0768] 따라서, 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에서 임의의 트라이아졸 화합물의 설명은 화합물의 위치이성질체뿐만 아니라 이의 혼합물을 포함하는 것을 의미한다.

[0769] 예를 들어, 아자이드 및 알킨의 [3+2] 고리화첨가는 다음과 같이 2개의 위치이성질체 트라이아졸을 생성할 수 있다.



[0770]

[0771] 특정 실시형태에서, 알킨은 변형된(strained) 사이클로알킨일 또는 헤테로사이클로알킨일이고, 고리화첨가 반응은 촉매의 존재 또는 부재 하에 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 예를 들어, 고리화첨가 반응은 당업계에서 "무금속 클릭 화학"으로 공지되어 있는 변형-촉진 아자이드-알킨 고리화첨가(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition: SPAAC)라고 불리는 반응에 의해 자발적으로 발생할 수 있다. 특정 실시형태에서, 변형된 사이클로알킨일 또는 헤테로사이클로알킨일은 본 명세서에 기재된 바와 같다.

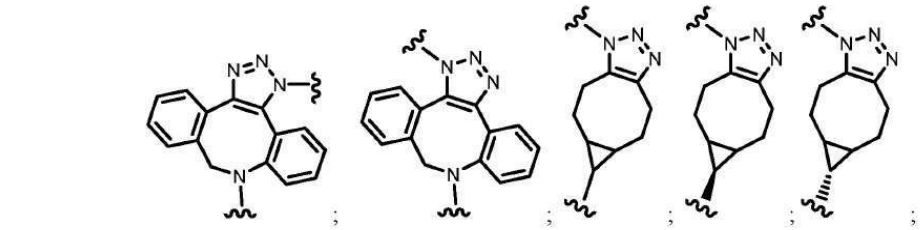
[0772] 이러한 무촉매 [3+2] 고리화첨가는 본 개시내용의 접합체를 형성하기 위해 본 명세서에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 알킨은 단지 예로서, 8원 고리 구조와 같은 고리 변형에 의해 활성화될 수 있으며, 이러한 알킨 고리에 전자-끌기기를 추가하거나, 루이스산, 예컨대, Au(I) 또는 Au(III)의 첨가에 의해 알킨이 활성화될 수 있다. 고리 변형에 의해 활성화된 알킨이 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Agard et al., J. Am. Chem. Soc, 2004, 126 (46):15046-15047]에 기재된 사이클로옥틴, 문헌[Boon et al., WO2009/067663 A1 (2009)]에 기재된 다이벤조사이클로옥틴 및 문헌[Debets et al., Chem. Comm., 2010, 46:97-99]에 기재된 아자-다이벤조사이클로옥틴.

[0773] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 접합체는 알킨기를 포함하는 작용화된 거대분자를 아자이드기를 포함하는 작용화된 단백질과 반응시켜 본 명세서에 기재된 바와 같은 접합체를 형성함으로써 수득될 수 있다. 다른 실시형태에서, 작용화된 단백질은 활성화된 알킨 모이어티를 가질 수 있고, 작용화된 거대분자는 아자이드 모이어티를 가질 수 있다.

[0774] 특정 실시형태에서, 작용화된 거대분자는 작용화된 PEG이다. 특정 실시형태에서, 작용화된 단백질은 작용화된 IL-2이다. 특정 실시형태에서, 작용화된 IL-2 내의 아자이드는 작용화된 PEG 내의 알킨과 반응하여 트라이아졸 모이어티를 형성한다(예를 들어, 1,3-쌍극성 고리화첨가를 통해). 특정 실시형태에서, 작용화된 PEG 내의 아자이드는 작용화된 IL-2 내의 알킨과 반응하여 트라이아졸 모이어티를 형성한다.

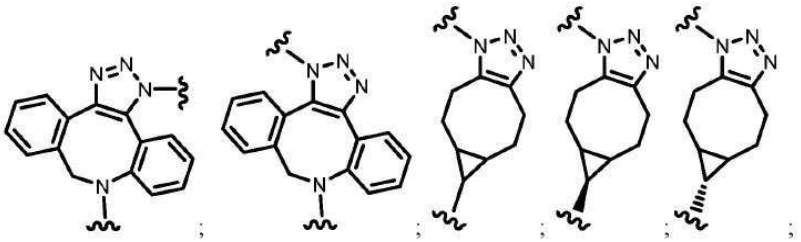
[0775] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 클릭 화학 생성물 군은 트라이아졸기를 포함한다.

[0776] 특정 실시형태에서, 클릭 화학 생성물 군은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0777] ; 및 .

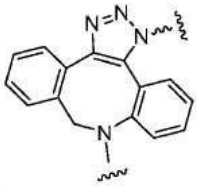
[0778] 본 명세서에 개시된 화합물, 접합체 및 화학식의 특정 실시형태에서, T는 하기로부터 선택된다:



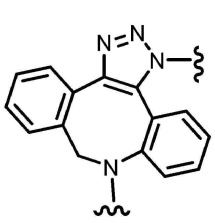
[0779] ;또는

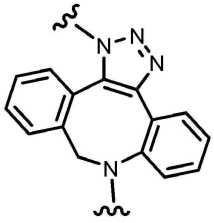
[0780] 트라이아졸 작용기 (T)를 포함하는 본 명세서에 개시된 화합물, 접합체 및 화학식의 특정 실시형태에서, 트라이아졸 작용기는 위치이성질체의 혼합물로서 존재하여, 화합물 또는 접합체를 생성시켜, 위치이성질체의 혼합물로서 존재할 수 있다.

[0781] 본 명세서에 사용된 바와 같이,



[0782] 의 구조는 하기 구조의 위치이성질체의 혼합물을 나타낸다:



[0783] ; 및  .

[0784] 본 명세서에 제공된 접합체가 산성 또는 염기성 모이어티를 함유하는 경우, 그것은 또한 약제학적으로 허용 가능한 염으로서 제공될 수 있다. 문헌[Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 1-19; *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, 2nd ed.; Stahl and Wermuth Eds.; John Wiley & Sons, 2011] 참조. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 용매화물이다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 수화물이다.

[0785] 본 명세서에 제공된 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염의 제조에 사용하기에 적합한 산은 아세트산, 2,2-다이클로로아세트산, 아실화된 아미노산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, L-아스파트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 붕산, (+)-캄포르산, 캄포르설폰산, (+)-(1*S*)-캄포르-10-설폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 사이클로헥산설팜산, 도데실황산, 에탄-1,2-다이설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시-에탄설폰산, 폼산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티스산, 글루코헵톤산, D-글루콘산, D-글루쿠론산, L-글루탐산, α-옥소글루타르산, 글리콜산, 히푸르산, 브로민화수소산, 염화수소산, 아이오딘화수소산, (+)-L-락트산, (±)-DL-락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, (-)-L-말산, 말론산, (±)-DL-만델산, 메탄설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 나프탈렌-1,5-다이설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 질산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 과염소산, 인산, L-피로글루탐산, 사카린산, 살리실산, 4-아미노-살리실산, 세바스산, 스테아르산, 석신산, 황산, 타닌산, (+)-L-타타르산, 티오사이안산, *p*-톨루엔설폰산, 운데실렌산 및 발레르산을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0786] 본 명세서에 제공된 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염의 제조에 사용하기에 적합한 염기는 무기 염기, 예컨대, 수산화마그네슘, 수산화칼슘, 수산화칼륨, 수산화아연 또는 수산화나트륨; 및 유기 염기, 예컨대, 1차, 2차, 3차 및 4차, 지방족 및 방향족 아민, 예컨대, 비제한적으로 L-아르기닌, 벤에타민, 벤자틴, 콜린, 데아놀, 다이에탄올아민, 다이에틸아민, 다이메틸아민, 다이프로필아민, 다이아이소프로필아민, 2-(다이에틸아미노)-에탄올, 에탄올아민, 에틸아민, 에틸렌다이아민, 아이소프로필아민, *N*-메틸-글루카민, 하이드라바민, 1*H*-이미다졸, L-라이신, 몰폴린, 4-(2-하이드록시에틸)-몰폴린, 메틸아민, 피페리딘, 피페라진, 프로필아민, 피롤리딘, 1-(2-하이드록시에틸)-피롤리딘, 피리딘, 퀴누클리딘, 퀴놀린, 아이소퀴놀린, 트라이에탄올아민, 트라이메틸아민, 트라이에틸아민, *N*-메틸-D-글루카민, 2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판다이올 및 트로메타민을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0787] 본 명세서에 제공된 접합체는 또한 전구약물로서 제공될 수 있고, 이것은 화합물의 기능성 유도체이며, 생체내에서 모 화합물로 쉽게 전환 가능하다. 전구약물이 종종 유용한데, 그 이유는 일부 상황에서 이들이 모 화합물보다 투여가 용이할 수 있기 때문이다. 예를 들어, 이들은 경구 투여에 의해 생체 이용 가능하지만 모 화합물은 그렇지 않다. 전구약물은 또한 모 화합물에 비해 약제학적 조성물에서 향상된 용해도를 가질 수 있다. 전구약물은 효소 과정 및 대사 가수분해를 포함한 다양한 기전에 의해 모 약물로 전환될 수 있다.

[0788] **약제학적 조성물**

[0789] 접합체는 전형적으로 조성물의 일부이다. 일반적으로, 조성물은 복수의 접합체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 각각의 접합체는 동일한 단백질로 구성된다(즉, 전체 조성물 중에서, 단 하나의 유형의 단백질이 발견된다). 또한, 조성물은 복수의 접합체를 포함할 수 있으며, 여기서 임의의 주어진 접합체는 2개 이상의 상이한 단백질로

이루어진 군으로부터 선택된 모이어티로 구성된다(즉, 전체 조성물 중에서 2개 이상의 상이한 단백질이 발견된다). 다른 실시형태에서, 조성물 내의 실질적으로 모든 접합체(예를 들어, 조성물 중의 복수의 접합체의 85% 이상)는 각각 동일한 단백질을 포함한다. 보다 구체적으로, 단백질은 IL-2이다.

[0790] 조성물은 단일 접합체 종(예를 들어, 모노페길화된 접합체, 여기서 단일 중합체가 조성물 중의 실질적으로 모든 접합체에 대해 동일한 위치에 부착됨) 또는 접합체 종의 혼합물(예를 들어, 모노페길화된 접합체의 혼합물(여기서 중합체의 부착은 상이한 부위에서 일어남) 및/또는 모노페길화된, 다이페길화된, 트라이페길화된 및 다중 페길화된 접합체의 혼합물에서 발생)을 포함할 수 있다. 조성물은 또한 임의의 주어진 단백질에 부착된 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 그 초과의 중합체를 갖는 다른 접합체를 포함할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 조성물이 복수의 접합체를 포함하는 경우를 포함하고, 각각의 접합체는 하나의 단백질에 공유 부착된 하나의 수용해성 중합체를 포함할 뿐만 아니라, 조성물은 하나의 단백질에 공유 부착된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 그 초과의 수용해성 중합체를 포함한다. 보다 구체적으로, 단백질은 IL-2이다.

[0791] 조성물 중의 접합체와 관련하여, 조성물은 하기 특징 중 하나 이상을 일반적으로 충족할 것이다: 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 10개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 9개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 8개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 7개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 6개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 5개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 4개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 3개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1 내지 2개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 85%가 단백질에 부착된 1개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 10개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 9개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 8개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 7개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 6개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 5개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 4개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 3개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1 내지 2개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 95%가 단백질에 부착된 1개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 10개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 9개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 8개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 7개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 6개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 5개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 4개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 3개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1 내지 2개의 중합체를 가질 것임; 조성물 중의 접합체의 적어도 약 99%가 단백질에 부착된 1개의 중합체를 가질 것임. 중합체 범위, 예를 들어 "x 내지 y의 중합체"에 대한 언급은 x 내지 y(이들 값 포함)의 중합체의 수를 고려하는 것으로 이해된다(즉, 예를 들어 "1 내지 3개의 중합체"는 1개의 중합체, 2개의 중합체 및 3개의 중합체를 고려하고, "1 내지 2개의 중합체"는 1개의 중합체 및 2개의 중합체를 고려하는 등). 보다 구체적으로, 단백질은 IL-2이다.

[0792] 임의의 주어진 모이어티에 대한 목적하는 중합체 수의 제어는 적절한 중합체 시약, 중합체 시약 대 단백질의 비율, 온도, pH 조건 및 접합 반응의 다른 양상을 선택함으로써 달성될 수 있다. 또한, 바람직하지 않은 접합체의 감소 또는 제거는 정제 수단을 통해 달성될 수 있다.

[0793] 예를 들어, 중합체-단백질 모이어티 접합체를 정제하여 상이한 접합된 종을 수득/단리할 수 있다. 구체적으로, 생성물 혼합물을 정제시켜 IL-2 모이어티당 평균 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 초과의 PEG를 얻을 수 있다. 최종 접합체 반응 혼합물의 정제를 위한 전략은 예를 들어, 사용된 중합체 시약의 분자량, 특정 단백질, 목적하는 투여 요법 및 개별 접합체(들)의 잔류 활성 및 생체내 특성을 포함하는 다수의 인자에 좌우될 것이다.

[0794] 바람직한 경우, 상이한 분자량을 갖는 접합체가 겔 여과 크로마토그래피 및/또는 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 단리될 수 있다. 즉, 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 상이한 분자량(여기서 그 차이는 수용해성

중합체 부분의 평균 분자량에 본질적으로 상응함)에 기초하여 상이한 수의 중합체-대-단백질 모이어티 비율(예를 들어, 1량체, 2량체, 3량체 등, 여기서 "1량체"는 단백질 모이어티에 대해서 1개의 중합체를 나타내고, "2량체"는 단백질 모이어티에 대해서 2개의 중합체를 나타내는 등임)를 분별시킨다. 예를 들어, 15,000달톤의 단백질이 약 20,000달톤의 분자량을 갖는 중합체 시약에 무작위로 접합되는 예시적인 반응에서, 생성된 반응 혼합물은 비변형된 단백질(약 15,000달톤의 분자량을 가짐), 모노페길화된 단백질(약 35,000달톤의 분자량을 가짐), 다이페길화된 단백질(약 55,000달톤의 분자량을 가짐) 등을 함유할 수 있다.

[0795] 이 접근법이 PEG 및 상이한 분자량을 갖는 다른 중합체-단백질 접합체를 분리시키는 데 사용될 수 있지만, 이 접근법은 일반적으로 단백질 내의 상이한 중합체 부착 부위를 갖는 위치 아이소폼을 분리시키는 데 효과적이지 않다. 예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 PEG 1량체, 2량체, 3량체 등의 혼합물로부터 서로를 분리시킬 수 있지만, 회수된 접합체 조성물 각각은 단백질 내의 상이한 반응성 기(예를 들어, 라이신 잔기)에 부착된 PEG(들)를 함유할 수 있다.

[0796] 특정 겔 여과 칼럼의 선택은 목적하는 분별 범위에 따라 달라질 것이다. 용리는 일반적으로 적합한 완충제, 예컨대, 포스페이트, 아세테이트 등을 사용하여 수행된다. 수집된 분획은 다수의 상이한 방법, 예를 들어, (i) 단백질 내용물에 대한 280㎚에서의 흡광도, (ii) 표준품으로서 소 혈청 알부민(BSA)을 사용한 염료-기반 단백질 분석, (iii) PEG 함량에 대한 아이오딘 시험(문헌[Sims et al. (1980) Anal. BioIL-2m, 107:60-63]), (iv) 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법(SDS PAGE), 이어서 아이오딘화 바륨으로 염색 및 (v) 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 분석할 수 있다.

[0797] 위치 아이소폼의 분리는 적합한 칼럼(예를 들어, C18 칼럼 또는 C3 칼럼)을 사용하는 역상-고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하는 역상 크로마토그래피 또는 이온 교환 칼럼을 사용하는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행된다. 두 접근법 모두 동일한 분자량(즉, 위치 아이소폼)을 갖는 중합체-활성제 이성질체를 분리하는 데 사용할 수 있다.

[0798] IL-2-중합체 접합체의 경우, 조성물은 바람직하게는 IL-2 활성을 갖지 않는 단백질이 실질적으로 존재하지 않는다. 또한, 조성물은 바람직하게는 다른 모든 비공유 부착된 수용해성 중합체가 실질적으로 존재하지 않는다. 그러나, 일부 상황에서, 조성물은 중합체-IL-2 모이어티 접합체 및 비접합된 IL-2 모이어티의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0799] 선택적으로, 본 개시내용의 조성물은 1종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 원하는 경우, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 접합체에 첨가하여 조성물을 형성할 수 있다.

[0800] 예시적인 부형제는 탄수화물, 무기 염, 항미생물제, 항산화제, 계면활성제, 완충제, 산, 염기, 아미노산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 비제한적으로 포함한다.

[0801] 탄수화물, 예컨대, 당, 유도체화 당, 예컨대, 알디톨, 알돈산, 에스터화된 당 및/또는 당 중합체가 부형제로서 존재할 수 있다. 구체적인 탄수화물 부형제는 예를 들어, 단당류, 예컨대, 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예컨대, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류, 예컨대, 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예컨대, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨, 솔비톨(글루시톨), 피라노실 솔비톨, 미오이노시톨, 사이클로덱스트린 등을 포함한다.

[0802] 부형제는 또한 무기 염 또는 완충제, 예컨대, 시트르산, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 질산칼륨, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨 및 이들의 조합물을 포함할 수 있다.

[0803] 조성물은 또한 미생물 성장을 방지하거나 억제하기 위한 항미생물제를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에 적합한 항미생물제의 비제한적인 예는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 벤질 알코올, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로로부탄올, 페놀, 페닐에틸 알코올, 페닐수은 나이트레이트, 티메로살 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0804] 항산화제가 또한 조성물에 존재할 수 있다. 항산화제는 산화를 방지하여, 접합체 또는 제제의 다른 성분의 열화를 방지하는 데 사용된다. 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태에 사용하기에 적합한 항산화제는 예를 들어, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 차아인산, 모노티오글리세롤, 프로필 갈레이트, 중아황산나트륨, 나트륨 폼알데하이드 설폭실레이트, 메타중아황산나트륨 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0805] 계면활성제가 부형제로서 존재할 수 있다. 예시적인 계면활성제는 폴리솔베이트, 예컨대, "Tween 20" 및 "Tween

80" 및 플루로닉, 예컨대, F68 및 F88; 솔비탄 에스터; 지질, 예컨대, 인지질, 예컨대, 레시틴 및 기타 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민(비록 바람직하게는 리포솜 형태가 아님), 지방산 및 지방 에스터; 스테로이드, 예컨대, 콜레스테롤; 및 IL-2화제(IL-2lating agent), 예컨대, EDTA, 아연 및 기타 적합한 양이온을 포함한다.

[0806] 산 또는 염기가 조성물에 부형제로서 존재할 수 있다. 사용될 수 있는 산의 비제한적인 예는 염화수소산, 아세트산, 인산, 시트르산, 말산, 락트산, 폼산, 트라이클로로아세트산, 질산, 과염소산, 인산, 황산, 푸마르산 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 산을 포함한다. 적합한 염기의 예는 비제한적으로 수산화나트륨, 아세트산나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 아세트산암모늄, 아세트산칼륨, 인산나트륨, 인산칼륨, 시트르산나트륨, 폼산나트륨, 황산나트륨, 황산칼륨, 푸마르산칼륨 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 염기를 포함한다.

[0807] 1종 이상의 아미노산이 본 명세서에 기재된 조성물에 부형제로서 존재할 수 있다. 이와 관련하여 예시적인 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 글리신을 포함한다.

[0808] 조성물 중의 접합체(즉, 활성제와 중합체 시약 사이에 형성된 접합체)의 양은 다수의 인자에 따라 달라질 것이지만, 조성물이 단위 용량 용기(예를 들어, 바이알)에 저장되는 경우 최적으로 치료적 유효 용량으로 존재할 것이다. 또한, 약제학적 제제는 주사기에 존재할 수 있다. 치료적 유효 용량은 어느 양이 임상적으로 목적하는 종점을 생성시키는지 결정하기 위해 증가하는 양의 접합체를 반복적으로 투여함으로써 실험적으로 결정될 수 있다.

[0809] 조성물 중 임의의 개별 부형제의 양은 부형제의 활성 및 조성물의 특정 요구에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 개별 부형제의 최적량은 일상적인 실험을 통해, 즉, 다양한 양의 부형제(낮은 값 내지 높은 값 범위)를 함유하는 조성물을 준비하고, 안정성 및 다른 매개변수를 조사한 다음, 유의한 유해 효과 없이 최적의 성능이 달성되는 범위를 결정함으로써 결정된다.

[0810] 그러나, 일반적으로, 부형제는 부형제의 중량 기준으로 약 1중량% 내지 약 99중량%, 바람직하게는 약 5중량% 내지 약 98중량%, 보다 바람직하게는 약 15 내지 약 95 중량%의 양으로 조성물에 존재할 것이고, 30중량% 미만의 농도가 가장 바람직하다.

[0811] 다른 부형제와 함께 이러한 상기 약제학적 부형제는 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), the "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998) 및 Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000]에 기재되어 있다.

[0812] **치료 방법**

[0813] 접합체 및 이의 조성물은 접합체의 투여에 의해 치유되거나 예방될 수 있는 임의의 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다. 당업자는 특정 접합체가 효과적으로 치료할 수 있는 병태를 인식한다. 예를 들어, 접합체는 암, 감염성 질환(예를 들어, 바이러스성) 및/또는 자가면역 질환을 치료하기 위해 단독으로 또는 다른 약물요법과 조합하여 사용될 수 있다.

[0814] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 개시된 접합체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시형태에서, 혈액암은 다발성 골수종, 림프종 또는 백혈병이다. 일부 실시형태에서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병, 비호지킨 림프종, 피부 T 세포 림프종이다. 일부 실시형태에서, 암은 고형 종양 암이다. 일부 실시형태에서, 고형 종양 암은 신세포 암종, 흑색종, 유방암 또는 방광암이다. 일부 실시형태에서, 흑색종은 전이성 흑색종이다. 일부 실시형태에서, 암은 육종, 척색종, 결장암, 직장암, 결장직장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포암, 기저 세포암, 선암종, 땀샘암, 피지선암, 유두암, 유두선암종, 낭선암, 수질암, 기관지암, 신세포암, 간세포암, 담관암, 융모막암, 정액종, 배아암, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환암, 위암, 비소세포폐암, 소세포 폐암, 방광암, 신세포 암종, 요로상피암, 상피암, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 속귀신경집종(acoustic neuroma), 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 망막모세포종, 비호지킨 림프종, 피부 T 세포 림프종, 급성 골수성 백혈병 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 IL-2로 치료될 수 있는 암이다.

[0815] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 감염성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 개시된 접합체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일

부 실시형태에서, 감염성 질환은 바이러스 질환이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 질환은 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 C형 간염 바이러스(HCV)이다. 일부 실시형태에서, 감염성 질환은 HIV이다. 일부 실시형태에서, 감염성 질환은 HCV이다.

[0816] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 자가면역 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 감염성 질환 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 개시된 접합체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 홍반성 루푸스, 염증성 장 질환(IBD) 또는 아토피성 피부염이다. 일부 실시형태에서, 류마티스 관절염은 소아 류마티스 관절염이다.

[0817] 특정 실시형태에서, 환자는 신세포 암종, 전이성 흑색종, C형 간염 바이러스(HCV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 급성 골수성 백혈병, 비호지킨 림프종, 피부 T 세포 림프종, 소아 류마티스 관절염, 아토피 피부염, 유방암 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택된 병을 앓고 있다.

[0818] 유리하게는, 접합체는 또 다른 활성제의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후에 환자에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 접합체는 상승작용적 선천 면역 반응 및 적응 면역 반응을 생성시키기 위해 항종양 항원 항체와 조합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 접합체는 항체-의존성 세포 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) 기능을 통해 항종양 활성을 갖는 항종양 항체와 조합될 수 있다. 본 개시내용에 기재된 PEG-IL-2 접합체는 CD8+ T-세포를 자극할 수 있다. CD8+ T-세포의 자극은 직접적인 종양 사멸의 이점뿐만 아니라 호중구 활성을 촉진시키는 것으로 공지된 IFNɣ와 같은 사이토카인의 방출을 통해 항체-의존성 세포 독성(ADCC)에 대한 다형핵 호중구(polymorphonuclear neutrophil: PMN)의 조절을 제공한다(문헌[Pelletier et al., J. Leukoc. Biol. 2010; 88:1163-1170]). PEG-IL-2 접합체와 ADCC 기능을 갖는 항종양 항체의 병용 요법이 이러한 항체의 항종양 활성을 잠재적으로 향상시킬 수 있다.

[0819] **제형/투여**

[0820] 투여를 필요로 하는 환자에게 투여되는 본 명세서에 개시된 접합체 및 조성물은 모든 유형의 제형, 특히, 주사에 적합한 제형, 예를 들어, 액체뿐만 아니라 재구성될 수 있는 분말 또는 동결건조물을 포괄하는 것을 의미한다. 주사 전에 고체 조성물을 재구성하기 위한 적합한 희석제의 예는 주사용 정균수, 수 중의 덱스트로스 5%, 인산염 완충 식염수, 링거 용액, 식염수, 멸균수, 탈이온수 및 이들의 조합물을 포함한다. 액체 약제학적 조성물과 관련하여, 용액 및 현탁액이 고려된다.

[0821] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태의 조성물은 반드시는 아니지만 전형적으로 주사를 통해 투여되고, 따라서 일반적으로 투여 직전에 액체 용액 또는 현탁액이다. 약제학적 제제는 또한 시럽, 크림, 연고, 정제, 분말 등과 같은 다른 형태를 취할 수 있다. 다른 투여 경로, 예컨대, 폐, 직장, 경피, 경점막, 경구, 경막내, 종양내, 종양주위, 복강내, 피하, 동맥내 등이 또한 포함된다.

[0822] 본 개시내용은 또한 접합체로의 치료에 반응성인 병태를 앓고 있는 환자에게 본 명세서에 제공된 바와 같은 접합체를 투여하는 방법을 제공한다. 이 방법은 일반적으로 주사를 통해 치료적 유효량의 접합체(바람직하게는 약제학적 조성물의 일부로 제공됨)를 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 이전에 기재된 바와 같이, 접합체는 (예를 들어, 근육내, 피하 및 비경구로) 주사될 수 있다. 비경구 투여에 적합한 제형 유형은 즉시 주사 용액, 사용 전 용매와 조합하기 위한 건조 분말, 즉시 주사용 현탁액, 사용 전에 비히클과 조합하기 위한 무수 불용성 조성물 및 투여 전 희석용 에멀션 및 액체 농축물을 포함한다.

[0823] 접합체를 투여하는 방법(바람직하게는 약제학적 조성물의 일부로서 제공됨)은 접합체를 특정 영역에 국지화시키기 위해 선택적으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 접합체를 포함하는 액체, 겔 및 고체 제형은 질환이 있는 영역(예컨대, 종양, 종양 근처, 염증 영역 및 염증 영역 근처)에 외과적으로 이식될 수 있다. 편리하게는, 목적하는 위치가 접합체에 더 잘 노출되도록 하기 위해서 기관 및 조직을 영상화할 수도 있다.

[0824] 투여될 실제 용량은 대상체의 연령, 체중 및 일반적인 병태뿐만 아니라 치료될 병태의 중증도, 의료 전문가의 판단 및 투여될 접합체에 따라 달라질 것이다. 치료적 유효량은 당업자에게 공지되어 있고/있거나 관련 참고 문헌 및 문헌에 기재되어 있다. 일반적으로, 치료적 유효량은 약 0.001mg 내지 100mg 범위, 바람직하게는 0.01mg/일 내지 75mg/일의 용량, 보다 바람직하게는 0.10mg/일 내지 50mg/일의 용량일 것이다. 주어진 용량은 예를 들어, 질환의 증상이 감소되고/되거나 완전히 제거될 때까지 주기적으로 투여될 수 있다.

[0825] 임의의 주어진 접합체의 단위 투여량(다시, 바람직하게는, 약제학적 제제의 일부로서 제공됨)은 임상의의 판단, 환자의 필요 등에 따라 다양한 투여 스케줄로 투여될 수 있다. 특정 투여 스케줄은 당업자에게 공지되어 있거나, 일상적인 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 예시적인 투여 스케줄은 비제한적으로 매일

1회, 매주 3회, 매주 2회, 매주 1회, 3주마다 1회, 매월 2회, 매월 1회 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일단 임상적 종말점이 달성되면, 조성물의 투여가 중단된다.

[0826] 본 개시내용이 이의 바람직한 구체적인 실시형태와 관련하여 기재되었지만, 상기 설명뿐만 아니라 하기 실시예는 본 개시내용의 범주를 제한하지 않고 예시하도록 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용의 범주 내의 다른 양상, 이점 및 변형은 본 개시내용이 속한 기술 분야의 당업자에게 명백할 것이다.

[0827] 본 명세서에 언급된 모든 논문, 책, 특허 및 기타 간행물은 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0828] **실험**

[0829] 본 개시내용의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 당업계의 기술 내에 있는 유기 합성, 생화학, 단백질 정제 등의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 완전히 설명되어 있다. 예를 들어, 상기 문헌[J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992)] 참조.

[0830] 하기 실시예에서, 사용된 수치(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력하였지만, 일부 실험 오류 및 편차를 고려해야 한다. 달리 제시되지 않는 한, 온도는 섭씨 온도이며, 압력은 해수면에서 대기압 또는 그 근처이다. 모든 시약은 달리 제시되지 않는 한 시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich) 또는 써모 피셔 사이언티픽사(Thermo Fisher Scientific)에서 상업적으로 얻는다. 생성된 모든 NMR은 300 또는 400㎒ NMR 분광계에서 얻는다. 모든 처리는 유리 또는 유리-라이닝된 용기에서 수행되며, 금속-함유 용기 또는 장비와의 접촉이 회피된다.

[0831] 물질: 달리 명시되지 않는 한, 모든 유기 용매 및 시약(무수 CH_2Cl_2, 2-프로판올, 아세톤, NMM 및 DBCO-아민)은 시그마-알드리치사에서 구매하고, 제공된 그대로 사용하였다. PyClockK는 Novabiochem®에서 구매하였다. 15kDa, 17kDa 및 20kDa Y-PEG-NHS 시약은 젠켐 테크놀로지사(JenKem Technology USA)에서 구매하여, 제공된 그대로 사용하였다. 5kDa, 10kDa 및 20kDa TheraPEG™ 시약은 공개된 절차(문헌[Brocchini *et al, Nat. Protoc.* **2006**, *1:5*, 2241-2252])로부터 개작된 방법을 사용하여 제조되었다. DL-다이티오트레이톨(DTT)은 멜포드사(Melford)에서 구매하였고, 사용하기 전에 세포 배양 등급수(지이 헬쓰케어사(GE Healthcare))에서 0.1M 용액을 제조하였다. 완충제 제조를 위한 물은 써모 피셔 사이언티픽사, 머크사(Merck) 및 시그마-알드리치사에서 공급받았고, 제공된 그대로 사용하였다. PBS, pH 7.4는 2M NaOH(VWR)를 사용한 pH 조정에 의해 DPBS(시그마-알드리치사)로부터 제조하였다. 다른 모든 물질은 VWR, 시그마-알드리치사, 지이 헬쓰케어사, 써모 피셔 사이언티픽사 및 머크사에서 구매하였고, 제공된 그대로 사용하였다.

[0832] 이들 실시예에서 언급된 모든 전구체 중합체 시약은 달리 지시되지 않는 한 상업적으로 입수 가능하다. 도 1의 아미노산 서열에 상응하는 IL-2("rIL-2")의 동결건조된 분말.

[0833] IL-2-PEG 접합체의 질량 및 몰량을 IL-2 양에 기초하여 계산하였다.

[0834] SDS-PAGE 분석

[0835] 샘플을 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)에 의해 분석한다. 샘플을 준비하고, 겔에 로딩하고, 제조사가 설명한 대로 전기영동법을 수행한다.

[0836] 크기 배제 크로마토그래피

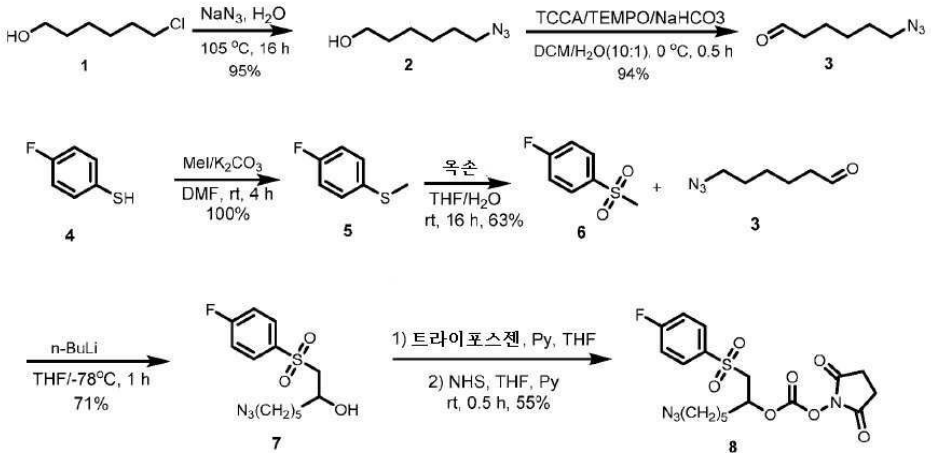
[0837] 크기 배제 크로마토그래피 방법을 사용하여 제조된 PEG-rIL-2 접합체를 정제시킨다. 정제 과정에 대한 세부 사항을 하기에 기재한다.

[0838] RP-HPLC 분석

[0839] 샘플을 HPLC 시스템 상에서 수행되는 역상 크로마토그래피(reversed-phase chromatography: RP-HPLC) 분석에 의해 분석한다. 분석적 RP-HPLC 분석을 ACE Excel 2superC18 칼럼(치수: 75×2.1㎜ id, 입자 크기 2㎛)이 있는 Dionex 2 UPLC 시스템에서 수행하였다. 10분에 걸쳐 완충액 A(94.95% H_2O, 5.0% MeCN, 0.05% TFA) 중의 0에서 100% 완충액 B(99.95% MeCN, 0.05% TFA)의 선형 구배를 0.8㎖/분의 유속으로 사용하였다. 샘플 로딩은 10㎍이었다.

[0840] **실시예 1**

[0841] 7-아지도-1-((4-플루오로페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(8)



[0842]

[0843] 6-아지도헥산-1-올(2)의 제조:

[0844] H_2O(750㎖) 중의 6-클로로헥산-1-올(75g, 0.549㏖, 1.0eq)의 용액에, NaN_3(97.5g, 1.50㏖, 2.73eq)를 첨가하였다. 혼합물을 105℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 LCMS 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 2(75g, 95%)를 제공하였다.

[0845] 6-아지도헥산알(3)의 제조:

[0846] 0℃에서 DCM/H_2O(750㎖/75㎖) 중의 화합물 2(75g, 0.523㏖, 1.0eq), TEMPO(817㎎, 5.23㎜ol, 0.01eq) 및 $NaHCO_3$(52.7g, 0.628㏖, 1.2eq)의 용액에, TCCA(45g, 0.194㏖, 0.37eq)를 3개의 분획으로 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 LCMS 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 여과시키고, 물로 희석시켰다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 3(70g, 94%)을 제공하였다.

[0847] (4-플루오로페닐)(메틸)설판(5)의 제조:

[0848] 실온에서 질소 분위기 하에서 DMF(250㎖) 중의 화합물 4(30g, 0.234㏖, 1.0eq)의 용액에, MeI(40g, 0.281㏖, 1.2eq) 및 K_2CO_3(97g, 0.702㏖, 3.0eq)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 물로 희석시키고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 5% LiCl(수성)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 5(45g, 100%)를 제공하였다.

[0849] 1-플루오로-4-(메틸설폰일)벤젠(6)의 제조:

[0850] THF/H_2O(450㎖/450㎖) 중의 화합물 5(45g, 0.317㏖, 1.0eq)의 용액에, 실온에서 질소 분위기 하에서 옥손(487g, 0.792㏖, 2.5eq)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 LCMS 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 여과하고, 물로 희석시키고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 6(35g, 63%)을 제공하였다.

[0851] 7-아지도-1-((4-플루오로페닐)설폰일)헵탄-2-올(7)의 제조:

[0852] -78℃에서 무수 THF(200㎖) 중의 화합물 6(20g, 0.115㏖, 1.0eq)의 용액에, n-BuLi(헥산 중의 2.5M, 60㎖, 0.149㏖, 1.3eq)을 적가하였다. 냉각욕을 제거하고, 혼합물을 0℃까지 가온시켰다. 30분 동안 교반한 후, 화합물 3(21g, 0.149㏖, 1.3eq)을 -78℃에서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 혼합물을 가온시켰다. 그 다음 혼합물을 NH_4Cl의 포화 수용액에 첨가하고(혼합물이 투명해졌음), 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제시켜 화합물

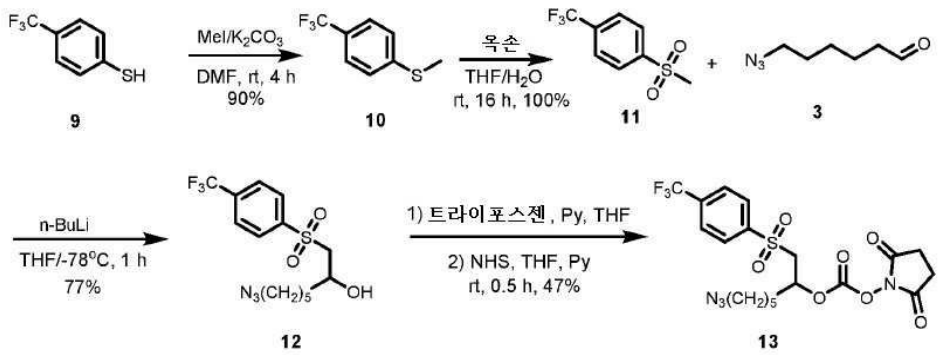
7(26g, 71%)을 제공하였다.

[0853] **7-아지도-1-((4-플루오로페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(8)의 제조**

[0854] 무수 THF(200㎖) 중의 화합물 **7**(15g, 47.62mmol, 1.0eq) 및 트라이포스젠(24g, 80.95mmol, 1.7eq)의 교반되는 용액에, 피리딘(7.5g, 95.24mmol, 2.0eq)을 실온에서 질소 분위기 하에서 적가하였다. 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 무수 THF(100㎖)에 용해시키고, NHS(16.4g, 0.143mol, 3.0eq) 및 피리딘(11.3g, 0.143mmol, 3.0eq)으로 연속적으로 처리하였다. 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트(100㎖)에 용해시키고, 0.1N HCl, 물, 포화 수성 $NaHCO_3$ 및 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **8**(12g, 55%)을 고체로서 제공하였다. ^{1}**H NMR** (400 MHz, d_6-DMSO) δ 7.95-7.92 (m, 2H), 7.46 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 5.10-5.09 (m, 1H), 4.04-3.97 (m, 1H), 3.84 (dd, J = 15.2, 2.0 Hz, 1H), 3.27-3.24 (m, 2H), 2.77 (s, 4H), 1.65-1.64 (m, 2H), 1.44-1.42 (m, 2H), 1.23-1.22 (m, 4H).

[0855] **실시예 2**

[0856] **7-아지도-1-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(13)**

[0857] 

[0858] **메틸(4-(트라이플루오로메틸)페닐)설판(10)의 제조:**

[0859] DMF(200㎖) 중의 화합물 **9**(24.5g, 0.138mol, 1.0eq)의 용액에, MeI(23.4g, 0.165mol, 1.2eq) 및 K_2CO_3(57g, 0.413mol, 3.0eq)를 실온에서 질소 분위기 하에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 물로 희석시키고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 5% LiCl(수성)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 **10**(24g, 90%)을 제공하였다.

[0860] **1-(메틸설폰일)-4-(트라이플루오로메틸)벤젠(11)의 제조:**

[0861] THF/H_2O(200㎖/200㎖) 중의 화합물 **10**(24g, 0.125mol, 1.0eq)의 용액에, 옥손(171g, 0.264mol, 2.1eq)을 실온에서 질소 분위기 하에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 LCMS 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 여과하고, 물로 희석시키고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 **11**(30.6g, 100%)을 제공하였다.

[0862] **7-아지도-1-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄-2-올(12)의 제조:**

[0863] 무수 THF(150㎖) 중의 화합물 **11**(15g, 66.96mmol, 1.0eq)의 용액에, n-BuLi(헥산 중의 2.5M, 35㎖, 87.05mmol, 1.3eq)을 -78℃에서 적가하였다. 냉각욕을 제거하고, 혼합물을 0℃까지 가온시켰다. 30분 동안 교반한 후, 화합물 **3**(12.5g, 87.05mmol, 1.3eq)을 -78℃에서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 혼합물을 가온시켰다. 그 다음 혼합물을 NH_4Cl의 포화 수용액에 첨가하고(혼합물이 투명해졌음), 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제시켜 순수하지 않은 화합물 **12**(19g, 77%)를 제공하였다.

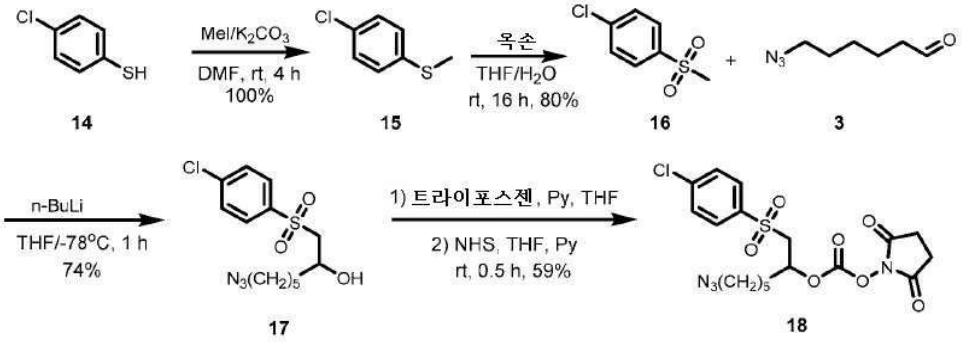
[0864] **7-아지도-1-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(13)의 제**

조

[0865] 무수 THF(200㎖) 중의 화합물 **12**(19g, 52.05mmol, 1.0eq) 및 트라이포스젠(26.3g, 88.49mmol, 1.7eq)의 교반되는 용액에, 피리딘(8㎖, 0.104㏖, 2.0eq)을 실온에서 질소 분위기 하에서 적가하였다. 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 무수 THF(100㎖)에 용해시키고, NHS(17.95g, 0.156㏖, 3.0eq) 및 피리딘(12.5㎖, 0.156mmol, 3.0eq)으로 연속적으로 처리하였다. 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트(100㎖)에 용해시키고, 0.1N HCl, 물, 포화 수성 $NaHCO_3$ 및 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **13**(12.5g, 47%)을 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 ㎒, d_6-DMSO) δ 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.16-5.15 (m, 1H), 4.16-4.09 (m, 1H), 3.95-3.92 (m, 1H), 3.26 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.77 (s, 4H), 1.66-1.65 (m, 2H), 1.44-1.42 (m, 2H), 1.24-1.23 (m, 4H).

[0866] **실시예 3**

[0867] **7-아지도-1-((4-클로로페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(18)**



[0868]

[0869] **(4-클로로페닐)(메틸)설판(15)의 제조:**

[0870] DMF(250㎖) 중의 화합물 **14**(30g, 0.207㏖, 1.0eq)의 용액에, MeI(35.3g, 0.249㏖, 1.2eq) 및 K_2CO_3(85.8g, 0.622㏖, 3.0eq)를 실온에서 질소 분위기 하에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 TLC 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 물로 희석시키고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 5% LiCl(수성)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 **15**(44g, 100%)를 주황색 오일로서 제공하였다. TLC: PE: EA=10:1, $R_{f\ (14)}$ =0.5, $R_{f\ (15)}$ =0.7.

[0871] **1-클로로-4-(메틸설폰일)벤젠(16)의 제조:**

[0872] THF/H_2O(400㎖/400㎖) 중의 화합물 **15**(60g, 0.380㏖, 1.0eq)의 용액에, 옥손(583g, 0.948㏖, 2.5eq)을 실온에서 질소 분위기 하에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 LCMS 분석은 목적하는 생성물로의 완전한 전환을 나타내었다. 그 다음 혼합물을 여과하고, 물로 희석시키고, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켜 조 화합물 **16**(57.8g, 80%)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0873] **7-아지도-1-((4-클로로페닐)설폰일)헵탄-2-올(17)의 제조:**

[0874] 무수 THF(300㎖) 중의 화합물 **16**(20g, 0.105㏖, 1.0eq)의 용액에, n-BuLi(헥산 중의 2.5M, 55㎖, 0.137㏖, 1.3eq)을 -78℃에서 적가하였다. 냉각욕을 제거하고, 혼합물을 0℃까지 가온시켰다. 30분 동안 교반한 후, 화합물 **3**(19g, 0.137㏖, 1.3eq)을 -78℃에서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 혼합물을 가온시켰다. 그 다음 혼합물을 NH_4Cl의 포화 수용액에 첨가하고(혼합물이 투명해졌음), 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **17**(26g, 74%)을 황색 고체로서 제공하였다.

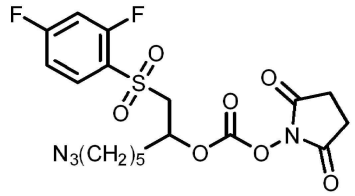
[0875] **7-아지도-1-((4-클로로페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(18)의 제조:**

[0876] 무수 THF(500㎖) 중의 화합물 **17**(31g, 93.42mmol, 1.0eq) 및 트라이포스젠(47g, 0.159㏖, 1.7eq)의 교반되는 용

액에, 피리딘(15㎖, 0.187㏖, 2.0eq)을 실온에서 질소 분위기 하에서 적가하였다. 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 무수 THF(500㎖)에 용해시키고, NHS(32g, 0.280㏖, 3.0eq) 및 피리딘(22㎖, 0.280㎜㏖, 3.0eq)으로 연속적으로 처리하였다. 10분 동안 교반한 후, 혼합물을 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트(300㎖)에 용해시키고, 0.1N HCl, 물, 포화 수성 $NaHCO_3$ 및 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **18**(26g, 59%)을 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 ㎒, d_6-DMSO) δ 7.87 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.69 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 5.11-5.10 (m, 1H), 4.06-4.00 (m, 1H), 3.86 (dd, J = 15.6, 2.4 Hz, 1H), 3.26 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.77 (s, 4H), 1.66-1.62 (m, 2H), 1.45-1.42 (m, 2H), 1.23-1.22 (m, 4H).

[0877] **실시예 4**

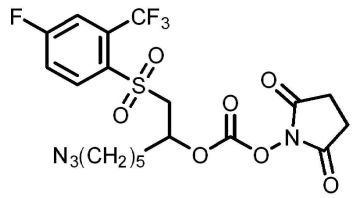
[0878] **7-아지도-1-((2,4-다이플루오로페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(19)**

[0879] 

[0880] 실시예 1과 유사한 제조 절차 하에서, 2,4-다이플루오로벤젠티올을 사용하여 실시예 4를 제조하였다. ^{1}H NMR (400 ㎒, $CDCl_3$) δ 8.01 - 7.94 (m, 1H), 7.12 - 7.05 (m, 1H), 7.05 - 6.97 (m, 1H), 5.24 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 15.2, 8.4 Hz, 1H), 3.46 (dd, *J* = 15.2, 3.4 Hz, 1H), 3.26 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.80 (s, 4H), 1.79 (s, 2H), 1.63 - 1.56 (m, 2H), 1.43 - 1.33 (m, 4H).

[0881] **실시예 5**

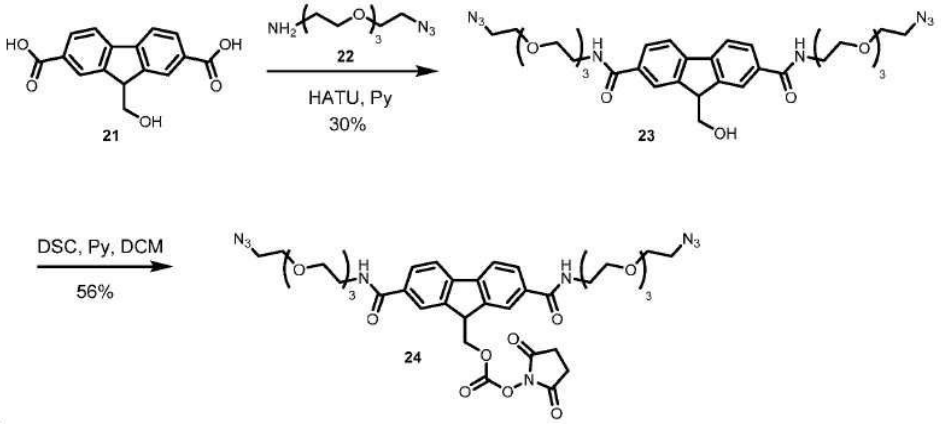
[0882] **7-아지도-1-((4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(20)**

[0883] 

[0884] 실시예 1과 유사한 제조 절차 하에서, 4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)벤젠티올을 사용하여 실시예 5를 제조하였다. ^{1}H NMR (400 ㎒, $CDCl_3$) δ 8.31 (dd, *J* = 8.8, 5.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.54 - 7.46 (m, 1H), 5.36 - 5.26 (m, 1H), 3.79 (dd, *J* = 15.2, 8.8 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 15.2, 3.2 Hz, 1H), 3.25 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.81 (s, 4H), 1.83 - 1.70 (m, 2H), 1.61 - 1.52 (m, 2H), 1.45 - 1.34 (m, 4H).

[0885] **실시예 6**

[0886] **(2,7-비스((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메틸 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(24)**



[0887]

[0888] **N2,N7-비스(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-9-(하이드록시메틸)-9H-플루오렌-2,7-다이카복스아마이드(23)의 제조:**

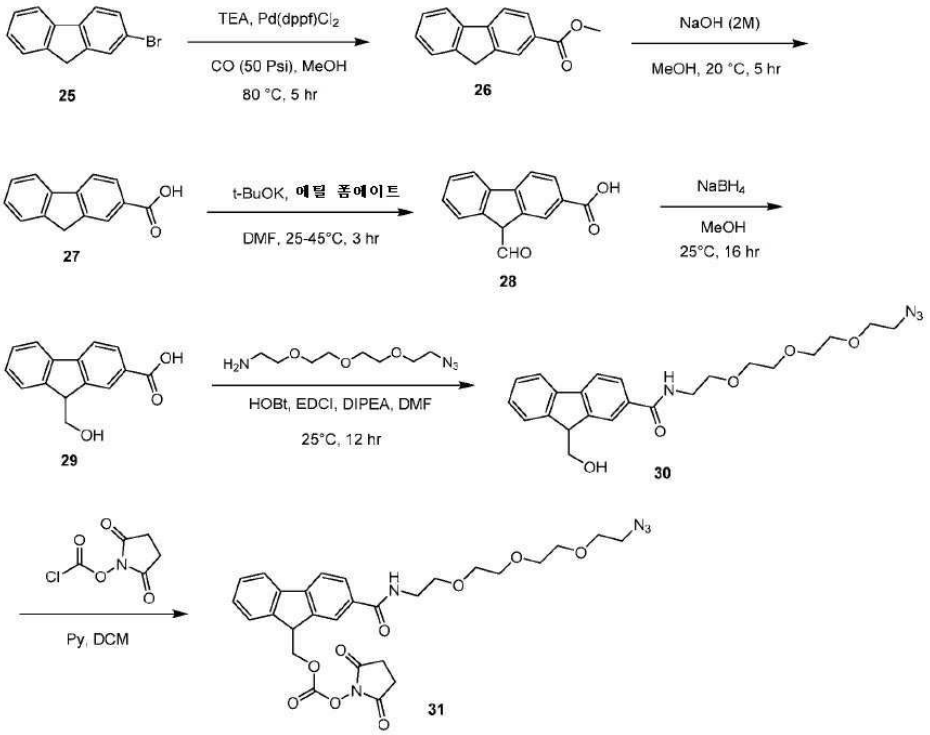
[0889] 9-(하이드록시메틸)-9H-플루오렌-2,7-다이카복실산(82.5mg, 0.24mmol)을 무수 피리딘(1.0㎖)에 용해시키고, 실온에서 이 용액에 HATU(273.8mg, 0.72mmol) 및 2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에탄-1-아민(117.1mg, 0.54mmol)을 첨가하였다. 그 다음 반응물을 2시간 동안 교반하였다. 생성물을 0에서 70% MeCN/H_2O(0.1% 폼산 함유)로 HPLC로 정제시켜 화합물 **23**(47.4mg, 30%)을 제공하였다. LCMS: m/z685(M+1)$^+$.

[0890] **(2,7-비스((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메틸 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(24)의 제조:**

[0891] 화합물 **23**(47.4mg, 0.069mmol)을 DCM(0.2㎖)에 용해시키고, 실온에서 N_2 하에서 DSC(35.47mg, 0.14mmol) 및 피리딘(16.7㎕, 0.21mmol)으로 처리하였다. 반응물을 1.5시간 동안 교반하고, 그 다음 DCM으로 희석시키고, 1N HCl 및 염수로 로 세척하였다. 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 잔류물을 MeCN/H_2O(0.1% TFA 함유) 중에서 HPLC로 정제시켜 목적하는 생성물 **24**(31.7mg, 56%, 밝은 황색 오일)를 제공하였다. LCMS: m/z826(M+1)$^+$.

[0892] **실시예 7**

[0893] **(2-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메틸 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(31)**



[0894]

[0895] **메틸 9H-플루오렌-2-카복실레이트(26)의 제조:**

[0896] MeOH(890㎖) 중의 화합물 **25**, 2-브로모-9H-플루오렌(128g, 522mmol), 트라이에틸아민, TEA(106g, 1.04mol, 145㎖) 및 Pd(dppf)Cl_2(38.2g, 52.2mmol)의 혼합물을 탈기시키고, CO(50 Psi)로 3회 퍼징하고, 그 다음 혼합물을 80℃에서 5시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=10/1)가 새로운 스팟(R_f=0.42)이 형성되었음을 나타내었다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(SiO_2, 석유 에터/에틸 아세테이트=100/1에서 10/1)로 정제시켜 화합물 **26**(120g, 조물질)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0897] **9H-플루오렌-2-카복실산(27)의 제조:**

[0898] MeOH(840㎖) 중의 화합물 **26**(120g, 535mmol)의 혼합물에, NaOH(2M)을 첨가하고, 그 다음 혼합물을 20℃에서 5시간 동안 N_2 분위기 교반하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=10/1)가 출발 물질이 완전히 소모되었고, 새로운 스팟(R_f=0.01)이 형성되었음을 나타내었다. 용액에 물(50㎖)을 첨가하고, 그 다음 그것을 EtOAc(100㎖)로 추출하였다. 수성상을 3M HCl을 사용하여 pH 3으로 조정하고, 그 다음 그것을 EtOAc(100㎖)로 추출하였다. 유기상을 감압 하에서 농축시켜 화합물 **27**(40.0g, 190mmol, 35.6% 수율)을 황색 고체로서 제공하였다.

[0899] **9-폼일-9H-플루오렌-2-카복실산(28)의 제조:**

[0900] DMF(196㎖) 중의 화합물 **27**(6.00g, 28.5mmol)의 혼합물에, 에틸 폼에이트(276g, 3.73mol) 및 t-BuOK(25.6g, 228mmol)를 서서히 첨가하였다. 혼합물을 45℃에서 0.5시간 동안 교반하고, 그 다음 2.5시간 동안 25℃까지 냉각시켰다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=0/1)가 출발 물질이 완전히 소모되었고, 새로운 스팟(R_f=0.48)이 형성되었음을 나타내었다. 용액을 1M HCl을 사용하여 pH 3으로 조정하였다. 그 다음 혼합물을 EtOAc(50.0㎖)로 추출하였다. 유기상을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **28**(7.00g, 조물질)을 갈색 고체로서 제공하였다.

[0901] **9-(하이드록시메틸)-9H-플루오렌-2-카복실산(29)의 제조:**

[0902] MeOH(42.0㎖) 중의 화합물 **28**(7.00g, 29.4mmol)의 혼합물에, $NaBH_4$(2.78g, 73.5mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 탈기시키고, N_2로 3회 퍼징하고, 그 다음 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. LCMS(생성물: RT=0.863분)가 목적하는 화합물 MS를 나타내었다. 용액에 물(120㎖)을 첨가하고, 그 다음 그것을 EtOAc(100㎖)로 추출하였다. 수성상을 1M HCl을 사용하여 pH 3으로 조정하고, 그 다음 그것을 EtOAc(100㎖)로 추출하였다. 유기상을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **29**(4.00g, 16.7mmol, 56.7% 수율)를 황색 고체로서 제공하였다.

[0903] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-9-(하이드록시메틸)-9H-플루오렌-2-카복스아마이드(30)의 제조:**

[0904] DMF(7.00㎖) 중의 화합물 **29**(1.00g, 4.16mmol) 및 2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에탄-1-아민(908mg, 4.16mmol)의 용액에 HOBt(619mg, 4.58mmol), EDCl(878mg, 4.58mmol) 및 DIPEA(1.24g, 9.57mmol)를 25℃에서 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS(생성물 RT=1.002분)가 출발 물질이 완전히 소모되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 물(10.0㎖)로 희석시키고, EtOAc(10.0㎖×2)로 추출하였다. 합한 유기상을 물(10.0㎖×2) 및 염수(10.0㎖)로 세척하였다. 유기상을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 분취용-HPLC(칼럼: Welch Xtimate C18 250*50mm*10 um; 이동상: [물(10mM NH_4HCO_3)-ACN]; B%: 18%에서 48%, 26분)로 정제시켜 화합물 **30**(1.40g, 3.17mmol, 76.2% 수율, 99.8% 순도)을 황색 오일로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.10 (s, 1H), 7.88 - 7.76 (m, 3H), 7.63 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.46 - 7.34 (m, 2H), 6.98 (s, 1H), 4.18 - 4.08 (m, 2H), 4.02 - 3.92 (m, 1H), 3.76 - 3.56 (m, 14H), 3.32 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.37 (s, 1H); LC-MS: m/z 441.1 $(M+1)^+$.

[0905] **(2-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메틸 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(31)의 제조:**

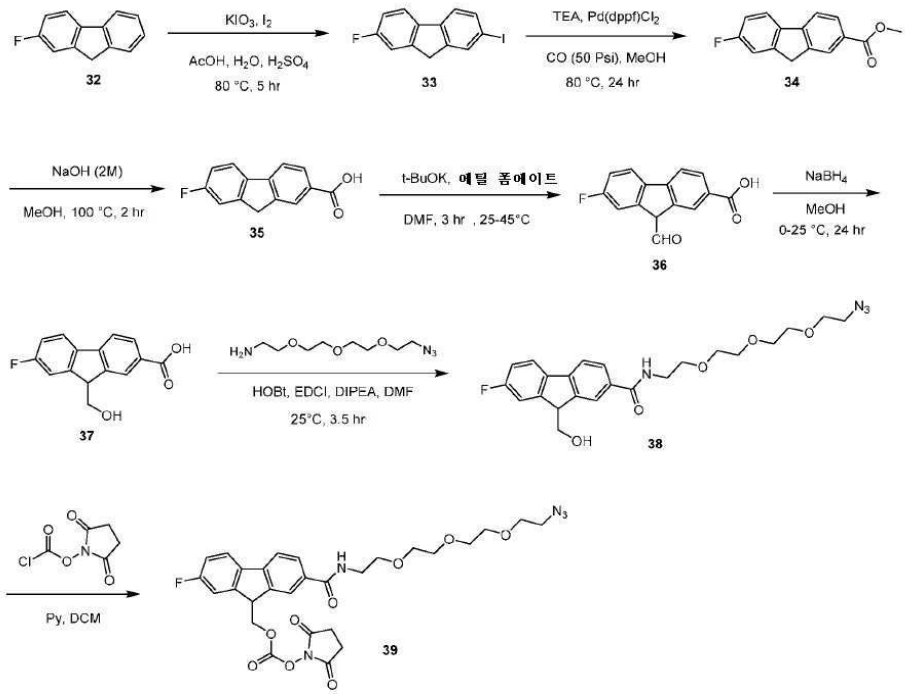
[0906] DCM(5㎖) 중의 1-하이드록시피롤리딘-2,5-다이온(0.5g, 1eq)의 용액을 -30℃까지 냉각시켰다. 이 용액에, -30℃에서 트라이클로로메틸 카보노클로리데이트(860mg, 1eq)를 적가하고, 그 다음 DIPEA(561mg, 1eq)를 적가하였다.

혼합물을 0℃까지 가온시키고, 3시간 동안 교반하였다. 그것을 25℃까지 가온시키고, 6시간 동안 교반을 계속하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=0/1, R_f=0.3)가 출발 물질이 완전히 소모되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 여과하여 여과액(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일 카보노클로리데이트의 DCM 용액)을 제공하였고, 이것을 추가로 정제시키지 않고 직접 사용하였다.

[0907] 0℃에서 DCM(1mℓ) 중의 화합물 **30**(0.1g, 1eq) 및 Py(17.96mg, 1eq)의 용액에 2,5-다이옥소피롤리딘-1-일 카보노클로리데이트(10eq, 이전 단계로부터의 DCM 용액)를 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS(출발 물질: RT=0.992분, 생성물: RT=1.059분)가 3.71%의 출발 물질이 남아있고, 40.2%의 목적하는 화합물이 검출되었음을 나타내었다. 반응물을 물(2.0mℓ)로 반응정지시키고, 그 다음 포화 시트르산 수용액을 사용하여 6으로 pH를 조정하였다. 혼합물을 DCM(2mℓ×2)으로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(5.0mℓ)로 세척하고, 그 다음 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 분취용-HPLC(칼럼: Welch Ultimate AQ-C18 150*30mm*5um; 이동상: [물(0.1%TFA)-ACN]; B%: 30%에서 60%,12분)로 정제시켰다. 분취용-HPLC 정제 후, 분획을 동결건조시켜 화합물 **31**을 무색 오일로서 제공하였다. LC-MS: m/z 582.2 $(M+1)^+$.

[0908] **실시예 8**

[0909] **(2-((2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-7-플루오로-9H-플루오렌-9-일)메틸 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(39)**



[0910]

[0911] **2-플루오로-7-아이오도-9H-플루오렌 (33)의 제조:**

[0912] CH_3COOH(408mℓ), H_2SO_4(9.60mℓ) 및 H_2O(19.2mℓ) 중의 2-플루오로-9H-플루오렌 **32**(24.4g, 132mmol), I_2(14.1g, 55.6mmol) 및 KIO_3(7.08g, 33.1mmol)의 혼합물을 탈기시키고, N_2로 3회 퍼징하였다. 혼합물을 80℃에서 5시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. HPLC(생성물 RT=3.515분)가 목적하는 화합물이 검출되었음을 나타내었다. 수용액을 EtOAc(50.0mℓ)로 추출하였다. 유기층을 H_2O(20.0mℓ), 염수(10.0mℓ)로 세척하고, 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **33**(38.0g, 123mmol, 92.6% 수율)을 갈색 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD): 7.87 (s, 1H), 7.70-7.67 (m, 2H), 7.48-7.46 (m, 1H), 7.27-7.22 (m, 1H), 7.17-7.09 (m, 1H), 3.86 (s, 2H).

[0913] **메틸 7-플루오로-9H-플루오렌-2-카복실레이트(34)의 제조:**

[0914] MeOH(200mℓ) 중의 화합물 **33**(38.0g, 123mmol), TEA(31.0g, 306mmol), $Pd(dppf)Cl_2$(8.97g, 12.3mmol)의 혼합물을

탈기시키고, CO(50Psi)로 3회 퍼징하였다. 혼합물을 80℃에서 24시간 동안 CO 분위기 하에서 교반하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=100/1)가 출발 물질이 완전히 소모되었고, 새로운 스팟(R_f = 0.40)이 형성되었음을 나타내었다. 용액을 감압 하에서 농축시켜 화합물 **34**(40.0g, 조물질)를 갈색 고체로서 제공하였다.

[0915] **7-플루오로-9H-플루오렌-2-카복실산(35)의 제조:**

[0916] MeOH(280㎖) 중의 화합물 **34**(40.0g, 165mmol)의 혼합물에, NaOH(2M, 206㎖, 2.5eq) 수용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 100℃에서 2시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=0/1)가 출발 물질이 완전히 소모되었고, 새로운 스팟(R_f = 0.03)이 형성되었음을 나타내었다. 반응 용액에 H_2O(150㎖)를 첨가하였다. 그 다음 그것을 EtOAc(250㎖)로 추출하였다. 수성층을 분리시키고, 1M HCl을 사용하여 pH 3으로 조정하였다. 그것을 EtOAc(200㎖)로 추출하였다. 유기층을 염수(20.0㎖)로 세척하고, 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **35**(33.0g, 145mmol, 87.6% 수율)를 갈색 고체로서 제공하였다.

[0917] **7-플루오로-9-폼일-9H-플루오렌-2-카복실산(36)의 제조:**

[0918] DMF(210㎖) 중의 화합물 **35**(33.0g, 145mmol)의 혼합물에, 에틸 폼에이트(507g, 6.84mol)를 첨가하였다. 그 다음 t-BuOK(130g, 1.16mol)를 서서히 첨가하였다. 혼합물을 45℃에서 0.5시간 동안 교반하고, 그 다음 혼합물을 2.5시간 동안 25℃까지 냉각시켰다. LCMS(생성물 RT=0.889)가 목적하는 화합물이 검출되었음을 나타내었다. 반응 용액에 물(150㎖)을 첨가하고, EtOAc(500㎖)로 추출하였다. 수성상을 1M HCl을 사용하여 pH 3으로 조정하고, 그 다음 그것을 EtOAc(500㎖)로 추출하였다. 유기층을 염수(120㎖)로 세척하고, 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **36**(30.0g, 조물질)을 황색 고체로서 제공하였다.

[0919] **7-플루오로-9-(하이드록시메틸)-9H-플루오렌-2-카복실산(37)의 제조:**

[0920] MeOH(210㎖) 중의 화합물 **36**(30.0g, 117mmol)의 혼합물에, $NaBH_4$(31.0g, 820mmol)를 첨가하고, 그 다음 혼합물을 25℃에서 24시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. LCMS(생성물 RT=0.906분)가 목적하는 화합물이 검출되었음을 나타내었다. 반응 용액에 물(150㎖)을 첨가하고, EtOAc(450㎖)로 추출하였다. 수성상을 1M HCl을 사용하여 pH 3으로 조정하였다. 그 다음 그것을 EtOAc(300㎖)로 추출하였다. 유기층을 염수(120㎖)로 세척하고, 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **37**(35.0g, 조물질)을 황색 고체로서 제공하였다.

[0921] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-7-플루오로-9-(하이드록시메틸)-9H-플루오렌-2-카복스아마이드(38)의 제조:**

[0922] DMF(14.0㎖) 중의 화합물 **37**(2.00g, 7.74mmol), HOBt(1.15g, 8.52mmol), EDCI(1.63g, 8.52mmol) 및 DIPEA(2.50g, 19.4mmol)의 혼합물을 25℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 그 다음 혼합물에 2-[2-[2-(2-아지도에톡시)에톡시]에톡시]에탄아민(1.86g, 8.52mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. LCMS(생성물 RT=1.171분)가 목적하는 화합물이 검출되었음을 나타내었다. 반응 용액을 물(20㎖)로 희석시키고, EtOAc(20㎖)로 추출하였다. 유기층을 염수(20.0㎖)로 세척하고, 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 조 생성물을 분취용-HPLC(칼럼: Phenomenex luna c18 250mm*100mm *10um; 이동상: [물(0.1%TFA)-ACN]; B%: 15%에서 53%, 25분)으로 정제시켜 화합물 **38**(1.00g, 2.12mmol, 48.7% 수율, 97.4% 순도)을 황색 오일로서 제공하였다. ^{1}H NMR: (400 MHz $CDCl_3$): δ 8.07 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.76 - 7.70 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.39 - 7.31 (m, 1H), 7.18 - 7.08 (m, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.16 - 3.96 (m, 3H), 3.76 - 3.56 (m, 14H), 3.33 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H); LC-MS: m/z 459.1 $(M+1)^+$.

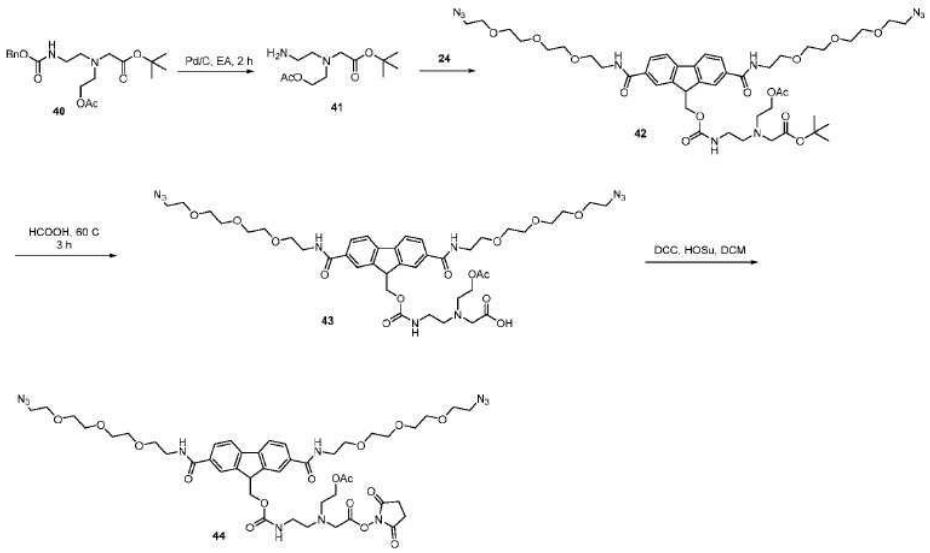
[0923] **(2-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메틸 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(39)의 제조:**

[0924] DCM(1㎖) 중의 화합물 **38**(0.1g, 1eq)의 용액에, 화합물 2,5-다이옥소피롤리딘-1-일 카보노클로리데이트(10*eq*, DCM 용액)를 0℃에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. LCMS(출발 물질: RT=1.026분, 생성물: RT=1.084분)가 6.33%의 출발 물질이 남아있고, 28.3%의 목적하는 화합물이 검출되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 포화 시트르산 수용액을 사용하여 pH 6으로 조정하였다. 혼합물을 DCM(2㎖×2)으로 추출하였

다. 합한 유기층을 염수(5.0㎖)로 세척하고, 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 분취용-HPLC(칼럼: Phenomenex Luna C18 200*40㎜*10um; 이동상: [물(0.1%TFA)-ACN]; B%: 25%에서 55%,10분)로 정제시켰다. 분취용-HPLC 정제 후, 용액을 동결건조시켜 화합물 **39**를 무색 오일로서 제공하였다. LC-MS: m/z 600.2 $(M+1)^+$.

[0925] **실시예 9**

[0926] **2,5-다이옥소피롤리딘-1-일 N-(2-아세톡시에틸)-N-(2-((((2,7-비스((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)아미노)에틸)글리신에이트(44)**



[0927]

[0928] **tert-부틸 N-(2-아세톡시에틸)-N-(2-아미노에틸)글리신에이트(41)의 제조:**

[0929] 에틸 아세테이트(0.6㎖) 중의 tert-부틸 N-(2-아세톡시에틸)-N-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)에틸)글리신에이트 **40**(75.0㎎, 0.19㎜ol, 1.0eq)의 용액에, Pd/C(40㎎, 10%, 무수)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 H_2로의 3회 대체 하에 두었다. 그 다음 혼합물을 2시간 동안 H_2 하에서 실온에서 교반하였다. 반응물을 ^{1}H NMR 및 TLC로 모니터링하였다. (PE:EA= 1:1) 화합물 **40**: R_f=0.3; 화합물 **41**: R_f =0.05. 반응 용액을 셀라이트 패드로 여과하였다. 유기층을 농축시켜 생성물 **41**(48.4㎎, 98%)을 밝은 황색 오일로서 제공하였다.

[0930] **N-(2-아세톡시에틸)-N-(2-((((2,7-비스((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)-에톡시)에톡시)-에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)아미노)에틸)글리신(43)의 제조:**

[0931] 상기에서 제조된 화합물 **41**을 EtOAc(0.6㎖)에 용해시켰다. 이것에 DCM(1㎖) 중의 화합물 **24**(161.0㎎, 0.19㎜ol)를 첨가하고, 그 다음 피리딘(20㎕)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하고, LCMS로 모니터링하였다. 반응물을 EtOAc(5㎖)에 취하고, 1N HCl(2㎖)로 세척하고, 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하였다. 그 다음 용매를 진공 하에서 제거하였다.

[0932] 조 생성물 **42**에 HCO_2H(4㎖)를 첨가하고, 3시간 동안 60℃까지 가열시켰다. 생성물을 10에서 100% MeCN/H_2O(0.1% TFA)에서 HPLC로 정제시켜 목적하는 화합물 **43**(31.4㎎, 3단계에 대해서 18%)을 얻었다.

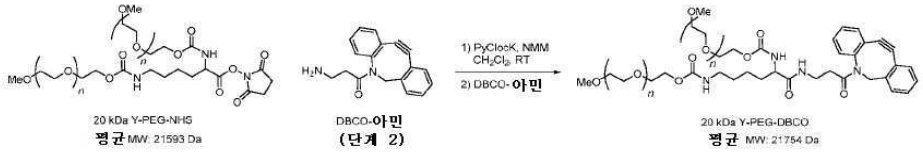
[0933] **2,5-다이옥소피롤리딘-1-일 N-(2-아세톡시에틸)-N-(2-((((2,7-비스((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-플루오렌-9-일)메톡시)카보닐)-아미노)에틸)글리신에이트(44)의 제조:**

[0934] 화합물 **43**(9.7㎎, 0.011㎜ol)을 DCM(0.037㎖)에 용해시키고, 0℃에서 DCM(0.04㎖) 중의 HOSu(2.56㎎, 0.022㎜ol) 및 DCC(4.54㎎, 0.022㎜ol)로 처리하였다. 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응물을 여과시키고, 농축시켰다. 3 내지 5배 부피의 Et_2O를 첨가하였고, 용액이 탁해졌고, 탁해진 용액을 원심분리시켰다. 상부 층의 맑은 용액을 경사분리시키고, 하부의 오일같은 고체를 Et_2O(2X)로 세척하고, 고진공 하에서 건조시켜 화합물 **44**(7.2㎎, 65%)를 얻었다. LCMS: 1012 $(M+1)^+$; HPLC 96% (UV254); ^{1}H NMR (300 ㎒, 클로로폼-d) δ 8.09 (p, J = 0.7

Hz, 2H), 7.84 (td, J = 8.3, 1.1 Hz, 4H), 6.92 (s, 3H), 4.43 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.16 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.79 - 3.55 (m, 47H), 3.38 - 3.24 (m, 8H), 3.00 - 2.78 (m, 11H), 2.01 (s, 3H).

[0935] **실시예 10**

[0936] 20kDa Y-PEG-DBCO

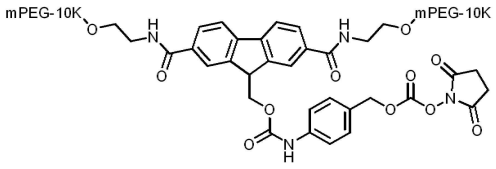


[0937]

[0938] 건조된 둥근 바닥 플라스크에, 테플론 코팅된 자석 교반 막대를 장치하고 20kDa Y-PEG-NHS(1.08g, 50.0μmol, 1.0당량) 및 PyClocK(0.033g, 60.0μmol, 1.2당량)를 첨가하였다. 플라스크를 고무 셉텀으로 밀봉하고, 불활성 아르곤 분위기 하에 두었다. 무수 CH_2Cl_2(5.0mℓ), 그 다음 N-메틸몰폴린(6.10㎕, 55.0μmol, 1.1당량)을 첨가하고, 반응 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. DBCO-아민(0.028mg, 100μmol, 2.0당량)을 한 번에 고체로서 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 3시간 더 교반하였다. 조 반응 혼합물을 유리 피펫으로 취하고, 격렬하게 교반하면서 2-프로판올(100mℓ)에 적가하였다. 백색 침전물이 생성되었고(PEG 물질), 생성된 현탁액을 4℃까지 냉각시키고, 여과하고(진공 여과), 얼음 냉각된 2-프로판올(3×50mℓ)로 세척하였다. 단리된 침전물을 미리 칭량된 팔콘 튜브(×2)로 옮기고, 따뜻한(40℃) 아세톤(90mℓ)에 용해시켰다. 용액을 빙욕에서 15분 동안 냉각시켜 PEG 물질의 침전을 유도하였다. 현탁액을 원심분리(10500rpm, 20분, 4℃)로 펠릿화시키고, 상청액을 조심스럽게 폐기하였다. 펠릿을 새로운 따듯한 아세톤(40℃)에 재용해시키고, 빙욕에서 냉각시켜 침전을 유도하고, 또 다른 라운드의 원심분리/경사분리에 적용하였다. 이 과정을 총 4회 반복하였다. 펠릿을 진공 하에서 건조시켰다. 단리된 백색 고체, 질량=1.08 g(99%). RP-HPLC 체류 시간=6.9분.

[0939] **실시예 11**

[0940] mPEG2-Fmoc-Bn-20K-NHS



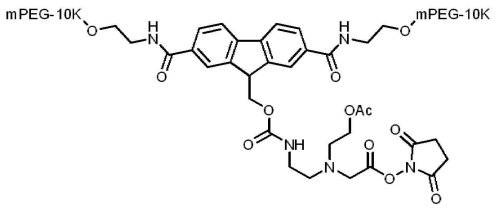
[0941]

[0942] **실시예 11** mPEG2-Fmoc-Bn-20K-NHS를 US20060293499A1 및 문헌[Bioconjugate Chemistry 2003, 14, 395-403]로부터의 변형된 문헌 절차에 따라서 생성시켰다. ^{1}H NMR (300 ㎒, d_6-DMSO) δ 9.14 (br, 1H), 8.56 (m, 2H), 8.25-8.17 (m, 2H), 8.04-7.97 (m, 4H), 7.44 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 5.77 (s, 2H), 4.69 (m, 2H), 4.46 (m, 1H), 3.51 (br, 1800H), 2.81 (s, 4H).

[0943] HPLC: 순도 94.7%; GPC: 순도 91.2%; MALDI/GPC: 21048Da.

[0944] **실시예 12**

[0945] mPEG2-Fmoc-Bi-20K-NHS



[0946]

[0947] **실시예 12** mPEG2-Fmoc-Bi-20K-NHS를 US20060293499A1 및 문헌[Bioconjugate Chemistry 2006, 17, 341-351]로부터의 변형된 문헌 절차에 따라서 생성시켰다.

[0948] **실시예 13**

[0949] **rIL-2 제조**

[0950] 도 1에 도시된 바와 같이 폴리펩타이드를 암호화하는 IL-2 유전자를 합성하고, NdeI/ XhoI 단편으로서 pET21a (+) 발현 벡터에 클로닝시켰다. 클로닝에 사용된 합성 프라이머의 서열은 다음과 같다: 정방향 프라이머: 5'-aatcatatggcacctacttcaagttctacaaa-3'(서열번호 4), 및 역방향 프라이머: 5'-aatttatcaagttagtgttgagatgat-3'(서열번호 5). 양성 클론을 제한 효소 소화(NdeI 및 XhoI)로 식별하고, 표준 서열결정 프로토콜을 사용하여 서열결정하였다.

[0951] 양성 클론을 선택하고, 이. 콜라이(*E. Coli*) 세포(BL21 DE3)에서 형질전환시켰다. IL-2 단백질의 유도를 위한 표준 절차를 따랐다. 간략하면, 단일 콜로니를 100㎍/㎖ 암피실린을 함유하는 5ml 루리아 브로쓰(LB) 배지에 접종하고, 37℃ 200rpm에서 밤새 성장시켰다. 밤새 성장된 배양물을 100㎍/㎖ 암피실린을 함유하는 LB 배지에서 100배 희석시키고, 37℃, 200rpm에서 성장시켰다. 600㎚에서의 흡광도가 대략 0.8에 도달했을 때, 1mM IPTG로 배양을 유도하였다. 유도 기간 동안 배양 온도를 42℃로 올렸다. 발효를 유도 4시간 후에 종료하였다.

[0952] 발효 후, 세포를 원심분리에 의해 수거하였다. 세포 덩어리 펠릿을 향후 균질화를 위해 -80℃에서 저장하였다. 동결된 세포 덩어리 펠릿을 세포 세척 완충액(20mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)에 10%(W/V) 농도로 재현탁시키고, 15600xg, 4℃에서 30분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 폐기하였다. 세척된 펠릿을 균질화 완충액(20mM Tris, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0.5%Trition-X100, pH 8.0)에 재현탁시키고, Sonicator(SCIENTZ(중국 저장성 닝보 소재)로부터의 SCIENTZ-IID)로 4 내지 15℃에서 3회 통과 동안 균질화시켰다. 균질물을 15600xg, 4℃에서 30분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 폐기하였다. 봉입체 펠릿을 완충액(20mM Tris, 0.1M NaCl, 2M 우레아, 1mM EDTA, pH 8.0)으로 세척하고, 15600xg, 4℃에서 30분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 폐기하였다. 원심분리 후, 조 IL-2 봉입체를 얻었다.

[0953] 조 IL-2 봉입체를 완충액, 6M 구아니딘, 100mM Tris, 2mM EDTA, 5mM 다이티오트레이톨(DTT), pH 8.0에 용해시켰다. 혼합물을 50℃에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 환원 후, 혼합물에 물을 첨가하여 구아니딘 농도를 4.8M로 감소시켰다. 15600xg에서 1시간 원심분리시킨 후, 생성된 겔-유사 펠릿을 폐기하였다. 물을 첨가하여 상청액 중의 구아니딘 농도를 3.5M로 더 감소시켰다. 100% 아세트산을 적정하여 pH를 5로 조정하였다. 혼합물을 실온에서 60분 동안 인큐베이션시키고, 1시간 동안 15600xg에서 원심분리시켰다. 생성된 펠릿을 3.5M 구아니딘, 20mM 아세테이트, 5mM DTT, pH 5 완충액에 현탁시키고, 1시간 동안 15600xg에서 원심분리시켰다. 이 세척 단계를 한 번 더 반복하였다.

[0954] 깨끗하고 환원된 IL-2 봉입체를 6M 구아니딘, 100mM Tris pH 8 완충액에 용해시켰다. 100mM $CuCl_2$ 스톡을 첨가하여 0.1mM의 최종 Cu^{2+} 농도에 도달시켰다. 혼합물을 4℃에서 밤새 인큐베이션시켰다.

[0955] 발현된 IL-2 용액을 투석 백(3킬로달톤의 분자량 기공 크기를 가짐)에 넣었다. 투석 백을 4.8M 구아니딘, 0.1M Tris, pH 8 완충액을 함유하는 저장소에 넣었다. 3시간의 평형 후, 먼저 15시간에 걸쳐 저장소로 물을 펌핑하여 저장소의 구아니딘 농도를 2M로 서서히 감소시킨 다음, 8시간에 걸쳐 저장소로 20mM PB pH 6.0 완충액을 펌핑하여 10mM 미만으로 감소시켰다. 전체 재접힘 과정을 4℃에서 완결하였다. 재접힌 IL-2를 SEC-HPLC로 확인하였다.

[0956] 재접힌 IL-2를 60분 동안 15600xg에서 원심분리시켜 침전물을 제거하였다. 상청액을 Mini Pellicon TFF 막 시스템(밀리포어사(Millipore Corporation), 미국 소재)으로 농축시켰다.

[0957] 재접히고, 농축된 IL-2를 SP Sepharose FF 수지로 패킹된 XK 칼럼(지이 헬쓰케어 바이오 사이언시스 에이비사(GE Healthcare Bio-Sciences AB), 스웨덴 업살사 소재)에 로딩하였다. 전개 완충액은 20mM PB pH 6.0이었고, 유량은 10㎖/분이었다. IL-2 단량체 피크 하의 분획을 풀링시켰다.

[0958] 풀링된 SP Sepharsoe FF 용리액을 Sephadex G25 수지로 패킹된 XK 칼럼(지이 헬쓰케어 바이오 사이언시스 에이비사, 스웨덴 업살사 소재)에 로딩하여 탈염시켰다. 전개 완충액은 20mM PB pH 6.0이었고, 유량은 25㎖/분이었다. IL-2 단량체 피크 하의 분획을 풀링시켰다.

[0959] 탈염된 IL-2 단량체 풀을 Q Sepharose FF 수지로 패킹된 XK 칼럼(지이 헬쓰케어 바이오 사이언시스 에이비사, 스웨덴 업살사 소재)에 로딩하였다. 전개 완충액은 20mM PB pH 6.0이었고, 유량은 25㎖/분이었다. 통과액 피크를 풀링시켰다. 크기 배제 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC 크로마토그래피)와 같은 다른 적합한 정제 방법이 또한 사용될 수 있다는 점에 유의해야 한다.

[0960] IL-2 단량체 분획 풀을 4℃ 및 10 내지 22psi 작동 압력에서 Mini Pellicon TFF 막 시스템(밀리포어사, 미국 소재)을 사용하여 약 1 내지 2mg/mℓ로 농축시켰다. 농축된 IL-2 단량체 용액을 4℃에서 최종 제형 완충액(10mM 아세테이트-Na, 5% 트레할로스, pH 4.5)에 투석시켰다. 제형화된 IL-2 용액을 0.22㎛ 필터를 통과시켜 멸균 상태로 만들고, 추가 사용을 위해 -80℃에 저장하였다.

[0961] **접합을 위한 동결건조된 rIL-2의 제조:**

[0962] rIL-2의 16개 바이알(16×5 mg)을 -80℃에서 실온까지 가온시켰다. 동결된 물질의 각각의 바이알에, 0.1% 수성 SDS(21mℓ)를 첨가하고, 바이알의 내용물을 완전한 용해가 달성될 때까지 혼합하였다. rIL-2 용액을 100mM 붕산나트륨, pH 8로 완충액 교환시키고, UF/DF(Vivaspin20, 5kDa MWCO PES)를 통해 농축시켰다. 완충액 교환된 단백질 용액을 멸균 여과하고(0.22㎛ PVDF), Nanodrop 2000 분광광도계(3.19mg/mℓ)를 사용하여 UV-A280으로 정량하였다.

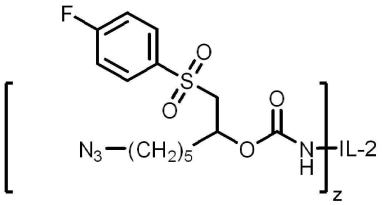
[0963] **pH 8.0 완충액에서의 접합을 위한 용액계 IL-2의 제조**

[0964] IL-2(15mg, 10mℓ)을 제조사의 지침에 따라서 P100 칼럼을 사용하여 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS로 완충액 교환시켰다. IL-2 용액을 UF/DF(Vivaspin20, 5kDa MWCO PES)를 통해 농축시켰다. 완충액 교환된 단백질 용액을 멸균 여과하고(0.22㎛ PVDF), Nanodrop 2000 분광광도계(각각 2.67 또는 2.5 또는 3.0mg/mℓ)를 사용하여 UV-A280으로 정량하였다.

[0965] **pH 9.0 완충액에서의 접합을 위한 용액계 IL-2의 제조**

[0966] IL-2(15mg, 10mℓ)을 제조사의 지침에 따라서 P100 칼럼을 사용하여 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS로 완충액 교환시켰다. IL-2 용액을 UF/DF(Vivaspin20, 5kDa MWCO PES)를 통해 농축시켰다. 완충액 교환된 단백질 용액을 멸균 여과하고(0.22㎛ PVDF), Nanodrop 2000 분광광도계(2.9mg/mℓ)를 사용하여 UV-A280으로 정량하였다.

[0967] **실시예 14**

[0968] 

[0969] <u>rIL-2과 실시예 1의 NHS 접합</u>

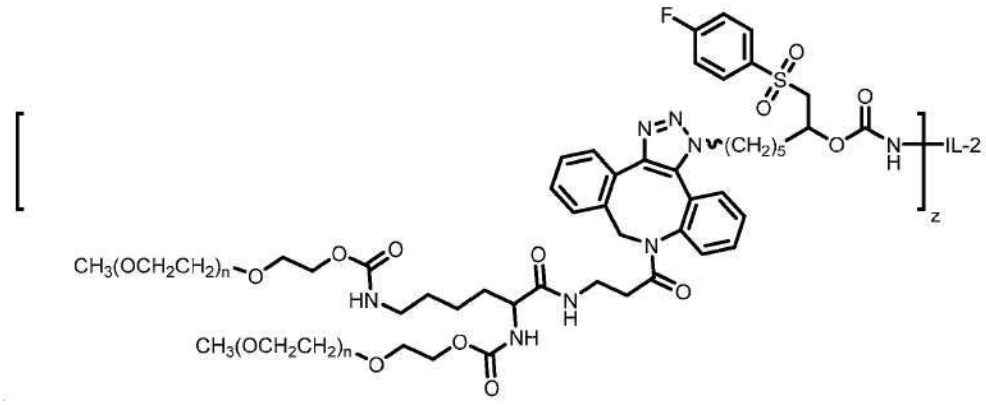
[0970] **[rIL-2]-[F-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 제조**

[0971] 접합 전에, IL-2를 100mM 붕산나트륨, pH 8을 함유하는 3.09mg/mℓ에 용해시켰다.

[0972] 화합물 **8**(4.4 mg)을 DMF(0.885mℓ)에 용해시켜 4.97mg/mℓ의 시약 용액을 제공하였다. rIL-2(10mg, 3.24mℓ)의 바이알에, 화합물 **8**(1.79mg, 360㎕, 6eq.)을 첨가하고, 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간째에, 반응물을 LC-MS로 분석하여 [rIL-2]-[F-Ph-SO_2-N_3]$_z$로서 작용화된 IL-2 종의 분포를 결정하였다.

[0973] 도 2는 [rIL-2]-[F-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 분포가 LC-MS에 의해서 결정하는 경우 대략 6에 집중되었다는 것을 나타내었다.

[0974] **실시예 15**



[0975]

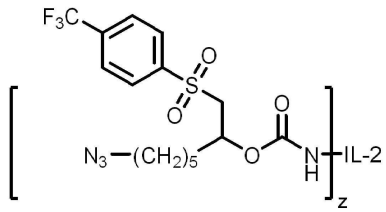
[0976] **20kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 [rIL-2]-[F-Ph-SO_2-N_3]$_z$의 클릭 페길화**

[0977] 20kDa Y-PEG-DBCO(143.7mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(1.419mℓ)에 용해시켰다. [rIL-2]-[F-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 실시예 14(9.5mg, 3.42mℓ)의 용액에, 20kDa Y-PEG-DBCO(134mg, 1.33mℓ, 10eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하였다. 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3mℓ/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[0978] 샘플을 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(8.8mg, 92% 수율). PEG:IL-2 비율을 SDS-PAGE로 결정하였다.

[0979] 도 3은 PEG:IL-2 비율이 4.9인 [20K mPEG-(F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] 접합체의 SDS-분석을 도시한다.

[0980] **실시예 16**



[0981]

[0982] **rIL-2과 실시예 2의 NHS 접합**

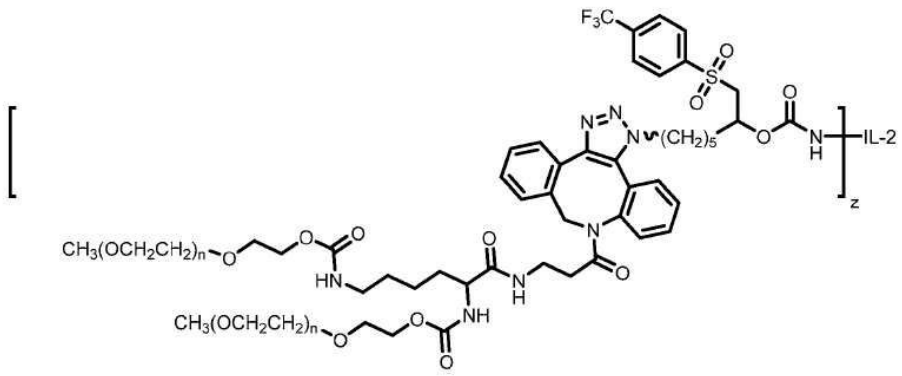
[0983] **[rIL-2]-[CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 제조**

[0984] 접합 전에, IL-2를 100mM 붕산나트륨, pH 8을 함유하는 3.09mg/mℓ에 용해시켰다.

[0985] 화합물 **13**(7.5mg)을 DMF(0.816mℓ)에 용해시켜 9.19mg/mℓ의 시약 용액을 제공하였다. rIL-2(10mg, 3.24mℓ)의 바이알에, 화합물 **13**(3.31mg, 360㎕, 10eq.)을 첨가하고, 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간째에, 반응물을 LC-MS로 분석하여 [rIL-2]-[CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$로서 작용화된 IL-2 종의 분포를 결정하였다.

[0986] 도 1은 [rIL-2]-[CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 분포의 형성이 LC-MS에 의해서 결정하는 경우 대략 6에 집중되었다는 것을 나타내었다.

[0987] **실시예 17**



[0988]

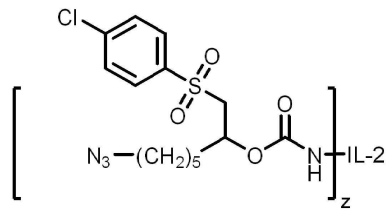
[0989] **20kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 [rIL-2]-[CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$의 클릭 페길화**

[0990] 20kDa Y-PEG-DBCO(210.9mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(1.388mℓ)에 용해시켰다. [rIL-2]-[CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 실시예 16(9.7mg, 3.49mℓ)의 용액에, 20kDa Y-PEG-DBCO(207mg, 1.36mℓ, 15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하였다. 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3mℓ/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[0991] 샘플을 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(7.9mg, 81% 수율). PEG:IL-2 비율을 SDS-PAGE로 결정하였다.

[0992] 도 3은 PEG:IL-2 비율이 5.4인 [20K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] 접합체의 SDS-분석을 도시한다.

[0993] **실시예 18**



[0994]

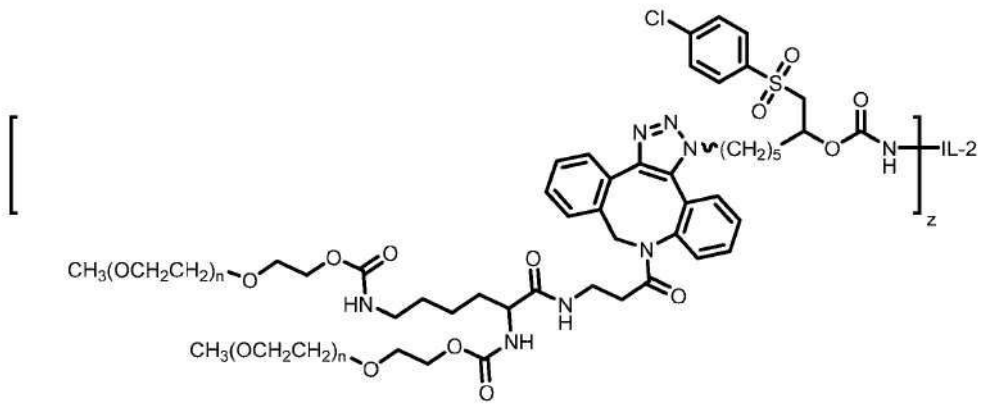
[0995] **rIL-2과 실시예 3의 NHS 접합**

[0996] **[rIL-2]-[Cl-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 제조:**

[0997] 접합 전에, IL-2를 100mM 붕산나트륨, pH 8을 함유하는 3.09mg/mℓ에 용해시켰다. 화합물 **18**(5.0mg)을 DMF(0.971mℓ)에 용해시켜 5.15mg/mℓ의 시약 용액을 제공하였다. rIL-2(10mg, 3.24mℓ)의 바이알에, 화합물 **18**(1.85mg, 360㎕, 6eq.)을 첨가하고, 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간째에, 반응물을 LC-MS로 분석하여 [rIL-2]-[Cl-Ph-SO_2-N_3]$_z$로서 작용화된 IL-2 종의 분포를 결정하였다.

[0998] 도 1은 [rIL-2]-[Cl-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 분포의 형성이 LC-MS에 의해서 결정하는 경우 대략 5에 집중되었다는 것을 나타내었다.

[0999] 실시예 19



[1000]

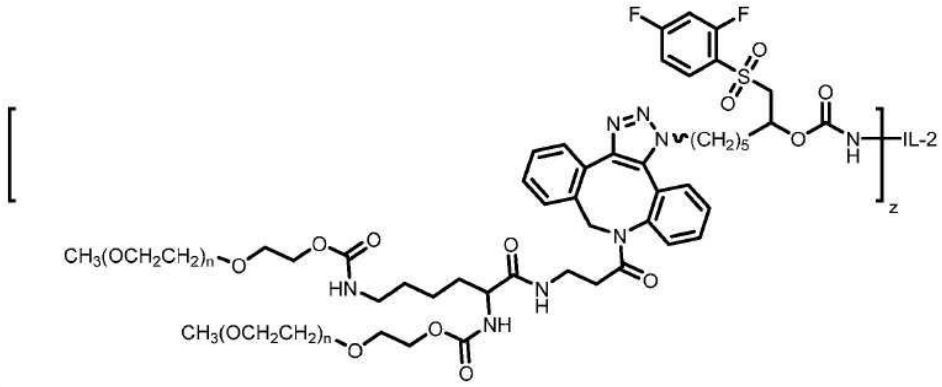
[1001] 20kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 [rIL-2]-[Cl-Ph-SO_2-N_3]$_z$의 클릭 페길화

[1002] 20kDa Y-PEG-DBCO(213.2mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(1.403㎖)에 용해시켰다. [rIL-2]-[Cl-Ph-SO_2-N_3]$_z$ 실시예 18(9.7mg, 3.49㎖)의 용액에, 20kDa Y-PEG-DBCO(207mg, 1.36㎖, 15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하였다. 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1003] 샘플을 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(8.2mg, 84%). PEG:IL-2 비율을 SDS-PAGE로 결정하였다.

[1004] 도 3은 PEG:IL-2 비율이 4.9인 [20K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] 접합체의 SDS-분석을 도시한다.

[1005] 실시예 20



[1006]

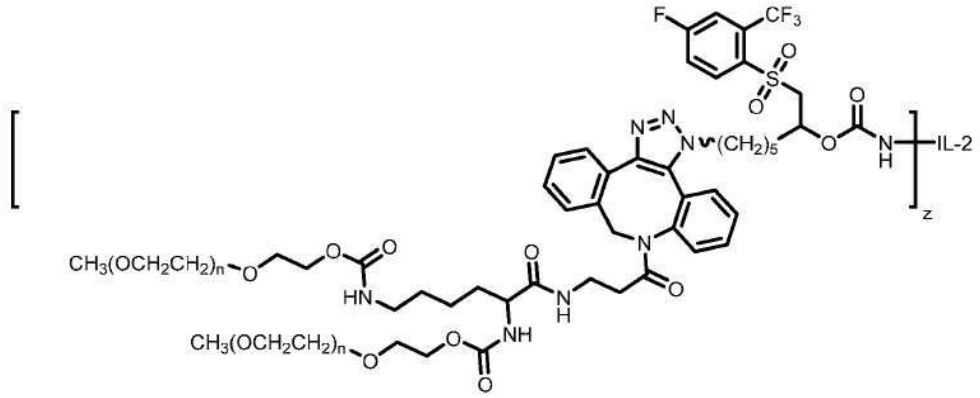
[1007] rIL-2와 실시예 4의 NHS 접합 및 20kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화

[1008] 실시예 4(5.8mg)를 DMF(0.677㎖)에 용해시켜 8.57mg/㎖ 시약 용액을 제공하였다. IL-2(7mg, 0.458㎛ol, 2.265㎖)의 바이알에, 실시예 4(2.16mg, 4.55㎛ol, 252㎕, 10eq.)를 첨가하고, 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1009] 20kDa Y-PEG-DBCO(406.4mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(2.00㎖)에 용해시켜 203mg/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[F,F-Ph-SO_2-N_3]$_z$(7.0mg, 0.458㎛ol, 2.52㎖)에, 20kDa Y-PEG-DBCO(199mg, 9.15㎛ol, 0.98㎖, 20eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨,

pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF). 실시예 20를 [20K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(5.2mg, 74% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 4.8이었다는 것을 나타내었다.

[1010] **실시예 21**



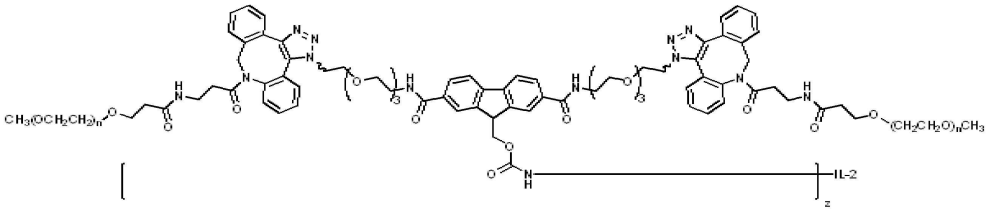
[1011]

[1012] **rIL-2와 실시예 5의 NHS 접합 및 20kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화**

[1013] 실시예 5(4.5mg)를 DMF(0.528mℓ)에 용해시켜 8.52mg/mℓ 시약 용액을 제공하였다. IL-2(7mg, 0.458μmol, 2.265mℓ)의 바이알에, 실시예 5(2.15mg, 4.10μmol, 252㎕, 9eq.)를 첨가하고, 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1014] 20kDa Y-PEG-DBCO(406.4mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(2.00mℓ)에 용해시켜 203mg/mℓ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[F,CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$(7.0mg, 0.458μmol, 2.52mℓ)에, 20kDa Y-PEG-DBCO(199mg, 9.15μmol, 0.98mℓ, 20eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3mℓ/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF). 실시예 21을 [20K mPEG-(F,CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(2.9mg, 41% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 4.5였다는 것을 나타내었다.

[1015] **실시예 22**



[1016]

[1017] **rIL-2와 실시예 6의 NHS 접합 및 10kDa PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화**

[1018] 접합 전에, IL-2를 100mM 붕산나트륨, pH 8을 함유하는 3.09mg/mℓ에 용해시켰다. 화합물 **24**(16.5mg)을 DMF(1.107mℓ)에 용해시켜 14.9mg/mℓ의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(10mg, 3.24mℓ)의 바이알에, 화합물 **24**(5.96mg, 400㎕, 11eq.)를 첨가하고, 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간째에, 반응물을 LC-MS로 분석하여 [rIL-2]-[Fmoc-(N_3)$_2$]$_z$로서 작용화된 IL-2 종의 분포를 결정하였다.

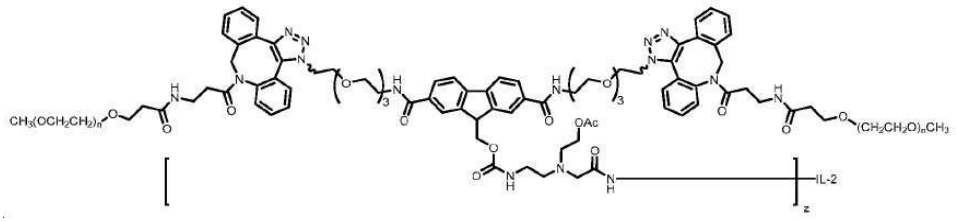
[1019] 10kDa PEG-DBCO(아이리스 바이오테크사(Iris Biotech), 276.3mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(1.439mℓ)에 용해시켰다. [rIL-2]-[Fmoc-(N_3)$_2$]$_z$(10mg, 3.64mℓ)의 용액에, 10kDa PEG-DBCO(262mg, 1.36mℓ, 40eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하였다. 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3mℓ/분 유량의 50mM 아세트산나트

륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1020] 샘플을 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다. PEG:IL-2 비율을 SDS-PAGE로 결정하였다.

[1021] 도 3은 PEG:IL-2 비율이 4.9인 접합체 $[mPEG_2\text{-}T_2\text{-}Fmoc\text{-}20K]_z\text{-}[rIL\text{-}2]$의 SDS-분석을 도시한다.

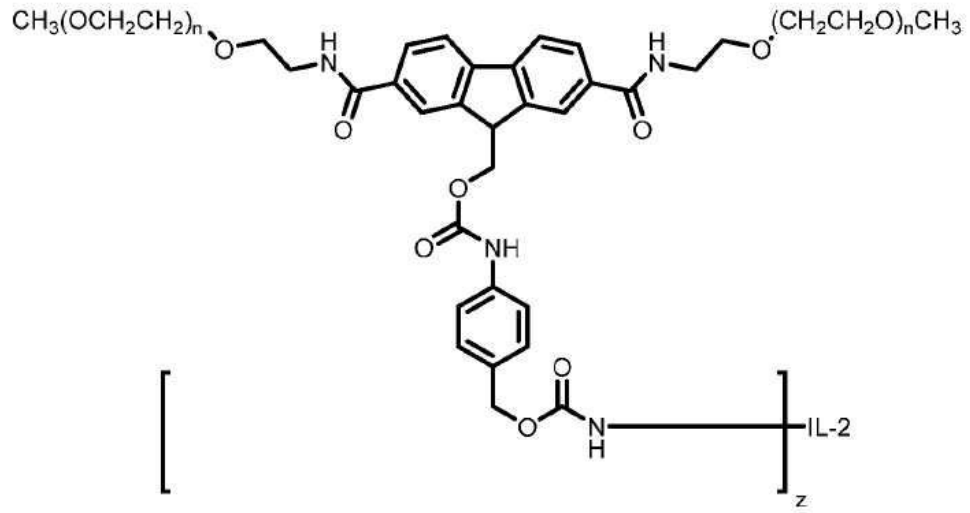
[1022] **실시예 23**

[1023] 

[1024] **rIL-2와 실시예 9의 NHS 접합 및 10kDa PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화**

[1025] 실시예 14 및 실시예 15와 유사한 제조 절차 하에서, 실시예 9를 사용하여 실시예 23을 $[mPEG_2\text{-}T_2\text{-}Fmoc\text{-}Bi\text{-}20K]_z\text{-}[rIL\text{-}2]$로서 제조하였다.

[1026] **실시예 24**

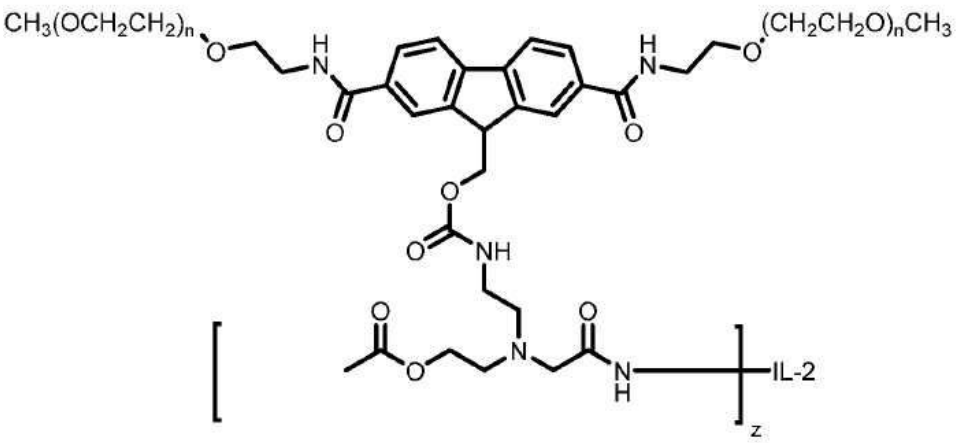
[1027] 

[1028] **실시예 11을 사용한 rIL-2의 페길화**

[1029] 접합 전에, IL-2를 100mM 붕산나트륨, pH 8을 함유한 1.5mg/mℓ에 용해시킨다. mPEG2-Fmoc-Bn-20K-NHS 실시예 11을 100mM 붕산나트륨, pH 8에 용해시킨다. 그리고 그것을 mPEG2-Fmoc-Bn-20K-NHS 대 rIL-2의 몰비가 100:1에 도달하기에 충분한 양으로 rIL-2(10mg)에 첨가한다. 접합 반응을 22℃에서 1시간 동안 진행시켜 $[mPEG2\text{-}Fmoc\text{-}Bn\text{-}20K]_z\text{-}[rIL\text{-}2]$ 접합체를 제공한다. 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시킨다. 샘플을 3mℓ/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시킨다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시킨다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시킨다(0.22㎛ PVDF).

[1030] $[mPEG2\text{-}Fmoc\text{-}Bn\text{-}20K]_z\text{-}[rIL\text{-}2]$를 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다. PEG:IL-2 비율을 SDS-PAGE로 결정한다.

[1031] 실시예 25

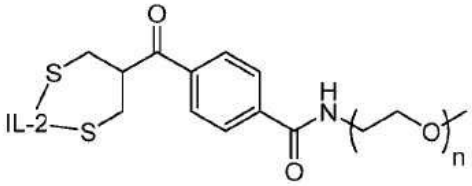


[1032]

[1033] 실시예 12를 사용한 rIL-2의 페길화

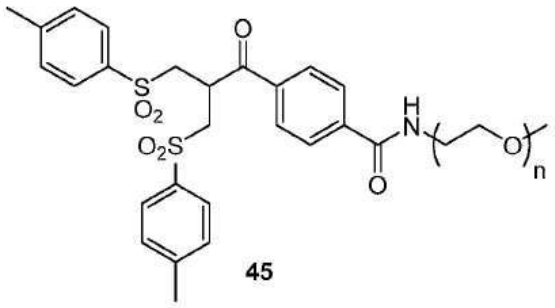
[1034] 실시예 24의 유사한 페길화 및 정제 조건을 사용하여, 실시예 12 mPEG2-Fmoc-Bi-20K-NHS를 사용한 rIL-2의 페길화는 $[mPEG2\text{-}Fmoc\text{-}Bi\text{-}20K]_z$-[rIL-2] 접합체를 생성시킨다.

[1035] 실시예 26



[1036]

[1037] 10kDa PEG 비스(설폰) 45을 사용한 rIL-2 이황화 결합의 페길화

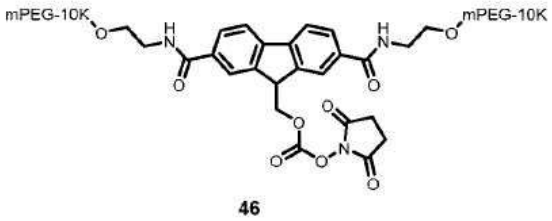


[1038]

[1039] 100mM 붕산나트륨 완충액, pH 8 중의 r-IL-2(4.2mg, 0.25mg/mℓ)의 용액에, 10mM DTT를 첨가하였다. 용액을 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 20mM EDTA를 함유하는 100mM 붕산나트륨 완충액, pH 8을 사용한 겔 여과에 의해서 과량의 DTT를 제거하였다. 환원된 단백질 용액에 1.3당량의 10kDa PEG 비스(설폰) **45**, 0.05% w/v SDS를 첨가하고, 용액을 16시간 동안 22℃에서 반응시켰다. 반응 용액을 Vivapure Q Mani H 필터로 여과하여 SDS를 제거하였다. 그 다음 그것을 50mM 아세트산나트륨, pH 4.0에서 5kDa MWCO 스핀 필터를 사용한 한외여과에 의해서 완충제 교환시켰다. 그 다음 용액을 5mℓ MacroCapSP 수지 칼럼 상에 로딩하였다. 50mM 아세트산나트륨 완충액, pH 4 중의 0 내지 1M 염화나트륨의 선형 구배를 사용하여 칼럼을 세척하여 접합체를 용리시켰다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 접합체를 추가로 단리시켜 1.4mg의 생성물을 생성시켰다. SDS-PAGE에 의한 순도: 97%. 분석용 SEC에 의한 순도: 87.3%

[1040] 실시예 27

[1041] PEG 시약 46을 사용한 rIL-2의 페길화



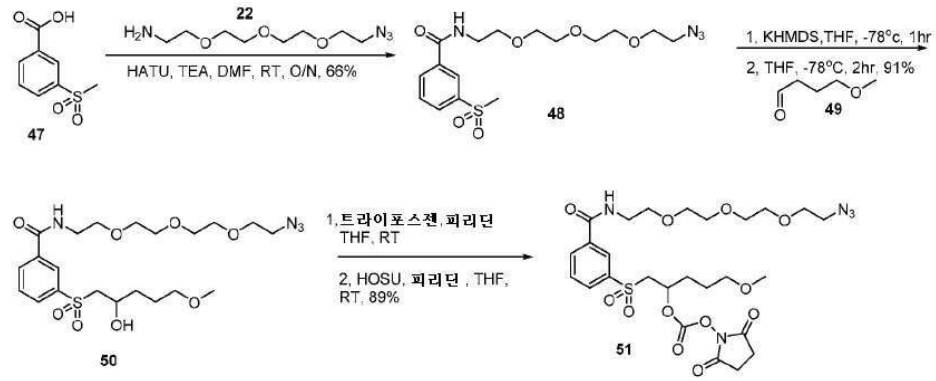
46

[1042]

[1043] PEG 시약 **46**(1.50 g)의 405mg/mℓ 용액을 2mM HCl(3.702mℓ)에서 제조하였다. rIL-2(10mg, 3.135mℓ)에, 405mg/mℓ의 PEG 시약 **46**(1.43g, 3.535mℓ, 100eq.)을 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 조 반응물을 SDS-PAGE로 분석하고, SEC로 정제시켰다. 조 IL-2-$(PEG)_z$ 생성물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg 칼럼을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3mℓ/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF). DirectDetect 장비(6.6mg, 66%)를 사용하여 IR로 단백질 농도를 정량하고, SDS-PAGE로 PEG:IL-2 비율을 결정하였다. 접합체 [$mPEG_2$-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2]의 SDS-분석은 PEG:IL-2 비율이 5.1이었다는 것을 나타내었다.

[1044] **실시예 28**

[1045] 1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)페닐)설폰일)-5-메톡시펜탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(52)



47 48 49 50 51

[1046]

[1047] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-3-(메틸설폰일)벤즈아마이드(48)의 제조:**

[1048] DMF(15mℓ) 중의 화합물 **47**(1.0g, 5.0mmol)의 용액에 화합물 **22**(1.3g, 6.0mmol), HATU(2.47g, 6.5mmol) 및 TEA(1.01g, 10.0mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 에틸 아세테이트 및 물로 용해시켰다. 혼합물을 에틸 아세테이트(3×20mℓ)로 추출하였다. 합한 유기물을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 회전식 증발로 농축시켰다. 생성된 잔류물을 칼럼 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **48**(900mg)을 황색 오일로서 제공하였다.

[1049] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-3-((2-하이드록시-5-메톡시펜틸)설폰일)벤즈아마이드(50)의 제조:**

[1050] -78℃에서 N_2 하에서 무수 THF(30mℓ) 중의 화합물 **48**(400mg, 1mmol) 및 화합물 **49**(560mg, 5.5mmol)의 용액에 KHMDS(5.5mℓ, 5.5mmol)를 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 수성 NH_4Cl 용액으로 반응정지시켰다. 혼합물을 에틸 아세테이트(3×20mℓ)로 추출하였다. 합한 유기물을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 회전식 증발로 농축시켰다. 생성된 잔류물을 CH_2Cl_2 중의 2% CH_3OH로 용리시키는 칼럼 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **50**(168mg)을 황색 오일로서 제공하였다.

[1051] **1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-카바모일)페닐)설폰일)-5-메톡시펜탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(51)의 제조:**

[1052] 무수 THF(5㎖) 중의 화합물 **50**(100mg, 0.2mmol) 및 트라이포스젠(89mg, 0.3mmol)의 용액에 피리딘(64mg, 0.8mmol)을 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반하였다. 그 다음 그것을 여과하고, 회전식 증발로 농축시켰다. 생성된 잔류물을 다음 단계에서 사용하였다.

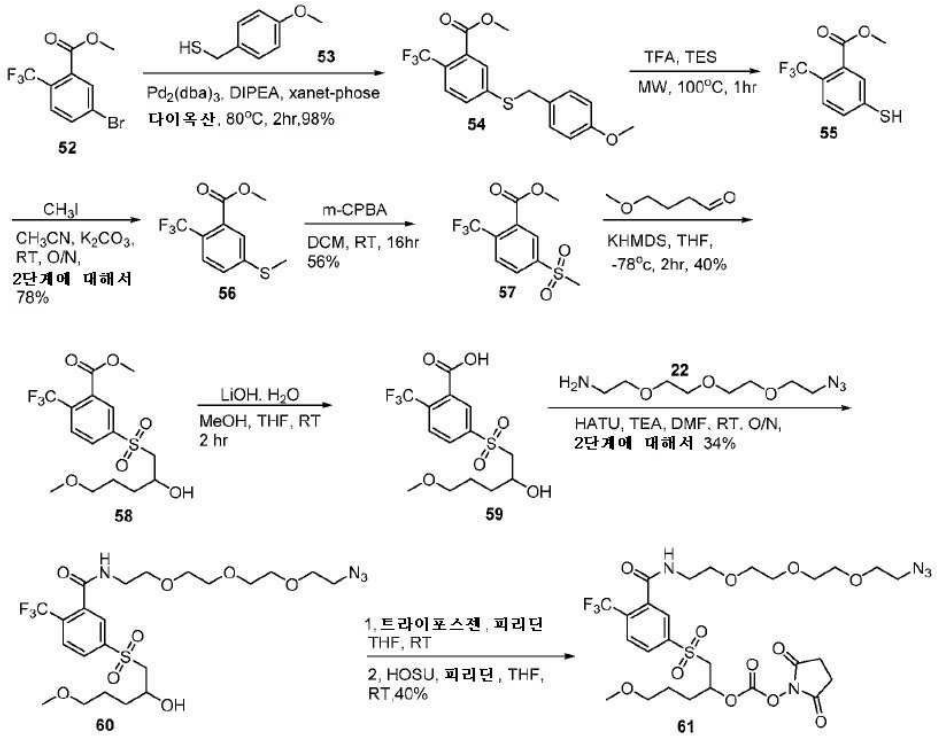
[1053] 무수 THF(5㎖) 중의 생성된 잔류물(117mg, 0.2mmol) 및 HOSu(69mg, 0.6mmol)의 용액에 피리딘(64mg, 0.8mmol)을 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(3×10㎖)로 추출하였다. 합한 유기물을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 회전식 증발로 농축시켰다. 생성된 잔류물을 분취용-TLC(CH_2Cl_2: CH_3OH = 30:1)로 정제시켜 화합물 **51**(55mg)을 무색 오일로서 제공하였다.

[1054] LCMS: m/z 644.25 [M+1].

[1055] ^{1}H NMR (400 ㎒, $CDCl_3$) δ 8.32 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.37 (br s, 1H), 5.30 - 5.24 (m, 1H), 3.77 - 3.55 (m, 15H), 3.45 - 3.31 (m, 5H), 3.27 (s, 3H), 2.81 (s, 4H), 1.94 - 1.78 (m, 2H), 1.66 - 1.58 (m, 2H).

[1056] **실시예 29**

[1057] **1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)-5-메톡시펜탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(61)**



[1058]

[1059] **메틸 5-((4-메톡시벤질)티오)-2-(트라이플루오로메틸)벤조에이트(54)의 제조:**

[1060] 다이옥산(50㎖) 중의 화합물 **52**(5.0g, 17.66mmol, 1.0eq), 화합물 **53**(4.09g, 26.5mmol, 1.5eq), $Pd_2(dba)_3$(1.62g, 1.76mmol, 0.1eq), Xant-phose(2.04g, 3.52mmol, 0.2eq) 및 DIEA(6.84g, 52.99mol, 3.0eq)의 용액을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 rt까지 냉각시키고, 셀라이트 패드로 여과하였다. 여과액을 농축시키고, 잔류물을 EtOAc(100ml)에 용해시켰다. 혼합물을 물(100㎖)로 세척하고, EtOAc(100㎖×3)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔(PE/EA=100/1에서 80/1에서 50/1) 상의 칼럼 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **54**(6.2g, 98%)를 밝은 황색 오일로서 제공하였다.

[1061] **TLC**: PE/EA=10/1, UV, R_f (화합물 **52**) = 0.80, R_f (화합물 **54**) = 0.60.

[1062] LC-MS: 379.10 $[M+23]^+$.

[1063] **메틸 5-머캅토-2-(트라이플루오로메틸)벤조에이트(55)의 제조:**

[1064] TFA(15㎖) 중의 화합물 **54**(1.0g, 2.80mmol, 1.0eq) 및 TES(0.98g, 8.42mmol, 3.0eq)의 용액을 마이크로파를 통해서, 120℃에서 1시간 동안 처리하였다. 생성된 혼합물을 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 빙수(20ml)에 붓고, 수성 중탄산나트륨 용액에 의해서 혼합물을 pH=7 내지 8로 조정하였다. 혼합물을 EtOAc(30mlx3)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **55**(800mg)를 회색오일로서 제공하였고, 이것을 추가로 정제시키지 않고 다음 단계에 직접 사용하였다.

[1065] **TLC**: PE/EA =5:1, UV, R_f (화합물 **54**) = 0.80, R_f (화합물 **55**) = 0.30.

[1066] **메틸 5-(메틸티오)-2-(트라이플루오로메틸)벤조에이트(56)의 제조:**

[1067] MeCN 50㎖) 중의 화합물 **55**(4.8g. 20.32mmol, 1.0eq)의 용액에 K_2CO_3(8.5g, 60.96mmol, 3.0eq) 및 CH_3I(14.4g. 101.6mmol, 5.0eq)를 0℃에서 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물에 물을 첨가하고, EtOAc(50㎖×3)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔(PE) 상의 칼럼 크로마토그래피로 정제시켜 화합물 **56**(4.0g, 78%)을 황색 고체로서 제공하였다.

[1068] **TLC**: PE/EA =5:1, UV, R_f (화합물 **55**) = 0.30, R_f (화합물 **56**) = 0.85.

[1069] LC-MS: 251.00 $[M+1]^+$.

[1070] **메틸 5-(메틸설폰일)-2-(트라이플루오로메틸)벤조에이트(57)의 제조:**

[1071] 0℃에서 DCM(50㎖) 중의 화합물 **56**(4.7g. 18.78mmol, 1.0eq)의 용액에 m-CPBA(19.5g, 112.68mmol, 6.0eq)를 한번에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 중탄산나트륨의 용액으로 반응 정지시켰다. 혼합물을 DCM(50㎖×3)으로 추출하고, NaCl 용액(100㎖×3)으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(PE/EA=100/1에서 50/1에서 20/1에서 10/1)로 정제시켜 화합물 **57**(2.97g, 56%)을 백색 고체로서 제공하였다.

[1072] **TLC**: PE/EA =5:1, UV, R_f (화합물 **56**) = 0.85, R_f (화합물 **57**) = 0.10.

[1073] **메틸 5-((2-하이드록시-5-메톡시펜틸)설폰일)-2-(트라이플루오로메틸)벤조에이트(58)의 제조:**

[1074] THF(10㎖) 중의 화합물 **57**(0.9g. 3.543mmol, 1.0eq) 및 4-메톡시부탄알(0.724mg. 7.086mmol, 2.0eq)의 용액에 KHMDS(5.4㎖, 5.315mmol, 1.5eq)를 -78℃에서 적가하고, 반응 혼합물을 -78℃에서 2시간 동안 교반하였다. 0℃에서 반응을 수성 NH_4Cl로 반응정지시키고, EtOAc(30㎖×3)로 추출하였다. 유기상을 포화 NaCl 용액(100㎖×3)으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(PE/EA=20/1 내지 5/1 내지 2/1)로 정제시켜 화합물 **58**(520mg, 40%)을 황색 오일로서 제공하였다.

[1075] **TLC**: PE/EA =2:1, UV, R_f (화합물 **57**) = 0.60, R_f (화합물 **58**) = 0.20.

[1076] LC-MS: 385.10$[M+1]^+$.

[1077] **5-((2-하이드록시-5-메톡시펜틸)설폰일)-2-(트라이플루오로메틸)벤조산(59)의 제조:**

[1078] MeOH/THF=1/1(6㎖) 중의 화합물 **58**(510mg, 1.327mmol, 1.0eq)의 용액에, 5% LiOH(63.6mg, 2.654mmol, 2.0eq)를 0℃에서 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 1N HCl을 사용하여 pH 2로 조정하였다. 혼합물을 EtOAc(20㎖×3)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **59**(505mg, 조물질, 100%)를 황색 오일로서 제공하였다.

[1079] LC-MS: 393.10$[M+23]^+$.

[1080] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-5-((2-하이드록시-5-메톡시펜틸)설폰일)-2-(트라이플루오로메틸)벤즈아마이드(60)의 제조**

[1081] DMF(12㎖) 중의 화합물 **59**(1.0g, 3.24mmol, 1.0eq), 화합물 **22**(0.849g, 3.89mmol, 1.2eq), HATU(1.6g, 4.21mmol, 1.3eq) 및 TEA(0.982g, 9.72mol, 3.0eq)의 용액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 물(50㎖)을 첨가하고, 에틸 아세테이트(30㎖×3)로 추출하였다. 유기상을 NaCl 수용액(50㎖×3)으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(PE/EA=20/1 내지 10/1 내지 5/1에서 2/1 내지 1/1) 및 분취용-TLC로 정제시켜 화합물 **60**(520mg, 34%)을 밝은 황색 오일로서 제공하였다.

[1082] LC-MS: 571.35$[M+1]^+$.

[1083] **1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)-5-메톡시펜탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(61)의 제조**

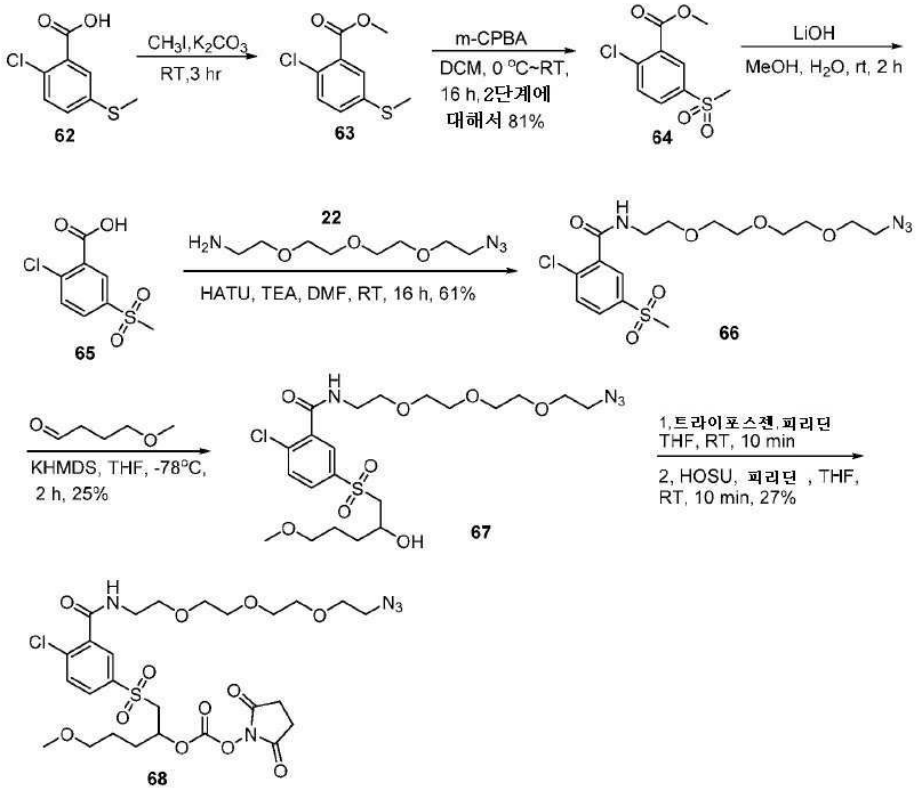
[1084] THF(3㎖) 중의 화합물 **60**(0.3g, 0.5258mmol, 1.0eq)의 용액에 피리딘(0.166g, 2.103mmol, 4.0eq) 및 트라이포스젠(0.39g, 1.3145mmol, 2.5eq)을 0℃에서 한번에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 THF(3ml)에 용해시켰다. 혼합물에 피리딘(0.166g, 2.103mmol, 4.0eq) 및 HOSU(0.182g, 1.5774mmol, 3.0eq)를 0℃에서 한번에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 물로 반응정지시키고, EtOAc(20㎖×3)로 추출하였다. 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 분취용-HPLC(0.1% HCOOH)로 정제시켰다. 용래 용액을 EtOAc로 추출하였다. 유기상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **61**(150mg, 40%)을 무색 오일로서 제공하였다.

[1085] LC-MS: 712.35$[M+1]^+$.

[1086] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.11 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.31 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 3.65 (d, J = 6.3 Hz, 8H), 3.59 (q, J = 5.0 Hz, 6H), 3.36 (dt, J = 18.4, 5.4 Hz, 4H), 3.29 (d, J = 1.0 Hz, 3H), 2.83 (s, 4H), 1.90 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.65 (d, J = 8.5 Hz, 2H).

[1087] **실시예 30**

[1088] **1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-4-클로로페닐)설폰일)-5-메톡시펜탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(68)**



[1089]

[1090] **메틸 2-클로로-5-(메틸티오)벤조에이트(63)의 제조**

[1091] 화합물 **62**(10.0g, 49.53mmol, 1.0eq), CH_3I(7.73g, 54.48mmol, 1.1eq)의 용액에, K_2CO_3(7.5g, 54.48mmol, 1.1eq)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물에 물(200ml) 및 EtOAc(200ml)를 첨가하였다. 유기층을 분리시키고, 5% LiCl 수용액으로 5회 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **63**(11.0g, 조물질)을 황색 오일로서 제공하였다.

[1092] **TLC**: PE/EA=3/1, UV, R_f (화합물 **62**) = 0.05, R_f (화합물 **63**) = 0.85.

[1093] ^{1}HNMR (400 ㎒, CD_3OD) δ 7.61 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.44 - 7.32 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.48 (s, 3H).

[1094] **메틸 2-클로로-5-(메틸설폰일)벤조에이트(64)의 제조**

[1095] DCM(60ml) 중의 화합물 **63**(6.0g. 27.78mmol, 1.0eq)의 용액에 m-CPBA(28.7g, 166.67mmol, 6.0eq)를 0℃에서 나누어 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 중탄산나트륨 수용액으로 반응 정지시키고, DCM(100㎖×3)으로 추출하고, NaCl 수용액(100㎖×3)으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(PE/EA=40/1 내지 20/1 내지 3/1)로 정제시켜 화합물 **64**(5.6g, 81%)를 백색 고체로서 제공하였다.

[1096] **TLC**: PE/EA=3/1, UV, R_f (화합물 **63**) = 0.85, R_f (화합물 **64**) = 0.45.

[1097] ^{1}HNMR (CD_3OD, 400 ㎒) δ 8.39 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.07 (s, 3H).

[1098] **2-클로로-5-(메틸설폰일)벤조산(65)의 제조**

[1099] MeOH/THF=1/1(6㎖) 중의 화합물 **64**(2.5g. 1.327mmol, 1.0eq)의 용액에, 5% LiOH 수용액(63.6㎎, 2.654mmol, 2.0eq)을 0℃에서 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 진한 1N HCl을 사용하여 pH = 3 내지 4로 조정하였다. 수상을 EtOAc(20㎖×3)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **65**(2.1g, 조물질)를 밝은 황색 고체로서 제공하였다.

[1100] **TLC**: PE/EA =3:1, UV, R_f (화합물 **64**) = 0.45, R_f (화합물 **65**) = 0.05.

[1101] ^{1}HNMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 8.36 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.15 (s, 3H).

[1102] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-2-클로로-5-(메틸설폰일)벤즈아마이드(66)의 제조**

[1103] DMF(8ml) 중의 화합물 **65**(879mg, 3.74mmol, 1.0eq), 화합물 **22**(900mg, 4.12mmol, 1.1eq), HATU(1.85g, 4.87mmol, 1.3eq) 및 TEA(1.14g, 11.24mol, 3.0eq)의 현탁액을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 물(20ml)을 첨가하고, 에틸 아세테이트(30mℓ×3)로 추출하고, NaCl 수용액(50mℓ×3)으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(PE/EA=100/1 내지 10/1 내지 5/1 내지 2/1 내지 1/1)로 정제시켜 화합물 **66**(995mg, 61%)을 무색 오일로서 제공하였다.

[1104] **TLC**: PE/EA =0:1, UV, R_f (화합물 **65**) = 0.25, R_f (화합물 **66**) = 0.55.

[1105] ^{1}HNMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 8.04-7.96 (m, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.70-3.53 (m, 14H), 3.33 (s, 2H), 3.15 (s, 3H).

[1106] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-2-클로로-5-((2-하이드록시-5-메톡시펜틸)설폰일)벤즈아마이드(67)의 제조**

[1107] THF(7mℓ) 중의 화합물 **66**(700mg, 1.609mmol, 1.0eq) 및 4-메톡시부탄알(657mg, 6.44mmol, 4.0eq)의 용액에 KHMDS(5.4mℓ, 5.315mmol, 1.5eq)를 -78℃에서 적가하였다. 반응 혼합물을 -78℃에서 2시간 동안 교반하였다. 0℃에서 반응물을 NH_4Cl 수용액으로 반응정지시키고, 에틸 아세테이트(30mℓ×3)로 추출하고, NaCl 수용액(100mℓ×3)으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(PE/EA=20/1 내지 5/1 내지 2/1)로 정제시켜 화합물 **67**(205mg, 25%)을 밝은 황색 오일로서 제공하였다.

[1108] **TLC**: PE/EA =0:1, UV, R_f (화합물 **66**) = 0.55, R_f (화합물 **67**) = 0.50.

[1109] ^{1}HNMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 8.01-7.92 (m, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.16-4.01 (m, 2H), 3.72-3.53 (m, 12H), 3.42-3.35 (m, 3H), 3.31-3.25 (m, 5H), 1.73-1.39 (m, 4H).

[1110] **1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-4-클로로페닐)설폰일)-5-메톡시펜탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(68)의 제조**

[1111] THF(2mℓ) 중의 화합물 **67**(200mg, 0.372mmol, 1.0eq)의 용액에 피리딘(117.5mg, 1.49mmol, 4.0eq) 및 트라이포스겐(221mg, 0.744mmol, 2.0eq)을 0℃에서 한번에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 THF(3ml)에 용해시켰다. 혼합물에 피리딘(117.5mg, 1.49mmol, 4.0eq) 및 HOSU(128mg, 1.12mmol, 3.0eq)을 0℃에서 한번에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 물로 반응정지시키고, 에틸 아세테이트(20mℓ×3)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 분취용-HPLC(0.1% HCOOH)로 정제시키고, 에틸 아세테이트로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 화합물 **68**(101mg, 27%)을 밝은 황색 오일로서 제공하였다.

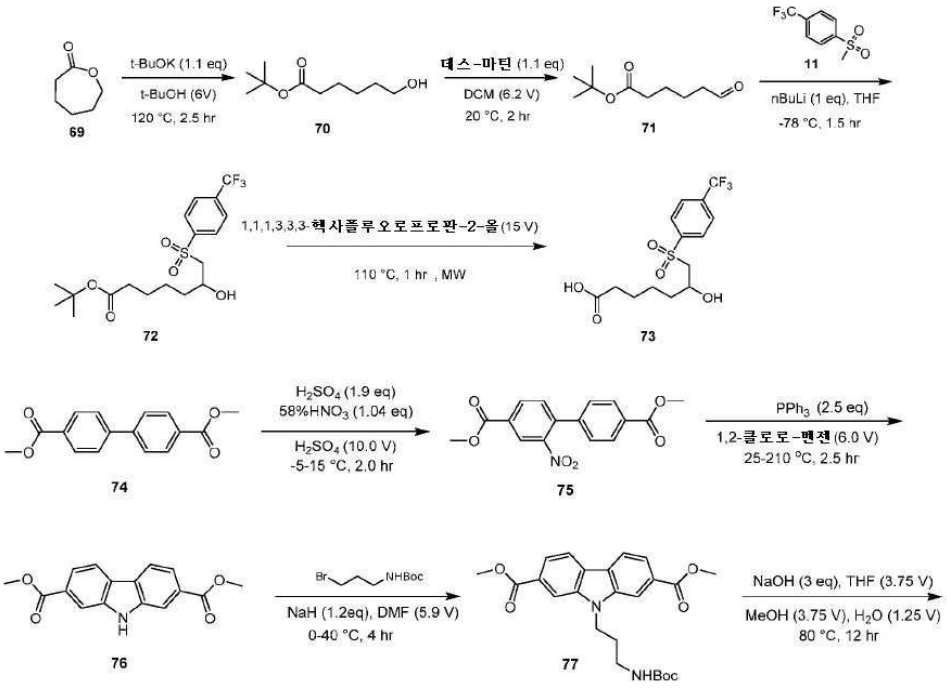
[1112] **TLC**: PE/EA=0/1, UV, R_f (화합물 **67**) = 0.50, R_f (화합물 **68**) = 0.55.

[1113] LC-MS: 678.25 $[M+1]^+$.

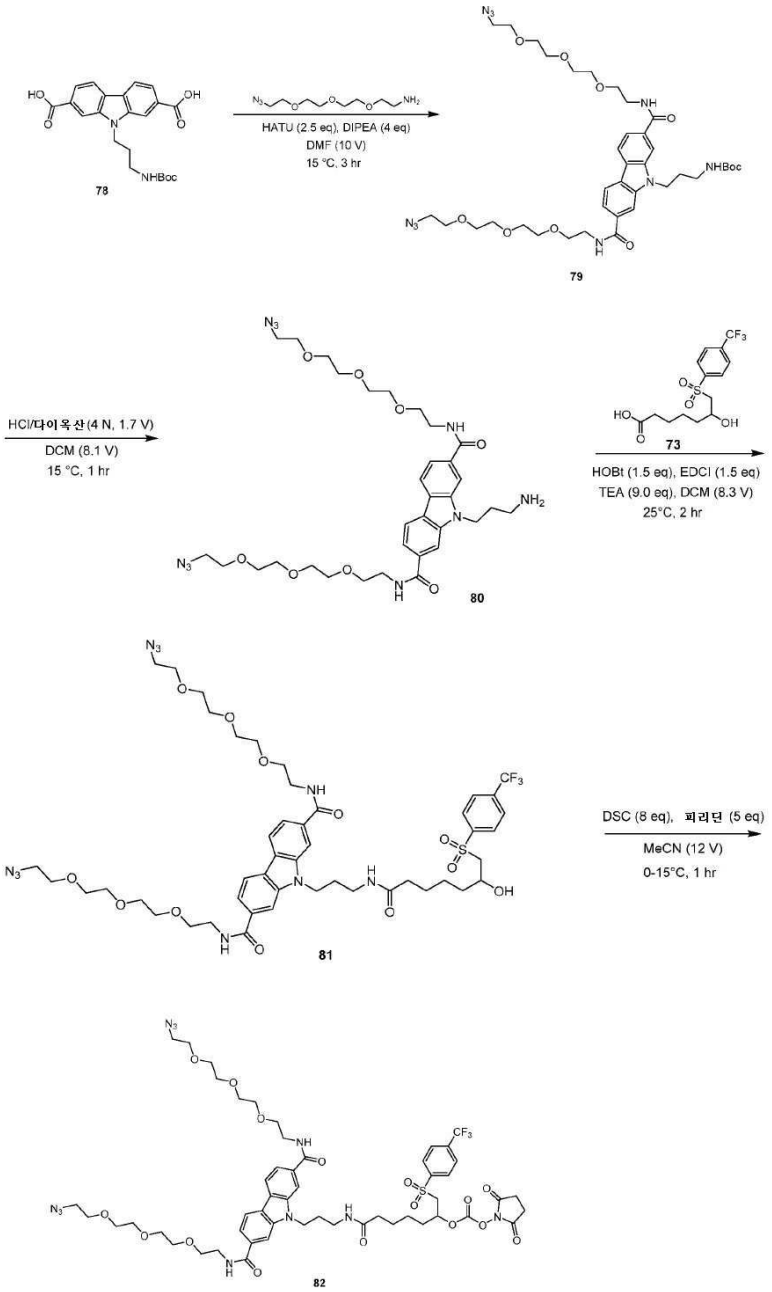
[1114] ^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 (s, 1H), 7.94-7.86 (m, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 3.74-3.52 (m, 15H), 3.44-3.31 (m, 5H), 3.28 (s, 3H), 2.82 (s, 4H), 1.87 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.61 (s, 2H).

[1115] **실시예 31**

[1116] 7-((3-(2,7-비스((2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-카바졸-9-일)프로필)아미노)-7-옥소-1-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(82)



[1117]



[1118]

[1119] **tert-부틸 6-하이드록시헥산오에이트(70)의 제조**

[1120] t-BuOH(600㎖) 중의 화합물 **69**(100g, 876mmol) 및 t-BuOK(108g, 964mmol)의 혼합물을 탈기시키고, N_2로 3회 퍼징하고, 그 다음 혼합물을 120℃에서 2.5시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. TLC(플레이트 1, 다이클로로메탄/메탄올=10/1, 화합물 **69**, R_f=0.60, 화합물 **70** R_f=0.50)가 화합물 **69**가 완전히 소모되고, 하나의 새로운 스팟이 형성되었음을 나타내었다. 반응은 TLC에 따라서 깨끗하였다. 반응 혼합물을 다이클로로메탄(600㎖)과 물(1.20L) 사이에 분배시켰다. 유기상을 분리시키고, 염수(300㎖)로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하고, 화합물 **70**(127g, 77.2% 수율)을 황색 오일로서 제공하였으며, 추가로 정제시키지 않고 다음 단계에 사용하였다.

[1121] ^{1}**H NMR** (400 ㎒, $CDCl_3$) δ ppm 3.66-3.63 (m, 2H), 2.25-2.21 (m, 2H), 1.66-1.57 (m, 5H), 1.44 (s, 9H), 1.40-1.39 (m, 2H).

[1122] **tert-부틸 6-옥소헥산오에이트(71)의 제조**

[1123] DCM(400㎖) 중의 화합물 **70**(64.0g, 340mmol)의 용액에 데스-마틴(Dess-Martin) 시약(159g, 374mmol, 116㎖)을 첨

가하였다. 혼합물을 20℃에서 2시간 동안 교반하였다. TLC(플레이트 1, 석유 에터/에틸 아세테이트=1/1, 화합물 **70** R_f=0.40, 화합물 **71** R_f=0.50)가 화합물 **70**이 완전히 소모되었음을 나타내었다. $NaHCO_3$ 수용액(200㎖)을 첨가하여 반응 혼합물을 반응정지시키고, DCM(100㎖×3)으로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(100㎖)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(SiO_2, 석유 에터/에틸 아세테이트=10/1 내지 1/1, 플레이트 2, 석유 에터/에틸 아세테이트=1/1, 화합물 **71** R_f=0.50)로 정제시켜 화합물 **71**(26.8g, 42.3% 수율)을 황색 오일로서 제공하였다.

[1124] ^{1}**H NMR**: (400 ㎒ $CDCl_3$) δ ppm 2.44-2.21 (m, 4H), 1.65-1.60 (m, 4H), 1.43 (s, 9H).

[1125] **tert-부틸 6-하이드록시-7-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄오에이트(72)의 제조**

[1126] THF(30.0㎖) 중의 화합물 **11**(7.15g, 31.9mmol)의 용액에 n-BuLi(2.5 M, 11.60㎖)을 적가하고, 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하였다. 그 다음 THF(5.00㎖) 중의 화합물 **71**(5.40g, 29.0mmol)의 용액을 -78℃에서 첨가하였다. 혼합물을 -78℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. TLC(플레이트 1, 석유 에터/에틸 아세테이트=1/1, 화합물 **71** R_f=0.70, 화합물 **72** R_f=0.40)가 화합물 **71**이 완전히 소모되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 NH_4Cl 수용액(50.0㎖)을 첨가하여 반응정지시키고, 그 다음 EtOAc(20.0㎖×3)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(30.0㎖)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(SiO_2, 석유 에터/에틸 아세테이트=30/1 내지 1/1, 플레이트 2, 석유 에터/에틸 아세테이트=1/1, 화합물 **72** R_f=0.40)로 정제시켜 화합물 **72**(8.57g, 72.0% 수율)를 황색 고체로서 제공하였다.

[1127] ^{1}**H NMR**: (400 ㎒ $CDCl_3$) δ ppm 8.10-8.08 (d, *J* = 8.4Hz, 2H), 7.88-7.86 (d, *J* = 8Hz, 2H), 4.21-4.20 (m, 1H), 3.31-3.16 (m, 3H), 2.23-2.18 (m, 2H), 1.61-1.35 (m, 15H).

[1128] **6-하이드록시-7-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄산(73)의 제조**

[1129] 화합물 **72**(1.00g, 2.44mmol)를 마이크로파 튜브 내의 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(15.0㎖)로 취하였다. 밀봉된 튜브를 110℃에서 1시간 동안 마이크로파 하에서 가열시켰다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=1/1, 화합물 **72**: R_f=0.5, 화합물 **73**: R_f=0.2)는 화합물 **72**가 완전히 소모되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 조 생성물을 정제시키지 않고 다음 단계에 직접 사용하여 화합물 **73**(0.860g, 2.43mmol, 99.6% 수율)을 황색 검으로서 제공하였다.

[1130] ^{1}**H NMR**: (400 ㎒ DMSO) δ ppm 11.93 (s, 1H), 8.00-8.13 (m, 4H), 5.11-5.17 (m, 1H), 4.85 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H), 3.43-3.48 (m, 2H), 2.16 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.33-1.46 (m, 6H).

[1131] **다이메틸 2-나이트로-[1,1'-바이페닐]-4,4'-다이카복실레이트(75)의 제조**

[1132] H_2SO_4(330㎖) 중의 화합물 **74**(33.0g, 122mmol)의 용액을 -5℃까지 냉각시키고, HNO_3(13.8g, 127mmol, 9.85㎖, 58% 순도) 및 H_2SO_4(22.8g, 232mmol, 12.4㎖)의 혼합물을 -5 내지 0℃의 온도를 유지시키면서 교반 하에서 1시간에 걸쳐서 적가하였다. 그 다음 혼합물을 1시간 동안 -5 내지 0℃에서 교반하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=3/1, 생성물 R_f=0.50)가 화합물 **74**(R_f=0.60)가 소모되었고, 더 큰 극성을 갖는 새로운 주요 스팟이 형성되었음을 나타내었다. 혼합물을 (300㎖)의 물로 희석시키고, 에틸 아세테이트(50.0㎖×2)로 추출하였다. 추출물을 염수(50.0㎖) 및 중탄산나트륨(100㎖)의 용액으로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 증발시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(SiO_2, 석유 에터/에틸 아세테이트=50/1 내지 0/1)로 정제시켜 화합물 **75**(16.0g, 50.6mmol, 41.4% 수율, 99.6% 순도)를 백색 고체로서 제공하였다.

[1133] ^{1}**H NMR**: (400 ㎒, $CDCl_3$) δ 8.57 (s, 1H), 8.31 - 8.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.14 - 8.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.56 - 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.42 - 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.96 (s, 3H).

[1134] **다이메틸 9H-카바졸-2,7-다이카복실레이트(76)의 제조**

[1135] 1,2-다이클로로벤젠(112㎖) 중의 화합물 **75**(20g, 63.4mmol), PPh_3(41.6g, 159mmol)의 혼합물을 25℃에서 탈기시키

고, N_2로 3회 퍼징하고, 그 다음 혼합물을 210℃에서 1.5시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=1/1, 화합물 **75**: R_f=0.43)가 화합물 **75**가 완전히 소모되고, 하나의 새로운 주요 스팟이 형성되었음을 나타내었다. 반응은 TLC에 따라서 깨끗하였다. 반응물을 25℃까지 냉각시키고, 메탄올(200㎖)을 첨가하였다. 15분 후, 생성된 고체 현탁물을 여과로 수집하여 화합물 **76**(12.0g, 42.4mmol, 66.8% 수율)을 회색 고체로 제공하였다.

[1136] ^{1}**H NMR**: (400 MHz, DMSO) δ 11.81 (s, 1H), 8.33 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 8.17 (s, 2H), 7.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.91 (s, 6H).

[1137] **다이메틸 9-(3-((tert-부톡시카보닐)아미노)프로필)-9H-카바졸-2,7-다이카복실레이트(77)의 제조**

[1138] DMF(80.0㎖) 중의 NaH(2.30g, 57.6mmol, 60% 순도)의 용액에 화합물 **76**(13.6g, 48.0mmol)을 0℃에서 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하고, 그 다음 tert-부틸 N-(3-브로모프로필)카바메이트(22.9g, 96.0mmol)를 첨가하고, 혼합물을 40℃에서 3시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에터/에틸 아세테이트=5/1, 화합물 **76**: R_f=0.2, 생성물: R_f=0.7)가 화합물 **76**이 완전히 소모되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 수성 NH_4Cl(100㎖)로 희석시키고, EtOAc(150㎖×2)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(100㎖)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(SiO_2, 석유 에터/에틸 아세테이트=10/1 내지 1/1)로 정제시켜 화합물 **77**(16.4g, 37.2mmol, 77.6% 수율)을 황색 고체로서 제공하였다.

[1139] ^{1}**HNMR**: (400 MHz, DMSO) δ 8.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.31 (s, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.03 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.56 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.74 (s, 6H), 2.99-3.00 (m, 2H), 1.87-1.98 (m, 2H), 1.22-1.36 (m, 9H).

[1140] **9-(3-((tert-부톡시카보닐)아미노)프로필)-9H-카바졸-2,7-다이카복실산(78)의 제조**

[1141] THF(30.0㎖), MeOH(30.0㎖) 및 H_2O(10.0㎖) 중의 화합물 **77**(8.00g, 18.2mmol) 및 NaOH(2.18g, 54.5mmol)의 혼합물을 탈기시키고, N_2로 3회 퍼징하고, 그 다음 혼합물을 80℃에서 12시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. TLC(다이클로로메탄/메탄올=10/1, 화합물 **77**: R_f=0.8)가 화합물 **77**이 완전히 소모되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 빙수 100㎖에 조심스럽게 붓고, 1N HCl을 사용하여 pH = 4로 희석시켰다. 반응 혼합물을 여과시키고, 여과 케이크를 20.0㎖의 물로 세척하고, 진공에서 건조시켰다. 조 생성물을 추가로 정제시키지 않고 다음 단계에 직접 사용하여 화합물 **78**(5.00g, 12.1mmol, 66.8% 수율)을 밝은 황색 고체로서 제공하였다.

[1142] ^{1}**HNMR**: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.01 (s, 2H), 8.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.25 (s, 2H), 7.85 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.56 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.97-3.00 (m, 2H), 1.89-1.99 (m, 2H), 1.37 (m, 8H).

[1143] **tert-부틸 (3-(2,7-비스((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-카바졸-9-일)프로필)카바메이트(79)의 제조**

[1144] DMF(50.0㎖) 중의 화합물 **78**(5.00g, 12.1mmol)의 용액에 HATU(11.5g, 30.3mmol) 및 DIPEA(6.27g, 48.5mmol) 및 2-[2-[2-(2-아지도에톡시)에톡시]에톡시]에탄아민(5.29g, 24.3mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 15℃에서 3시간 동안 교반하였다. LC-MS가 목적하는 MS가 검출된 하나의 새로운 피크(화합물 **79**: Rt=0.752분)를 나타내었다. 반응 혼합물을 물(90.0㎖)로 희석시키고, 2-Me-THF(50.0㎖×2)로 추출하였다. 합한 유기층을 물(50.0 ㎖)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(0.1% NH_4HCO_3 조건)로 정제시켜 화합물 **79**(4.00g, 4.92mmol, 40.6% 수율)를 백색 고체로서 제공하였다.

[1145] ^{1}**HNMR**: (400 MHz, DMSO) δ 8.68 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 8.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.19 (s, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.03 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.53 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.54-3.65 (m, 26H), 3.40-3.41 (m, 4H), 3.38-3.40 (m, 2H), 3.03-3.05 (m, 2H), 1.99-2.02 (m, 2H), 1.40 (s, 9H).

[1146] **9-(3-아미노프로필)-N2,N7-비스(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-9H-카바졸-2,7-다이카복스아마이드(80)의 제조**

[1147] DCM(25.0㎖) 중의 화합물 **79**(3.00g, 3.69mmol)의 용액에 HCl/MeOH(5.00㎖)를 첨가하였다. 혼합물을 15℃에서 1

시간 동안 교반하였다. TLC(다이클로로메탄/메탄올 = 10/1, 화합물 **79**: R_f=0.6, 화합물 **80**: R_f=0.05)가 화합물 **79**가 완전히 소모되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 조 생성물을 추가로 정제시키지 않고 다음 단계에 직접 사용하여 화합물 **80**(2.70g, 3.60mmol, 97.7% 수율, HCl 염)을 황색 고체로서 제공하였다.

[1148] ^{1}**HNMR**: (400 MHz, DMSO) δ 8.78 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 8.36 (s, 2H), 8.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.05 (s, 3H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.63 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.65-3.60 (m, 17H), 3.50-3.56 (m, 5H), 3.36-3.37 (m, 5H), 2.88-2.91 (m, 2H), 2.14-2.18 (m, 2H).

[1149] **N2,N7-비스(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-9-(3-(6-하이드록시-7-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄아미도)프로필)-9H-카바졸-2,7-다이카복스아마이드(81)의 제조**

[1150] DCM(15.0mℓ) 중의 화합물 **80**(1.80g, 2.40mmol, HCl), 화합물 **73**(851mg, 2.40mmol), HOBt(487mg, 3.60mmol), EDCI(691mg, 3.60mmol) 및 Et_3N(2.19g, 21.6mmol)의 혼합물을 탈기시키고, N_2로 3회 퍼징하고, 그 다음 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS가 목적하는 MS가 검출된 하나의 새로운 피크(화합물 **81**: Rt=1.21분)를 나타내었다. 반응 혼합물을 물(30.0mℓ)로 희석시키고, EtOAc(20.0mℓ×3)로 추출하였다. 합한 유기층을 염수(30.0mℓ)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 분취용-HPLC(칼럼: Xtimate C18 10u 250mm×80mm; 이동상: [물(10mM NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 35% 내지 65%, 21분)로 정제시켜 화합물 **81**(1.00g, 953umol, 39.7% 수율)을 밝은 황색 고체로서 제공하였다.

[1151] ^{1}**HNMR**: (400 MHz, DMSO) δ 8.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 8.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.20 (s, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.92-7.93 (m, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.89 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.55 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.93 (s, 1H), 3.56-3.67 (m, 30H), 3.40-3.42 (m, 5H), 3.15-3.16 (m, 2H), 2.01-2.11 (m, 4H), 1.27-1.51 (m, 7H).

[1152] **7-((3-(2,7-비스((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)-9H-카바졸-9-일)프로필)아미노)-7-옥소-1-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(82)의 제조**

[1153] ACN(6.00mℓ) 중의 화합물 **81**(500mg, 477umol) 및 N,N'-다이석신이미딜 카보네이트(977mg, 3.81mmol)의 용액에 피리딘(188mg, 2.38mmol)을 0℃에서 첨가하였다. 혼합물을 15℃에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS가 목적하는 MS가 검출된 하나의 새로운 피크(생성물 Rt=2.26분)를 나타내었다. 반응 혼합물을 물(20.0mℓ)로 희석시키고, DCM(10.0mℓ×5)으로 추출하였다. 합한 유기층을 물(20.0 mℓ)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켜 잔류물을 제공하였다. 잔류물을 분취용-HPLC(칼럼: Phenomenex luna C18 250×50mm×10 um; 이동상: [물(0.04% HCl)-ACN]; B%: 50% 내지 70%, 10분)로 정제시켜 **82**(0.102g, 79.4umol, 16.7% 수율, 92.7% 순도)를 황색 고체로서 제공하였다.

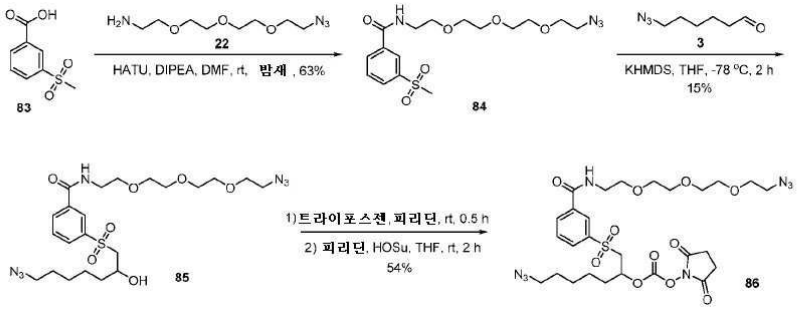
[1154] ^{1}**HNMR**: (400 MHz, DMSO) δ 8.6 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 8.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.13-8.17 (m,4H), 8.01-8.11 (m, 3H), 7.96 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 5.16-5.18 (m, 1H), 4.49 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.91-4.12 (m, 13H), 3.55-3.59 (m, 14H), 4.49-4.53 (m, 4H), 3.34-3.36 (m, 4H), 3.09-3.10 (m, 2H), 2.79 (s, 4H), 1.97-2.06 (m, 4H), 1.61-1.68 (m, 2H), 1.42-1.44 (m, 2H), 1.23-1.25 (m, 2H).

[1155] **HPLC**: 체류 시간: 2.632분, 면적 백분율: 92.0%.

[1156] **LCMS**: 체류 시간: 2.630분, $M+H^+$=1190.4.

[1157] **실시예 32**

[1158] **7-아지도-1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)카바모일)페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(86)**



[1159]

[1160] **N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-3-(메틸설폰일)벤즈아마이드(84)의 제조**

[1161] 다이메틸폼아마이드(40㎖) 중의 화합물 **83**(2.0g, 10mmol, 1.0eq) 및 화합물 **22**(2.18g, 10mmol, 1.0eq)의 용액에 2-(7-아자-1H-벤조트라이아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(4.56g, 12mmol, 1.2eq) 및 *N,N*-다이아이소프로필에틸아민(2.0g, 20mmol, 2.0eq)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응물을 LCMS 및 TLC로 모니터링하였다. 혼합물을 물(50㎖)로 희석시키고, 에틸 아세테이트(5×150㎖)로 추출하고, 염수(100㎖)로 세척하였다. 유기층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(다이클로로메탄:메탄올, 97:3)로 정제시켜 화합물 **84**(2.5g, 63%)를 제공하였다.

[1162] **TLC**: 다이클로로메탄:메탄올=10:1, UV 254nm, I_2에 의해서, R_f: (***화합물 83***) = 0.3; R_f: (***화합물 84***) = 0.5.

[1163] **3-((7-아지도-2-하이드록시헵틸)설폰일)-N-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)벤즈아마이드(85)의 제조**

[1164] 테트라하이드로퓨란(30㎖) 중의 화합물 **84**(2.0g, 5.0mmol, 1.0eq)의 용액에 포타슘 비스(트라이메틸실릴)아마이드(1.0M, 15㎖, 15mmol, 3.0eq)의 용액을 -78℃에서 서서히 첨가하였다. 그 다음 화합물 **3**(2.1g, 15mmol, 3.0eq)을 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 TLC로 모니터링하였다. 그 다음 혼합물을 포화 염화 암모늄 수용액(30㎖)으로 반응정지시키고, 에틸 아세테이트(2×30㎖)로 추출하였다. 유기층을 염수(20㎖)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(다이클로로메탄:메탄올, 97:3)로 정제시켜 화합물 **85** (400mg, 15%)를 제공하였다.

[1165] **TLC**: 다이클로로메탄:메탄올 = 10:1, UV 254nm, R_f: (***화합물 84***) = 0.5; R_f: (***화합물 85***) = 0.5.

[1166] **7-아지도-1-((3-((2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)-에톡시)에틸)카바모일)페닐)설폰일)헵탄-2-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(86)의 제조**

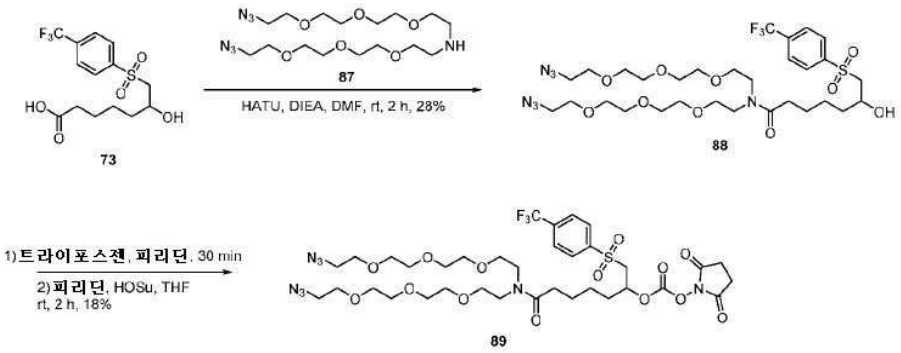
[1167] 테트라하이드로퓨란(4㎖) 중의 화합물 **85**(400mg, 0.74mmol, 1.0eq) 중의 혼합물에 트라이포스젠(372mg, 1.25mmol, 1.7eq) 및 피리딘(117mg, 1.48mmol, 2.0eq)을 첨가하였다. 30분 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 여과하였다. 여과액에 피리딘(117mg, 1.48mmol, 2.0eq) 및 *N*-하이드록시석신이미드(176mg, 0.89mmol, 1.2eq)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 LCMS로 모니터링하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(3×5㎖)로 추출하고 및 염수(5㎖)로 세척하였다. 그 다음 유기층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 분취용-HPLC로 정제시켜 화합물 **86**(270mg, 54%)을 무색 오일로서 제공하였다.

[1168] **LCMS**: $[M+1]^+$ =683.

[1169] **^{1}HNMR (400 MHz, CD_3OD)**: δ 8.32 (s, 1H), 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.68 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 5.25 (s, 1H), 3.59-3.66 (m, 16H), 3.37-3.32 (m, 2H), 3.25 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.81 (s, 4H), 1.79 (s, 2H), 1.57 (s, 2H), 1.39 (s, 4H).

[1170] **실시예 33**

[1171] **1-아지도-12-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-13-옥소-19-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)-3,6,9-트라이옥사-12-아자노나데칸-18-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(89)**



[1172]

[1173] N,N-비스(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-6-하이드록시-7-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)헵탄아마이드(88)의 제조

[1174] 다이메틸폼아마이드(3㎖) 중의 화합물 **73**(102㎎, 0.3㎜ol, 1.2eq)의 용액에 2-(7-아자-1H-벤조트라이아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(136㎎, 0.76㎜ol, 1.5eq) 및 *N,N*-다이아이소프로필에틸아민(124㎎, 0.96㎜ol, 4.0eq)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하였다. 그 다음 혼합물에 화합물 **87**(100㎎, 0.24㎜ol, 1.0eq)을 첨가하고, 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 LCMS 및 TLC로 모니터링하였다. 혼합물을 물(10㎖)로 희석시키고, 에틸 아세테이트(5×10㎖)로 추출하고, 염수(10㎖)로 세척하였다. 유기층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 상의 칼럼 크로마토그래피(다이클로로메탄:메탄올, 98:2)로 정제시켜 화합물 **88**(50㎎, 28%)을 제공하였다.

[1175] **TLC**: 다이클로로메탄:메탄올=10:1, UV 254㎚, I_2에 의해서, R_f: (***화합물 87***) = 0.5; R_f: (***화합물 88***) = 0.4.

[1176] **1-아지도-12-(2-(2-(2-(2-아지도에톡시)에톡시)에톡시)에틸)-13-옥소-19-((4-(트라이플루오로메틸)페닐)설폰일)-3,6,9-트라이옥사-12-아자노나데칸-18-일 (2,5-다이옥소피롤리딘-1-일) 카보네이트(89)의 제조**

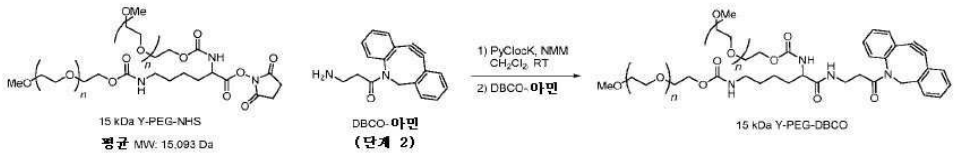
[1177] 테트라하이드로퓨란(4㎖) 중의 화합물 **88**(400㎎, 0.53㎜ol, 1.0eq)의 혼합물에 트라이포스젠(267㎎, 0.9㎜ol, 1.7eq) 및 피리딘(84㎎, 1.06㎜ol, 2.0eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하였다. 여과액에 피리딘(84㎎, 1.06㎜ol, 2.0eq) 및 *N*-하이드록시석신이미드(73㎎, 0.64㎜ol, 1.2eq)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 LCMS로 모니터링하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(3×5㎖)로 추출하고 및 염수(5㎖)로 세척하였다. 그 다음 혼합물을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축시켰다. 잔류물을 분취용-HPLC로 정제시켜 화합물 **89**(85㎎, 18%)를 황색 오일로서 제공하였다.

[1178] **LCMS**: $[M+1]^+$ =897.

[1179] **^{1}HNMR (400 ㎒, CD_3OD)**: δ 8.15-8.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.96-7.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.27 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.59-3.61 (m, 26H), 3.35 (m, 6H), 2.81 (s, 4H), 3.46-3.42 (m, 2H), 1.79-1.77 (m, 2H), 1.58 (m, 2H) 및 1.39-1.37 (m, 2H).

[1180] **실시예 34**

[1181] 15kDa Y-PEG-DBCO



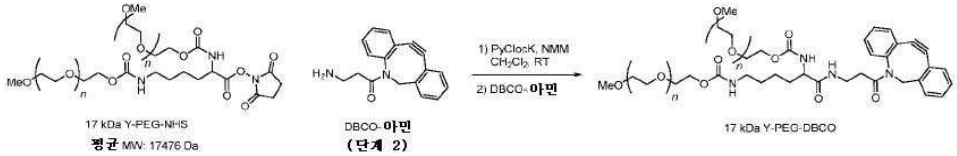
[1182]

[1183] 건조된 둥근 바닥 플라스크에, 테플론 코팅된 자석 교반 막대를 장치하고 15kDa Y-PEG-NHS(1.13g, 74.9㎛ol, 1.0당량) 및 PyClocK(0.082g, 148㎛ol, 2.0당량)를 첨가하였다. 플라스크를 고무 셉텀으로 밀봉하고, 불활성 아르곤 분위기 하에 두었다. 무수 CH_2Cl_2(18㎖), 그 다음 N-메틸몰폴린(18㎕, 164㎛ol, 2.2당량)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. DBCO-아민(52㎎, 188㎛ol, 2.5당량)을 N-메틸몰폴린(18㎕, 164㎛ol,

2.2당량)과 함께 CH_2Cl_2(2㎖) 중의 용액으로서 한번에 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 추가로 5시간 동안 교반하였다. 조 반응 혼합물을 진공 하에서 농축시키고, 그 다음 뜨거운 2-프로판올(120㎖)에 취하였다. 생성된 용액을 빙욕에서 냉각시켜 침전물을 형성하였다. 단리된 침전물을 미리 칭량된 팔콘 튜브(×3)로 옮기고, 침전물을 원심분리(12000rpm, 30분, -3℃)로 침강시켰다. 침전을 2-프로판올(120㎖)로 1회 반복하고, 아세톤(3×120㎖)으로 3회 반복하였다. 펠릿을 진공 하에서 건조시켰다. 단리된 백색 고체, 질량 = 995mg(88%). RP-HPLC 체류 시간=6.9분.

[1184] **실시예 35**

[1185] 17kDa Y-PEG-DBCO

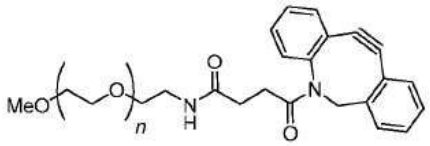


[1186]

[1187] 건조된 둥근 바닥 플라스크에, 테플론 코팅된 자석 교반 막대를 장치하고, 17kDa Y-PEG-NHS(1.0g, 57.2μmol, 1.0당량) 및 CH_2Cl_2(18.0㎖)를 첨가하였다. 플라스크를 고무 셉텀으로 밀봉하고, 불활성 아르곤 분위기 하에 두었다. DBCO-아민(40mg, 145μmol, 2.5당량), 그 다음 N-메틸몰폴린(19㎕, 173μmol, 3.0당량)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. 조 반응 혼합물을 진공 하에서 농축시키고, 그 다음 뜨거운 아세톤(90㎖)에 취하였다. 생성된 용액을 빙욕에서 30분 동안 냉각시켜 침전물을 형성하였고, 이것을 원심분리(11000 rpm, 30 min, -8℃)로 침강시켰다. 용매를 경사분리시키고, 침전 공정을 2-프로판올(90㎖)로 1회, 아세톤(2×90㎖)으로 2회 반복하였다. 생성된 고체를 진공 하에서 건조시켰다. 단리된 백색 고체, 질량 = 910mg(91%). RP-HPLC 체류 시간 =6.7분.

[1188] **실시예 36**

[1189] 7.5kDa PEG-DBCO

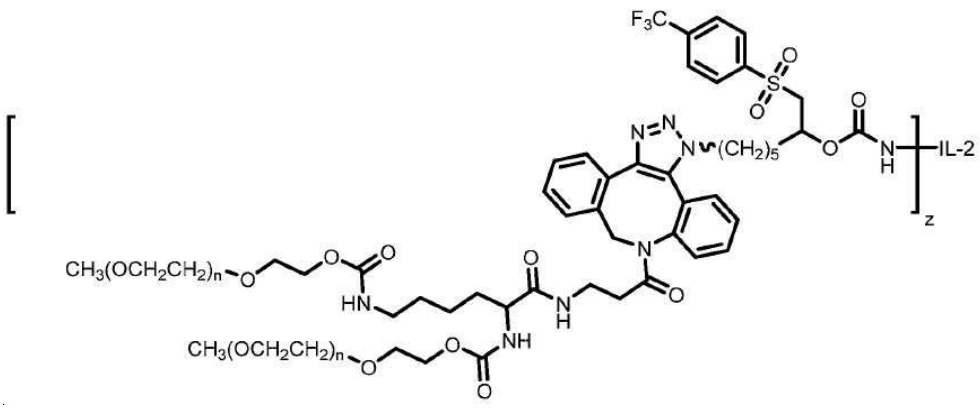


7.5 kDa PEG-DBCO

[1190]

[1191] 7.5kDa PEG-DBCO 시약을 젠켐 테크놀로지사(JenKem Technology USA)에서 구매하였다. HPLC: 순도 98.0%; GPC: 순도 99.1%; MALDI: 7481Da.

[1192] **실시예 37**



[1193]

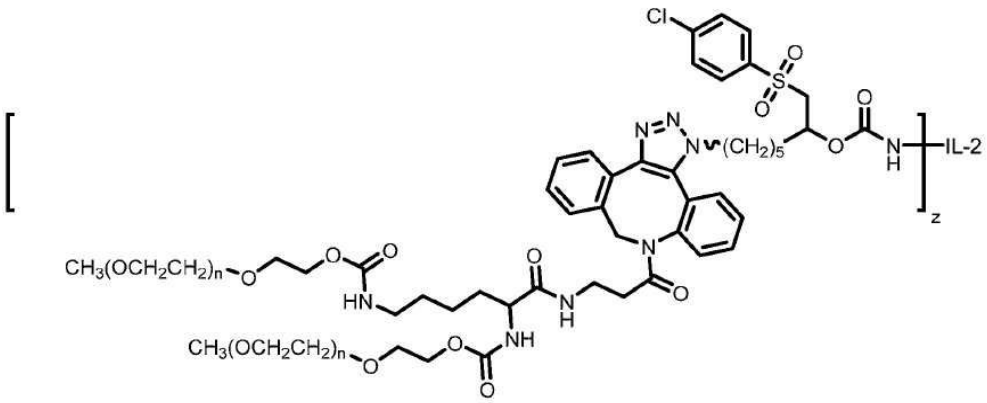
[1194] rIL-2와 실시예 2의 NHS 접합 및 15kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화

[1195] 실시예 2(3.2mg)를 DMF(439㎕)에 용해시켜 7.29mg/㎖ 시약 용액을 제공하였다. IL-2(8.0mg, 0.523μmol, 2.76㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(841㎕)로 희석시키고, 실시예 2(2.92mg, 5.77μmol, 400㎕, 11eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1196] 15kDa Y-PEG-DBCO(125mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(500㎕)에 용해시켜 250mg/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$(7.6mg, 0.497μmol, 3.80㎖),15kDa Y-PEG-DBCO(114mg, 7.47μmol, 455㎕, 15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1197] 실시예 37을 [15K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(5.55mg, 73% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 6.7이었다는 것을 나타내었다.

[1198] **실시예 38**



[1199]

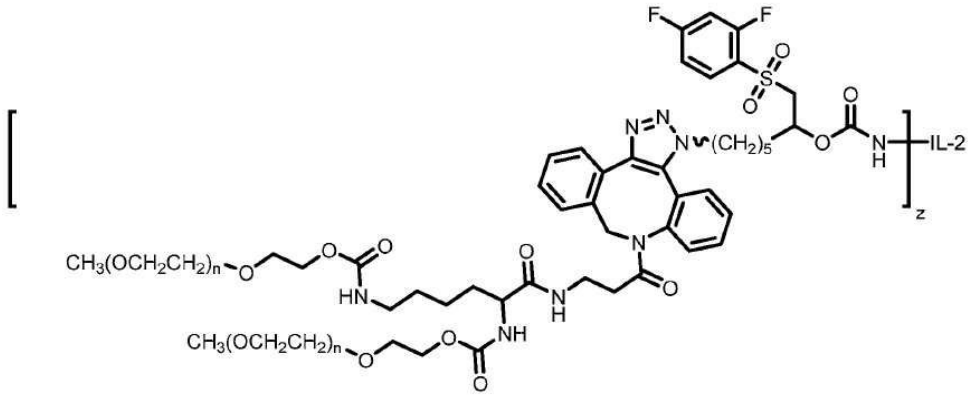
[1200] <u>rIL-2와 실시예 3의 NHS 접합 및 15kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화</u>

[1201] 실시예 3(3.0mg)을 DMF(607㎕)에 용해시켜 4.94mg/㎖ 시약 용액을 제공하였다. IL-2(8.0mg, 0.523μmol, 2.67㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(933㎕)로 희석시키고, 실시예 3(1.98mg, 4.19μmol, 400㎕, 8eq.)을 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1202] 15kDa Y-PEG-DBCO(150mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.00㎖)에 용해시켜 150mg/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[Cl-Ph-SO_2-N_3]$_z$(7.7mg, 0.503μmol, 3.65㎖)에,15kDa Y-PEG-DBCO(138mg, 9.06μmol, 921㎕,18eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1203] 실시예 38을 [15K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(6.39mg, 83% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 5.4였다는 것을 나타내었다.

[1204] **실시예 39**



[1205]

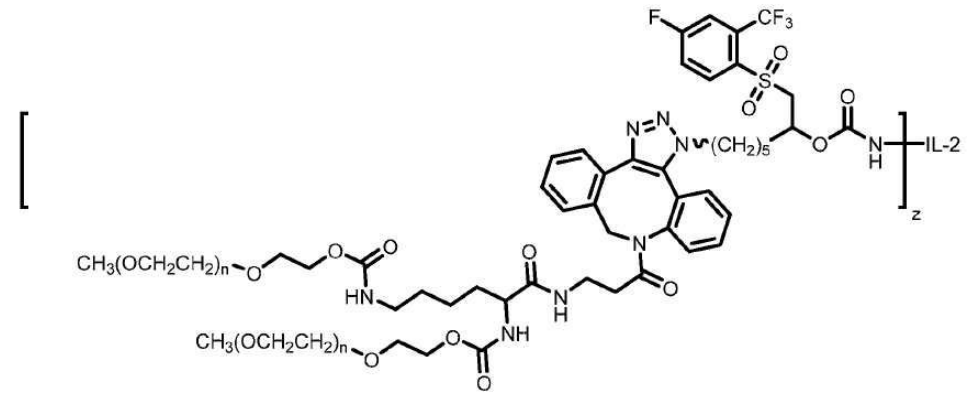
[1206] **rIL-2와 실시예 4의 NHS 접합 및 15kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화**

[1207] 실시예 4(4.0mg)를 DMF(269㎕)에 용해시켜 14.9mg/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(8mg, 0.523μmol, 4.00㎖)의 바이알에, 실시예 4(2.98mg, 6.28μmol, 200㎕, 12eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1208] 15kDa Y-PEG-DBCO(125mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(833㎕)에 용해시키고 150mg/㎖의 시약 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[F,F-Ph-SO_2-N_3]$_z$(8.0mg, 0.523μmol, 4.20㎖)에, 15kDa Y-PEG-DBCO(120mg, 7.87μmol, 798㎕,15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1209] 실시예 39를 [15K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(7.26mg, 91% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 5.9였다는 것을 나타내었다.

[1210] **실시예 40**



[1211]

[1212] **rIL-2와 실시예 5의 NHS 접합 및 15kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화**

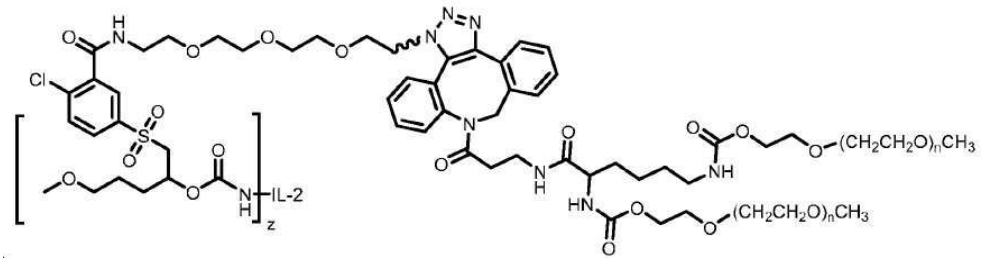
[1213] 실시예 5(4.5mg)를 DMF(438㎕)에 용해시켜 10.3mg/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(7mg, 0.458μmol, 2.33㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(817㎕)로 희석시키고, 실시예 5(3.61mg, 6.88μmol, 350㎕, 15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1214] 15kDa Y-PEG-DBCO(120mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(800㎕)에 용해시키고 150mg/㎖의 시약 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[F,CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$(7.0mg, 0.458μmol, 3.50㎖)에,15kDa Y-PEG-DBCO(105mg,

6.88μmol, 698㎕,15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1215] 실시예 40을 [15K mPEG-(F,CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(6.73mg, 96% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 5.9였다는 것을 나타내었다.

[1216] **실시예 41**

[1217] 

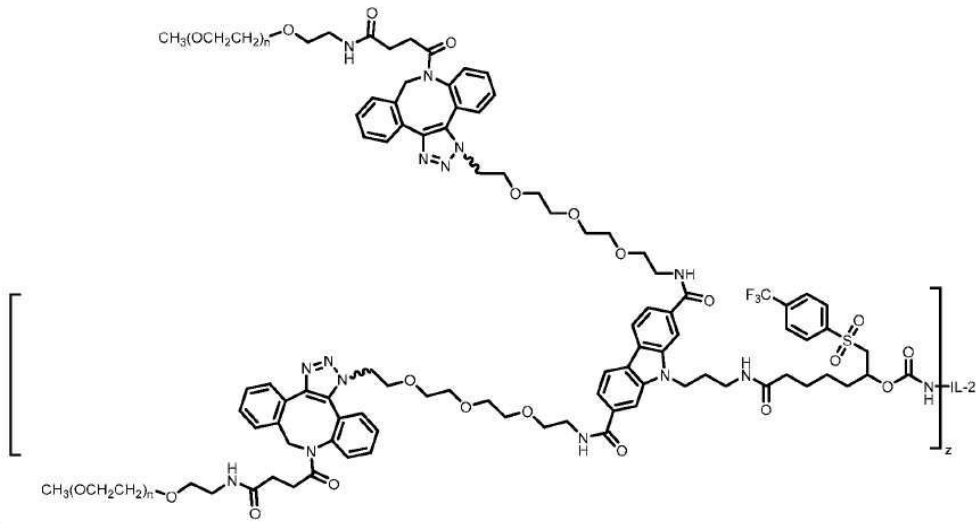
[1218] <u>rIL-2와 실시예 30의 NHS 접합 및 15kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화</u>

[1219] 실시예 30(101mg)을 DMF(2.02㎖)에 용해시켜 50mg/㎖ 용액의 시약을 제공하였다. IL-2(12mg, 0.784μmol, 4.88㎖)의 바이알에, 실시예 30(21.3mg, 31.4μmol, 425㎕, 40eq.) 및 DMF(28.3㎕)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1220] 15kDa Y-PEG-DBCO(578mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(2.09㎖)에 용해시켜 277mg/㎖ 시약 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[Cl,CONH-Ph-SO_2-N_3]$_z$(11.6mg, 0.758μmol, 5.16㎖)에, 15kDa Y-PEG-DBCO(578mg, 37.89μmol, 2.09㎖, 50eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1221] 실시예 41을 [15K mPEG-(Cl,CONH-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(5.37mg, 46% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 5.4였다는 것을 나타내었다.

[1222] 실시예 42



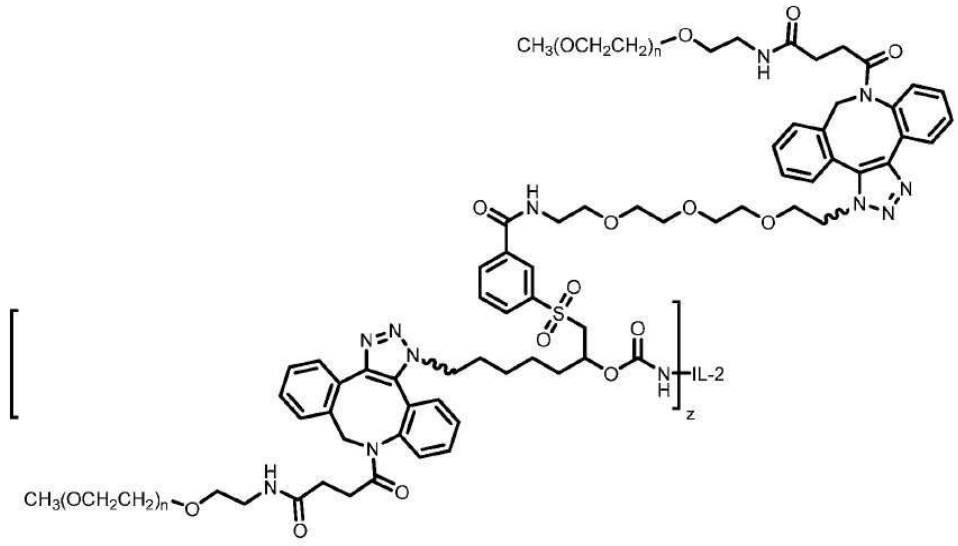
[1223]

[1224] rIL-2와 실시예 31의 NHS 접합 및 7.5kDa PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화

[1225] 실시예 31(50mg)을 DMF(1.00㎖)에 용해시켜 50mg/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(12mg, 0.784㎛ol, 4.8㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(0.6㎖)로 희석시키고, 실시예 31(14mg, 11.8㎛ol, 280㎕, 15eq.) 및 DMF(320㎕)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간째에, 반응물을 LC-MS로 분석하여 작용화된 IL-2 종의 분포를 결정하였다.

[1226] 7.5kDa PEG-DBCO(250mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(1.67㎖)에 용해시켜 150mg/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[CF_3-Ph-Ar-SO_2-N_3]$_z$(12mg, 0.784㎛ol, 6.0㎖)에, 7.5kDa PEG-DBCO(206mg, 27.5㎛ol, 1.37㎖,35eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF). 실시예 42를 [2x7.5K mPEG-(CF_3-Ph-Ar-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(10mg, 84% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 5 내지 7이었다는 것을 나타내었다.

[1227] 실시예 43



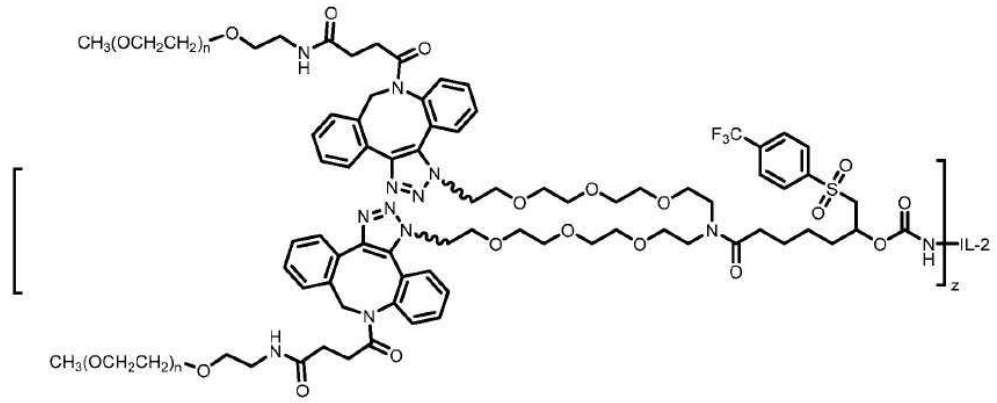
[1228]

[1229] rIL-2와 실시예 32의 NHS 접합 및 7.5kDa PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화

[1230] 실시예 32(99㎎)를 DMF(1.98㎖)에 용해시켜 50㎎/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(12㎎, 0.784㎛ol, 4.0㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.40㎖)로 희석시키고, 실시예 32(9.1㎎, 13.4㎛ol, 181㎕, 17eq.) 및 DMF(419㎕)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간째에, 반응물을 LC-MS로 분석하여 작용화된 IL-2 종의 분포를 결정하였다.

[1231] 7.5kDa PEG-DBCO(250㎎)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(1.67㎖)에 용해시켜 150㎎/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[CONH-Ph-R-SO_2-N_3]$_z$(11.8㎎, 0.771㎛ol, 5.9㎖)에, 7.5kDa PEG-DBCO(231㎎, 30.9㎛ol, 1.54㎖, 40eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛m PVDF). 실시예 43을 [2x7.5K mPEG-(CONH-Ph-R-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(10.23㎎, 87% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 5 내지 7이었다는 것을 나타내었다.

[1232] **실시예 44**

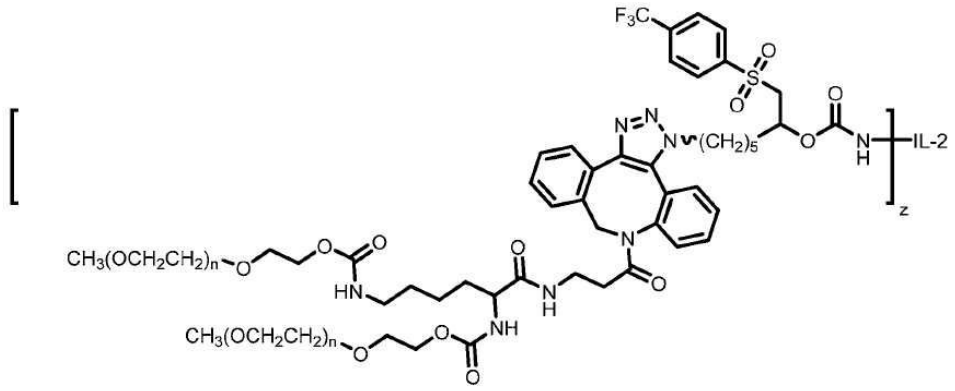
[1233] 

[1234] <u>rIL-2와 실시예 33의 NHS 접합 및 7.5kDa PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화</u>

[1235] 실시예 33(11.3㎎)을 DMF(0.226㎖)에 용해시켜 50㎎/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(10.8㎎, 0.706㎛ol, 3.60㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.26㎖)로 희석시키고, 실시예 33(9.50㎎, 10.6㎛ol, 190㎕, 15eq.) 및 DMF(0.35㎖)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 1시간째에, 반응물을 LC-MS로 분석하여 작용화된 IL-2 종의 분포를 결정하였다.

[1236] 7.5kDa PEG-DBCO(240㎎)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(1.60㎖)에 용해시켜 150㎎/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[CF_3-Ph-R-SO_2-N_3]$_z$(10.5㎎, 0.686㎛ol, 3.85㎖)에, 7.5kDa PEG-DBCO(205㎎, 27.4㎛ol, 1.37㎖, 40eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 2시간 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛m PVDF). 실시예 44를 [2x7.5K mPEG-(CF_3-Ph-R-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(10.45㎎, 99% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비가 5.6이었다는 것을 나타내었다.

[1237] **실시예 45**



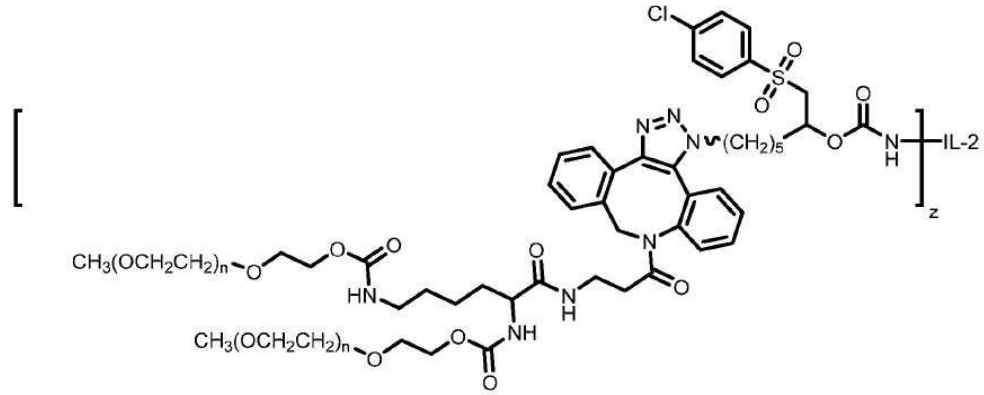
[1238]

[1239] <u>rIL-2와 실시예 2의 NHS 접합 및 17kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화</u>

[1240] 실시예 2(5.0mg)를 DMF(687㎕)에 용해시켜 7.28mg/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(12.0mg, 0.784μmol, 4.14㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.26㎖)로 희석시키고, 실시예 2(4.37mg, 8.63μmol, 600㎕, 11eq.) 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 15분 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다. 추가 실시예 2(1.99mg, 3.93μmol, 273㎕, 5eq.)를 반응에 첨가하여 작용화 수준을 증가시켰다. 22℃에서 추가로 15분 인큐베이션시킨 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1241] 17kDa Y-PEG-DBCO(302mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.21㎖)에 용해시켜 250mg/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$(12.0mg, 0.784μmol, 6.00㎖)에,17kDa Y-PEG-DBCO(277mg, 15.7μmol, 1.11㎖, 20eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을15분 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1242] **실시예 46**



[1243]

[1244] <u>rIL-2와 실시예 3의 NHS 접합 및 17kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화</u>

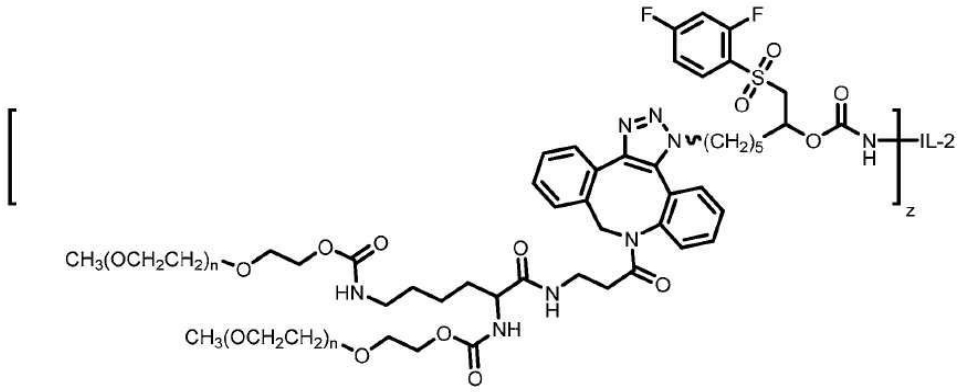
[1245] 실시예 3(4.2mg)을 DMF(679㎕)에 용해시켜 6.18mg/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(12.0mg, 0.784μmol, 4.14㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.26㎖)로 희석시키고, 실시예 3(3.71mg, 7.84μmol, 600 ㎕, 10 eq.)을 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 15분 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1246] 17kDa Y-PEG-DBCO(185mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(740㎕)에 용해시켜 250mg/㎖ 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[Cl-Ph-SO_2-N_3]$_z$(12.0mg, 0.784μmol, 6.00㎖)에, 17kDa Y-PEG-DBCO(173mg, 9.80μmol,

692㎕, 12.5eq.) 및 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(165㎕)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을15분 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1247] 실시예 46을 [17K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(9.7㎎, 81% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 6.2였다는 것을 나타내었다.

[1248] **실시예 47**



[1249]

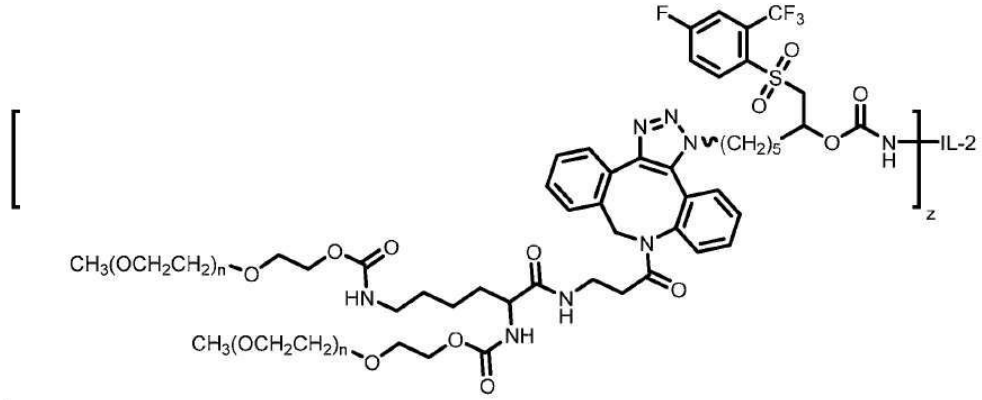
[1250] <u>rIL-2와 실시예 4의 NHS 접합 및 17kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화</u>

[1251] 실시예 4(6.0㎎)를 DMF(645㎕)에 용해시켜 9.30㎎/㎖의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(10.5㎎, 0.686 μ㏖, 3.62㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.10㎖)로 희석시키고, 실시예 4(4.88㎎, 10.3 μ㏖, 525㎕, 15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 15분 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1252] 17kDa Y-PEG-DBCO(260㎎)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(1.04㎖)에 용해시켜 250㎎/㎖의 핵산 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[F,F-Ph-SO_2-N_3]$_z$(10.5㎎, 0.686 μ㏖, 5.25㎖)에,17kDa Y-PEG-DBCO(242㎎, 13.7 μ㏖, 968㎕, 20eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을15분 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1253] 실시예 47을 [17K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(9.5㎎, 91% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 6.5였다는 것을 나타내었다.

[1254] **실시예 48**



[1255]

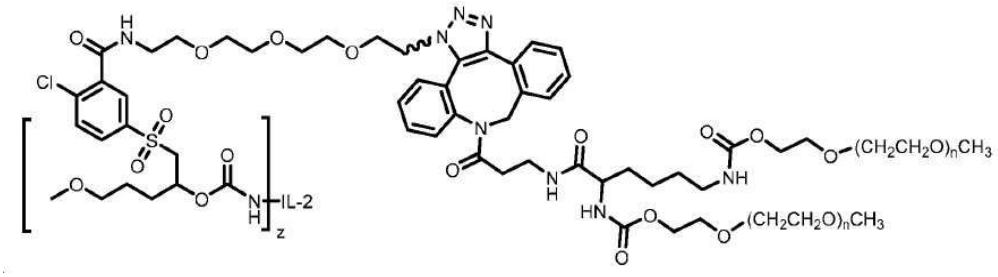
[1256] **rIL-2와 실시예 5의 NHS 접합 및 17kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화**

[1257] 실시예 5(6.6mg)를 DMF(600㎕)에 용해시켜 11.0mg/mℓ의 시약 용액을 제공하였다. IL-2(12.0mg, 0.784μmol, 4.49mℓ)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(906㎕)로 희석시키고, 실시예 5(6.20mg, 11.8μmol, 560㎕, 15eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 15분 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1258] 17kDa Y-PEG-DBCO(235mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(0.94mℓ)에 용해시켜 250mg/mℓ의 핵산 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[F,CF_3-Ph-SO_2-N_3]$_z$(12.0mg, 0.784μmol, 6.00mℓ)에,17kDa Y-PEG-DBCO(228mg, 12.9μmol, 912㎕, 16.5eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을15분 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 3mℓ/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1259] 실시예 48을 [17K mPEG-(F,CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(9.4mg, 78% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 7.3이었다는 것을 나타내었다.

[1260] **실시예 49**



[1261]

[1262] **rIL-2와 실시예 30의 NHS 접합 및 17kDa Y-PEG-DBCO를 사용한 클릭-페길화**

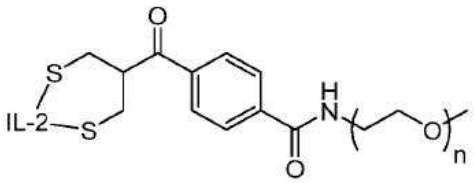
[1263] 실시예 30(101mg)을 DMF(2.02mℓ)에 용해시켜 50mg/mℓ 용액의 시약을 제공하고, 이 용액을 접합 전에 DMF를 사용하여 35.5mg/mℓ로 희석시켰다. IL-2(12.0mg, 0.784μmol, 4.49mℓ)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(906㎕)로 희석시키고, 실시예 30(21.3mg, 31.4μmol, 600㎕, 40eq.)을 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 15분 후, 반응물을 LC-MS로 분석하여 평균 IL-2 작용화도를 결정하였다.

[1264] 17kDa Y-PEG-DBCO(700mg)를 100mM 붕산나트륨, pH 9, 20mM EDTA, 0.05% SDS(2.80mℓ)에 용해시켜 250mg/mℓ의 핵산 용액을 제공하였다. [rIL-2]-[Cl,CONH-Ph-SO_2-N_3]$_z$(12.0mg, 0.784μmol, 6.00mℓ)에, 17kDa Y-PEG-DBCO(692mg, 39.2μmol, 2.77mℓ, 50eq.)를 첨가하였다. 반응물을 혼합하고, 22℃에서 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을15분 후 SDS-PAGE로 분석하고, 조 반응 혼합물을 HiLoad 26/600 Superdex 200 pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘

플을 3㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 농축/UF/DF(Vivaspin20, 50kDa MWCO PES)에 의해서 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, 마지막으로 멸균 여과시켰다(0.22㎛ PVDF).

[1265] 실시예 49를 [17K mPEG-(Cl,CONH-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2]로서 DirectDetect 장비를 사용하여 IR로 정량하였다(9.3mg, 77% 수율). 접합체의 SDS-PAGE 분석은 PEG:IL-2 비율이 7.0이었다는 것을 나타내었다.

[1266] **실시예 50**



[1267]

[1268] **20kDa PEG 비스(설폰)을 사용한 rIL-2 이황화 결합의 페길화**

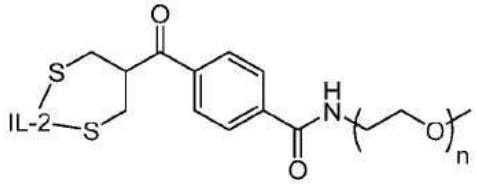
[1269] 접합 전에, IL-2 용액(10mM 아세트산나트륨, pH 4.5, 5% 트레할로스)을 제조사의 지침에 따라서 100mM 붕산나트륨, pH 8(0.05% SDS)로 평형화된 CentriPure P100 칼럼을 사용한 겔 투과에 의해서 완충액 교환시켰다. 완충액 교환된 단백질 용액을 Nanodrop 2000 분광광도계(1.34mg/㎖)를 사용하여 UV-A280로 정량하였다.

[1270] IL-2(12mg, 8.96㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(0.05% SDS)로 9㎖로 희석시키고, 이 용액에 0.1M DTT(1.0㎖, 100㎛ol, 127당량)를 첨가하여, 1.2mg/㎖의 최종 IL-2 농도를 제공하였다. 생성된 환원 반응물을 약하게 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 환원된 IL-2를 제조사의 지침에 따라서 CentriPure P100 칼럼을 사용하여 새로운 100mM 붕산나트륨, pH 8 (0.05% SDS)로 완충액 교환시키고, 회수된 단백질의 양(반응 완충액 21.08㎖ 중의 10.5 mg)을 UV-A280으로 결정하였다. 20kDa TheraPEG™ 시약(19.5mg)의 용액을 물(3.59㎖)에서 제조하였다. 환원된 IL-2(10.5mg, 0.686㎛ol, 21.08㎖)에, 100mM 붕산나트륨, pH 8(0.05% SDS)(17.71㎖) 및 20kDa TheraPEG™(3.37㎖, 0.892㎛ol, 1.3당량) 5.44mg/㎖ 용액을 첨가하여, 0.25mg/㎖의 최종 IL-2 농도를 제공하였다. 접합 반응물을 약하게 혼합하고, 22℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 조 반응물을 SDS-PAGE 및 분석용 SEC로 분석하고, 그 다음 분취용 SEC로 정제시켰다.

[1271] 조 반응물을 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, UF/DF(Vivapsin20, 5kDa MWCO PES)로 농축시켰다. 제조사의 지침에 따라서 4㎖ Detergent Removal Spin Columns(Pierce®)을 사용하여 페길화된 IL-2 샘플로부터 SDS를 제거하였다. 그 다음 페길화된 IL-2 생성물을 HiLoad 16/600 Superdex 200pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 2㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 멸균 여과하였다(0.22㎛ PVDF).

[1272] 샘플을 Nanodrop 2000 분광광도계를 사용하여 UV-A280으로 정량하고, SEC 및 SDS-PAGE로 분석하였다. 실시예 50을 용액으로 0.9mg(8% 수율)으로 생성시켰다. SDS-PAGE에 의한 순도: >99%. 분석용 SEC에 의한 순도: 96.1%.

[1273] **실시예 51**



[1274]

[1275] **5kDa PEG 비스(설폰)을 사용한 rIL-2 이황화 결합의 페길화**

[1276] 접합 전에, IL-2 용액(10mM 아세트산나트륨, pH 4.5, 5% 트레할로스)을 제조사의 지침에 따라서 100mM 붕산나트륨, pH 8(0.05% SDS)로 평형화된 CentriPure P100 칼럼을 사용한 겔 투과에 의해서 완충액 교환시켰다. 완충액 교환된 단백질 용액을 Nanodrop 2000 분광광도계(1.34mg/㎖)를 사용하여 UV-A280로 정량하였다.

[1277] IL-2(12㎎, 8.96㎖)를 100mM 붕산나트륨, pH 8(0.05% SDS)로 9㎖로 희석시키고, 이 용액에 0.1M DTT(1.0㎖, 100㎛ol, 127당량)를 첨가하여, 1.2㎎/㎖의 최종 IL-2 농도를 제공하였다. 생성된 환원 반응물을 약하게 혼합하고, 22℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 환원된 IL-2를 제조사의 지침에 따라서 CentriPure P100 칼럼을 사용하여 100mM 붕산나트륨, pH 8 (0.05% SDS)로 완충액 교환시키고, 회수된 단백질의 양(반응 완충액 14.26㎖ 중의 11.6㎎)을 UV-A280으로 결정하였다. 5kDa TheraPEG™ 시약(16.1㎎)의 용액을 물(11.03㎖)에서 제조하였다. 환원된 IL-2(11.6㎎, 0.758㎛ol, 14.26㎖)에, 100mM 붕산나트륨, pH 8(0.05% SDS)(28.24㎖) 및 1.5㎎/㎖ 용액의 5kDa TheraPEG™(3.37㎖, 0.981㎛ol, 1.3당량)을 첨가하였다. 접합 반응물을 약하게 혼합하고, 22℃에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 조 반응물을 SDS-PAGE 및 분석용 SEC로 분석하고, 그 다음 분취용 SEC로 정제시켰다.

[1278] 조 반응물을 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 완충액 교환시키고, UF/DF(Vivapsin20, 5kDa MWCO PES)로 농축시켰다. 제조사의 지침에 따라서 4㎖ Detergent Removal Spin Columns(Pierce®)을 사용하여 페길화된 IL-2 샘플로부터 SDS를 제거하였다. 그 다음 페길화된 IL-2 생성물을 HiLoad 16/600 Superdex 200pg을 사용하여 SEC로 정제시켰다. 샘플을 2㎖/분 유량의 50mM 아세트산나트륨, pH 4.5(150mM NaCl)로 등용매 용리시켰다. 이 방법으로 수집된 분획을 SDS-PAGE로 분석하고, 고순도 분획을 풀링시켰다. 풀링된 분획을 멸균 여과하였다(0.22㎛m PVDF).

[1279] 샘플을 Nanodrop 2000 분광광도계를 사용하여 UV-A280으로 정량하고, SEC 및 SDS-PAGE로 분석하였다. 실시예 51을 용액으로 1.7㎎(14% 수율)으로 생성시켰다. SDS-PAGE에 의한 순도: >99%. 분석용 SEC에 의한 순도: 98.3%.

[1280] **실시예 52**

[1281] **예시적인 rIL-2-[PEG]$_2$ 접합체의 활성**

[1282] 알데스류킨(대조군), 실시예 15, 17, 19, 20, 22, 26, 27, 37 내지 49의 활성을 CTLL-2 세포를 사용하여 세포 증식 검정으로 평가하였다.

[1283] 37℃에서 5% CO_2 분위기 하에서 CTLL-2 세포(마우스 세포독성 T 림프구 세포주)를 10% 우태아 혈청 및 10% IL-2 배양 보충제(ConA(콘카나발린-A) 함유 T-STIM™)가 보충된 완전 RPMI 1640에서 유지시켰다. 세포를 세포가 스플리팅 전에 2 내지 3×10^5개 세포/㎖의 세포 밀도에 도달할 때까지 현탁액에서 배양시켰다.

[1284] 활성 검정의 경우, 마지막 스플리트 3 내지 4일 후에, 세포를 둘베코 인산염 완충 식염수로 3회 세척하였다. 그 다음 세포를 T-STIM™이 없는 보충 배지에 약 5×10^5개 세포/㎖의 세포 밀도로 재현탁시키고, 96웰 백색 벽 투명 바닥 마이크로플레이트에 90㎕/웰로 플레이팅하였다. 인큐베이션 과정 동안 접합체의 방출을 최소화하기 위해서, pH 6.7 내지 7로 조정된 보충 배지(T-STIM™ 없음)를 사용하여 또한 실험을 수행하였다. 그 다음, T-STIM™이 없는 보충 배지에 희석된 10마이크로l의 10X 농도의 시험 화합물을 첨가하였다. 세포를 37℃에서 5% CO_2 분위기에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 48시간 인큐베이션 후, CCK8 시약을 첨가하고(20㎕/웰), 37℃에서, 5% CO_2에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 다음 플레이트를 Molecular devices Spectra Max i3X를 사용하여 450nM 및 630nM에서 판독하였다.

[1285] 방출된 IL-2 및 방출되지 않은 접합체의 활성을 시험하였다. 시험 화합물을 산성 (10mM 아세트산나트륨 완충액, pH 4) 하에서 저장하여 접합을 안정화시켰다. 접합체의 활성을 시험하기 위해서, 샘플을 검정 약 1시간 전에 저장 배지에서 보충 배지로 희석시켰다. 방출된 IL-2의 활성을 시험하기 위해서, 방출 가능한 접합체를 100mM(최종 농도) 중탄산나트륨 완충액, pH 9로 10배 희석시키고, 검정 시작 전 8시간 동안 37℃에서 사전 인큐베이션시켰다.

[1286] 세포 증식에 대한 EC_{50} 값(최대 반응의 50%를 나타내는 데 필요한 시험 화합물의 농도)을 GraphPad's Prism 5.01 소프트웨어를 사용하여 용량-반응 곡선의 비-선형 회귀 분석으로부터 얻었다.

[1287] IL-2 및 접합체의 활성을 세포 증식 검정을 사용하여 측정하고, 결과의 요약을 하기 표 3에 나타낸다. 모든 시험 물품은 일부 실시예를 도 4A 내지 도 4E에 도시한 것처럼 용량-의존적 방식으로 CTLL-2 세포의 성장을 유도하였다. 표 3 및 도 4A 내지 4E에 나타낸 바와 같이, IL-2의 방출을 유도하는 조건 하에서 실시예 15, 17, 19, 20, 22, 27, 37 내지 49로부터의 접합체를 사전 인큐베이션시킨 후, 활성은 회복되었다. 이들 접합체로부터 방

출된 IL-2는 대조군 IL-2에 상대적인 효력을 나타내었다.

표 3

IL-2 및 PEG-IL-2 접합체에 응답한 CTLL-2 세포 증식의 요약.

시험 화합물	EC50(ng/mL)
IL-2 대조군	3.96
실시예 15: [20K mPEG-(F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	58.17
실시예 15: [20K mPEG-(F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	1.71
실시예 17: [20K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	50.80
실시예 17: [20K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	1.54
실시예 19: [20K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	40.87
실시예 19: [20K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	2.45
실시예 22: [mPEG$_2$-T_2-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	5.12
실시예 22: [mPEG$_2$-T_2-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	8.94
실시예 27: [mPEG$_2$-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	3.40
실시예 27: [mPEG$_2$-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	2.59
실시예 20: [20K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	50.82
실시예 20: [20K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	1.30
실시예 37: [15K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 37: [15K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	0.85
실시예 38: [15K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 38: [15K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	2.08
실시예 39: [15K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 39: [15K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	1.51
실시예 40: [15K mPEG-(F,CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 40: [15K mPEG-(F,CF_3-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출됨)	1.28
실시예 41: [15K mPEG-(Cl,CONH-Ph-SO_2)]$_z$-[rIL-2] (방출되지 않음)	116.0

[1288]

시험 화합물	EC50(ng/mL)
실시예 41: [15 KmPEG-(Cl,CONH-Ph-SO2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	0.90
실시예 42: [2x7.5K mPEG-(CF_3-Ph-Ar-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 42: [2x7.5 KmPEG-(CF3-Ph-Ar-SO2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	2.53
실시예 43: [2x7.5K mPEG-(CONH-Ph-R-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 43: [2x7.5 KmPEG-(CONH-Ph-R-SO2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	1.85
실시예 44: [2x7.5K mPEG-(CF_3-Ph-R-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 44: [2x7.5 KmPEG-(CF3-Ph-R-SO2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	0.71
실시예 45: [17K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 45: [17K mPEG-(CF_3-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	1.87
실시예 46: [17K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 46: [17K mPEG-(Cl-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	7.52
실시예 47: [17K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 47: [17K mPEG-(F,F-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	0.85
실시예 48: [17K mPEG-(F,CF_3-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	해당 없음
실시예 48: [17K mPEG-(F,CF_3-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	1.21
실시예 49: [17K mPEG-(Cl,CONH-Ph-SO_2)]$_x$-[rIL-2] (방출되지 않음)	176
실시예 49: [17 KmPEG-(Cl,CONH-Ph-SO2)]$_x$-[rIL-2] (방출됨)	1.48
실시예 26 (10K-티오브릿지)-IL-2	2.73

[1289]

[1290] **실시예 53**

[1291] **예시적인 rIL-2-[PEG]$_x$ 접합체의 pH 방출 연구**

[1292] 시험 샘플을 P2 칼럼을 사용하여 100mM PBS, pH 7.4로 완충액 교환시켰다. 칼럼으로부터의 용리물을 여과하고(0.2㎛ PVDF 필터), Nanodrop 분광광도계를 사용하여 UV-A280으로 정량하였다. 샘플을 100mM PBS, pH 7.4를 사용하여 0.1mg/mℓ로 희석시켰다. 14개의 바이알(2개 반복의 7개 시점)에 시험 샘플(100㎕)을 로딩하였다. 2개의 바이알을 2M 아세트산으로 즉시 반응정지시키고, -80℃에서 동결시켰다(t = 0 h). 남아있는 12개의 바이알을 37℃에서 인큐베이션시켰다. 미리 결정된 시점(t = 6, 24, 48, 72, 96 및 120h)에, 2개의 바이알을 37℃에서의 저장으로부터 꺼내고, 원심분리시키고(1.5분, 4000g), 2M 아세트산으로 반응정지시키고, 그 다음 -80℃에서 동결시켰다. 모든 시점 샘플을 수집한 후, 샘플을 해동시키고, SDS-PAGE로 분석하였다. 겔의 농도계 분석에 의해서 평균 PEG:IL-2 비율을 결정하고, 이들 데이터를 변환시키고, GraphPad Prism v7.04를 사용하여 시간에 대해 플로팅하고, 링커 절단 반감기를 결정하고, 표 4에 요약하였다. $T_{1/2}$은 접합체에서 IL-2로부터 PEG의 양의 절반을 방출하기까지의 시간으로서 결정되었다.

표 4

PEG-IL-2 접합체의 링커 절단 반감기.

시험 화합물	T1/2(hr)
실시예 15: [20 KmPEG-(F-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	299
실시예 17: [20 KmPEG-(CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	69
실시예 19: [20 KmPEG-(Cl-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	183
실시예 22: [mPEG$_2$-T$_2$-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2]	44
실시예 20: [20 KmPEG-(F,F-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	86
실시예 21: [20 KmPEG-(F,CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	57
실시예 37: [15 KmPEG-(CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	82
실시예 38: [15 KmPEG-(Cl-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	179
실시예 39: [15 KmPEG-(F,F-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	60
실시예 40: [15 KmPEG-(F,CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	53
실시예 41: [15 KmPEG-(Cl,CONH-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	37
실시예 42: [2x7.5 KmPEG-(CF3-Ph-Ar-SO2)]$_z$-[rIL-2]	84
실시예 43: [2x7.5 KmPEG-(CONH-Ph-R-SO2)]$_z$-[rIL-2]	257
실시예 44: [2x7.5 KmPEG-(CF3-Ph-R-SO2)]$_z$-[rIL-2]	55
실시예 45: [17 KmPEG-(CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	89
실시예 46: [17 KmPEG-(Cl-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	184
실시예 47: [17 KmPEG-(F,F-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	74
실시예 48: [17 KmPEG-(F,CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	58
실시예 49: [17 KmPEG-(Cl,CONH-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	30

[1293]

[1294] **실시예 54**

[1295] **피하 B16F10 흑색종 효능 연구**

[1296] $1 X 10^5$ B16F10개 세포를 각각 7 내지 9주령의 동계 C57BL/6 마우스 각각의 등 가운데 영역에 피하로 이식하였다. 종양을 감지할 수 있는 크기, 즉, 70 내지 120cu ㎜로 성장시키고, 그 후 무작위화하고, 지정된 바와 같이 군(n=8)에 배정하였다. 마우스에게 시험 화합물, 즉, rIL-2, rIL-2-중합체 접합체 또는 비히클을 표 5 내지 표 9에 제시된 바와 같이 상이한 용량 농도 및 투여 요법으로 투여하였다. 체중 및 종양 부피를 2일 또는 3일마다 측정하였다. 본 연구의 종점은 주어진 군에 대해서 중간 종양 부피가 2000cu ㎜에 도달하기까지의 시간이었다.

표 5

실시예 54, 도 5에 대한 군 배정.

시험 화합물	투여 농도(mg/kg)	투여 경로	용량
비히클: 10mM 아세트산나트륨, 150mM NaCl, pH 4.5	0	IV	q1d
rIL-2 대조군	3	IP	b.i.d. x 5
실시예 15 [20 KmPEG-(F-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	5	IV	q1d
실시예 17 [20 KmPEG-(CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	5	IV	q1d
실시예 19 [20 KmPEG-(Cl-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	5	IV	q1d
실시예 22 [mPEG$_2$-T$_2$-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2]	5	IV	q1d
실시예 27 [mPEG2-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2]	5	IV	q1d

주석: "b.i.d x 5"는 5 일 동안 1 일 2 회를 의미하고; "q1d"는 1 일 동안 1 회 용량을 의미한다.

[1297]

표 6

실시예 54, 도 6에 대한 군 배정.

시험 화합물	투여 농도(mg/kg)	투여 경로	용량
비히클: 10mM 아세트산나트륨, 150mM NaCl, pH 4.5	0	IV	q1d
rIL-2 대조군	3	IP	b.i.d. x 5
실시예 27 [mPEG2-Fmoc-20K]$_z$-[rIL-2]	4	IV	q1d
실시예 26 (10K-Thio 브릿지)-IL-2	4	IV	q1d
실시예 20: [20 KmPEG-(F,F-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	4	IV	q1d
실시예 21: [20 KmPEG-(F,CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	4	IV	q1d

주석: "b.i.d x 5"는 5 일 동안 1 일 2 회를 의미하고; "q1d"는 1 일 동안 1 회 용량을 의미한다.

[1298]

표 7

실시예 54, 도 7에 대한 군 배정.

시험 화합물	투여 농도(mg/kg)	투여 경로	용량
비히클: 10mM 아세트산나트륨, 150mM NaCl, pH 4.5	0	IV	qd, 제 13 일, 제 21 일 및 제 29 일에 투여
rIL-2 대조군	3	IP	b.i.d. x 5, 2주기, 제 13 일(PM), 제 14 일, 제 15 일, 제 16 일, 제 17 일, 제 18 일 (AM) 및 제 19 일(PM), 제 20 일, 제 21 일, 제 22 일, 제 23 일, 제 24 일(AM)에 투여
실시예 17 [20 KmPEG-(CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	2	IV	qd, 제 13 일, 제 21 일 및 제 29 일에 투여
실시예 37: [15 KmPEG-(CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	2	IV	qd, 제 13 일, 제 21 일 및 제 29 일에 투여
실시예 38: [15 KmPEG-(Cl-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	2	IV	qd, 제 13 일, 제 21 일 및 제 29 일에 투여
실시예 39: [15 KmPEG-(F,F-	2	IV	qd, 제 13 일,

[1299]

시험 화합물	투여 농도(mg/kg)	투여 경로	용량
Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]			제 21 일 및 제 29 일에 투여
실시예 40: [15 KmPEG-(F,CF3-Ph-SO2)]$_z$-[rIL-2]	2	IV	qd, 제 13 일, 제 21 일 및 제 29 일에 투여

주석: "b.i.d x 5"는 5 일 동안 1 일 2 회를 의미하고; "qd"는 1 일 동안 1 회 용량을 의미한다.

[1300]

표 8

실시예 54, 도 8에 대한 군 배정.

시험 화합물	투여 농도(mg/kg)	투여 경로	용량
비히클: 10mM 아세트산나트륨, 150mM NaCl, pH 4.5	0	IV	Q1w x 2
rIL-2 대조군	3	IP	b.i.d. x 5, 2 주기
실시예 43: [2x7.5 KmPEG-(CONH-Ph-R-SO2)]$_2$-[rIL-2]	3	IV	Q1w x 2
실시예 41: [15 KmPEG-(Cl,CONH-Ph-SO2)]$_2$-[rIL-2]	3	IV	Q1w x 2
실시예 44: [2x7.5 KmPEG-(CF3-Ph-R-SO2)]$_2$-[rIL-2]	3	IV	Q1w x 2
실시예 40: [15 KmPEG-(F,CF3-Ph-SO2)]$_2$-[rIL-2]	3	IV	Q1w x 2

주석: "b.i.d x 5"는 5일 동안 1일 2회를 의미하고; "q1w x 2"는 2주기 동안 1주 2회를 의미한다.

[1301]

표 9

실시예 54, 도 9에 대한 군 배정.

시험 화합물	투여 농도(mg/kg)	투여 경로	용량
비히클: 10mM 아세트산나트륨, 150mM NaCl, pH 4.5	0	IV	Q1w x 3
rIL-2 대조군	3	IP	b.i.d. x 5, 2 주기
실시예 42: [2x7.5 KmPEG-(CF3-Ph-Ar-SO2)]$_2$-[rIL-2]	2	IV	Q1w x 3
실시예 45: [17 KmPEG-(CF3-Ph-SO2)]$_2$-[rIL-2]	2	IV	Q1w x 3
실시예 46: [17 KmPEG-(Cl-Ph-SO2)]$_2$-[rIL-2]	2	IV	Q1w x 3
실시예 47: [17 KmPEG-(F,F-Ph-SO2)]$_2$-[rIL-2]	2	IV	Q1w x 3
실시예 48: [17 KmPEG-(F,CF3-Ph-SO2)]$_2$-[rIL-2]	2	IV	Q1w x 3
실시예 49: [17 KmPEG-(Cl,CONH-Ph-SO2)]$_2$-[rIL-2]	2	IV	Q1w x 3

주석: "b.i.d x 5"는 5일 동안 1일 2회를 의미하고; "q1w x 3"은 3주기 동안 1주 2회를 의미한다.

[1302]

[1303] 상이한 투여 방식으로 rIL-2 및 rIL-2-중합체 접합체를 투여한 후 종양 성장 저해를 도 5 내지 도 9에 제공한다. 이들 결과는, 평가된 rIL-2-중합체 접합체가 5일 동안 1일 2회 3㎎/㎏으로 투여된 더 낮은 용량에서 rIL-2보다 더 양호한 효능을 갖는다는 것을 나타낸다. IL-2-PEG 접합체에 대한 마우스 모델에서 어떠한 가시적인 독성도 관찰되어 않은 반면, IL-2 군 마우스는 무기력 및 몸의 오한 증상을 나타내었다. 상이한 링커를 통해 부착된 IL-2-PEG 접합체는 상이한 항-종양 활성을 보유하였다. 30 내지 80시간의 가수분해 속도를 갖는 접합체가 최적의 항종양 효능을 나타내었다.

도면

도면1

```
1      ATGCCAACCTCCTCCTCTACCAAGAAAACTCAACTGCAACTGGAACACCTGCTGCTGGAT
1       M  P  T  S  S  S  T  K  K  T  Q  L  Q  L  E  H  L  L  L  D

61     CTGCAAATGATTCTGAACGGCATTAACAACTACAAGAACCCGAAACTGACCCGTATGCTG
21      L  Q  M  I  L  N  G  I  N  N  Y  K  N  P  K  L  T  R  M  L

121    ACCTTCAAATTCTATATGCCGAAGAAAGCTACCGAACTGAAACACCTGCAATGCCTGGAA
41      T  F  K  F  Y  M  P  K  K  A  T  E  L  K  H  L  Q  C  L  E

181    GAGGAGCTGAAACCGCTGGAGGAGGTTCTGAACCTGGCTCAGAGCAAGAACTTTCATCTG
61      E  E  L  K  P  L  E  E  V  L  N  L  A  Q  S  K  N  F  H  L

241    CGTCCACGTGACCTGATTTCCAACATCAACGTTATCGTTCTGGAACTGAAAGGTAGCGAA
81      R  P  R  D  L  I  S  N  I  N  V  I  V  L  E  L  K  G  S  E

301    ACCACTTTCATGTGCGAGTACGCTGACGAAACCGCTACCATCGTTGAATTTCTGAACCGC
        T  T  F  M  C  E  Y  A  D  E  T  A  T  I  V  E  F  L  N  R
101
361    TGGATCACCTTCTCTCAGTCCATTATCTCTACTCTGACCTAA  ( 서열번호  2)
121     W  I  T  F  S  Q  S  I  I  S  T  L  T  *  ( 서열번호  3)
```

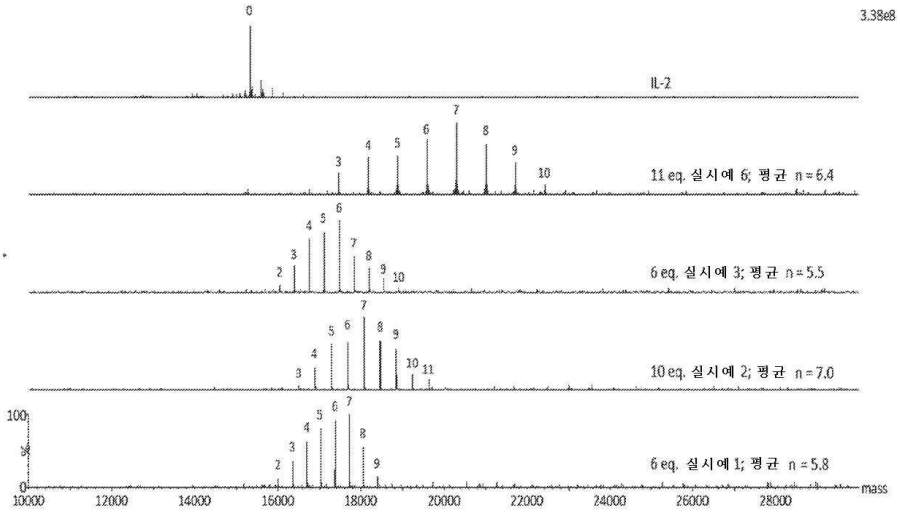
서열번호1:

PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA

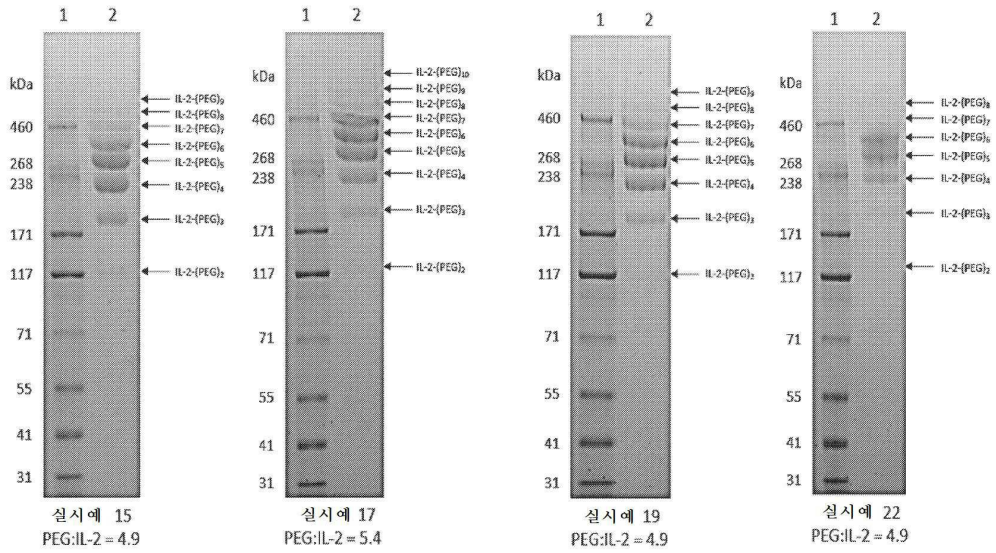
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE

TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT

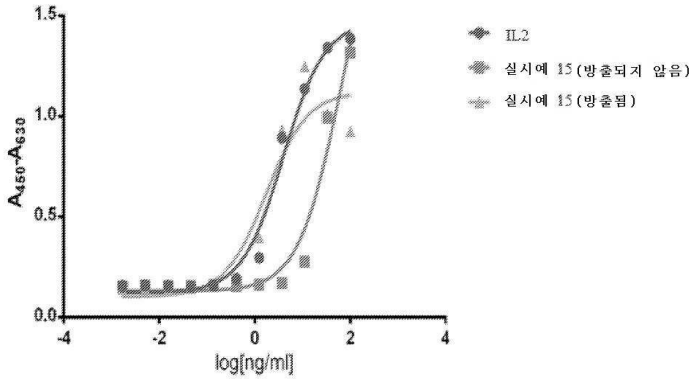
도면2



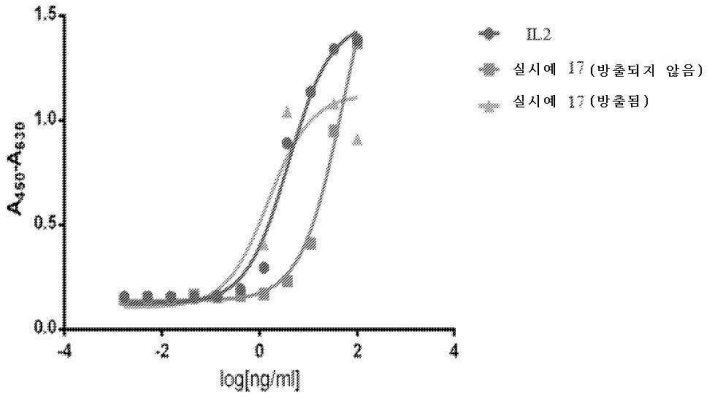
도면3



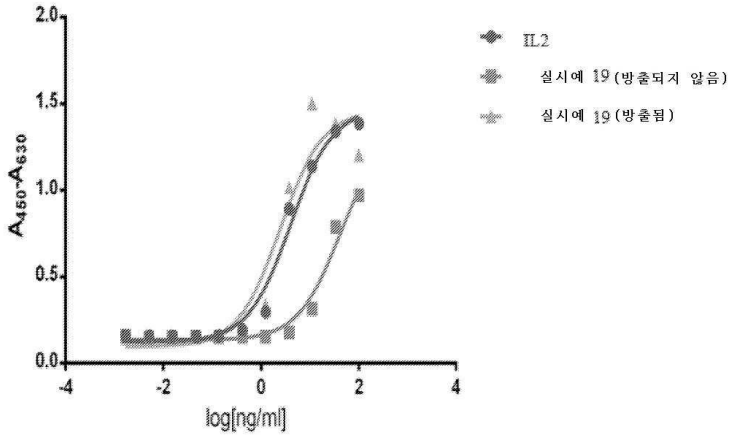
도면4a



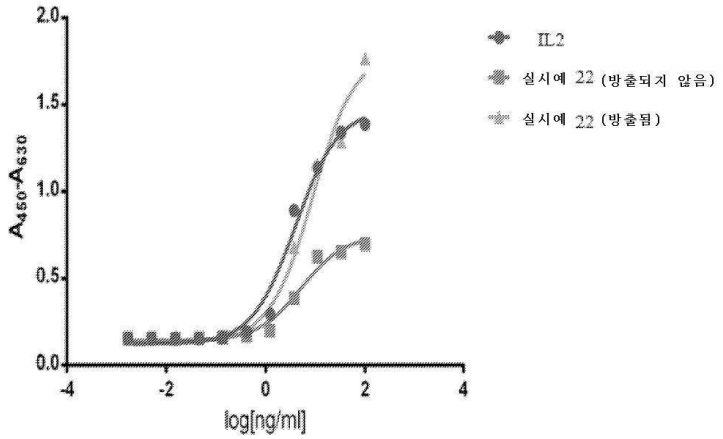
도면4b



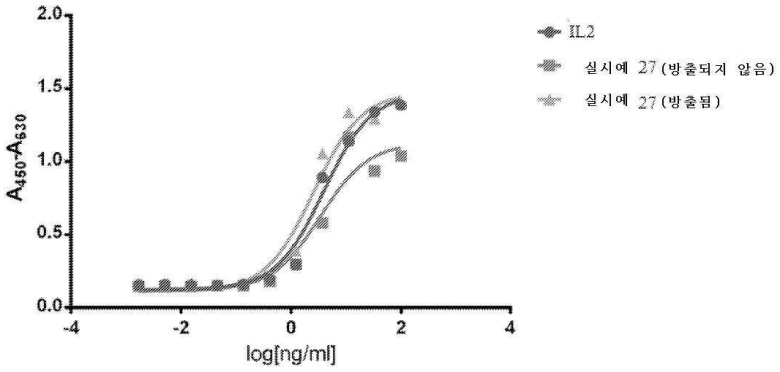
도면4c



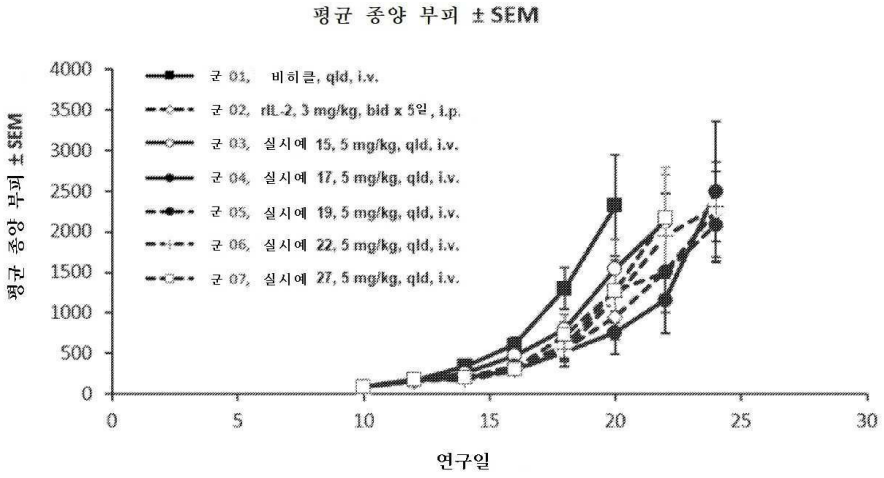
도면4d



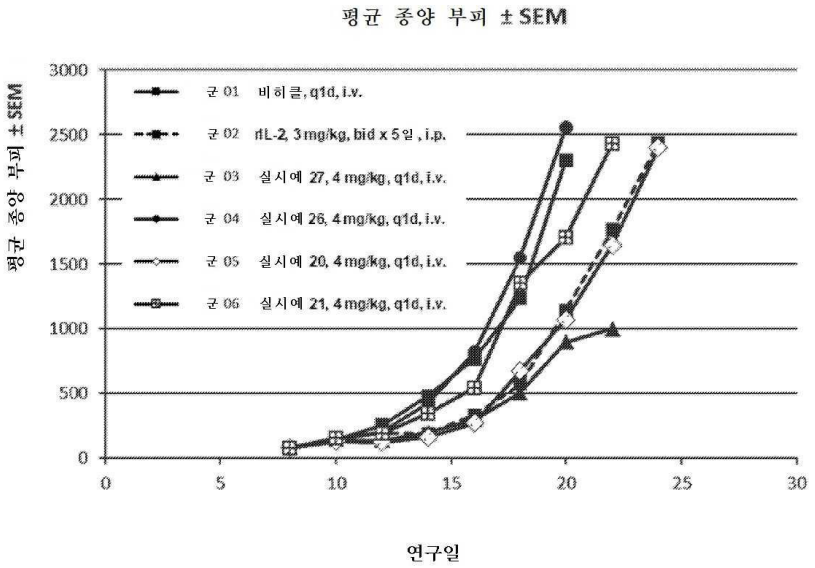
도면4e



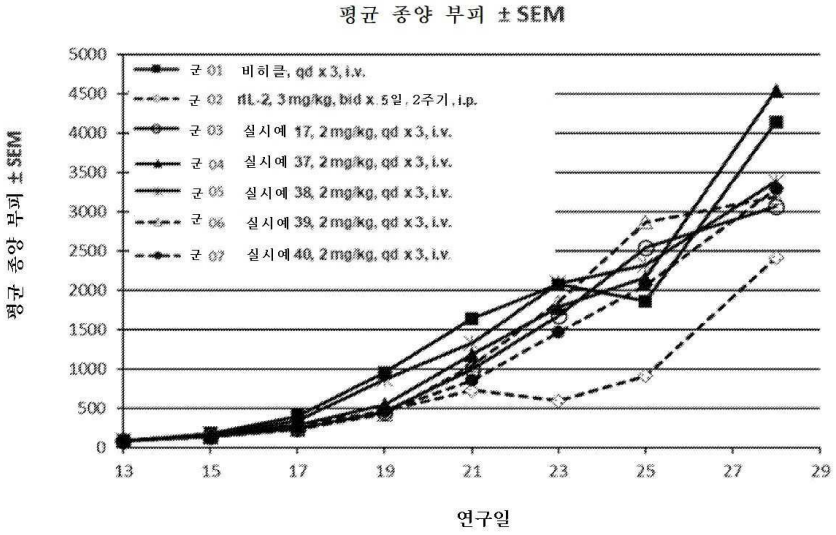
도면5


평균 종양 부피 ± SEM
평균 종양 부피 ± SEM
연구일
군 01, 비히클, qld, i.v.
군 02, rIL-2, 3 mg/kg, bid x 5일, i.p.
군 03, 실시예 15, 5 mg/kg, qld, i.v.
군 04, 실시예 17, 5 mg/kg, qld, i.v.
군 05, 실시예 19, 5 mg/kg, qld, i.v.
군 06, 실시예 22, 5 mg/kg, qld, i.v.
군 07, 실시예 27, 5 mg/kg, qld, i.v.
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30

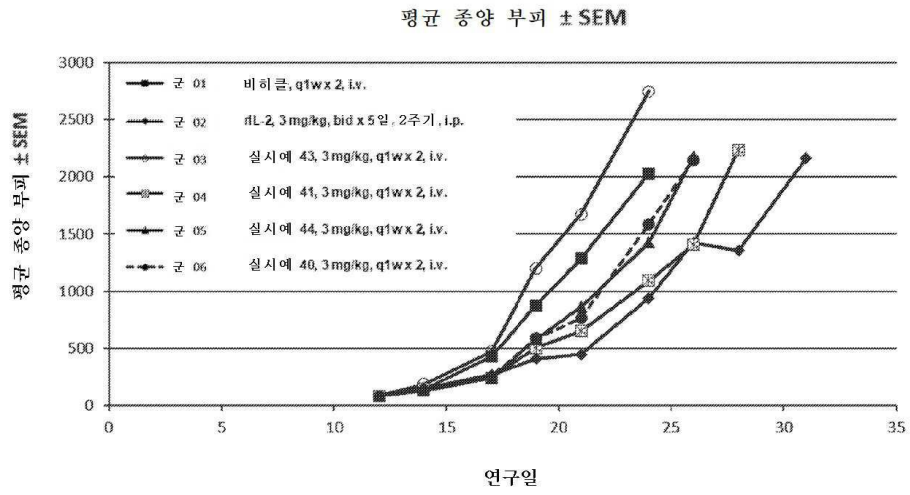
도면6


평균 종양 부피 ± SEM
평균 종양 부피 ± SEM
연구일
군 01 비히클, q1d, i.v.
군 02 rIL-2, 3 mg/kg, bid x 5일, i.p.
군 03 실시예 27, 4 mg/kg, q1d, i.v.
군 04 실시예 26, 4 mg/kg, q1d, i.v.
군 05 실시예 20, 4 mg/kg, q1d, i.v.
군 06 실시예 21, 4 mg/kg, q1d, i.v.
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30

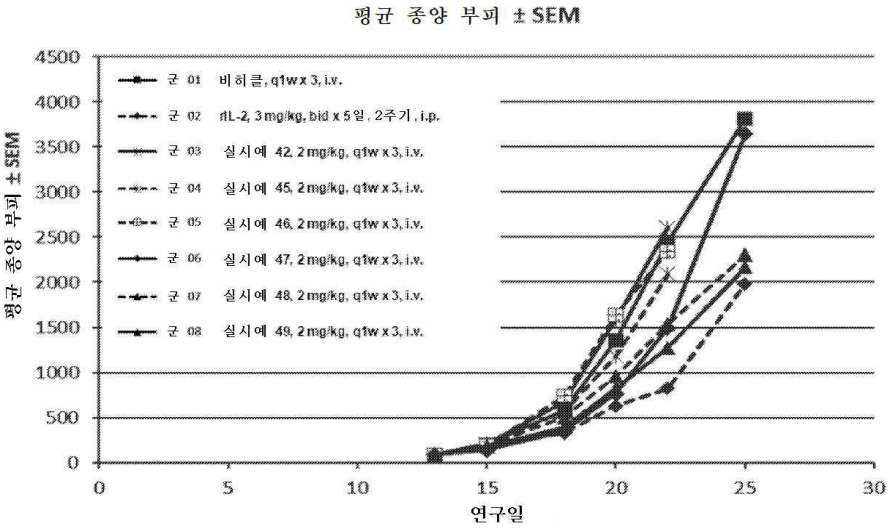
도면7


평균 종양 부피 ± SEM
평균 종양 부피 ± SEM
연구일
군 01 비히클, qd x 3, i.v.
군 02 rIL-2, 3 mg/kg, bid x 5일, 2주기, i.p.
군 03 실시예 17, 2 mg/kg, qd x 3, i.v.
군 04 실시예 37, 2 mg/kg, qd x 3, i.v.
군 05 실시예 38, 2 mg/kg, qd x 3, i.v.
군 06 실시예 39, 2 mg/kg, qd x 3, i.v.
군 07 실시예 40, 2 mg/kg, qd x 3, i.v.
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
13
15
17
19
21
23
25
27
29

도면8



도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Beijing Xuanyi PharmaSciences Co., Ltd.

<120> PROTEIN-MACROMOLECULE CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> WO/2021/067458

<140> PCT/US2020/053572

<141> 2020-09-30

<150> US 62/908,435

<151> 2019-09-30

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant IL-2

<400> 1

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant IL-2

<400> 2

atgccaacct cctcctctac caagaaaact caactgcaac tggaacacct gctgctggat 60

ctgcaaatga ttctgaacgg cattaacaac tacaagaacc cgaaactgac ccgtatgctg 120

accttcaaat tctatatgcc gaagaaagct accgaactga aacacctgca atgcctggaa 180

gaggagctga aaccgctgga ggaggttctg aacctggctc agagcaagaa ctttcatctg 240

cgtccacgtg acctgatttc caacatcaac gttatcgttc tggaactgaa aggtagcgaa 300

accactttca tgtgcgagta cgctgacgaa accgctacca tcgttgaatt tctgaaccgc 360

tggatcacct tctctcagtc cattatctct actctgacct aa 402

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant IL-2

<400> 3

Met Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 4

aatcatatgg cacctacttc aagttctaca aa 32

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 5

aatttatcaa gttagtgttg agatgat 27