

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0041610
(43) 공개일자 2022년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6854 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0125094

(22) 출원일자 2020년09월25일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

홍승택

서울특별시 송파구 송파대로 567, 510동 1502호 (잠실동, 아파트)

김은선

서울특별시 강남구 선릉로 120, 개포1차우성아파트 11-105

(74) 대리인

특허법인 피씨알

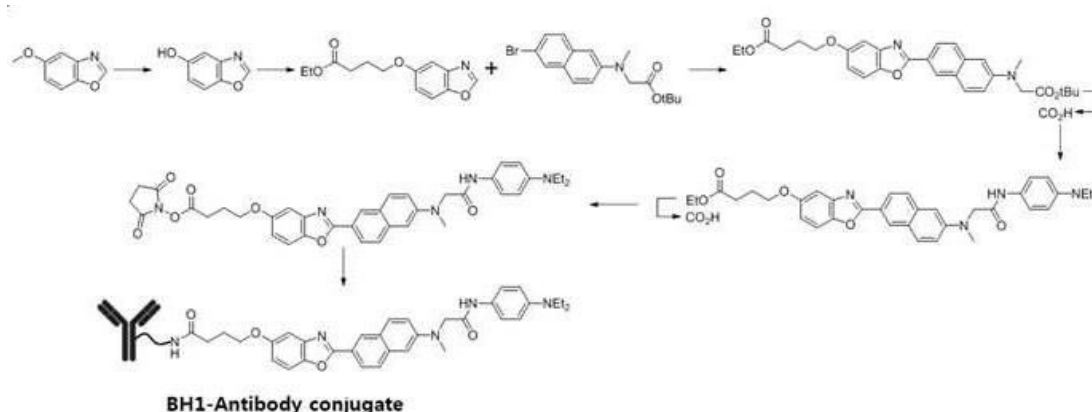
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 항체-pH 표지자 접합체 및 항체-기준 형광 표지자 접합체를 포함하는 항체의 치료 반응성 예측용 조성물

(57) 요약

이광자 형광 프로브인 BH1이 접합된 항체-BH1 접합체는 살아있는 세포 내부의 리소좀 활성을 측정함으로써 항체의 치료 반응성을 예측할 수 있으며, 기준 형광 표지자 역할을 하는 또 다른 이광자 형광 프로브 Pyr1이 접합된 항체-Pyr1 접합체와 함께 이용함으로써 항체의 치료 반응성을 더욱 정확히 예측할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류
G01N 2800/52 (2021.08)

명세서

청구범위

청구항 1

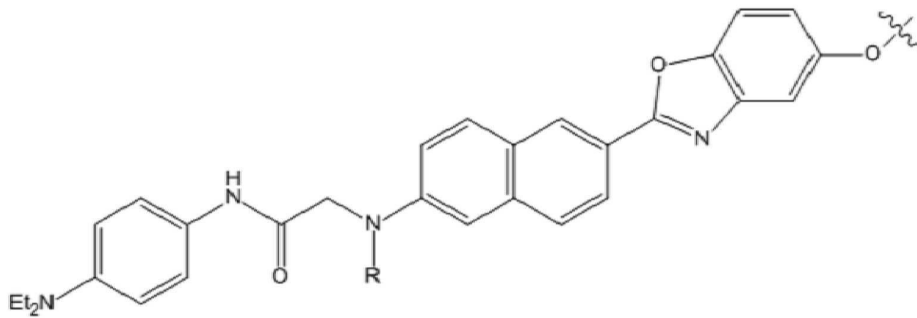
항체, 링커, 및 BH1을 포함하는 항체-BH1 접합체로서,

상기 BH1은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,

상기 BH1은 링커에 의해 항체에 결합된,

항체-BH1 접합체:

[화학식 1]



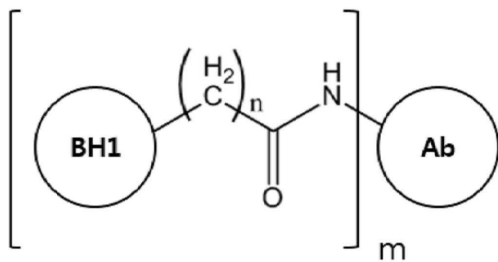
상기 화학식 1에서 R은 H, 또는 탄소수 1 내지 3의 알킬기이고, 물결선(wavy line)은 링커와의 연결지점이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 BH1의 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 것인, 항체-BH1 접합체:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서 n은 1 내지 5의 정수이고, m은 1 내지 10의 정수이다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체는 세포 표면 단백질에 결합하는 치료용 항체인,

항체-BH1 접합체.

청구항 4

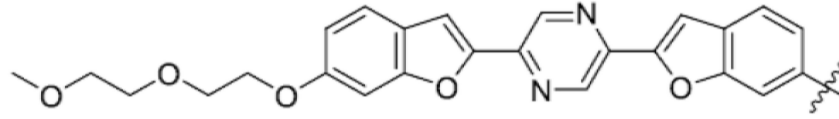
항체, 링커, 및 Pry1을 포함하는 항체-Pyr1 접합체로서,

상기 Pyr1은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물이고,

상기 Pyr1은 링커에 의해 항체에 결합된,

항체-Pyr1 접합체:

[화학식 3]



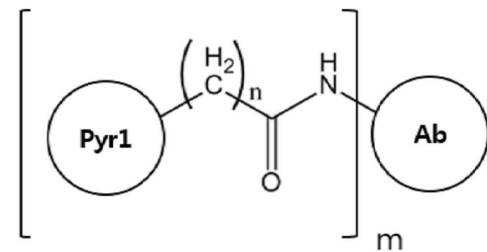
상기 화학식 3의 물결선(wavy line)은 링커와의 연결지점이다.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 Pyr1의 링커는 하기 화학식 4로 표시되는 것인, 항체-Pyr1 접합체:

[화학식 4]



상기 화학식 4에서 m은 1 내지 5의 정수이고, m은 1 내지 10의 정수이다.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 항체는 세포 표면 단백질에 결합하는 치료용 항체인,

항체-Pyr1 접합체.

청구항 7

제1항의 항체-BH1 접합체를 포함하는 항체의 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

제4항의 항체-Pyr1 접합체를 더 포함하는 항체의 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 항체는 인플리시맙이고, 상기 치료 반응성은 만성 염증성 질환인,

항체의 치료 반응성 예측용 조성물.

청구항 10

제7항의 조성물을 포함하는 세투시맙 치료 반응성 예측용 키트.

청구항 11

생물학적 시료를 준비하는 단계;

상기 시료와 제1항의 항체-BH1 접합체 및 제4항의 항체-Pyr1 접합체를 접촉시키는 단계; 및

상기 항체-BH1 접합체 및 항체-Pyr1 접합체의 형광을 측정하여 I_{BH1}/I_{Pyr1} 값을 얻는 단계를 포함하는,

항체의 치료 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 항체-pH 표지자 접합체 및 항체-기준 형광 표지자 접합체를 포함하는 항체의 치료 반응성 예측용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 세투시맵(Cetuximab)은 암 세포 표면의 EGFR 수용체에 결합하여 작동하는 암 치료제이다. 이 때문에 세투시맵의 최초 개발단계에서는 EGFR 수용체가 많이 발현되는 암일수록 효과가 우수할 것으로 예상하였으며, 병리학적 조직검사인 immunohistochemistry 방법을 통하여 환자의 암조직의 EGFR 발현 정도를 보고 투여여부를 결정하였다. 그러나 이후 세투시맵의 효과는 EGFR 수용체의 발현 정도와 상관관계가 높지 않다는 점이 밝혀졌다.
- [0003] 현재는 환자의 유전자에 RAS 돌연변이가 존재하는지 여부로 세투시맵의 치료 반응성을 예측하고 있으며, 임상에서도 RAS 돌연변이가 없는 경우에만 보험이 적용된다. 그러나 유전자 검사는 상당한 비용과 시간이 소요되어 세투시맵의 투여여부를 신속하고 간편하게 결정하기 어려운 문제가 있다.
- [0004] 인플리시맵(Infliximab)은 면역 체계에 이상이 생겨 발생하는 과도하고 지속적인 염증성 질환의 치료에 사용되는 치료용 항체이다. TNF- α 는 정상적인 신체에서 면역 세포와 염증을 조절하여 면역반응에 중요한 역할을 하지만, 과도하게 생성되는 경우 만성 염증성 질환의 원인이 된다. 인플리시맵은 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체로써 TNF- α 가 활성화되는 것을 억제하고 TNF- α 를 생산하는 세포의 분해를 일으켜 만성 염증성 질환을 치료 또는 개선한다.
- [0005] 세투시맵의 치료 효과는 리소좀 활성화와 연관되어 있음이 보고 되었으며, 인플리시맵의 작용 기전을 고려하면 이의 치료 효과 역시 리소좀 활성화와 연관성이 있음이 추정된다. 리소좀 활성을 측정하기 위해 기존에 개발된 pH 표지자 물질들을 이용할 수 있다. 그러나 치료용항체-pH 표지자 접합체를 이용하여 리소좀의 활성을 측정하거나, 항체의 치료 반응성을 예측하는 용도로 사용한 예는 아직 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) (비특허문헌 0001) RAS testing and cetuximab treatment for metastatic colorectal cancer: a cost-effectiveness analysis in a setting with limited health resources, Bin Wu et al., Oncotarget. 2017 Sep 19; 8(41): 71164-71172.

발명의 내용

해결하려는 과제

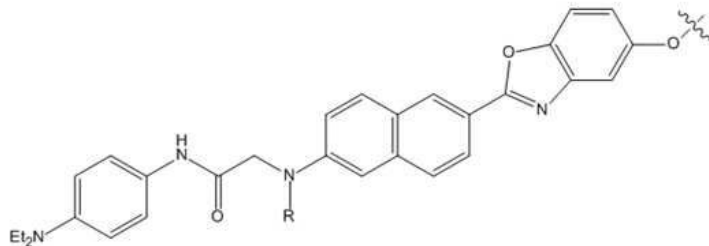
- [0007] 일 구체예에 따르면, 세포의 리소좀 pH를 측정할 수 있는 항체-BH1 접합체, 이를 포함하는 항체의 치료 반응성 예측용 조성물, 및 이를 이용하여 항체의 치료 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 일 양상은, 항체, 링커, 및 BH1을 포함하는 항체-BH1 접합체로서, 상기 BH1은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물

이고, 상기 BH1은 링커에 의해 항체에 결합된, 항체-BH1 접합체를 제공한다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R은 H, 또는 탄소수 1 내지 3의 알킬기이고, 물결선(wavy line)은 링커와의 연결지점이다. 상기 알킬기는 직선형(normal) 또는 분지형(branch)일 수 있다.

상기 항체-BH1 접합체는 항체의 세포 내 이입(endocytosis) 특성을 이용하여 리소솜 활성을 정확하고 간편하게 측정할 수 있다.

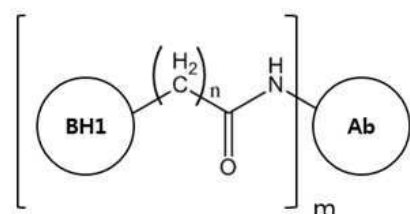
상기 항체는 세포 표면 단백질에 결합하는 항체일 수 있으며, 예를 들면 EGFR 또는 TNF- α (tumor necrosis factor- α)와 결합하는 항체일 수 있다. 상기 항체는 치료용 항체로서 세투시맵(cetuximab), 또는 인플리시맵(infliximab)일 수 있다. 세투시맵은 단일클론 치료용 항체로써 주로 대장암 또는 두경부암 치료에 사용되는 표적 항암제이다. 세투시맵은 EGFR(epidermal growth factor receptor)의 억제제이며, 대장암, 폐암, 및 두경부암 치료에 효과가 있다고 알려져 있다. 인플리시맵은 면역 체계에 이상이 생겨 발생하는 과도하고 지속적인 염증성 질환 치료에 사용되는 치료용 항체이며, TNF- α 를 제거하거나 억제하여 항염증 및 면역억제 효과를 나타낸다. 상기 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 단일쇄 항체 또는 항체의 단편일 수 있다.

상기 링커는 pH 표지자 또는 기준 형광 표지자를 공유결합을 통하여 항체에 결합시키는 부분을 말한다.

상기 BH1은 특정 pH 범위에 따라 형광을 나타낼 수 있으며, 예를 들면 pH 1 내지 8, pH 2 내지 8, pH 3 내지 8, pH 4 내지 8, pH 5 내지 8, pH 1 내지 7, pH 2 내지 7, pH 3 내지 7, pH 4 내지 7, pH 5 내지 7, pH 1 내지 6, pH 2 내지 6, pH 3 내지 6, pH 4 내지 6, pH 5 내지 6, pH 1 내지 5, pH 2 내지 5, pH 3 내지 5, pH 4 내지 5, pH 3 내지 5, pH 4 내지 5, 또는 pH 3 내지 4에서 형광을 나타낼 수 있다. 상기 BH1은 일광자 형광 프로브로서 사용될 수 있으며, 예를 들면 370 nm의 파장을 흡수하며, 466 nm에서 형광을 방출할 수 있다. 상기 BH1은 이광자 형광 프로브로서 사용될 수 있다. 이광자(Two photon) 형광 프로브는 낮은 에너지를 가진 광자 2개를 동시에 흡수하여 들뜬 상태에 도달하고 빛을 방출한다. 이광자 프로브에서 사용하는 장파장의 빛은 생체 조직에 거의 흡수되지 않아 빛의 손실이 적고, background emission이 거의 없으며, 이광자 흡수의 세기는 초점으로부터 거리의 네제곱에 반비례하여 이광자 형광은 빛의 초점에서만 방출된다. 이에 의해, 이광자 프로브를 이용하면 손상되지 않은 조직(intact tissue) 내부의 영상을 고화질로 얻을 수 있는 장점이 있다.

일 구체예에 따르면, 상기 BH1의 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 것일 수 있다.

[화학식 2]

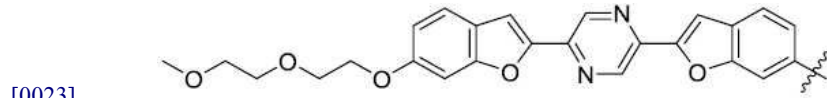


상기 화학식 2에서 n은 1 내지 5의 정수이고, m은 1 내지 10, 또는 1 내지 5의 정수이다. 상기 화학식 2에서 NH는 항체에서 유래한 아민기이다.

상기 항체-BH1 접합체에서, 하나의 항체에 결합된 BH1은 하나 또는 그 이상일 수 있으며, 예를 들면 1 내지 10개, 1 내지 9개, 1 내지 8개, 1 내지 7개, 1 내지 6개, 1 내지 5개 또는 1 내지 4개일 수 있다.

[0021] 다른 양상은, 항체, 링커, 및 Pyr1을 포함하는 항체-Pyr1 접합체로서, 상기 Pyr1은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물이고, 상기 Pyr1은 링커에 의해 항체에 결합된, 항체-Pyr1 접합체를 제공한다.

[0022] [화학식 3]

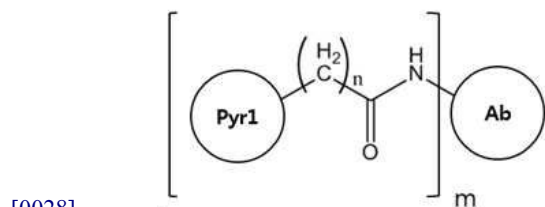


[0024] 상기 화학식 3의 물결선(wavy line)은 링커와의 연결지점이다.

[0025] 상기 Pyr1은 일광자 프로브로서 사용될 수 있으며, 예를 들면 438nm의 파장을 흡수하여 610 nm에서 형광을 방출할 수 있다. 예를 들면, Pyr1은 353 nm ($\epsilon = 2.1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) 및 438 nm ($\epsilon = 2.7 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) 파장을 흡수할 수 있으며, pH 7.4의 PBS에서 $\lambda_{fl} = 610 \text{ nm}$ 를 중심으로 형광을 방출할 수 있다. 상기 Pyr1은 이광자 형광 프로브로서 사용될 수 있다.

[0026] 일 구체예에 따르면, 상기 Pyr1의 링커는 하기 화학식 4로 표시되는 것일 수 있다.

[0027] [화학식 4]



[0029] 상기 화학식 4에서 n은 1 내지 5의 정수이고, m은 1 내지 10 또는 1 내지 5의 정수이다. 일 실시예에 따르면, n은 3일 수 있다.

[0030] 상기 항체-Pyr1 접합체에서, 하나의 항체에 결합된 Pyr1은 하나 또는 그 이상일 수 있으며, 예를 들면 1 내지 10 개, 1 내지 9 개, 1 내지 8 개, 1 내지 7 개, 1 내지 6 개, 1 내지 5 개 또는 1 내지 4개일 수 있다.

[0032] 또 다른 양상은 상기 항체-BH1 접합체를 포함하는 항체의 치료 반응성 예측용 조성물을 제공한다. 상기 항체는 세포 표면 단백질에 결합하여 치료 효과를 나타내는 항체일 수 있으며, 예를 들면 EGFR에 결합하는 항체 또는 TNF- α 에 결합하는 항체일 수 있고, 구체적으로는 세투시맵 또는 인플리시맵일 수 있다. 상기 항체-BH1 접합체는 세포 내 리소좀 활성 표지자일 수 있다.

[0033] 상기 항체-BH1 접합체의 예로써, 세투시맵-BH1 접합체는 암세포의 EGFR과 결합하여 세포 내부로 이동하며, 리소좀의 활성이 활발할수록 EGFR 분해가 활발하여 세투시맵의 치료 효과가 높고, 동시에 BH1의 형광을 강하게 발산할 수 있다. 따라서 세투시맵의 치료효과와 BH1의 형광 강도는 연관되어 있으므로 세투시맵의 치료 반응성을 확인할 수 있다.

[0034] 상기 항체의 치료 반응성 예측용 조성물은 상기 항체-Pyr1 접합체를 더 포함할 수 있다. 상기 항체-Pyr1 접합체는 기준 형광 표지자일 수 있다. 항체-Pyr1 접합체는 항체-BH1 접합체와 동일 또는 유사한 세포 침투활성을 가지며 리소좀 활성과 관계없이 형광을 발산하므로, 항체-BH1가 발산하는 형광의 강도에 대한 기준이 될 수 있다.

[0036] 또 다른 양상은 생물학적 시료를 준비하는 단계; 상기 시료와 상기 항체-BH1 접합체 및 상기 항체-Pyr1 접합체를 접촉시키는 단계; 및 상기 항체-BH1 접합체 및 항체-Pyr1 접합체의 형광을 측정하여 I_{BH1}/I_{Pyr1} 값을 얻는 단계를 포함하는 항체의 치료 반응성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0037] 상기 시료는 진단하고자 하는 질환을 가진 환자의 조직일 수 있다. 예를 들면 상기 시료는 EGFR을 발현하는 대장암, 두경부암, 또는 폐암의 세포 또는 조직일 수 있다. 또는 상기 시료는 TNF- α 를 발현하는 만성 염증성 질환 또는 자가면역질환이 발병한 부위의 조직으로써, 궤양성 대장염, 크론병, 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 또는 건선 발병 부위의 세포 또는 조직일 수 있다.

[0038] 상기 항체의 치료 반응성은 예를 들면 세투시맙의 대장암 치료 반응성 또는 인플리시맙의 만성 염증성 질환 치료 반응성일 수 있다. 상기 만성 염증성 질환은 예를 들면 궤양성 대장염, 크론병, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 또는 건선일 수 있다.

[0039] 상기 항체는 상술한 바와 동일하다.

[0040] 상기 I_{BH1} 는 BH1이 pH 환경에 따라 방출하는 형광의 강도를 의미한다. I_{pyr1} 는 Pyr1가 방출하는 형광의 강도로서 BH1의 형광 강도를 확인하기 위한 기준이 될 수 있다.

발명의 효과

[0042] 일 구체예에 따른 항체-BH1은 이광자 프로브인 BH1에 의해 살아있는 세포 내부의 리소좀 활성을 효과적으로 측정함으로써 항체의 치료 반응성을 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 일 실시예에 따른 항체-BH1 접합체의 제조 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 일 실시예에 따른 항체-Pyr1 접합체의 제조 과정을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

사용기기 및 측정조건

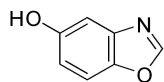
[0048] ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 300 (^1H NMR의 경우 300MHz, ^{13}C NMR의 경우 75MHz) 및 Bruker Avance III 500, 600 및 700 (^1H NMR의 경우 500, 600, 700MHz, ^{13}C NMR의 경우 151MHz)에 의해 측정되었다. 분광계는 CDCl_3 를 용매로 사용하고 내부 참조를 이용하였다(CDCl_3 : δ H 7.26; δ C 77.0).

[0049] 화합물의 고분해능 질량 스펙트럼 (HRMS)은 각각 질량 분석기 Waters SYNAPT G2 및 JEOL JMS-700에서 획득하였다. 화합물의 HRMS는 고해상도 TOF-MS (Time-of-Flight Mass Spectrometry) 모드에서 TripleTOF 6600을 사용하여 획득하였다. 질량 범위는 m/z 600과 4,000 사이에서 선택되었으며 소스 매개 변수는 최고 품질의 질량 데이터를 얻기 위해 최적화하였다. 전체 데이터 처리는 BioPharmaView™ 소프트웨어에서 수행하였다.

[0050] 자외선 가시광 흡수 및 형광 방출 스펙트럼은 각각 Agilent 8453 다이오드 어레이 UV-Vis 분광 광도계 및 Hitachi 형광 분광 광도계 F-7000로 측정하였다. 2 광자(TP) 여기(excitation)는 모드 잠금(mode-locked) Ti:sapphire 레이저 (Chameleon, 90MHz, 200fs; Coherent Inc.)를 사용하여 구현되었다. 모든 화학 시약은 상업적 공급 업체에서 구입했으며 달리 명시하지 않는 한 추가 정제 없이 사용하였다.

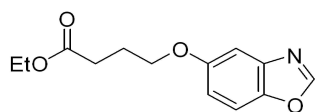
실시예 1: 세투시맙-BH1 접합체 제조

[0053] 5-메톡시벤조[d]옥사졸(5-methoxybenzo[d]oxazole)과 tert-부틸 N-(6-브로모나프탈렌-2-일)-N메틸글리시네이트(tert-butyl N-(6-bromonaphthalen-2-yl)-Nmethylglycinate)는 이전에 공개된 방법에 따라 합성하였다. (Chen, L.; Ju, L.; Bustin, K. A.; Hoover, J. M., Chem. Commun. 2015, 51 (81), 15059-15062.; Kim, H. J.; Han, J. H.; Kim, M. K.; Lim, C. S.; Kim, H. M.; Cho, B. R., Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49 (38), 6786-6789.) 다른 화합물의 합성 과정은 하기 내용과 같다.

[0054] 벤조[d]옥사졸-5-올의 합성

[0055]

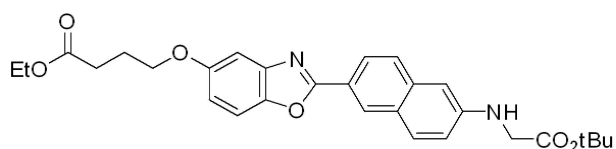
[0056] 벤조[d]옥사졸-5-올(benzo[d]oxazol-5-ol)의 합성 방법은 다음과 같다. 둥근 바닥 플라스크에 8.2 g 의 5-methoxybenzo[d]oxazole 를 100 mL 의 CH_2Cl_2 에 녹여 0°C 에서 교반하고, 37 g 의 AlCl_3 를 투입한 후 환류하였다. TLC를 이용하여 반응의 종결을 확인한 후 반응물을 냉각한 후에 증류수를 천천히 가하고 CH_2Cl_2 을 이용하여 추출하였다. 추출한 유기층은 무수 MgSO_4 로 수분을 제거하고 여과하여 감압 농축한 후 컬럼 크로마토그래피 (용리조건: 50% ethyl acetate in hexane) 로 분리하였다. 수율: 74%

[0058] 에틸 4-(벤조[d]옥사졸-5-일옥시)부타노에이트의 합성

[0059]

[0060] 에틸 4-(벤조[d]옥사졸-5-일옥시)부타노에이트(ethyl 4-(benzo[d]oxazol-5-yloxy)butanoate)는 다음 방법으로 합성하였다.

[0061] 둥근 바닥 플라스크에 5.7 g 의 ethyl 4-bromobutanoate, 3.6 g 의 benzo[d]oxazol-5-ol, 4.4 g 의 potassium carbonate 를 넣은 후 50 mL 의 DMF 로 녹인 후 80°C 에서 3 시간 동안 교반하였다. 반응의 종결을 TLC를 이용하여 확인한 후에 혼합물을 실온으로 냉각시키고 증류수와 ethyl acetate를 이용하여 추출하였다. 추출한 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 수분을 제거하고 여과하여 감압 농축한 후 컬럼 크로마토그래피 (용리조건: 33% ethyl acetate in hexane) 로 분리하였다. 수율: 78%

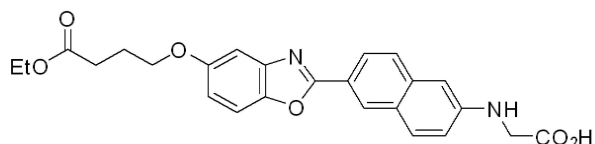
[0063] 에틸 4-((2-(6-((2-(tert-부톡시)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥시)부타노에이트의 합성

[0064]

[0065] 에틸 4-((2-(6-((2-(tert-부톡시)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥시)부타노에이트(ethyl 4-((2-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoate)는 다음 방법으로 합성하였다.

[0066] 둥근 바닥 플라스크에 2.1 g 의 tert-butyl N-(6-bromonaphthalen-2-yl)-N-methylglycinate 와 2.2 g 의 ethyl 4-(benzo[d]oxazol-5-yloxy)butanoate, 2.9 g 의 cesium carbonate, 0.79 g 의 triphenyl phosphine, 0.29 g 의 copper(I) iodide, 0.41 g 의 palladium(II) acetate trimer를 차례로 넣은 후 Argon 가스를 충전하였다. 12 mL 의 DMF 를 주입한 후 80°C 에서 1시간 동안 교반하며 반응의 종결을 TLC로 확인하였다. 반응 종결 후 셀라이트 패드를 통해 여과하고 ethyl acetate로 세척 하였다. 여과된 용액을 ethyl acetate와 증류수로 분획하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고 용매를 감압 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피 (용리조건: 70% ethyl acetate in hexane) 로 분리하였다. 수율: 38%

[0068] (6-(5-(4-에톡시-4-옥소부톡시)벤조[d]옥사졸-2-일)나프탈렌-2-일)글리신의 합성



[0069]

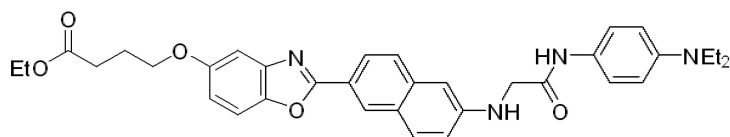
[0070] (6-(5-(4-에톡시-4-옥소부톡시)벤조[d]옥사졸-2-일)나프탈렌-2-일)글리신 ((6-(5-(4-ethoxy-4-oxobutoxy)benzo[d]oxazol-2-yl)naphthalen-2-yl)glycine)은 다음 방법으로 합성하였다.

[0071] 둥근 바닥 플라스크에서 10 mL 의 CH_2Cl_2 에 녹인 0.76 g 의 ethyl 4-((2-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoate를 0℃에서 교반하며 10 mL 의 trifluoroacetic acid를 적하 하였다. 반응 혼합물을 실온에서 7 시간 동안 교반한 다음 반응의 종결을 TLC로 확인한 후 용매를 감압 농축하였다. 잔류물을 CH_2Cl_2 및 hexane의 혼합물로 고형화시켜 (6-(5-(4-ethoxy-4-oxobutoxy)benzo[d]oxazol-2-yl)naphthalen-2-yl)glycine를 고체로서 수득 하였다. 수율: 78%

[0073]

에틸

4-((2-(6-((2-((4-(디에틸아미노)페닐)아미노)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥시)부타노에이트의 합성



[0074]

[0075]

에틸

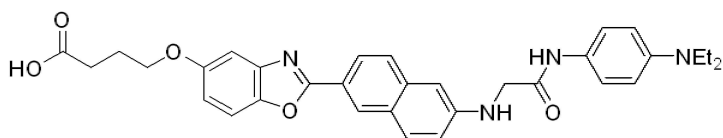
4-((2-(6-((2-((4-(디에틸아미노)페닐)아미노)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥시)부타노에이트(ethyl 4-((2-(6-((2-((4-(diethylamino)phenyl)amino)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoate)는 다음 방법으로 합성하였다.

[0076]

둥근 바닥 플라스크에 450 mg 의 ethyl 4-((2-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoate와 149 mg의 *N,N*-diethylbenzene-1,4-diamine, 432 mg 의 HATU를 넣고 2 mL 의 DMF로 녹인 후에 0.26 mL의 DIPEA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하며 TLC 로 반응의 종결을 확인한 후에 혼합물을 ethyl acetate와 증류수로 추출하였다. 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 수분을 제거하고 여과하여 감압 농축한 후 컬럼 크로마토그래피 (용리조건: 80% ethyl acetate in hexane) 로 분리하였다. 수율: 70%

[0078]

4-((2-(6-((2-((4-(디에틸아미노)페닐)아미노)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥시)부타노익산의 합성



[0079]

[0080]

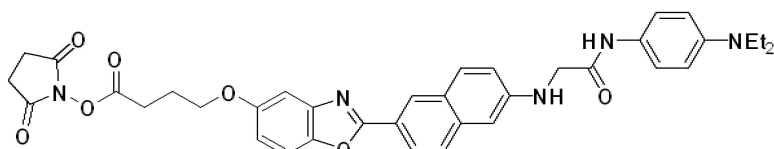
4-((2-(6-((2-((4-(디에틸아미노)페닐)아미노)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥시)부타노익산(4-((2-(6-((2-((4-(diethylamino)phenyl)amino)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoic acid)은 다음 방법으로 합성하였다.

[0081]

둥근 바닥 플라스크에서 4.2 mL 의 1,4-디옥산(1,4-dioxane) 에 녹인 250 mg 의 ethyl 4-((2-(6-((2-((4-(diethylamino)phenyl)amino)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoate를 교반 하면서 1.3 mL 의 1N KOH(aq) 표준용액을 조금씩 첨가한 다음 상온에서 10 시간 동안 교반하였다. 이 혼합물에 1N HCl(aq) 표준용액 0.84 mL 을 적가한 후 생성된 침전물을 여과하여 수집하고 증류수로 세척하여 4-((2-(6-

((2-((4-(diethylamino)phenyl)amino)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoic acid를 고체로서 수득 하였다. 수율: 75%

[0083] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 4-((2-(6-((2-((4-(디에틸아미노)페닐)아미노)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥소)부타노에이트의 합성



[0085]

[0086] 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 4-((2-(6-((2-((4-(디에틸아미노)페닐)아미노)-2-옥소에틸)아미노)나프탈렌-2-일)벤조[d]옥사졸-5-일)옥소)부타노에이트(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-((2-(6-((2-((4-(diethylamino)phenyl)amino)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoate, 이하 BH1으로 지칭할 수 있다)은 다음 방법으로 합성하였다.

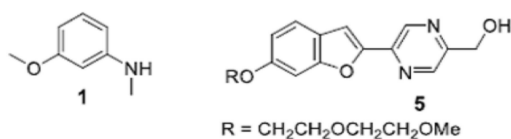
[0087] Argon 가스로 충전한 둥근 바닥 플라스크에서 166 mg 의 4-((2-(6-((2-((4-(diethylamino)phenyl)amino)-2-oxoethyl)amino)naphthalen-2-yl)benzo[d]oxazol-5-yl)oxy)butanoic acid 와 306 mg 의 DMAP 을 2 mL의 CH₂Cl₂/MeOH (10/1) 으로 녹인 후 47 mg 의 EDCI 와 35 mg 의 N-hydroxysuccinimide를 한번에 첨가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. TLC로 반응의 종결을 확인한 후에 생성물을 증류수와 CH₂Cl₂ 로 추출하였다. 유기층은 염수로 한번 더 세척한 후에 무수 Na₂SO₄로 건조시키고 용매를 증발시켰다. 잔류물을 ethyl acetate로 세척하면서 여과하여 고체 생성물을 수집했다. 수율: 55%

[0089] 세투스마-BH1 접합체 제조

[0090] BH1과 세투스마를 20:1의 몰 비율로 NaHCO₃-Na₂CO₃ 버퍼(pH 9.5, 0.1M)에서 4℃ 조건으로 2시간 동안 교반한 후에 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)와 PD-10 카트리지를 이용하여 접합되지 않고 남은 잔류 BH1을 제거 후 3 kDa cut-off centricon으로 농축하여 접합체의 PBS 용액을 획득하였다.

[0092] 실시예 2: 세투스마-Pyr1 접합체 제조

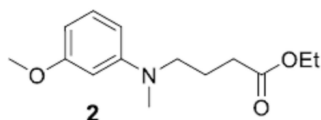
[0093] 3-메톡시-N-메틸아닐린 및 2-하이드록시메틸-5-[6-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)벤조푸란-2-일]피라진 제조



[0094]

[0095] 도 2에서, 3-메톡시-N-메틸아닐린(3-Methoxy-N-methylaniline) (1) 및 2-하이드록시메틸-5-[6-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)벤조푸란-2-일]피라진 (2-hydroxymethyl-5-[6-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)benzofuran-2-yl]pyrazine) (5)은 기존에 알려진 방법에 따라 제조되었다. (Hirayama, T. et al., Synthesis of a new bifunctionalised fluorescent label and physical properties of the bound form on model peptide of troponin C. Org. Biomol. Chem. 2007, 5, 2040-2045; Lim, C. S. et al., Two-Photon Probes for Lysosomes and Mitochondria: Simultaneous Detection of Lysosomes and Mitochondria in Live Tissues by Dual-Color Two-Photon Microscopy Imaging. Chem. Asian J. 2015, 10, 2240-2249)

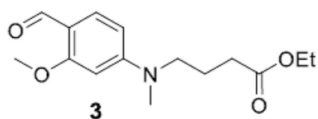
[0097] 3-메톡시-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필]아닐린 제조



[0098]

[0099] 3-메톡시-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필]아닐린(3-Methoxy-[N-methyl-N-(3-ethoxycarbonyl)propyl]aniline) (2)의 제조 과정은 다음과 같다. DMF (50 mL), 3-메톡시-N-메틸아닐린(6.7g, 49mmol), 에틸 4-요오도부타노에이트(13g, 53mmol), K₂CO₃(20g, 150mmol) 및 CaCO₃(4.9g, 49mmol)의 혼합물을 80℃에서 12시간 동안 교반하고, 생성물을 CH₂Cl₂로 추출하여 증류수로 세척한 다음 무수 MgSO₄로 건조하고 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피(용리조건: hexane/ethyl acetate (6/1))로 정제하였다. 정제된 생성물은 무색의 오일이었다. 화합물 (2)에 대한 물성값은 다음과 같다. R_f = 0.48(hexane/ethyl acetate (6/1)). 수율 11g(95 %); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 7.41 (t, J = 8.1Hz, 1H), 7.10 (t, J = 2.3Hz, 1H), 7.07 (ddd, J = 8.1, 2.2, 0.7Hz, 1H), 6.95 (ddd, J = 8.1, 2.2, 0.7Hz, 1H), 4.08 (q, J = 7.2Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.56-3.51 (m, 2H), 3.17 (s, 3H), 2.34 (t, J = 6.8Hz, 2H), 1.87-1.79 (m, 2H), 1.21 (t, J = 7.2Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.02, 160.96, 141.78, 131.37, 115.01, 112.45, 107.08, 60.75, 57.65, 55.57, 45.56, 30.28, 20.21, 13.91ppm. HRMS (EI) m/z [M]⁺ C₁₄H₂₁NO₃에 대한 계산치: 251.1521, 실측치: 251.1539.

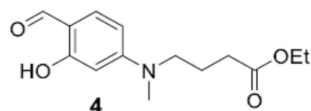
[0101] 2-메톡시-4-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필아미노]벤즈알데히드 제조



[0102]

[0103] 2-메톡시-4-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필아미노]벤즈알데히드(2-Methoxy-4-[N-methyl-N-(3-ethoxycarbonyl)propylamino]benzaldehyde) (3)의 제조과정은 다음과 같다. 화합물 2 (10g, 40mmol)를 DMF (50mL)에 녹인 용액에 POCl₃ (5.6mL, 60mmol)을 0℃에서 적가(dropwise)하였다. 용액을 실온에서 5 시간 동안 교반한 후, 1N NaOH(aq)로 중화시키고 밤새 교반하였다. 생성물을 CH₂Cl₂로 추출하고 염수로 세척한 후 무수 Na₂SO₄로 건조시키고 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피(용리조건: hexane/ethyl acetate (2/1))로 정제하였다. 제품은 무색 오일이었다. 화합물 (3)에 대한 물성값은 다음과 같다. R_f = 0.39(hexane/ethyl acetate (2/1)). 수율 8.7g (78 %); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 10.09 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.9Hz, 1H), 6.26 (dd, J = 8.9, 2.3Hz, 1H), 6.10 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 7.1Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.44-3.37 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.31 (t, J = 7.1Hz, 2H), 1.89 (quin, J = 7.1Hz, 2H), 1.21 (t, J = 7.1Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 187.20, 172.79, 163.84, 154.94, 130.40, 114.44, 104.20, 92.89, 60.44, 55.20, 51.45, 38.41, 30.86, 21.89, 14.08 ppm. HRMS (EI) m/z [M]⁺ C₁₅H₂₁NO₄에 대한 계산치: 279.1471, 실측치: 279.1488.

[0105] 2-히드록시-4-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필아미노]벤즈알데히드 제조



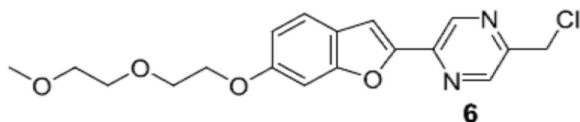
[0106]

[0107]

2-히드록시-4-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필아미노]벤즈알데히드(2-Hydroxy-4-[N-methyl-N-(3-ethoxycarbonyl)propylamino]benzaldehyde (4)의 제조과정은 다음과 같다. 화합물 3(8.7g, 35mmol)과 AlCl_3 (20g, 150mmol)를 CH_2Cl_2 (100 mL)에 녹인 혼합물을 Ar하에서 3시간 동안 환류시켰다. 실온으로 냉각한 후, 혼합물을 얼음과 포화된 $\text{NH}_4\text{Cl}(\text{aq})$ 용액이 들어있는 비커에 부었다. 생성물을 CH_2Cl_2 로 추출하고 염수로 세척한 후 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피(용리조건: hexane/ethyl acetate (3/1))로 정제하였다. 생성물은 밝은 회색 고체였다. 화합물 4의 물성값은 다음과 같다. $R_f = 0.39$ (hexane/ethyl acetate (3/1)). 수율 7.4g (80 %); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 11.59 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 7.28 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 1H), 6.32 (dd, $J = 8.8, 2.3\text{Hz}$, 1H), 6.10 (d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 4.14 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 2H), 3.47-3.41 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.34 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.94 (quin, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H) ppm. ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): δ 191.85, 172.38, 163.77, 154.95, 134.89, 111.28, 104.23, 96.66, 60.19, 51.05, 38.10, 30.68, 21.80, 13.85 ppm. HRMS (EI) m/z $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ 에 대한 계산치: 265.1314, 실측치: 265.1315.

[0109]

2-클로로메틸-5-[6-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)벤조푸란-2-일]피라진 제조



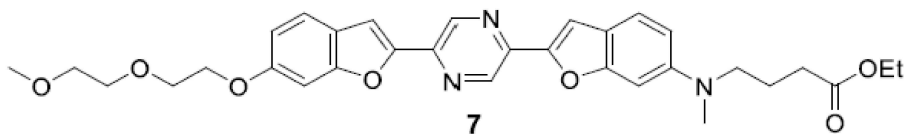
[0110]

[0111]

2-클로로메틸-5-[6-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)벤조푸란-2-일]피라진(2-Chloromethyl-5-[6-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)benzofuran-2-yl]pyrazine) (6)은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. CH_2Cl_2 (8.5 mL)에 녹인 Et_3N (1.2 mL, 8.5 mmol) 용액을 CH_2Cl_2 (15 mL)에 녹인 화합물 5 (1.5 g, 4.3 mmol) 용액에 첨가하고 0°C 에서 교반하였다. 이 용액에 CH_2Cl_2 (8.5 mL)에 녹인 SOCl_2 (0.62 mL, 8.5 mmol) 용액을 0°C 에서 교반하면서 적가하였다. 3시간 후, 생성된 혼합물을 얼음과 포화 $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ 용액이 들어있는 비커에 부었다. 생성물을 CH_2Cl_2 로 추출하고 염수로 세척한 후 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피(용리조건: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97/3))로 정제하였다. 생성물은 황색 고체였다. 화합물 6의 물성값은 다음과 같다. $R_f = 0.55$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20/1)). 수율 1.4g (91 %); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 9.03 (d, $J = 1.3\text{Hz}$, 1H), 8.71 (d, $J = 1.3\text{Hz}$, 1H), 7.52 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.12 (d, $J = 2.1\text{Hz}$, 1H), 6.96 (dd, $J = 8.6, 2.2\text{Hz}$, 1H), 4.73 (s, 2H), 4.23-4.20 (m, 2H), 3.93-3.90 (m, 2H), 3.76-3.73 (m, 2H), 3.61-3.58 (m, 2H), 3.40 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): δ 158.55, 156.71, 151.46, 149.85, 144.32, 143.76, 139.98, 122.11, 121.74, 113.68, 107.40, 96.67, 71.92, 70.78, 69.65, 67.94, 59.09, 43.97 ppm. HRMS (EI) m/z $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_4$ 에 대한 계산치: 362.1033, 실측치: 362.1031.

[0113]

2-[6-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)벤조푸란-2-일]-5-{6-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필-아미노]벤조푸란-2-일}피라진 제조



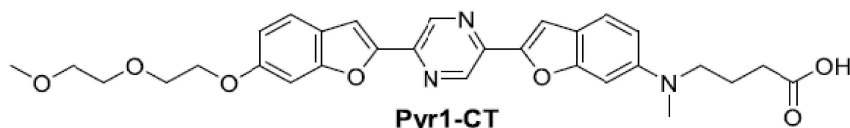
[0114]

[0115]

2-[6-(2-(2-메톡시에톡시)에톡시)벤조푸란-2-일]-5-{6-[N-메틸-N-(3-에톡시카르보닐)프로필-아미노]벤조푸란-2-일}피라진(2-[6-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)benzofuran-2-yl]-5-{6-[N-methyl-N-(3-

ethoxycarbonyl)propyl-amino]benzofuran-2-yl}pyrazine) (7)의 제조 과정은 다음과 같다. DMF (10 mL)에 녹인 화합물 6 (1.7g, 4.8mmol), 화합물 4 (1.5g, 5.7mmol) 및 K_2CO_3 (4.0g, 29mmol)의 혼합물을 40℃에서 4시간 동안 교반한 다음 90℃에서 밤새 교반하였다. 용매를 증발시킨 후 증류수를 넣고 CH_2Cl_2 로 조 생성물을 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고 무수 $MgSO_4$ 로 건조시킨 후 용매를 증발시켰다. 조 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피(용리조건: $CH_2Cl_2/MeOH$ (97/3))로 정제하였다. 생성물은 밝은 주황색 고체였다. 화합물 7의 물성은 다음과 같다. R_f = 0.44 ($CH_2Cl_2/MeOH$ (20/1)). 수율 2.2g (80 %); ^1H NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 9.02 (s, 2H), 7.51 (d, J = 8.6Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.7Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.14 (d, J = 2.0Hz, 1H), 6.95 (dd, J = 8.6, 2.0Hz, 1H), 6.87 (d, J = 2.1Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 8.7, 2.1Hz, 1H), 4.26-4.19 (m, 2H), 4.15 (q, J = 7.2, 2H), 3.95-3.88 (m, 2H), 3.78-3.72 (m, 2H), 3.63-3.58 (m, 2H), 3.46 (t, J = 7.3Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 2.38 (t, J = 7.2Hz, 2H), 1.97 (quin, J = 7.2Hz, 2H), 1.26 (t, J = 7.2Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$): δ 173.03, 158.16, 157.85, 156.47, 152.11, 150.31, 148.79, 143.00, 141.92, 140.15, 139.93, 121.93, 121.85, 121.75, 118.09, 96.60, 113.33, 110.40, 106.98, 93.99, 71.84, 70.69, 69.59, 67.83, 60.42, 59.01, 52.29, 38.77, 31.39, 22.02, 14.15ppm. HRMS (EI) m/z $[M]^+$ $C_{32}H_{35}N_3O_7$ 에 대한 계산치: 573.2475, 실측치: 573.2475.

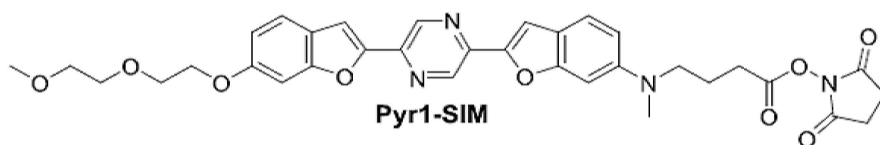
[0117] Pyr1-CT 제조



[0118]

[0119] Pyr1-CT의 제조과정은 다음과 같다. 1,4-디옥산(1,4-dioxane) (19mL)에 녹인 화합물 7 (1.1g, 1.9mmol)을 교반 하면서 KOH(aq) (1N, 5.7mL, 5.7mmol) 표준용액을 조금씩 첨가한 다음 혼합물을 상온에서 10 시간 동안 교반하였다. 이 혼합물에 HCl(aq) 표준용액 (1N, 3.8 mL, 3.8 mmol)을 적가하였다. 생성된 침전물을 여과하여 수집한 후 증류수로 세척하였다. 생성물은 밝은 빨간색 고체였다. Pyr1-CT의 물성은 다음과 같다. 수율 1.0g (95 %); ^1H NMR (700MHz, $CDCl_3$): δ 9.00 (s, 2H), 7.50 (d, J = 8.6Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.5Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.12 (brs, 1H), 6.94 (dd, J = 8.6, 2.1Hz, 1H), 6.89 (brs, 1H), 6.78 (brs, 1H), 4.24-4.18 (m, 2H), 3.94-3.88 (m, 2H), 3.77-3.73 (m, 2H), 3.63-3.58 (m, 2H), 3.46 (t, J = 7.0Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.02 (brs, 3H), 2.46 (t, J = 7.0Hz, 2H), 1.99 (quin, J = 7.0Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$): δ 177.20, 158.29, 157.93, 156.60, 152.14, 150.38, 148.88, 143.08, 142.08, 140.25, 140.10, 122.04, 122.01, 121.88, 118.57, 96.72, 94.48, 110.66, 107.14, 94.32, 71.94, 70.78, 69.70, 67.94, 59.10, 52.39, 39.01, 31.03, 21.96ppm. HRMS (EI) m/z $[M]^+$ $C_{30}H_{31}N_3O_7$ 에 대한 계산치: 545.2162, 실측치: 545.2177.

[0121] Pyr1-SIM 제조



[0122]

[0123] Pyr1-SIM은 다음 방법으로 제조하였다. $CH_2Cl_2/MeOH$ (10/1)로 녹인 화합물 Pyr1-CT (0.58g, 1.0mmol)와 DMAP (0.12g, 1.0mmol)의 혼합물에 EDCI (0.19g, 1.2mmol)와 N-하이드록시 숙신이미드(N-hydroxysuccinimide)(0.14g, 1.2mmol)를 한번에 첨가하고 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 생성물을 CH_2Cl_2 로

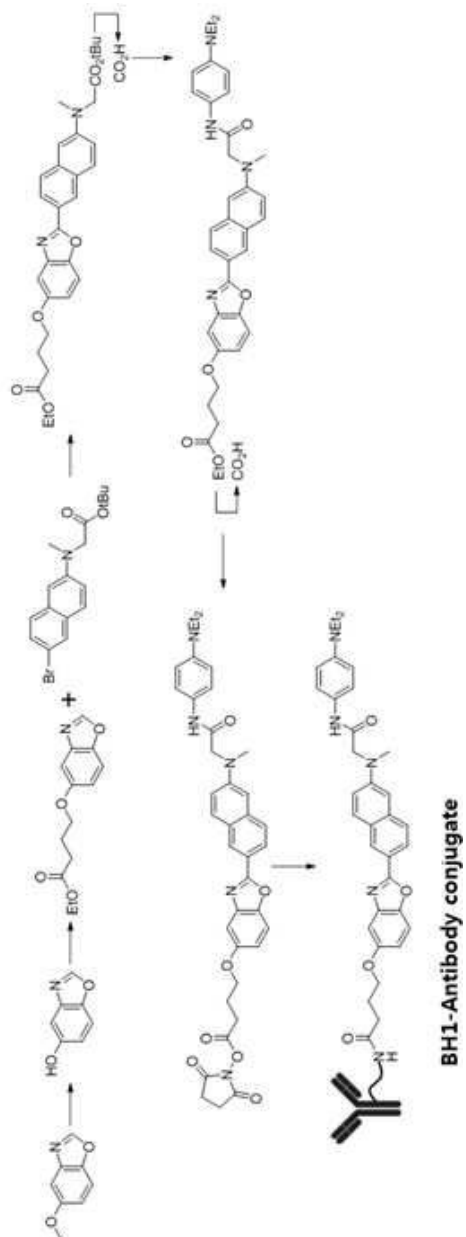
추출하고 염수로 세척한 후 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고 용매를 증발시켰다. 잔류물을 ethyl acetate로 세척 하면서 여과하였다. 생성물은 황토색(Yellow Ochre) 고체였다. Pyr1-SIM의 물성은 다음과 같다. 수율 0.50g (65 %); ^1H NMR (600MHz, CDCl_3): δ 9.00 (s, 2H), 7.49 (d, J = 8.6Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.7Hz, 1H), 7.39 (d, J = 0.9Hz, 1H), 7.38 (d, J = 0.9Hz, 1H), 7.12 (d, J = 2.2Hz, 1H), 6.93 (dd, J = 8.6, 2.2Hz, 1H), 6.86 (d, J = 2.2Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 8.7, 2.2Hz, 1H), 4.22-4.19 (m, 2H), 3.92-3.89 (m, 2H), 3.76-3.73 (m, 2H), 3.61-3.58 (m, 2H), 3.51 (t, J = 7.3Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 2.88-2.81 (m, 4H), 2.69 (t, J = 7.1Hz, 2H), 2.08 (quin, J = 7.2Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3): δ 169.05 (2C), 168.29, 158.28, 157.94, 156.59, 152.21, 150.48, 148.74, 143.14, 142.11, 140.27, 140.11, 122.05, 122.04, 121.07, 118.60, 113.45, 106.21, 96.73, 94.26, 71.92, 70.77, 69.67, 67.95, 59.07, 51.80, 39.00, 28.30, 25.56 (2C), 21.95ppm. HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_9$ 에 대한 계산치: 643.2404, 실측치: 643.2401.

[0125] 세투시맵-Pyr1 접합체 제조

[0126] Pyr1과 세투시맵을 20:1의 물 비율로 NaHCO_3 - Na_2CO_3 버퍼(pH 9.5, 0.1M)에서 4℃ 조건으로 2시간 동안 교반한 후에 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)와 PD-10 카트리지를 이용하여 접합되지 않고 남은 잔류 Pyr1을 제거 후 3 kDa cut-off centricon으로 농축하여 접합체의 PBS 용액을 획득하였다.

도면

도면1



도면2

