



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2020-0043970  
(43) 공개일자 2020년04월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 7/06* (2006.01) *A61K 38/08* (2019.01)  
*A61K 49/00* (2006.01) *A61K 51/08* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *C07K 14/715* (2006.01)  
*C07K 5/12* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 7/06* (2013.01)  
*A61K 38/08* (2019.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7000227
- (22) 출원일자(국제) 2020년02월17일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년01월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/018530
- (87) 국제공개번호 WO 2019/050564  
 국제공개일자 2019년03월14일
- (30) 우선권주장  
 62/554,354 2017년09월05일 미국(US)

- (71) 출원인  
**메인라인 바이오사이언스**  
 미국, 펜실베니아 19355, 말번 그레이트 벨리 파크웨이 5, 스위트 100
- (72) 발명자  
**장, 권거**  
 미국, 펜실베니아 19355, 멜번 랩 로드 216  
**옌, 량, 정**  
 미국, 인디애나 46033, 카멀 스프링브룩 런 12420
- (74) 대리인  
**특허법인이름리온**

전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 **고친화성 CXCR4 선택적 결합 콘주게이트 및 그 사용 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 암, HIV 감염 및 면역 장애를 포함한, CXCR4의 과발현 및/또는 상향 조절과 관련된 병태에 대해 대상체 진단, 환자의 영상화 또는 표적화된 약물 전달에 이용될 수 있는 펩티드 콘주게이트(PC)를 제공한다. 본 발명은 화학식 P-(L-A)<sub>n</sub> (I)의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 PC 또는 약학적으로 허용가능한 염 및 PC 키트 및 조성물을 제공한다. 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트(PC)는 환자를 진단, 치료 또는 영상화하는데 유용하다. 화학식 (I)의 화합물에서, n은 1 내지 (P에 있는 아미노산 잔기의 수와 P의 아미노산 잔기에 있는 측쇄 작용기의 수의) 합계까지의 정수이고; 각각의 A는 독립적으로 진단제, 치료제 또는 영상화제이고; L은 링커이거나 부재하며; 및 P는 고친화성 CXCR4 선택적 결합 펩티드 리간드이다.

(52) CPC특허분류

*A61K 49/0056* (2013.01)

*A61K 51/08* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 14/7158* (2013.01)

*C07K 5/12* (2013.01)

---



Ar<sup>1</sup>은 임의로 치환된 아릴이고;

X<sup>1</sup>은 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr) 또는 Lys(iPr)이고;

X<sup>2</sup>는 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr), Lys(iPr), D-Arg, D-Dap, D-Dab, D-Orn, D-Lys, D-Dap(iPr), D-Dab(iPr), D-Orn(iPr) 또는 D-Lys(iPr)이거나 또는 부재하고;

X<sup>3</sup>은 Lys 또는 Gly 이거나 또는 부재하고;

X<sup>4</sup>는 Lys, Phe, 2Nal, 1Nal, 이의 D-이성질체 또는 Gly이거나 또는 부재하고;

X<sup>5</sup>는 Lys 또는 Gly이거나 또는 부재하고;

R<sup>2</sup>는 -OR<sup>4</sup> 또는 -NHR<sup>5</sup>이되, 여기서 R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 H, 알킬, 임의로 치환된 아릴 또는 임의로 치환된 아랄킬임.)

### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

A가 영상화제인 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

### 청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 영상화제는 상기 링커에 부착된 양전자 방출 방사성 동위 원소이고 상기 양전자 방출 방사성 동위 원소는 <sup>34</sup>Cl, <sup>45</sup>Ti, <sup>51</sup>Mn, <sup>61</sup>Cu, <sup>63</sup>Zn, <sup>68</sup>Ga, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O 및 <sup>18</sup>F로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

### 청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 영상화제는 킬레이트 그룹 및 상기 킬레이트 그룹에 배워된 방사성 금속 동위 원소를 포함하고, 상기 방사성 금속 동위 원소는 테크네튬(technetium), 레늄, 갈륨, 가돌리늄, 인듐, 구리 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

### 청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 영상화제는 형광 염료인 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

### 청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 형광 염료는 알렉사플루오르(AlexaFluor) 염료, 오리건 그린(Oregon Green) 염료, 플루오레세인(fluoresceins), BODIPY(보론-디피로메텐) 염료, 시아닌 염료, 로다민 염료, 디라이트(DyLight) 염료 및 텍사스 레드(Texas Red)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

### 청구항 10

제 1 항에 있어서,  
A가 진단제인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

**청구항 11**

제 10 항에 있어서,  
상기 진단제는 영상화제, 동위 원소 제제(agent) 또는 방사성 제제(agent)인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

**청구항 12**

제 1 항에 있어서,  
상기 링커는 생체 내에서 A를 방출할 수 있는 작용기를 포함하는 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

**청구항 13**

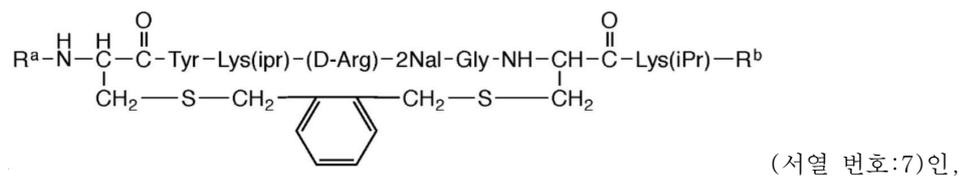
제 1 항에 있어서,  
A가 치료제인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

**청구항 14**

제 13 항에 있어서,  
상기 치료제는 블레오마이신(bleomycin), 칼리케아미신(calicheamicin), 다우노루비신(daunorubicin), 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 메르탄신(mertansine), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 파클리탁셀(paclitaxel), SN-38, 테시린(tesirine), 토포테칸(topotecan), 튜블리신(tubulysin), 빈카 알칼로이드류(vinca alkaloids) 및 이의 유사체 또는 유도체 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

**청구항 15**

제 1 항에 있어서,  
상기 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트가,  
시클로[Phe-Tyr-Lys(iPr)-(D-Arg)-2Nal-Gly-(D-Glu)]-Lys(iPr)-(mini-PEG6)-Cys(S-파클리탁셀)-Gly-NH<sub>2</sub>(서열 번호:3)(여기서 상기 시클릭 구조는 D-Glu의 측쇄에 연결된 Phe의 α-아미노와의 사이에서 형성됨); 또는  
R<sup>a</sup>-시클로[Cys-Tyr-Lys(iPr)-(D-Arg)-2Nal-Gly-Cys]-Lys(iPr)-R<sup>b</sup>(서열 번호:4);  
R<sup>a</sup>-시클로[hCys-Tyr-Lys(iPr)-(D-Arg)-2Nal-Gly-Cys]-Lys(iPr)-R<sup>b</sup>(서열 번호:5);  
R<sup>a</sup>-시클로[Cys-Tyr-Lys(iPr)-(D-Arg)-2Nal-Gly-hCys]-Lys(iPr)-R<sup>b</sup>(서열 번호:6); 및



고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

(여기서,

$R^a$ 는 아세틸-, 아세틸-Cys(S-파클리탁셀)- 또는 아세틸-Cys(S-파클리탁셀)-(mini-PEG6)-이고;

$R^b$ 는 글리실-아미드, 글리실-Cys(S-파클리탁셀)-아미드 또는 (mini-PEG6)-Cys(S-파클리탁셀)-아미드이되,

단, 상기  $R^a$  또는  $R^b$  중 하나 이상은 S-파클리탁셀을 포함함.)

**청구항 16**

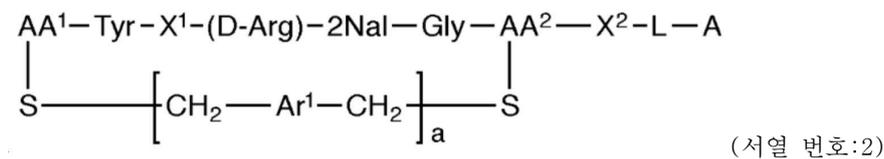
제 1 항에 있어서,

제 1 항의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트가

하기 화학식 III이거나 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

[화학식 III]



(상기 화학식 III에서,

$a$ 는 0 또는 1이고;

$\text{AA}^1$ 은 거기에 부착된 황 원자와 함께 3-메르캅토프로피온산, 임의로 치환된 시스테인 또는 임의로 치환된 호모시스테인이되, 여기서 A는 상기 시스테인 또는 호모시스테인의  $\alpha$ -아미노기에 임의로 부착되고;

$\text{AA}^2$ 는 거기에 부착된 황 원자와 함께 시스테인 또는 호모시스테인이고;

$\text{Ar}^1$ 은 임의로 치환된 아릴이고;

$\text{X}^1$ 은 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr) 또는 Lys(iPr)이고;

$\text{X}^2$ 는 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr), Lys(iPr), D-Arg, D-Dap, D-Dab, D-Orn, D-Lys, D-Dap(iPr), D-Dab(iPr), D-Orn(iPr) 또는 D-Lys(iPr)이거나 또는 부재하고;

L은 임의의 링커이고;

A는 제 1 항에 정의된 것과 동일함.)

**청구항 17**

제 16 항에 있어서,

$a$ 가 0인 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 18**

제 16 항에 있어서,

$a$ 가 1인 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 19**

제 16 항에 있어서,

AA<sup>1</sup>은 거기에 부착된 황 원자와 함께 3-메르캅토프로피온산인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 20**

제 16 항에 있어서,

AA<sup>1</sup>은 거기에 부착된 황 원자와 함께 시스테인인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 21**

제 16 항에 있어서,

AA<sup>1</sup>은 거기에 부착된 황 원자와 함께 호모시스테인인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 22**

제 16 항에 있어서,

AA<sup>2</sup>는 거기에 부착된 황 원자와 함께 시스테인인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 23**

제 16 항에 있어서,

AA<sup>2</sup>는 거기에 부착된 황 원자와 함께 호모시스테인인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 24**

제 16 항에 있어서,

A가 영상화제인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 25**

제 16 항에 있어서,

A가 치료제인 것을 특징으로 하는,  
고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

**청구항 26**

제 25 항에 있어서,

상기 치료제는 블레오마이신, 칼리케아미신, 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 이리노테칸, 메르탄신, 모노 메틸 아우리스타틴 E, 파클리탁셀, SN-38, 테시린, 토포테칸, 투볼리신, 빈카 알칼로이드류 및 이의 유사체 또는 유도체 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

**청구항 27**

제 16 항에 있어서,

A가 진단제인 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트.

**청구항 28**

제 27 항의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트를 포함하는,

진단 키트.

**청구항 29**

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트 및 이의 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 이들의 조합물을 포함하는,

조성물.

**청구항 30**

환자의 암 세포를 영상화하는 방법으로서,

제 5 항의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트를 영상화 유효량으로 환자에게 투여하고;

영상화 장치를 이용하여 상기 환자의 암세포를 영상화하는 것;

을 포함하는 것을 특징으로 하는,

환자의 암 세포를 영상화하는 방법.

**청구항 31**

환자의 암을 치료하는 방법으로서,

상기 방법은 제 16 항의 약학 조성물을 치료적 유효량으로 암 환자에게 투여하는 것을 포함하는,

환자의 암을 치료하는 방법.

**청구항 32**

제 1 항의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트(PC)를 포함하는 진단 키트 또는 영상화 키트로서,

화학식 I에서 A가 진단제 또는 영상화제인 것을 특징으로 하는,

진단 키트 또는 영상화 키트.

**청구항 33**

류머티스성 관절염, 폐섬유증, HIV 감염 또는 암으로 고통받는 환자의 치료 방법으로서,

상기 방법은 제 16 항의 화합물을 이의 치료를 필요로 하는 환자에게 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함하고, 상기 암은 유방암, 췌장암, 흑색종, 전립선암, 신장암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 폐암, 난소암, 결장암, 다발성 골수종, 다형성교아종(glioblastoma multiforme) 및 만성 림프성 백혈병으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는,

치료 방법.

**청구항 34**

제 13 항에 있어서,

상기 치료제는 HIV 프로테아제 억제제, HIV 융합 억제제, HIV 역전사 효소 억제제, HIV 인테그라아제 억제제, HIV 진입 억제제 및 이들의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

### 청구항 35

제 34 항에 있어서,

상기 치료제는 HIV 융합 억제제인 엔푸비르티드(enfuvirtide)인 것을 특징으로 하는,

고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 출원은 본 명세서에 그 전문이 참조로 삽입된, 2017년 9월 5일자로 출원된, 미국 가출원 제62/554,354호의 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 화학식 P-(L-A)<sub>n</sub> (I) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트(conjugate)("PC") 및 이의 이용방법 및 제조방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트는 환자의 진단, 치료 또는 영상화에 유용하다. 화학식 I의 화합물에서, 각 A는 독립적으로 진단제, 치료제 또는 영상화제이고; L은 링커이거나 부재하며; 및 P는 고친화성 CXCR4 선택적 결합 펩티드 리간드이다. 특히, 본 발명은 암, HIV 감염 및 면역 장애와 같은 CXCR4의 과발현 및/또는 상향 조절이 관련된 질환에 대해 표적화된 약물 전달 또는 환자의 영상화 또는 환자의 진단에 관한 것이다. 상기 용도를 위한 조성물, 키트 및 방법이 본 명세서에 개시되어 있다.

### 배경 기술

[0003] 연구에 따르면, 케모카인 및 케모카인 수용체 쌍인, CXCL12(기질세포 유래 인자-1 또는 SDF-1이라고도 함) 및 CXCR4는 조혈 작용, 여러 단계의 종양발생 및 배아 발달에 중요한 역할을 한다(Broxmeyer, H.E. 등, *Int. J. Hematol.* 2001, 74, 9-17; Horuk, R., *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009, 8, 23-33). 예를 들어, CXCL12에 의한 CXCR4의 활성화는 면역 시스템에서 염증에 대한 반응으로 백혈구 주화성을 지시하고 배아가 발달하는 동안 전구 세포 이동을 지시하는 것으로 나타났다. CXCL12에 의한 CXCR4의 활성화 또한 유방암 전이 및 기억 T 세포 이동에 관련된 신호 전달 경로를 매개하는 것으로 나타났다(Orimo, A. 등, *Cell* 2005, 121, 335-348).

[0004] 푸신 또는 CD184(분화 클러스터 184)로도 공지된, G-단백질 결합 수용체인 CXCR4는 광범위한 인간 암에서 성분을 이루거나 과발현되어, 국소 종양 세포 증식, 생존 및 혈관 형성을 촉진한다(Huang, E.H. 등, *J. Surg. Res.* 2009, 155, 231-236). CXCR4는 HIV의 숙주 세포로의 진입 및 감염을 위한 공동-수용체이고 가능성 있는 HIV 치료법으로 평가되었음이 또한 보고되었다(Tamamura, H. 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 253, 877-882; Oberlin, E. 등, *Nature*, 1996, 382, 833-835).

[0005] 보고에 따르면, CXCR4는 수많은 인간 암에서 과발현되는 것으로 확인되었다. CXCR4 길항작용은 종양-기질 상호작용을 방해하고, 세포 독성 약물에 대해 암 세포를 민감하게 하고, 종양 성장 및 전이 부담을 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서, CXCR4는 암 치료의 가능성 있는 치료 개입을 위한 표적일 뿐만 아니라 질병 진행, 치료 지침 및 기타 진단 목적의 비침습적 모니터링을 위한 표적이다(Chatterjee, S. 등, *Adv Cancer Res.* 2014; 124:31-82). 표적화된 약물 전달의 가능성 있는 방법으로서 CXCR4와의 결합 및 상호 작용이 제안되었다(Wang, Y. 등, *Curr Pharmacol Rep* (2016) 2:1-10).

[0006] 따라서, CXCR4와 선택적으로 결합할 수 있는 모이어티(moiety)를 갖는 화합물(즉, CXCR4 선택적 결합 콘주게이트)은 비제한적으로, CXCR4의 활성화 또는 과발현과 관련된 다수의 임상적 증상 치료, 환자 진단 및 의학적 영상화를 포함한 다양한 용도를 가질 수 있을 것으로 여겨진다.

[0007] 그에 따라, CXCR4와 선택적으로 결합할 수 있는 콘주게이트가 필요하다.

**발명의 내용**

[0008] 본 발명의 일 측면은 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트("PC")를 제공한다. 일부 구현예에서, 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트는 CXCR4에 선택적으로 결합하기 위한 높은 친화성을 가지면서 활성 성분에 (임의로 링커를 경유하여) 연결되거나 부착되는 펩티드 모이어티를 포함한다. 상기 활성 성분은 진단제, 치료제 또는 영상화제일 수 있다. 상기 방식으로, 펩티드 모이어티는 CXCR4 수용체에 선택적으로 결합하여 활성 성분을 전달한다.

[0009] 특정 일 구현예에서, 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트는 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다:

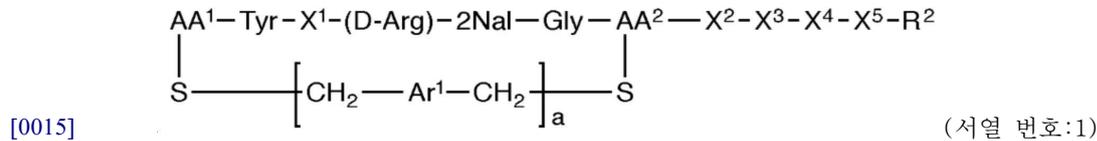
[0010] [화학식 I]



[0012] 상기 화학식 I에서, n은 1부터 (P 안에 있는 측쇄 작용기를 갖는) 아미노산 잔기의 총 수까지의 정수이고; P는 고친화성 CXCR4 선택적 결합 펩티드 모이어티이고; 각각의 L은 독립적으로 임의의 링커(즉, 상기 링커는 부재하거나 폴리에틸렌 글리콜 모이어티와 같은 링커 또는 당업자에게 공지된 기타 링커일 수 있음)이고; 각각의 A는 독립적으로 활성 성분, 예컨대 진단제, 치료제 또는 영상화제이다. 당업자에게 이의없이 명백하지만, L이 부재인 경우, A는 예를 들어, 화학적 결합, 예컨대 아마이드 결합 또는 에스테르 결합을 통해 P에 직접 부착된다는 점에 유의해야 한다. 특정 일 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 CXCR4의 과발현 또는 상향 조절과 관련된 임상 증상의 진단 또는 치료에 사용된다. 즉, A는 진단제 또는 약물이다. 전형적으로, 화학식 I의 화합물은 (i) CXCR4에 대한 고친화성을 갖는 펩티드 리간드(즉, 펩티드 모이어티), (2) 임의의 링커 및 (3) 활성 성분, 예를 들어, 진단제, 치료제(예를 들어, 약물) 또는 영상화제(예를 들어, 방사성 모이어티, 형광 모이어티 등)를 포함한다.

[0013] 특정 일 구현예에서, 모이어티 P(즉, 고친화성 CXCR4 선택적 결합 펩티드 모이어티)는 하기 화학식 II의 모이어티이다:

[0014] [화학식 II]



[0016] 상기 화학식 II에서

[0017] a는 0 또는 1이고;

[0018] AA<sup>1</sup>은 거기에 부착된 황 원자와 함께 3-메르캅토프로피온산이거나, 임의로 치환된 시스테인이거나 또는 임의로 치환된 호모시스테인이고;

[0019] AA<sup>2</sup>는 거기에 부착된 황 원자와 함께 시스테인 또는 호모시스테인이고;

[0020] Ar<sup>1</sup>은 임의로 치환된 아릴이고;

[0021] X<sup>1</sup>은 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr) 또는 Lys(iPr)이고;

[0022] X<sup>2</sup>는 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr), Lys(iPr), D-Arg, D-Dap, D-Dab, D-Orn, D-Lys, D-Dap(iPr), D-Dab(iPr), D-Orn(iPr) 또는 D-Lys(iPr)이거나 또는 부재하고;

[0023] X<sup>3</sup>은 Lys, Gly이거나 또는 부재하고;

[0024] X<sup>4</sup>는 Lys, Phe, 2Nal, 1Nal, 이의 D-이성질체 또는 Gly이거나 또는 부재하고;

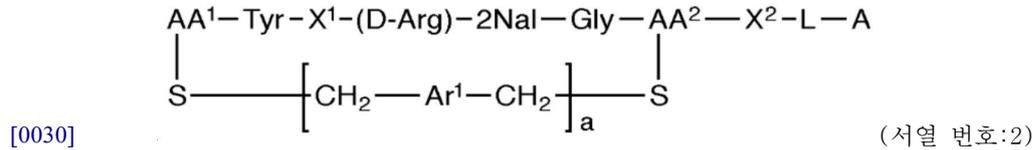
[0025] X<sup>5</sup>는 Lys, Gly이거나 또는 부재하고;

[0026] R<sup>2</sup>는 -OR<sup>4</sup> 또는 -NHR<sup>5</sup>이고, 여기서 R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 H, 알킬, 임의로 치환된 아릴 또는 임의로 치환된 아탈킬이다.

[0027] 화학식 I의 임의의 링커와 모이어티 A(즉, -L-A 모이어티)는 이의 측쇄에 존재하는 작용기를 통해 아미노산의 어디에도 부착될 수 있음을 이해해야 한다.

[0028] 다른 구현예에서, 본 발명의 화합물은 하기 화학식 III의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다:

[0029] [화학식 III]



[0031] 상기 화학식 III에서,

[0032] a는 0 또는 1이고;

[0033] AA<sup>1</sup>은 거기에 부착된 황 원자와 함께 3-메르캅토프로피온산, 임의로 치환된 시스테인 또는 임의로 치환된 호모시스테인이고;

[0034] AA<sup>2</sup>는 거기에 부착된 황 원자와 함께 시스테인 또는 호모시스테인이고;

[0035] Ar<sup>1</sup>은 임의로 치환된 아릴이고;

[0036] X<sup>1</sup>은 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr) 또는 Lys(iPr)이고;

[0037] X<sup>2</sup>는 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr), Lys(iPr), D-Arg, D-Dap, D-Dab, D-Orn, D-Lys, D-Dap(iPr), D-Dab(iPr), D-Orn(iPr), D-Lys(iPr)이거나 또는 부재하고;

[0038] L 및 A는 본 명세서에 정의된 바와 같다.

[0039] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 개시된 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트, 예를 들어, A가 진단제인 화학식 I의 화합물을 포함하는 진단 키트를 제공한다.

[0040] 본 발명의 다른 측면은, (i) 본 명세서에 개시된 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트 및 (ii) 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 이들의 조합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 또 다른 측면은 환자의 암세포를 영상화하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 통상적으로 본 발명의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트, 예를 들어, A가 영상화제인 화학식 I의 화합물을 영상화 유효량으로 환자에게 투여하고; 및 영상화 장치를 이용하여 상기 환자에서 암세포를 영상화하는 것을 포함한다.

[0042] 본 발명의 다른 측면은 A가 암 치료제(즉, 암 또는 종양학 약물)인 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 치료적 유효량으로 투여하여 환자의 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0043] 화학식 I의 화합물의 A가 진단제 또는 영상화제인 경우, 본 발명의 화합물은 각각 진단 키트 또는 영상화 키트 내에서 이용될 수 있음을 이해해야 한다.

[0044] 본 발명의 특정 일 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 류머티스성 관절염, 폐섬유증, HIV 감염 또는 암으로 고통받는 환자를 치료하는데 이용된다. 상기 방법은 치료적 유효량의 화학식 I의 화합물(A는 각각 류머티스성 관절염, 폐섬유증, HIV 감염 또는 암을 치료하는 치료제임)을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 화학식 I의 화합물로 치료되는 전형적인 암은 비제한적으로, 유방암, 췌장암, 흑색종, 전립선암, 신장암, 신경모세포종(neuroblastoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 폐암, 난소암, 결장암, 다발성 골수종, 다형성교아종(glioblastoma multiforme) 및 만성 림프성 백혈병을 포함한다.

[0045] 본 발명의 다른 측면은 CXCR4의 과발현 및/또는 상향 조절과 관련된 임상 증상에 대한 표적화된 약물 전달을 위한 방법을 제공한다. 예시적인 임상 증상은 비제한적으로, 류머티스성 관절염, 폐섬유증, HIV 감염 및 암을 포함한다. 특정 암의 예로는 유방암, 췌장암, 흑색종, 전립선암, 신장암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 폐암, 난소암, 결장암, 다발성 골수종, 다형성교아종 및 만성 림프성 백혈병이 포함된다.

[0046] 본 발명의 다른 측면은 CXCR4의 과발현 및/또는 상향 조절과 관련된 임상 증상을 모니터링하고 질환을 진단하기 위한 방법을 제공한다. 예시적인 임상 증상은 비제한적으로, 류머티스성 관절염, 폐섬유증, HIV 감염 및 암을 포함한다. 특정 암의 예로는 유방암, 췌장암, 흑색종, 전립선암, 신장암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 폐암, 난소암, 결장암, 다발성 골수종, 다형성교아종 및 만성 림프성 백혈병이 포함된다.

[0047] 본 발명의 다른 측면은 CXCR4의 과발현 및/또는 상향 조절과 관련된 임상 증상을 모니터링하고 질환을 진단하기 위한 키트를 제공한다. 예시적인 임상 증상은 비제한적으로, 류머티스성 관절염, 폐섬유증, HIV 감염 및 암을 포함한다. 특정 암의 예로는 유방암, 췌장암, 흑색종, 전립선암, 신장암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 폐암, 난소암, 결장암, 다발성 골수종, 다형성교아종 및 만성 림프성 백혈병이 포함된다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0048] CXCR4는 자가면역 병리 예컨대 류머티스성 관절염뿐만 아니라 암, 바이러스 감염을 포함한 다양한 질환 및 장애의 면역 반응 및 염증 반응에서 중요한 역할을 한다. 본 발명은 CXCR4 과발현 및/또는 활성화와 관련된 임상 증상을 치료, 진단 또는 영상화하기 위해 CXCR4의 과발현 또는 활성화를 감소시키거나 예방하는데 적어도 부분적으로 기초하고 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "과발현 및/또는 활성화(overexpression and/or activation)"는 유전자의 정상(즉, 대조군) 또는 기준선 수준 이상의 발현 및/또는 CXCR4의 정상, 대조군 또는 기준선 수준 이상의 활성화를 각각 지칭한다.

[0049] 상기 용어 "정상(normal)", "기준선 수준(baseline level)" 및 "대조군 수준(control level)"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고 본 명세서에 개시된 것과 같은 CXCR4의 과발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 임상 증상을 갖지 않는 대상체(들)에서 CXCR4의 발현 수준 및/또는 활성 수준을 지칭한다. 일부 구현예에서, 상기 기준선 수준은 정상 수준일 수 있고, CXCR4의 과발현 및/또는 활성화(또는 활성)와 관련된 임상 증상을 갖지 않는 정상 대상체로부터의 샘플 내 수준을 의미할 수 있다. 이로 인해 CXCR4 발현 또는 그것의 생물학적 활성의 기준선 수준에 근거한 결정 즉, 질환 또는 임상 증상에 대해 평가되거나 테스트될 샘플이 기준선 수준과 비교하여 CXCR4 발현 또는 활성화에 있어서 측정 가능하게 증가했는지, 감소했는지 또는 실질적으로 변화가 없는지 여부에 근거한 결정이 가능하다.

[0050] CXCR4의 과발현 및/또는 활성화는 또한 샘플 결과를 양성 대조군과 비교하여 결정될 수도 있음을 이해해야 한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 상기 용어 "양성 대조군(positive control)"은 샘플로부터의 데이터에 근거하여 상기 샘플이 CXCR4의 과발현 및/또는 활성화와 관련된 질환 또는 임상 증상(예를 들어, 암, 자가면역 질환, 예컨대 류머티스성 관절염 및 바이러스 감염, 예컨대 HIV 감염)을 갖는 것으로 여겨지는 개체의 집단 또는 대상체로부터의 샘플에서 확립된 CXCR4 발현 및/또는 활성화(또는 활성) 수준을 지칭한다.

[0051] 다른 구현예에서, 기준선 수준은 테스트될 대상체의 이전 샘플로부터 확립될 수 있어서, 대상체의 질환 진행 또는 경감을 시간에 따라 모니터링할 수 있고/있거나 치료의 효율을 평가할 수 있다.

[0052] 본 발명의 일부 구현예는 진단제, 치료제 또는 영상화제에, 임의로 링커를 통해 부착되는 CXCR4에 대한 고친화성을 갖는 화합물을 제공한다. 상기 화합물은 CXCR4 결합 모이어티 및 활성 성분을 포함한다. 본 발명은 또한 상기를 이용하기 위한 방법 예를 들어, CXCR4의 과발현 및/또는 활성화에 의해 나타나거나 또는 이와 관련된 임상 증상을 치료하기 위한 치료제의 표적화된 전달을 위한 방법을 제공한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 상기 용어 "고친화성(high affinity)"은 CXCR4에 결합하는 화합물 또는 모이어티가 약 10 nM 이하, 전형적으로 약 3 nM 이하 및 종종 1 nM 이하의 결합 상수( $K_b$ )를 갖는다는 것을 의미한다. 택일적으로, 상기 용어 "고친화성"은 CXCR4에 결합하는 화합물 또는 모이어티가 약 30 nM 이하, 전형적으로 약 10 nM 이하 및 종종 약 3 nM 이하의 50 % 결합 억제 농도( $IC_{50}$ )를 갖는다는 것을 의미한다. 결합 상수 및  $IC_{50}$ 을 결정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 2016년 9월 6일에 출원된 미국 가출원 제62/384,132호 및 2017년 5월 11일에 출원된 미국 가출원 제62/505,064호 및 2017년 9월 5일에 출원된 국제 출원 제PCT/US17/50106호를 참조할 수 있고, 이들 모두는 그 전문이 참조로 본 명세서에 편입되어 있다. 특히,  $K_b$  및  $IC_{50}$  값은 상기 참조된 가출원에 기재된 CXCR4/ $^{125}I$ -SDF-1 $\alpha$  결합 분석을 이용하여 결정된다. 수치값을 언급하는 경우 용어 "약(about)"은 수치값의  $\pm 20\%$ , 전형적으로  $\pm 10\%$  및 종종  $\pm 5\%$ 를 의미한다.

[0053] 본 발명의 특정 일 측면에서, 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트("PC")는 하기 화학식 I의 콘주게이트 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다:

[0054] [화학식 I]



[0056] 상기 화학식 I에서

[0057] n은 1부터 (P 안의 아미노산 총 수와 측쇄 작용기의 총 수의) 합계까지의 정수이고, 전형적으로 n은 1 내지 (P 안의) 아미노산의 수이거나 또는 n은 1 내지 (측쇄 작용기를 갖는 P 안의) 아미노산의 수이고, 종종 n은 1 내지 5의 정수이고, 보다 종종 n은 1 내지 3의 정수이며;

[0058] A는 하나 이상의 진단제, 치료제 또는 영상화제이고;

[0059] 각각의 L은 독립적으로 2 작용성 링커이거나 또는 부재하고; L이 부재인 경우, A는 예를 들어, 화학적 결합, 예컨대 아마이드 결합 또는 에스테르 결합을 통해 P에 부착되고;

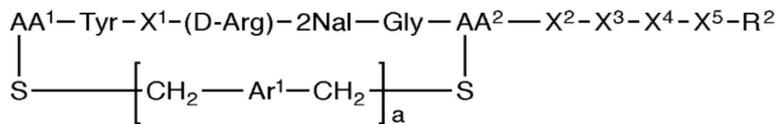
[0060] P는 고친화성 CXCR4 선택적 결합 펩티드 리간드(즉, CXCR4에 선택적으로 결합하는 펩티드 모이어티)이다.

[0061] 변수 n은 1부터 (P 안의 아미노산 총 수와 측쇄 작용기의 총 수의) 합계까지의 정수이다. 전형적으로, n은 1 내지 7, 종종 1 내지 5, 보다 종종 1 내지 3 및 가장 종종 1 또는 2인 정수이다. 예를 들어, P 안에 총 7 개의 아미노산 잔기가 있고 2개의 리신 그룹(측쇄 작용기로 -NH<sub>2</sub>를 가짐)을 갖는 경우, n은 1 내지 9(P의 7 개의 아미노산 잔기 + 2 개의 측쇄 작용기)의 정수일 수 있다. 상기와 같은 방식으로, P의 모든 작용기는 -L-A 모이어티에 부착될 수 있다.

[0062] 화학식 I의 화합물 안에 있는 모이어티 A는 P 모이어티의 임의의 부분에 부착될 수 있다. 전형적으로, A 모이어티는 상기 펩티드(P 모이어티)의 N-말단 또는 C-말단에 부착되거나 또는 상기 펩티드의 아미노산 잔기의 측쇄에 존재하는 작용기에 부착되거나 또는 이들 위치 중 어느 하나의 조합에 부착된다. 일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 복수의 A 모이어티를 갖는다.

[0063] 특정 일 구현예에서, P는 하기 화학식 II의 고친화성 CXCR4 결합 펩티드이다:

[0064] [화학식 II]



서열 번호:1

[0065] 상기 화학식 II에서,

[0066] a는 0 또는 1이고;

[0067] AA<sup>1</sup>은 거기에 부착된 황 원자와 함께 3-메르캅토프로피온산이거나, 임의로 치환된 시스테인이거나 또는 임의로 치환된 호모시스테인이고;

[0068] AA<sup>2</sup>는 거기에 부착된 황 원자와 함께 시스테인이거나 또는 호모시스테인이고;

[0069] Ar<sup>1</sup>은 임의로 치환된 아릴이고;

[0070] X<sup>1</sup>은 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr) 또는 Lys(iPr)이고;

[0071] X<sup>2</sup>는 Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr), Lys(iPr), D-Arg, D-Dap, D-Dab, D-Orn, D-Lys, D-Dap(iPr), D-Dab(iPr), D-Orn(iPr) 또는 D-Lys(iPr)이거나 또는 부재하고;

[0072] X<sup>3</sup>은 Lys, Gly이거나 또는 부재하고;

[0073] X<sup>4</sup>는 Lys, Phe, 2Nal, 1Nal, 이의 D-이성질체 또는 Gly이거나 또는 부재하고;

[0074] X<sup>5</sup>는 Lys, Gly이거나 또는 부재하며;

- [0076]  $R^2$ 는  $-OR^4$  또는  $-NHR^5$ 이고, 여기서  $R^4$  및  $R^5$ 는 H, 알킬, 임의로 치환된 아틸 또는 임의로 치환된 아랄킬이다.
- [0077] 화학식 I 화합물의 모이어티 -L-A는  $AA^1$ (예를 들어, 시스테인 또는 호모시스테인의  $\alpha$ -아미노기)에 부착될 수 있고/있거나  $R^4$  및/또는  $R^5$  또는  $R^4$  및  $R^5$ 는 -L-A일 수 있고, L은 임의로 링커이고 A는 치료제, 진단제 또는 영상화제이다. 또한 상기 모이어티 -L-A는 N-말단 아미노산의  $\alpha$ -아미노기 또는 펩티드 모이어티의 임의의 아미노산의 측쇄에 있는 작용기에 부착될 수 있다.
- [0078] 다른 구현예에서, A는 영상화제이다. 본 발명의 유용한 영상화제 중 특정 일 예는 양전자 방출 방사성 동위 원소 예컨대  $^{34}Cl$ ,  $^{45}Ti$ ,  $^{51}Mn$ ,  $^{61}Cu$ ,  $^{63}Zn$ ,  $^{68}Ga$ ,  $^{11}C$ ,  $^{13}N$ ,  $^{15}O$  및  $^{18}F$ 를 포함한다. 전형적으로, 상기 양전자 방출 방사성 동위 원소는 링커에 부착되거나 또는 링커의 일부(L 모이어티)로서 부착된다.
- [0079] 유용한 영상화제 중의 다른 예는 킬레이트 그룹에 배위된(즉, 킬레이트화된) 방사성 금속 동위 원소를 포함한다. 유용한 특정 방사성 금속 동위 원소는 테크네튬(technetium), 레늄, 갈륨, 가돌리늄, 인듐, 구리 및 이들의 조합물을 포함한다. 특정 방사성 금속 동위 원소에 대한 적합한 킬레이트 그룹은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 페로센 및 이의 유도체, 에틸렌디아민테트라아세트산("EDTA"), 이의 유도체, 펩티드 모이어티 Dap-Asp-Cys 및 이의 유도체(미국 특허 제7,128,893호 참조) 및 기타가 당업계에 공지되어 있다.
- [0080] 유용한 영상화제 중의 또 다른 예는 조영제를 포함한다. 조영제는 예를 들어, 자기 공명 영상(MRI)에 널리 사용된다. 가도베네이트(gadobenate), 가도부트롤(gadobutrol), 가도디아미드(gadodiamide), 가도포스베셋(gadofosveset), 가도펜테테이트(gadopentetate), 가도테레이트(gadoterate), 가도테리돌(gadoteridol), 가도베르세타미드(gadoversetamide), 가도세테이트(gadoxetate) 및 산화철을 포함하여 다양한 조영제가 당업자에게 공지되어 있다.
- [0081] 유용한 영상화제 중의 또 다른 예는 형광 염료, 예컨대 플루오레닐메틸옥시카르보닐(FMOC) 및 이의 유도체, 알렉사플루오르(AlexaFluor) 염료, 오리건 그린(Oregon Green) 염료, 플루오레세인, BODIPY(보론-디피로메텐(boron-dipyrromethene)) 염료, 시아닌 염료, 로다민 염료, 디라이트(DyLight) 염료 및 텍사스 레드(Texas Red)를 포함한다.
- [0082] 다른 구현예에서, A는 진단제이다. 본 발명의 화합물 내에서 이용될 수 있는 예시적인 진단제는 영상화제, 동위 원소 제제(agent) 또는 방사성 제제(agent)를 포함한다.
- [0083] 다른 구현예에서, 링커 L은 생체 내에서 A를 방출할 수 있는 작용기를 포함한다. 상기 방식에서, 모이어티 A는 생체 내에서 방출된다. A를 방출할 수 있는 적합한 작용기는 링커에 연결된 모이어티 A 상에 있는 작용기의 성질에 의존한다. 예를 들어, A 상의 작용기가 히드록실기(즉, -OH) 또는 아미노기(-NH<sub>2</sub>)인 경우, A와 L 사이에 각각 에스테르 결합 또는 아마이드 결합을 형성하도록 L 상의 작용기는 카르복실레이트일 수 있다. A 상의 작용기가 카르복실산인 경우, L 상의 상응하는 작용기는 히드록실기 또는 아미노기여서 에스테르 결합 또는 아마이드 결합을 각각 형성할 수 있다. 이황화 결합, 에스테르 결합, 티올-말레이미드(thiol-maleimide) 결합 및 이와 유사한 결합을 포함하여 생체 내에서 A를 방출할 수 있는 L 상의 다른 적합한 작용기가 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0084] 다른 구현예에서, A는 치료제이다. 적합한 치료제는 암, 자가면역 질환(예를 들어, 류머티스성 관절염), 바이러스 감염(예를 들어, HIV 감염) 등의 치료를 위해 당업자에게 공지된 것들을 포함한다. 본 발명의 화합물 내 유용한 예시적인 치료제로 블레오마이신(bleomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 도세탁셀(docetaxel), 이리노테칸(irinotecan), 모노메틸 아우리스타틴(monomethyl auristatin) E, 메르탄신(mertansine), 파클리탁셀(paclitaxel), SN-38, 테시린(tesirine), 튜블리신(tubulysin), 빈카 알칼로이드류(vinca alkaloids) 및 이의 유사체 또는 유도체, HIV 프로테아제 억제제, HIV 융합 억제제, HIV 역전사 효소 억제제, HIV 인테그라아제 억제제, HIV 진입 억제제 및 자가면역 질환을 위한 치료제가 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 본 발명의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트의 특정 예로는,
- [0086] 시클로[Phe-Tyr-Lys(iPr)-(D-Arg)-2Nal-Gly-(D-Glu)]-Lys(iPr)-(mini-PEG6)-Cys(S-파클리탁셀)-Gly-NH<sub>2</sub>(여기서 상기 시클릭 구조는 D-Glu(서열 번호:3)의 측쇄에 연결된 Phe의  $\alpha$ -아미노와의 사이에 형성됨); 또는
- [0087] R<sup>a</sup>-시클로[Cys-Tyr-Lys(iPr)-(D-Arg)-2Nal-Gly-Cys]-Lys(iPr)-R<sup>b</sup>(서열 번호:4);



마이신, 칼리케아미신(calicheamicin), 다우노루비신, 도세탁셀, 독소루비신, 이리노테칸, 메르탄신, 모노메틸 아우리스타틴 E, 파클리탁셀, SN-38, 테시린, 토폠폠테칸(topotecan), 투블리신, 빈카 알칼로이드류 및 이의 유사체 또는 유도체 및 이들의 조합물이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0111] L은 예를 들어,  $H_2N-CH_2CH_2-(PEG)_m-CH_2CH_2-COOH$ ,  $HOOC-CH_2CH_2-(PEG)_m-CH_2CH_2-COOH$  또는  $H_2N-CH_2CH_2-(PEG)_m-CH_2CH_2-NH_2$ 의 형태인 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 천연 및 비천연 아미노산 또는 폴리아미노산(PAA)과 같은 임의의 생체 적합성 2 작용성 링커일 수 있고, m은 0 내지 100, 전형적으로 1 내지 50, 종종 1 내지 25 및 보다 종종 1 내지 10의 정수이다. 일반적으로, L이 중합체(예를 들어, PEG, PAA)인 경우, 사슬 내의 단량체 총수는 약 1(즉, 단량체) 내지 약 20, 전형적으로 약 1 내지 약 10 및 종종 약 1 내지 6이다.

[0112] 다른 구현예에서, 화학식 III의 화합물 내 A는 진단제, 예컨대 방사성 제제, 형광 제제 등이다. 상기 영상화제는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 자기 공명 영상화제를 위한 조영제, 초음파 조영제 및 방사선(radio) 조영제가 있다. 예를 들어, en.wikipedia.org/wiki/Contrast\_agent 참조.

[0113] 또한, 본 명세서에 기재된 다양한 그룹의 조합으로 다른 구현예가 형성될 수 있다. 상기 방식으로, 본 발명 내의 다양한 화합물이 구현된다.

[0114] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘주게이트(화학식 I의 화합물의 A가 진단제임)를 포함하는 진단 키트를 제공한다.

[0115] 본 발명의 다른 측면은 화학식 I의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 약학적으로 허용가능한 담체는 희석제, 부형제, 향미제, 보조제, 결합제, 안정화제, 착색제 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 일반적으로, "약학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 일반적으로 안전하고 독성이 없으며 생물학적으로나 또는 달리 바람직한 약학 조성물을 제조하는데 유용한 임의의 부형제를 지칭하고 인간 약학적 용도뿐만 아니라 수의학적 용도로도 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0116] 본 발명은, 본 발명의 하나 이상의 화합물 또는 개별 이성질체, 이성질체의 라세미 또는 비-라세미 혼합물 또는 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 용매화물과 함께 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및 임의로 기타 치료적 및/또는 예방적 성분을 포함하는 약학 조성물을 포함한다.

[0117] 일반적으로, 본 발명의 화합물은 유사한 효용성을 제공하는 제제에 대해 허용된 임의의 투여 방식으로 치료적 유효량이 투여된다. 치료될 질환의 중증도, 대상체의 연령 및 상대적인 건강, 사용되는 화합물의 효능, 투여 경로 및 형태, 투여가 지시되는 적응증 및 관련된 의사의 선호 및 경험과 같은 수많은 요인에 따라, 적합한 투여량 범위는 전형적으로 매일 1-500 mg, 전형적으로 매일 1-100 mg 및 종종 매일 1-30 mg이다. 상기 질환을 치료하는 당업자는 전형적으로, 과도한 실험없이 개인적인 지식 및 본 출원의 개시에 의존하여 본 발명의 화합물의 치료적 유효량을 확인할 수 있다.

[0118] 전형적으로, 본 발명의 화합물은 경구(불 및 설하 포함), 직장, 비강, 국소, 폐, 질 또는 비경구(근육내, 동맥내, 척추 강내, 피하 및 정맥내 포함) 투여에 적합한 것 또는 흡입 또는 흡입제에 의한 투여를 위해 적합한 형태를 포함한 약학적 제형으로 투여된다. 전형적인 투여 방식은 일반적으로 고통의 정도에 따라 조정될 수 있는 편리한 일일 투여 요법을 이용한 경구 투여이다.

[0119] 본 발명의 화합물 또는 화합물들과 함께 하나 이상의 통상적 보조제, 담체 또는 희석제가 약학 조성물 및 단위 투여량 내로 배치될 수 있다. 상기 약학 조성물 및 단위 제형은 추가의 활성 화합물 또는 주성분을 포함하거나 포함하지 않으면서 통상적인 비율로 통상적인 성분을 포함할 수 있고, 상기 단위 제형은 이용될 활성 성분을 의도된 일일 투여량 범위에 상응하는 임의의 적합한 유효량으로 함유할 수 있다. 상기 약학 조성물은 고체, 예컨대 정제 또는 충전 캡슐, 반고체, 분말, 서방성 제형 또는 액체, 예컨대 용액, 현탁액, 유제, 엘릭시르제 또는 경구용 충전 캡슐; 또는 직장 또는 질 투여를 위한 좌제 형태; 또는 비경구 용도의 무균 주사용 용액 형태로 이용될 수 있다. 그에 따라 정제 당 활성 성분 약 1 밀리그램 또는 보다 광범위하게 약 0.01 내지 약 100 밀리그램을 함유하는 제형이 대표적인 적합한 단위 제형이다.

[0120] 본 발명의 화합물은 매우 다양한 경구 투여 제형으로 제형화될 수 있다. 약학 조성물 및 제형은 활성 성분으로서 본 발명의 화합물 또는 화합물들 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 고체 또는 액체 중 하나일 수 있다. 고체 형태 조제는 분말, 정제, 환약, 캡슐, 교감, 좌제 및 분산성 과립을 포함한다. 고체 담체는 또한 희석제, 향미제, 가용화제, 율활제, 현탁제, 결합제, 보존제, 정제 봉해제 또는 캡슐화 물질로서 작용할 수 있는 하나 이상의 물질일 수 있다. 분말에서, 상기 담체는 일반적으로 미

분된 활성 성분과의 혼합물인 미분된 고체이다. 정제에서, 상기 활성 성분은 일반적으로 필요한 결합능력을 갖는 담체와 적합한 비율로 혼합되고, 원하는 형상 및 크기로 압축된다. 분말 및 정제는 바람직하게는 약 1 내지 약 70 %의 활성 화합물을 함유한다. 적합한 담체는 탄산 마그네슘, 스테아르산 마그네슘, 활석, 설탕, 락토오스, 펙틴, 덱스트린, 전분, 젤라틴, 트래거캔스 고무, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 저 융점 왁스, 코코아 버터 및 이와 유사한 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 담체를 갖거나 갖지 않는 활성 성분이 그것과 관련된 담체로 둘러싸인 캡슐로 제공될 경우, 상기 용어 "조제(preparation)"는 담체로서 캡슐화 물질을 갖는 활성 화합물의 제형을 포함하는 것으로 의도된다. 유사하게, 교갑 및 로젠지가 포함된다. 정제, 분말, 캡슐, 환약, 교갑(cachet) 및 로젠지는 경구 투여에 적합한 고체 형태일 수 있다.

[0121] 경구 투여에 적합한 기타 형태는 유제, 시럽, 엘릭시르제, 수용액, 수성 현탁액을 포함하는 액체 형태 조제 또는 사용 직전에 액체 형태 조제로 전환되도록 의도된 고체 형태 조제를 포함한다. 유제는 용액, 예를 들어 수성 프로필렌 글리콜 용액으로 제조될 수 있거나 예를 들어, 레시틴, 소르비탄 모노올리에이트 또는 아카시아와 같은 유화제를 함유할 수 있다. 활성 성분을 물에 용해시키고 적합한 착색제, 향미제, 안정화제 및 증점제를 첨가하여 수성 용액을 제조할 수 있다. 미분된 활성 성분을 점성 물질, 예컨대 천연 또는 합성 검, 수지, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 기타 공지된 현탁제와 함께 물에 분산시켜 수성 현탁액을 제조할 수 있다. 고체 형태 조제는 용액, 현탁액 및 유제를 포함하고, 활성 성분 외에 착색제, 향미제, 안정화제, 완충액, 인공 및 천연 감미제, 분산제, 증점제, 가용화제 및 이와 유사한 것을 함유할 수 있다.

[0122] 본 발명의 화합물은 또한 비경구 투여(예를 들어 볼루스 주사 또는 연속 주입과 같은 주사)를 위해 제형화될 수 있고 앰플, 미리 채워진 주사기, 소량 주입의 단위 용량 형태 또는 보존제가 첨가된 다회 용량 컨테이너로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중 현탁액, 용액 또는 에멀전(예를 들어 수성 폴리에틸렌 글리콜 중의 용액)과 같은 형태를 취할 수 있다. 유성 또는 비-수성 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일(예를 들어, 올리브 오일) 및 주사 가능한 유기 에스테르(예를 들어, 에틸 올리에이트)가 포함되고, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 또는 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화 제제를 함유할 수 있다. 택일적으로, 활성 성분은 용액으로부터 동결건조에 의해 수득되거나 멸균 고체의 무균적 분리에 의해 수득된 분말 형태일 수 있고 적합한 비히클, 예를 들어 멸균되고 발열원이 없는 물로 사용 전 만들어질 수 있다.

[0123] 본 발명의 화합물은 연고(ointments), 크림 또는 로션으로서 표피에 국소 투여를 위해 제형화되거나 또는 경피 패치로서 제형화될 수 있다. 예를 들어, 연고(ointments) 및 크림은 적합한 증점제 및/또는 겔화제를 첨가하여 수성 또는 유성 베이스로 제형화될 수 있다. 로션은 수성 또는 유성 베이스로 제형화될 수 있고 또한 일반적으로 하나 이상의 유화제, 안정화제, 분산제, 현탁제, 증점제 또는 착색제를 함유할 것이다. 구강으로 국소 투여하기에 적합한 제형은 향미 베이스, 통상적으로 자당 및 아카시아 또는 트래거캔스 고무 중에 활성제를 포함하는 로젠지; 젤라틴 및 글리세린 또는 자당 및 아카시아와 같은 비활성 베이스에 활성 성분을 포함하는 향정; 및 적합한 액체 담체 중에 활성 성분을 포함하는 구강 청결제를 포함한다.

[0124] 본 발명의 화합물은 좌약으로 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 지방산 글리세리드 또는 코코아 버터의 혼합물과 같은 저 융점 왁스를 먼저 용융시키고 예를 들어 교반에 의해 활성 성분을 균일하게 분산시킨다. 이어서 용융된 균질 혼합물을 편리한 크기의 주형에 붓고 냉각시켜 고형화한다.

[0125] 본 발명의 화합물은 또한 질 투여를 위해 제형화될 수 있다. 활성 성분 외에 상기 담체를 함유하는 질 좌약(pessaries), 탐폰, 크림, 겔, 연고(pastes), 폼(foams) 또는 스프레이가 적절한 것으로 당업계에 공지되어 있다.

[0126] 본 발명의 화합물은 비강 투여를 위해 제형화될 수 있다. 용액 또는 현탁액은 통상적 수단, 예를 들어, 점적기, 피펫 또는 스프레이로 비강에 직접 적용된다. 상기 제형은 단일 용량 또는 다회 용량 형태로 제공될 수 있다. 다회 용량 형태의 점적기 또는 피펫의 경우에, 환자가 미리 결정된 적절한 부피의 용액 또는 현탁액을 투여하여 달성될 수 있다. 스프레이의 경우에는, 예를 들어 원자화 스프레이 계량 펌프의 수단으로 달성될 수 있다.

[0127] 본 발명의 화합물은 특히 기도 및 비강 내 투여를 포함하여 에어로졸 투여를 위해 제형화될 수 있다. 화합물은 일반적으로 예를 들어 대략 5 미크론 이하의 작은 입자크기를 가질 것이다. 상기 입자 크기는 당업계에 공지된 수단, 예를 들어 미분화에 의해 얻어질 수 있다. 활성 성분은 클로로플루오로카본(CFC), 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄(dichlorodifluoromethane), 트리클로로플루오로메탄(trichlorofluoromethane) 또는 디클로로테트라플루오로에탄(dichlorotetrafluoroethane) 또는 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스와 같은 적합한 압축 불활성 가스와 함께 가압 팩으로 제공된다. 에어로졸은 또한 레시틴과 같은 계면활성제를 알맞게 함유할 수 있다.

약물의 용량은 계량 밸브로 조절할 수 있다. 택일적으로 활성 성분은 건조 분말 형태, 예를 들어, 적합한 분말 베이스, 예컨대 락토오스, 전분, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈(PVP)과 같은 전분 유도체 중 화합물의 분말 혼합물로 제공될 수 있다. 분말 담체는 전형적으로 비강에서 겔을 형성한다. 분말 조성물은 단위 용량 형태, 예를 들어 분말이 흡입기에 의해 투여될 수 있는 예를 들어 젤라틴 또는 블리스터 팩의 캡슐 또는 카트리지로 제공될 수 있다.

- [0128] 원하는 경우, 제형을 활성 성분의 지속적인 방출 또는 제어된 방출에 알맞은 장용 코팅으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 경피 또는 피하 약물 전달 장치로 제형화될 수 있다. 상기 전달 시스템은 화합물의 서방성이 필요하거나 회피하는 경우 및 치료 요법에 대한 환자의 순응이 중요한 경우에 유리하다. 경피 전달 시스템 내 화합물은 피부에 접촉되는 고체 지지체에 흔히 부착된다. 관심 화합물은 또한 침투 증강제 예를 들어, 아존(Azone)(1-도데실아자시클로헥탄-2-온)과 결합될 수 있다. 서방성 전달 시스템은 수술 또는 주사에 의해 피하 층 내로 피하 삽입될 수 있다. 상기 피하 이식은 지용성 막 예를 들어, 실리콘 고무 또는 생분해성 중합체, 예를 들어, 폴리락트산으로 화합물을 캡슐화한다.
- [0129] 약학적 조제는 전형적으로 단위 제형이다. 상기 형태에서 상기 조제는 적절한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 용량으로 종종 세분화된다. 단위 제형은 포장된 조제일 수 있고, 상기 포장은 분리된 양의 조제, 예컨대 소포된 정제, 캡슐 및 바이알 또는 앰플 내 분말을 함유할 수 있다. 또한, 단위 제형은 캡슐, 정제, 교감 또는 로젠지 그 자체일 수 있거나 또는 포장된 형태로 이들의 적절한 수의 어느 것일 수 있다.
- [0130] 기타 적합한 약학적 담체 및 이들 제형이 문헌[Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa]에 기재되어 있다.
- [0131] 치료에 사용하기 위해, 치료적 유효량의 화학식 I의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 원료 화학 물질로서 투여할 수 있는 경우, 활성 성분을 약학 조성물로 제공할 수 있다. 따라서, 본 개시는 또한 치료적 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 전구약물 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 조합물에 적용되는 경우, 상기 용어는 조합하여, 연속적으로 또는 동시에 투여되는지 상관없이, 치료 효과를 초래하는 활성 성분의 조합된 양을 지칭한다. 화학식 I의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염은 상기에 기재된 바와 같다. 담체(들), 희석제(들) 또는 부형제(들)은 제형의 다른 성분들과 양립될 수 있다는 점에서 허용가능해야 하며 이의 수용체에 해롭지 않아야 한다. 본 개시의 다른 측면에 따라, 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 이의 전구약물과 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 혼합하는 것을 포함한, 약학적 제형을 제조하는 방법이 또한 제공된다.
- [0132] 본 개시의 조성물이 본 개시의 화합물 및 하나 이상의 추가 치료제 또는 예방제의 조합을 포함하는 경우, 상기 화합물 및 추가 제제 모두 통상적으로 단일치료 요법에서 정상적으로 투여되는 투여량의 약 10 내지 150 % 및 보다 전형적으로 약 10 내지 80 %의 투여량 수준으로 존재한다.
- [0133] 본 발명의 다른 측면은 환자의 암세포를 영상화하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 환자에게 유효량의 화학식 I(A가 영상화제)의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트 영상화제를 투여하고, 영상화 장치를 이용하여 상기 환자에서 암세포를 영상화하는 것을 포함한다. 이용되는 영상화 장치는 화학식 I의 화합물의 영상화제 A의 성질에 의존한다. 예를 들어, A가 양전자 방출 방사성 동위 원소인 경우 이용되는 영상화 장치는 PET 스캐너이고, A가 조영제인 경우 영상화 장치는 컴퓨터 단층 촬영 장치 또는 MRI 장치일 수 있다. A가 방사성 동위 원소인 경우, 영상화 장치는 x-선 기계 또는 기타 유사 장치일 수 있다.
- [0134] 본 발명의 하나의 특정 측면은 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료적 유효량의 화학식 I(A가 암 치료 약물)의 화합물 또는 화학식 I(A가 암 치료 약물)의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 암 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0135] 본 발명의 다른 특정 측면은 화학식 I의 고친화성 CXCR4 선택적 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트(PC)를 포함하는 진단 키트 또는 영상화 키트를 제공하고, 여기서 A는 각각 진단제 또는 영상화제이다.
- [0136] 본 발명의 또 다른 특정 측면은 류머티스성 관절염, 폐섬유증, HIV 감염 또는 암으로 고통받는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료적 유효량의 화학식 I의 화합물을 이의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법에서, 화학식 I의 화합물의 A는 치료될 특정 임상 증상을 치료하는데 이용될 수 있는 치료제이다. 본 발명의 화합물을 이용하여 치료될 수 있는 일부 암은 유방암, 췌장암, 흑색종, 전립선암, 신장암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 폐암, 난소암, 결장암, 다발성 골수종, 다형성교아종 및 만성 림프성 백혈병을

포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0137] 본 발명의 추가 목적, 장점 및 신규한 특징은 하기 실시예(제한하려는 의도가 아님) 실험 시 당업자에게 명백해질 것이다. 실시예에서, 실행을 위해 구조적으로 축소된 절차는 현재 시제로 기재되고, 실험실에서 수행되어 온 절차는 과거 시제로 기재된다.
- [0138] **실시예**
- [0139] 하기 약어가 사용된다: Ac: 아세틸; Boc: 터트-부틸옥시카르보닐; BOP: (벤조트리아졸-1-일옥시)-트리스(디메틸아미노) 포스포늄 헥사플루오로포스페이트; Bz: 벤조일; Bzl: 벤질; Dab: 1,4-디아미노부티르산; Dap: 1,3-디아미노프로피온산; DCC: 디시클로헥실-카르보디이미드; DCM: 디클로로메탄; DIC: 디이소프로필 카르보디이미드; DIEA: 디이소프로필-에틸아민; DMAP: 4-(*N,N*-디메틸아미노)피리딘; DMF: *N,N*-디메틸 포름아미드; DMSO: 디메틸-술폰; EDT: 1,2-에탄-디티올; Et: 에틸; Fmoc: 9-플루오레닐메톡시 카르보닐; HATU: *N*-[(디메틸아미노)-1*H*-1,2,3-트리아졸로[4,5-*b*]피리딘-1-일메틸렌]-*N*-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트 *N*-옥사이드; HBTU: *O*-벤조-트리아졸일-*N,N,N',N'*-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트; HCTU: 1*H*-벤조트리아조-리움 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-5-클로로-3-옥사이드 헥사플루오로포스페이트; HOBt: 히드록시벤조트리아졸; hCys: 호모시스테인; iPr: 이소프로필; IPA: 이소프로필 알콜; Me: 메틸; Mmt: 4-메톡시트리틸(mthoxytrityl); Mpa: 3-메르캅토프로피온산; 2NaI: 2-나프틸알라닌; 1NaI: 1-나프틸알라닌; NMM: *N*-메틸모르폴린; NMP: *N*-메틸-피롤리돈; Orn: 오르니틴; Pbf: 2,2,4,6,7-펜타메틸-디히드로벤조푸란-5-술폰일; PBS: 인산 완충 식염수; PyBOP: (벤조트리아졸-1-일옥시)-트리스(피롤리디노)-포스포늄 헥사플루오로-포스페이트; PyBrOP: 브로모트리스(피롤리디노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트; *t*Bu: 터트-부틸; TFA: 트리플루오로아세트산; TFE: 트리플루오로에탄올(trifluoroethanol); THF: 테트라히드로푸란; TIS: 트라이소프로필 실란; Trt: 트리틸; mini-PEG6: 에틸렌 글리콜의 6-mer; 모든 공통 아미노산은 3 개의 문자 기호로 표현되거나 그렇지 않으면 명시된다.
- [0140] **질량 분광학(MS) 분석:** 하기 실시예에 기재된 바와 같이 본 발명의 화합물 제조는 제한적이기보다 예시적인 의미를 갖는다. 각각의 하기 실시예에서, 관측된 분자량은 디-콘볼루션 값으로 보고된다. 상기 디-콘볼루션 값은  $MW(\text{관측}) = n(m/z) - n$ 의 화학식에서 파생되고,  $m/z$ 는 하전된 이온(양성 모드)을 나타내고  $n$ 은 특정한 종의 하전수이다. 다수의 하전된 종이 질량 스펙트럼에 존재할 경우, 관측된 분자량은 평균으로 보고된다.
- [0141] **펩티드 합성, 환형 구조 형성 및 염 교환의 일반적인 방법:** 당업계에 공지된 고체상 펩티드 합성 화학을 이용하여 펩티드를 합성하였다. 상기 펩티드의 환형 구조는 이황화물에 대해서는, 산의 존재 하에 공기 산화 또는 요오드 산화를 이용하여 확립되었고, 비스티오에테르 고리에 대해서는 염기, 예컨대 15 mM 중탄산 암모늄 용액의 존재 하에 비스(할로메틸) 아릴 화합물, 전형적으로 비스(브로모메틸) 아릴 화합물의 1.3 당량을 사용하여, 친핵성 치환으로 확립되었다.
- [0142] 동위 원소 또는 방사성 표지된 아세톤은 다양한 판매회사로부터 상업적으로 이용가능하다. 동위 원소 또는 방사성 표지된 아세톤의 맞춤 제조가 필요한 경우 공지된 기술, 예를 들어 문헌[Rolf Voges, 등, *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14*(John Wiley & Sons (2009))]에서 방법을 찾을 수 있다.
- [0143] 다양한 링커를 갖는 펩티드-약물 콘쥬게이트의 제조는 당업계에 공지되어 있다(G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press Elsevier, 2008). 예를 들어, 시스테인 측쇄의 티올을 통한 콘쥬게이션(즉, 펩티드의 연결 또는 부착)에 관한 절차는 Backer 및 그의 동료들에 의해 보고되었다(참조: M. V. Backer, 등, pp 275-294 in *Methods in Molecular Biology*, vol. 494: *Peptide-Based Drug Design*, edited by L. Otvos, Humana Press, New York, NY, 2008).
- [0144] **파클리탁셀 활성화** - 2'-말레이미드-파클리탁셀 제조: 1 g의 파클리탁셀(1.2 mmole)을 160 mL의 DCM에 용해시키고, 0.12 mmole의 DMAP를 첨가하고 0 °C로 상기 혼합물을 냉각시킴. 냉각된 혼합물에 2.4 mmole의 3-말레이미도 프로피온산을 첨가한 뒤, 1.2 mmole의 DIC를 교반 하에 첨가하였다. 이어서 상기 반응 혼합물을 서서히 실온으로 가온하고 연속적인 교반 하에 18 시간 동안 실온에서 커플링 반응을 진행시켰다. 2'-말레이미드-파클리탁셀의 미정제 생성물을 순도 >90 %로 정제하여 환형 CXCR4 길항제 펩티드에 콘쥬게이션하기 위해 이용했다.
- [0145] 고친화성 CXCR4 결합 리간드 펩티드 콘쥬게이트에 접합되는 암 치료법으로서 본 명세서에 개시된 대부분의 약물은 당업자에게 공지된 유사한 방식으로 혼입되고 활성화될 수 있다.
- [0146] **정제, 염 형태 전환 및 최종 생성물 특성화:** 최종 생성물을 역상 HPLC로 정제하고 분석용 HPLC 및 질량 분광학에 의해 추가로 특성을 규명하였다. 역상 HPLC로 정제된 펩티드는 일반적으로 트리플루오로아세트산(TFA) 형태

였다. 상기 염은 전형적으로 약학적으로 보다 친화적인 염 형태, 예컨대 아세트산 또는 염산 염 형태로 전환되었다. TFA 염 중의 펩티드를 염산 염으로 전환시키는 것은 희석된 염산 용액에서 TFA 염 중의 펩티드를 반복적으로 동결건조하여 달성될 수 있다. TFA 염 중의 펩티드를 아세테이트 염으로 전환시키기 위해, 전형적으로 하기 방법이 이용되었다. 강한 음이온 교환 수지(염화물 형태, 치환능 3 mmole/g, 물 함량 50 %, 펩티드 1 g 당 2 g의 수지를 이용함)를 먼저 초순수(milli Q water)로 3회 세척하고, 이어서 1 N NaOH 용액(3 회)으로 회당 5 분씩 3회, 이어서 초순수로 회당 5 분씩 5회 세척하였다. 상기 수지를 pH가 약 7.4에 도달할 때까지 75 % 에탄올 물로 추가 세척하였다. 상기 수지를 10 % 아세트산 용액으로 매 회 5 분씩 3회 처리하였다. 이어서 상기 수지를 1 % 아세트산 용액으로 매 회 5 분씩 3회 세척하였다. 정제된 펩티드의 염 전환을 위해 상기 수지가 준비되었다.

[0147] 상기 정제되고 동결건조된 펩티드를 1 % 아세트산 용액에 용해시키고 상기 기재된 바와 같이 제조된 수지를 첨가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반 또는 자기 교반하였다. 상청액을 분리하였다. 수지를 1 % 아세트산 용액으로 3회 세척하였다. 상기 상청액 및 세척 용액을 합하여 0.22 mm 막으로 여과하고 동결건조시켜 아세테이트 염 중의 펩티드를 얻었다.

[0148] **실시예 1: (MLB-1707)의 합성**

[0149] **펩티드 사슬 조립:** Cys(Mmt)-Tyr(tBu)-Lys(iPr,Boc)-(D-Arg(Pbf))-2Nal-Gly-Cys(Mmt)-Lys(iPr,Boc)-(mini-PEG6)-Cys(Trt)(서열 번호:8)의 펩티드 사슬이 Rink AM 수지를 이용하여 표준 Fmoc 화학으로 조립되었다. 간단히, 0.8 g의 Rink AM 수지를 DCM 중에서 14 시간 동안 팽윤시킨 후 DMF로 4회 세척하였다. DMF 중 20 % 피페리딘으로 20 분 동안 실온에서 Fmoc 제거를 수행하고 DMF로 여러 번 세척하였다. 닌히드린 테스트는 음성이었다. 단계적인 사슬 조립을 선형 펩티드 C-말단의 Fmoc-Cys(Trt)-OH로 시작했다. 3 당량의 보호된 아미노산 Fmoc-Cys(Trt)-OH를 DMF 중 DIC/HOBt로 활성화시키고 실온에서 2 시간 동안, 상기 제조된 Fmoc-제거 Rink AM 수지에 커플링시켰다. 닌히드린 테스트는 음성이었다. 비-반응 아미노기의 캡핑을 아세트산 무수물/DIEA/DCM의 1:1:2 부피비 혼합물 5 mL로 30 분 동안 수행했다. 이어서 DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc를 제거하였다. 하기 잔기가 순차적으로 캡핑없이 커플되었다: Fmoc-mini-PEG6-OH, Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2Nal-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH 및 Fmoc-Cys(Mmt)-OH. 최종 잔기 Fmoc-Cys(Mmt)의 커플링 후에, DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc 보호를 다시 제거하였다. 실온에서 30 분 동안 5 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DMF(1:1:4, v/v/v) 혼합물로 N-말단 아세틸화를 수행했다. 이어서 수지를 DMF로 3회 세척한 다음 DCM으로 2회 세척하고, 진공 건조시켰다.

[0150] **Cys 잔기 상의 Mmt 보호 제거 및 교체 상에서 고리화:** 수지 1 g 당 30 mL의 절단 각테일(TFA/EDT/TIS/DCM, 3:1.5:1.5:100, v/v)을 이용하여, Cys 측쇄의 Mmt 보호를 제거하였다. 상기 탈보호 절차를 실온에서 매 회 10 분씩, 3회 반복하였다. 이어서 수지를 DCM으로 3회 및 DMF로 10회 세척하여, 잔여 TFA를 완전히 제거하였다. 잘 세척한 수지에, 수지 1 g 당 10 mL의 DMF 및 2 mL의 DIEA를 첨가하고, 이어서 1.2 eq의 1,2-비스(브로모메틸)벤젠을 서서히 적가하였다. 고리화 반응을 실온에서 1 시간(h) 동안 진행시켰다. 시험 절단 및 MS로 고리화 완료를 확인하였다. 이어서 반응 혼합물을 수지로부터 배출시키고, 수지를 DMF로 3회 및 DCM으로 2회 추가 세척하였다. 이어서 상기 수지를 절단 전에 진공 건조시켰다.

[0151] **교체 지지체로부터 펩티드 절단 및 측쇄 탈보호:** 실온에서 70 분 동안, 수지 1 g 당 10 mL의 절단 각테일(100 mL의 TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/티오아니솔/페놀 용액당 81.5 mL TFA, 2.5 mL EDT, 1.0 mL TIS, 5.0 mL H<sub>2</sub>O, 5.0 mL 티오아니솔 및 5.0 g 페놀 함유)을 이용하여 완성된 펩티드를 건조 수지로부터 절단 및 탈보호하였다. 수지를 여과로 제거하고 수 mL의 절단 각테일로 세척했다. 절단 혼합물에 8 배 부피의 메틸 t-부틸 에테르를 첨가하였다. 미정제 펩티드 침전물을 3000 rpm에서 3 분 동안 원심분리하여 분리하였다. 상기 미정제 펩티드 침전물을 메틸 t-부틸 에테르로 3회 세척하였다. 상기 미정제 펩티드를 분취용 HPLC 상에서 >90 % 순도로 정제하고 동결건조시켰다.

[0152] **파클리티락셀의 컨쥬게이션:** 상기 정제된 환형 펩티드를 앞서 제조된 2'-말레이미드-파클리티락셀과 1:1.2 몰비로 혼합하고, 30 % 수성 아세토니트릴을 첨가하여 최종 펩티드 농도 10 mg/mL을 얻었다. 0.5 몰/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 용액을 이용하여 반응 혼합물의 pH를 7.5로 조정하였다. 컨쥬게이션 반응을 약 30 분 내에 완료하고 MS로 확인하였다. 최종 생성물을 역상 분취용 컬럼 Daisogel(50x250 mm, 8 mm)(이동상 - 용매 A: 0.1 % TFA 물; 용매 B: 0.1 % TFA 아세토니트릴)을 이용하여 정제하였다. 표적 생성물을 함유하는 분획을 합하여 동결건조시켰다(TFA 염).

- [0153] 상기 기재된 바와 같은 염 교환으로 아세테이트 염의 펩티드를 얻었다. 최종 펩티드 생성물의 분석 HPLC 순도는 95.14 %; MW 계산치: 2725.56; MW 관측치: 2724.75이었다.
- [0154] **실시예 2:** (MLB-1708)의 합성
- [0155] **펩티드 사슬 조립:** Cys(Trt)-Cys(Mmt)-Tyr(tBu)-Lys(iPr, Boc)-(D-Arg(Pbf))-2NaI-Gly-Cys(Mmt)-Lys(iPr, Boc)-Gly(서열 번호:9)의 펩티드 사슬을 Rink AM 수지를 이용하여 표준 Fmoc 화학으로 조립하였다. 간단히, 3.6 g의 Rink AM 수지를 DCM 중에서 14 시간 동안 팽윤시키고 이어서 DMF로 4 회 세척하였다. 실온에서 20 분 동안 DMF 중 20 % 피페리딘으로 Fmoc의 제거를 수행하고 DMF로 여러 번 세척했다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 단계적인 사슬 조립은 선형 펩티드의 C-말단 Fmoc-Gly-OH로 시작했다. 3 당량의 보호된 아미노산 Fmoc-Gly-OH를 DMF 중의 DIC/HOBt로 활성화시키고 실온에서 2 시간 동안, 상기 제조된 Fmoc-제거 Rink AM 수지에 커플시켰다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 20 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DCM의 혼합물 1:1:2의 비율에서 비-반응 아미노기의 캡핑을 30 분 동안 수행하였다. 이어서 DMF 중의 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc를 제거하였다. 하기 잔기들이 캡핑없이 순차적으로 커플되었다: Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2NaI-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH 및 Fmoc-Cys(Trt)-OH. 마지막 잔기 Fmoc-Cys(Trt)-OH의 커플링 후에, DMF 중의 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc 보호를 다시 제거하였다. 실온에서 30 분 동안 20 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DMF(1:1:4, v/v/v) 혼합물로 N-말단 아세틸화를 수행했다. 이어서 수지를 DMF로 3 회 세척한 다음 DCM으로 2 회 세척하여, 진공 건조시켰다.
- [0156] **Cys 잔기 상의 Mmt 보호 제거 및 교체 상에서 고리화:** 수지 1 g 당 30 mL의 절단 각테일(TFA/EDT/TIS/DCM, 3:1.5:1.5:100, v/v)을 이용하여, Cys 측쇄의 Mmt 보호를 제거하였다. 상기 탈보호 절차를 실온에서 매 회 10 분씩, 3 회 반복하였다. 이어서 수지를 DCM으로 3 회 및 DMF로 10 회 세척하여, 잔여 TFA를 완전히 제거하였다. 잘 세척한 수지에, 수지 1 g 당 10 mL의 DMF 및 2 mL의 DIEA를 첨가하였다. 고리화 반응을 실온에서 1 시간 동안 진행시켰다. 시험 절단 및 MS로 고리화 완료를 확인하였다. 이어서 반응 혼합물을 수지로부터 배출시키고, 수지를 DMF로 3 회 및 DCM으로 2 회 추가 세척하였다. 이어서 상기 수지를 절단 전에 진공 건조시켰다.
- [0157] **교체 지지체로부터 펩티드 절단 및 측쇄 탈보호:** 실온에서 70 분 동안, 수지 1 g 당 10 mL의 절단 각테일(100 mL의 TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/티오아니솔/페놀 용액당 81.5 mL TFA, 2.5 mL EDT, 1.0 mL TIS, 5.0 mL H<sub>2</sub>O, 5.0 mL 티오아니솔 및 5.0 g 페놀 함유)을 이용하여 완성된 펩티드를 건조 수지로부터 절단 및 탈보호하였다. 수지를 여과로 제거하고 수 mL의 절단 각테일로 세척했다. 절단 혼합물에 8 배 부피의 메틸 t-부틸 에테르를 첨가하였다. 미정제 펩티드 침전물을 3000 rpm에서 3 분 동안 원심분리하여 분리하였다. 상기 미정제 펩티드 침전물을 메틸 t-부틸 에테르로 3 회 세척하였다. 상기 미정제 펩티드를 분취용 HPLC 상에서 >90 % 순도로 정제하고 동결건조시켰다.
- [0158] **파클리티셀의 컨주게이션:** 상기 정제된 환형 펩티드를 앞서 제조된 2' -말레이미드-파클리티셀과 1:1.2 몰비로 혼합하고, 30 % 수성 아세토니트릴을 첨가하여 최종 펩티드 농도 10 mg/mL을 얻었다. 0.5 몰/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 용액을 이용하여 반응 혼합물의 pH를 7.5로 조정하였다. 컨주게이션 반응을 약 30 분 내에 완료하고 MS로 확인하였다. 최종 생성물을 역상 분취용 컬럼 Daisogel(50x250 mm, 8 mm)(이동상 - 용매 A: 0.1 % TFA 물; 용매 B: 0.1 % TFA 아세토니트릴)을 이용하여 정제하였다. 표적 생성물을 함유하는 분획을 합하여 동결건조시켰다(TFA 염).
- [0159] 상기 기재된 바와 같은 염 교환으로 아세테이트 염의 펩티드를 얻었다. 최종 펩티드 생성물의 분석 HPLC 순도는 95.71 %; MW 계산치: 2343.70; MW 측정치: 2342.85이었다.
- [0160] **실시예 3:** (MLB-1710)의 합성
- [0161] **펩티드 사슬 조립:** Cys(Trt)-Cys(Mmt)-Tyr(tBu)-Lys(iPr, Boc)-(D-Arg(Pbf))-2NaI-Gly-Cys(Mmt)-Lys(iPr, Boc)-Gly(서열 번호:9)의 펩티드 사슬은 Rink AM 수지를 이용하여 표준 Fmoc 화학으로 조립되었다. 간단히, 3.6 g의 Rink AM 수지를 DCM 중에서 14 시간 동안 팽윤시킨 후 DMF로 4 회 세척하였다. 실온에서 20 분 동안 DMF 중 20 % 피페리딘으로 Fmoc 제거를 수행하고 DMF로 여러 번 세척하였다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 단계적인 사슬 조립은 선형 펩티드 C-말단의 Fmoc-Gly-OH로 시작했다. 3 당량의 보호된 아미노산 Fmoc-Gly-OH를 DMF 중 DIC/HOBt로 활성화시키고 실온에서 2 시간 동안, 상기 제조된 Fmoc-제거 Rink AM 수지에 커플시켰다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 비-반응 아미노기의 캡핑을 아세트산 무수물/DIEA/DCM의 1:1:2 부피비 혼합물 20 mL로 30 분 동안 수행했다. 이어서 DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc를 제거하였다. 하기 잔기들이 캡핑없이 순차적으로 커플되었다: Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2NaI-OH, Fmoc-

D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH 및 Fmoc-Cys(Trt)-OH. 마지막 잔기 Fmoc-Cys(Trt)-OH의 커플링 후에, DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc 보호를 다시 제거하였다. 20 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DMF(1:1:4, v/v/v) 혼합물로 실온에서 30 분 동안 N-말단 아세틸화를 수행하였다. 이어서 수지를 DMF로 3 회 세척한 다음 DCM으로 2 회 세척하고, 진공 건조시켰다.

[0162] **Cys 잔기 상의 Mmt 보호 제거 및 고체 상에서 고리화:** 수지 1 g 당 30 mL의 절단 각테일(TFA/EDT/TIS/DCM, 3:1.5:1.5:100, v/v)을 이용하여, Cys 측쇄의 Mmt 보호를 제거하였다. 상기 탈보호 절차를 실온에서 매 회 10 분씩, 3 회 반복하였다. 이어서 수지를 DCM으로 3 회 및 DMF로 10 회 세척하여 잔여 TFA를 완전히 제거하였다. 잘 세척한 수지에, 수지 1 g 당 10 mL의 DMF 및 2 mL의 DIEA를 첨가하고, 이어서 1.2 eq의 1,2-비스(브로모메틸) 벤젠을 서서히 적가하였다. 고리화 반응을 실온에서 1 시간 동안 진행시켰다. 시험 절단 및 MS로 고리화 완료를 확인하였다. 이어서 반응 혼합물을 수지로부터 배출시키고, 수지를 DMF로 3 회 및 DCM으로 2 회 추가 세척하였다. 이어서 상기 수지를 절단 전에 진공 건조시켰다.

[0163] **고체 지지체로부터 펩티드 절단 및 측쇄 탈보호:** 실온에서 70 분 동안, 수지 1 g 당 10 mL의 절단 각테일(100 mL의 TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/티오아니솔/페놀 용액 당 81.5 mL TFA, 2.5 mL EDT, 1.0 mL TIS, 5.0 mL H<sub>2</sub>O, 5.0 mL 티오아니솔 및 5.0 g 페놀 함유)을 이용하여 완성된 펩티드를 건조 수지로부터 절단 및 탈보호하였다. 수지를 여과로 제거하고 수 mL의 절단 각테일로 세척했다. 절단 혼합물에 8 배 부피의 메틸 t-부틸 에테르를 첨가하였다. 미정제 펩티드 침전물을 3000 rpm에서 3 분 동안 원심분리하여 분리하였다. 상기 미정제 펩티드 침전물을 메틸 t-부틸 에테르로 3 회 세척하였다. 상기 미정제 펩티드를 분취용 HPLC 상에서 >90 % 순도로 정제하고 동결건조시켰다.

[0164] **파클리티셀의 컨주게이션:** 상기 정제된 환형 펩티드를 앞서 제조된 2' -말레이미드-파클리티셀과 1:1.2 몰비로 혼합하고, 30 % 수성 아세토니트릴을 첨가하여 최종 펩티드 농도 10 mg/mL을 얻었다. 0.5 몰/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 용액을 이용하여 반응 혼합물의 pH를 7.5로 조정하였다. 컨주게이션 반응을 약 30 분 내에 완료하고 MS로 확인하였다. 최종 생성물을 역상 분취용 컬럼 Daisogel(50x250 mm, 8 mm)(이동상 - 용매 A: 0.1 % TFA 물; 용매 B: 0.1 % TFA 아세토니트릴)을 이용하여 정제하였다. 표적 생성물을 함유하는 분획을 합하여 동결건조시켰다(TFA 염).

[0165] 상기 기재된 바와 같은 염 교환으로 아세테이트 염의 펩티드를 얻었다. 최종 펩티드 생성물의 분석 HPLC 순도는 95.07 %; MW 계산치: 2446.96; MW 측정치: 2446.50이었다.

[0166] **실시예 4:** (MLB-1711)의 합성

[0167] **펩티드 사슬 조립:** Cys(Trt)-(mini-PEG6)-Cys(Mmt)-Tyr(tBu)-Lys(iPr,Boc)-(D-Arg(Pbf))-2Nal-Gly-Cys(Mmt)-Lys(iPr,Boc)-Gly(서열 번호:10)의 펩티드 사슬은 Rink AM 수지를 이용하여 표준 Fmoc 화학으로 조립되었다. 간단히, 3.6 g의 Rink AM 수지를 DCM 중에서 14 시간 동안 팽윤시킨 후 DMF로 4 회 세척하였다. DMF 중 20 % 피페리딘으로 20 분 동안 실온에서 Fmoc 제거를 수행하고 DMF로 여러 번 세척하였다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 단계적인 사슬 조립을 선형 펩티드 C-말단의 Fmoc-Gly-OH로 시작했다. 3 당량의 보호된 아미노산 Fmoc-Gly-OH를 DMF 중 DIC/HOBt로 활성화시키고, 상기 제조된 Fmoc-제거 Rink AM 수지로 실온에서 2 시간 동안 커플시켰다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 아세트산 무수물/DIEA/DCM의 1:1:2 부피비 혼합물 20 mL로 비-반응 아미노기의 캡핑을 30 분 동안 수행했다. 이어서 DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc를 제거하였다. 하기 잔기들이 캡핑없이 순차적으로 커플되었다: Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2Nal-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-(mini-PEG6)-OH 및 Fmoc-Cys(Trt)-OH. 마지막 잔기 Fmoc-Cys(Trt)-OH의 커플링 후, DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc 보호를 다시 제거하였다. 20 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DMF(1:1:4, v/v/v) 혼합물로 실온에서 30 분 동안 N-말단 아세틸화를 수행하였다. 이어서 수지를 DMF로 3 회 세척한 다음 DCM으로 2 회 세척하고, 진공 건조시켰다.

[0168] **Cys 잔기 상의 Mmt 보호 제거 및 고체 상에서 고리화:** 수지 1 g 당 30 mL의 절단 각테일(TFA/EDT/TIS/DCM, 3:1.5:1.5:100, v/v)을 이용하여, Cys 측쇄의 Mmt 보호를 제거하였다. 상기 탈보호 절차를 실온에서 매 회 10 분씩, 3 회 반복하였다. 이어서 수지를 DCM으로 3회 및 DMF로 10 회 세척하여, 잔여 TFA를 완전히 제거하였다. 잘 세척한 수지에, 수지 1 g 당 10 mL의 DMF 및 2 mL의 DIEA를 첨가한 뒤, 1.2 eq의 1,2-비스(브로모메틸) 벤젠을 서서히 적가하였다. 실온에서 1 시간 동안 고리화 반응을 진행시켰다. 시험 절단 및 MS로 고리화 완료를 확인하였다. 이어서 반응 혼합물을 수지로부터 배출시키고, 수지를 DMF로 3 회 및 DCM으로 2 회 추가 세척하였다. 이어서 상기 수지를 절단 전에 진공 건조시켰다.

- [0169] **고체 지지체로부터 펩티드 절단 및 측쇄 탈보호:** 수지 1 g 당 10 mL의 절단 카테일(100 mL의 TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/티오아니솔/페놀 용액 당 81.5 mL TFA, 2.5 mL EDT, 1.0 mL TIS, 5.0 mL H<sub>2</sub>O, 5.0 mL 티오아니솔 및 5.0 g 페놀 함유)을 이용하여 실온에서 70 분 동안 건조 수지로부터 완성된 펩티드를 절단 및 탈보호하였다. 수지를 여과로 제거하고 수 ml의 절단 카테일로 세척했다. 절단 혼합물에 8 배 부피의 메틸 t-부틸 에테르를 첨가하였다. 미정제 펩티드 침전물을 3000 rpm에서 3 분 동안 원심분리하여 분리하였다. 상기 미정제 펩티드 침전물을 메틸 t-부틸 에테르로 3 회 세척하였다. 상기 미정제 펩티드를 분취용 HPLC 상에서 >90 % 순도로 정제하고 동결건조시켰다.
- [0170] **파클리티셀의 컨쥬게이션:** 상기 정제된 환형 펩티드를 앞서 제조된 2' -말레이미드-파클리티셀과 1:1.2 몰비로 혼합하고, 30 % 수성 아세토니트릴을 첨가하여 최종 펩티드 농도 10 mg/mL을 얻었다. 0.5 몰/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 용액을 이용하여 반응 혼합물의 pH를 7.5로 조정하였다. 컨쥬게이션 반응을 약 30 분 내에 완료하고 MS로 확인하였다. 최종 생성물을 역상 분취용 컬럼 Daisogel(50x250 mm, 8 mm)(이동상 - 용매 A: 0.1 % TFA 물; 용매 B: 0.1 % TFA 아세토니트릴)을 이용하여 정제하였다. 표적 생성물을 함유하는 분획을 합하여 동결건조시켰다(TFA 염).
- [0171] 상기 기재된 바와 같은 염 교환으로 아세테이트 염의 펩티드를 얻었다. 최종 펩티드 생성물의 분석 HPLC 순도는 95.10 %; MW 계산치: 2781.25; MW 측정치: 2781.75이었다.
- [0172] **실시예 5:** (MLB-1713)의 합성
- [0173] **펩티드 사슬 조립:** Phe-Tyr(tBu)-Lys(iPr,Boc)-(D-Arg(Pbf))-2Nal-Gly-(D-Glu(OA11))-Lys(iPr,Boc)-(mini-PEG6)-Cys(Trt)-Gly(서열 번호:11)의 펩티드 사슬은 Rink AM 수지를 이용하여 표준 Fmoc 화학으로 조립되었다. 간단히, 1.0 g의 Rink AM 수지를 DCM 중에서 14 시간 동안 팽윤시킨 후 DMF로 4 회 세척하였다. DMF 중 20 % 피페리딘으로 20 분 동안 실온에서 Fmoc 제거를 수행하고 DMF로 여러 번 세척하였다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 단계적인 사슬 조립을 선형 펩티드 C-말단의 Fmoc-Gly-OH로 시작했다. 3 당량의 보호된 아미노산 Fmoc-Gly-OH를 DMF 중 DIC/HOBt로 활성화시키고, 상기 제조된 Fmoc-제거 Rink AM 수지로 실온에서 2 시간 동안 커플시켰다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 6 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DCM의 1:1:2의 부피비 혼합물로 30 분 동안 비-반응 아미노기의 캡핑을 수행했다. 이어서 DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc를 제거하였다. 하기 잔기들이 캡핑없이 순차적으로 커플되었다: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-(mini-PEG6)-OH, Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH, Fmoc-D-Glu(OA11)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2Nal-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(iPr,Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH 및 Fmoc-Phe-OH. 마지막 잔기 Fmoc-Phe-OH의 커플링 후, 이어서 수지를 DMF로 3 회 세척했다. Phe의 Fmoc 보호 그룹을 이 단계에서 제거하지 않았다.
- [0174] **OA11 보호의 제거, Fmoc 보호의 제거 및 고체 상에서의 고리화:** 디클로로메탄 안에 24 당량의 페닐실란 존재 하에 0.1 당량의 Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>로 D-Glu의 알릴 에스테르 측쇄 보호를 제거했다. 알릴 측쇄 탈보호의 완전한 제거를 위해 상기 과정을 1 회 반복하였다. 이어서 DMF 중의 20 % 피페리딘으로 20 분 동안, N-말단에 있는 Fmoc 보호 그룹을 제거하였다. 이어서 D-Glu의 탈보호된 측쇄 카복실산을 PyBOP((벤조트리아졸-1-일옥시)-트리스(피롤리디노)-포스포늄 헥사플루오로포스페이트)/DIEA로 활성화시키고 수지 상의 Phe 잔기의 알파 아미노기에 고리화시켰다. 2 시간 이내에 고리화를 완료하고, 시험 절단 후에 MS로 확인하였다.
- [0175] **고체 지지체로부터 펩티드 절단 및 측쇄 탈보호:** 수지 1 g 당 10 mL의 절단 카테일(100 mL의 TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/티오아니솔/페놀 용액 당 81.5 mL TFA, 2.5 mL EDT, 1.0 mL TIS, 5.0 mL H<sub>2</sub>O, 5.0 mL 티오아니솔 및 5.0 g 페놀 함유)을 이용하여 실온에서 70 분 동안, 완성된 펩티드를 건조 수지로부터 절단 및 탈보호하였다. 수지를 여과로 제거하고 수 ml의 절단 카테일로 세척했다. 절단 혼합물에 8 배 부피의 메틸 t-부틸 에테르를 첨가하였다. 미정제 펩티드 침전물을 3000 rpm에서 3 분 동안 원심분리하여 분리하였다. 상기 미정제 펩티드 침전물을 메틸 t-부틸 에테르로 3 회 세척하였다. 상기 미정제 펩티드를 분취용 HPLC 상에서 >90 % 순도로 정제하고 동결건조시켰다.
- [0176] **파클리티셀의 컨쥬게이션:** 상기 정제된 환형 펩티드를 앞서 제조된 2' -말레이미드-파클리티셀과 1:1.2 몰비로 혼합하고, 30 % 수성 아세토니트릴을 첨가하여 최종 펩티드 농도 10 mg/mL을 얻었다. 0.5 몰/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 용액을 이용하여 반응 혼합물의 pH를 7.5로 조정하였다. 컨쥬게이션 반응을 약 30 분 내에 완료하고 MS로 확인하였다. 최종 생성물을 역상 분취용 컬럼 Daisogel(50x250 mm, 8 mm)(이동상 - 용매 A: 0.1 % TFA 물; 용매 B: 0.1 % TFA 아세토니트릴)을 이용하여 정제하였다. 표적 생성물을 함유하는 분획을 합하여 동결건조시켰다(TFA 염).

- [0177] 상기 기재된 바와 같은 염 교환으로 아세테이트 염의 펩티드를 얻었다. 최종 펩티드 생성물의 분석 HPLC 순도는 95.03 %; MW 계산치: 2690.40; MW 측정치: 2690.25이었다.
- [0178] **실시예 6:** (MLB-1703)의 합성
- [0179] **펩티드 사슬 조립:** Cys(Mmt)-Tyr(tBu)-Lys(iPr, Boc)-(D-Arg(Pbf))-2Nal-Gly-Cys(Mmt)-Lys(iPr, Boc)-Gly-Cys(Trt)(서열 번호:12)의 펩티드 사슬은 Rink AM 수지를 이용하여 표준 Fmoc 화학으로 조립되었다. 간단히, 0.8 g의 Rink AM 수지를 DCM 중에서 14 시간 동안 팽윤시킨 후 DMF로 4 회 세척하였다. DMF 중 20 % 피페리딘에서 20 분 동안 실온으로 Fmoc 제거를 수행하고 DMF로 여러 번 세척하였다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 단계적인 사슬 조립은 선형 펩티드의 C-말단의 Fmoc-Cys(Trt)-OH로 시작했다. 3 당량의 보호 아미노산 Fmoc-Cys(Trt)-OH를 DMF 중의 DIC/HOBt로 활성화시키고, 상기 제조된 Fmoc-제거 Rink AM 수지로 실온에서 2 시간 동안 커플시켰다. 닐히드린 테스트는 음성이었다. 5 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DCM의 1:1:2 부피비 혼합물로 30 분 동안 비-반응 아미노기의 캡핑을 수행하였다. 이어서 DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc를 제거하였다. 하기 잔기들이 캡핑없이 순차적으로 커플되었다: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-2Nal-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH 및 Fmoc-Cys(Mmt)-OH. 마지막 잔기 Fmoc-Cys(Mmt)-OH의 커플링 후, DMF 중 20 % 피페리딘을 이용하여 20 분 동안 Fmoc 보호를 다시 제거하였다. 5 mL의 아세트산 무수물/DIEA/DMF(1:1:4, v/v/v)의 혼합물로 실온에서 30 분 동안 N-말단 아세틸화를 수행하였다. 이어서 수지를 DMF로 3 회 세척한 다음 DCM으로 2 회 세척하고, 진공 건조시켰다.
- [0180] **Cys 잔기 상의 Mmt 보호 제거 및 교체 상에서 고리화:** 수지 1 g 당 30 mL의 절단 각테일(TFA/EDT/TIS/DCM, 3:1.5:1.5:100, v/v)을 이용하여, Cys 측쇄의 Mmt 보호를 제거하였다. 상기 탈보호 절차를 실온에서 매 회 10 분씩, 3 회 반복하였다. 이어서 수지를 DCM으로 3 회 및 DMF로 10 회 세척하여, 잔여 TFA를 완전히 제거하였다. 잘 세척한 수지에, 수지 1 g 당 10 mL의 DMF 및 2 mL의 DIEA를 첨가하고, 이어서 1.2 eq의 1,2-비스(브로모메틸)벤젠을 서서히 적가하였다. 고리화 반응을 실온에서 1 시간 동안 진행시켰다. 시험 절단 및 MS로 고리화 완료를 확인하였다. 이어서 반응 혼합물을 수지로부터 배출시키고, 수지를 DMF로 3 회 및 DCM으로 2 회 추가 세척하였다. 이어서 상기 수지를 절단 전에 진공 건조시켰다.
- [0181] **교체 지지체로부터 펩티드 절단 및 측쇄 탈보호:** 수지 1 g 당 10 mL의 절단 각테일(100 mL의 TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/티오아니솔/페놀 용액 당 81.5 mL TFA, 2.5 mL EDT, 1.0 mL TIS, 5.0 mL H<sub>2</sub>O, 5.0 mL 티오아니솔 및 5.0 g 페놀 함유)을 이용하여 실온에서 70 분 동안, 완성된 펩티드를 건조 수지로부터 절단 및 탈보호하였다. 수지를 여과로 제거하고 수 mL의 절단 각테일로 세척했다. 절단 혼합물에 8 배 부피의 메틸 t-부틸 에테르를 첨가하였다. 미정제 펩티드 침전물을 3000 rpm에서 3 분 동안 원심분리하여 분리하였다. 상기 미정제 펩티드 침전물을 메틸 t-부틸 에테르로 3 회 세척하였다. 상기 미정제 펩티드를 분취용 HPLC 상에서 >90 % 순도로 정제하고 동결건조시켰다.
- [0182] **파클리티셀의 컨쥬게이션:** 상기 정제된 환형 펩티드를 앞서 제조된 2' -말레이미드-파클리티셀과 1:1.2 몰비로 혼합하고, 30 % 수성 아세트나이트릴을 첨가하여 최종 펩티드 농도 10 mg/mL을 얻었다. 0.5 몰/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 용액을 이용하여 반응 혼합물의 pH를 7.5로 조정하였다. 컨쥬게이션 반응을 약 30 분 내에 완료하고 MS로 확인하였다. 최종 생성물을 역상 분취용 컬럼 Daisogel(50x250 mm, 8 mm)(이동상 - 용매 A: 0.1 % TFA 물; 용매 B: 0.1 % TFA 아세트나이트릴)을 이용하여 정제하였다. 표적 생성물을 함유하는 분획을 합하여 동결건조시켰다(TFA 염).
- [0183] 상기 기재된 바와 같은 염 교환으로 아세테이트 염의 펩티드를 얻었다. 최종 펩티드 생성물의 분석 HPLC 순도는 95.13 %; MW 계산치: 2447.86; MW 측정치: 2446.95이었다.
- [0184] **인간 CXCR4<sup>125</sup> I-SDF-1a 결합 억제 분석(EUROFINS CEREP SA(Le Bois l'Eveque, 86600 Celle L'Evescault, 프랑스)에 의해 수행됨):** Chem-1 세포에서 발현된 인간 케모카인 수용체 CXCR4가 pH 7.4의 변형된 HEPES 완충액에서 사용되었다. 0.5 μg(막 단백질은 로트에서 로트로 변경될 수 있고, 사용되는 농도는 필요한 경우 조정될 것임)의 분취량을 25 °C에서 90 분 동안 0.03 nM [<sup>125</sup>I]SDF-1α와 함께 인큐베이션했다. 비-특이적 결합을 30 nM SDF-1α의 존재 하에 측정하였다. 막을 여과하고 세척한 뒤 필터를 계수하여 특이적으로 결합한 [<sup>125</sup>I]SDF-1α를 결정하였다. 11-포인트 희석으로 10 μM에서 시작하여 화합물을 스크리닝했다(Valenzuela-Fernandez A, 등 *J Biol Chem.* 277(18):15677, 2002). 물리적 특성과 함께 CXCR4 결합 데이터를 하기 표에 나타냈다.

표 1

예시적 펩티드의 특성 및 결합 활성						
실시예 번호	MLB 번호	계산치 MW(Da)	측정치 MW(Da)	HPLC 순도(%)	CXCR4 IC <sub>50</sub> (nM)	CXCR4 K <sub>b</sub> (nM)
1	MLB-1707	2725.56	2724.75	95.14	2.30	0.70
2	MLB-1708	2343.70	2342.85	95.71	9.40	2.80
3	MLB-1710	2446.96	2446.50	95.07	16.0	4.90
4	MLB-1711	2781.25	2781.75	95.10	3.90	1.20
5	MLB-1713	2690.40	2690.25	95.03	0.96	0.29
6	MLB-1703	2447.86	2446.95	95.13	n/a*	n/a*

\*n/a: 구할 수 없음.

[0185]

[0186]

본 명세서에 개시된 고친화성 CXCR4 결합 리간드 펩티드 약물 콘주게이트 외에, 기타 고친화성 CXCR4 결합 리간드 펩티드의 제조 및 특성화는 2016년 9월 6일자로 출원된 미국 가출원 제62/384, 132호 및 2017년 5월 11일에 출원된 미국 가출원 제62/505,064호에서 찾을 수 있다(하기 표 2 참조).

[0187]

동위 원소 또는 방사성 표지된 아세톤은 다양한 판매회사로부터 상업적으로 이용가능하다. 동위 원소 또는 방사성 표지된 아세톤의 맞춤 제조가 필요한 경우 공지된 기술, 예를 들어 문헌[Rolf Voges, 등, *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14*(John Wiley & Sons (2009))]에서 방법을 찾을 수 있다.

[0188]

다양한 링커를 갖는 펩티드-약물 콘주게이트의 제조는 당업계에 공지되어 있다(G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press Elsevier, 2008). 시스테인 측쇄의 티올을 통한 펩티드 콘주게이트 제조 (예를 들어, 펩티드에 활성 성분의 연결 또는 부착) 방법의 예가 문헌[Backer 등, pp 275-294 in *Methods in Molecular Biology*, vol. 494: *Peptide-Based Drug Design*, edited by L. Otvos, Humana Press, New York, NY, 2008]에 개시되어 있다.

표 2

기타 고친화성 CXCR4 결합 리간드 펩티드

항목	MLB 번호	계산치 MW(Da)	측정치 MW(Da)	HPLC 순도(%)	CXCR4 IC <sub>50</sub> (nM)	결합 K <sub>b</sub> (nM)
1	MLB-001	1353.49	1353.45	96.64	24.0	7.3
2	MLB-002	1366.93	1367.70	98.78	0.92	0.28
3	MLB-003	1381.35	1381.80	98.14	0.98	0.30
4	MLB-004	1366.83	1367.25	97.02	0.70	0.21
5	MLB-005	1353.49	1353.00	96.05	>>1000	>>1000
6	MLB-006	1408.69	1409.10	96.54	1.50	0.45
7	MLB-007	1204.51	1205.25	95.71	0.64	0.19
8	MLB-008	1430.43	1431.00	96.44	0.95	0.29
9	MLB-009	1451.84	1452.60	96.38	0.61	0.18
10	MLB-010	1247.61	1248.00	96.13	0.56	0.17
11	MLB-021	1310.64	1310.70	95.98	0.42	0.13
12	MLB-022	1310.64	1310.55	95.64	0.71	0.21
13	MLB-023	1296.61	1296.75	97.04	3.40	1.00
14	MLB-024	1338.69	1338.9	97.59	1.30	0.39
15	MLB-025	1324.67	1324.65	95.67	0.84	0.25
16	MLB-026	1276.62	1276.65	95.03	0.89	0.27
17	MLB-027	1318.70	1318.80	95.50	0.48	0.15
18	MLB-028	1458.97	1458.75	96.42	8.20	2.50
19	MLB-029	1515.08	1515.00	95.31	11.0	3.20
20	MLB-030	1400.76	1400.85	95.60	1.30	0.39
21	MLB-031	1309.69	1309.20	96.54	n/a*	n/a*
22	MLB-032	1338.70	1338.60	97.59	0.40	0.12
23	MLB-033	1338.82	1338.45	95.23	3.30	0.99

\*n/a: 구할 수 없음.

[0189]

[0190]

본 발명의 상기 논의는 예시 및 설명의 목적으로 제시되었다. 상기 기재는 본 명세서에 개시된 형태 또는 형태로 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 본 발명의 기재가 하나 이상의 구현예 및 특정 변형 및 수정의 기재 를 포함했지만, 예를 들어, 본 발명을 이해한 후에 당업자의 기술 및 지식 내에 있을 수 있는 바와 같이, 기타 변형 및 수정은 본 발명의 범위 내에 있다. 임의의 특허가능한 주제를 공적으로 제공할 의도없이, 대안의, 상호 교환적인 및/또는 등가의 구조, 기능, 범위 또는 단계가 본 명세서에 개시되었는지 여부에 관계없이, 대안의, 상호교환적인 및/또는 등가의 구조, 기능, 범위 또는 단계를 청구 범위에 포함하면서, 허용된 범위까지 대안적인 구현예를 포함하는 권리를 얻는 것이 의도된다. 본 명세서에 인용된 모든 참고 문헌은 그 전문이 참조로 편 입되어 있다.

서열 목록

- <110> Mainline Biosciences
- <120> HIGH AFFINITY CXCR4 SELECTIVE BINDING CONJUGATE AND METHOD FOR USING THE SAME
- <130> MLB-000300PC
- <150> 62/554,354
- <151> 2017-09-05
- <160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Compound of Formula II

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)

<223> Along with the sulfur atom that is attached to is  
3-mercaptopropionic acid (MPA), optionally N-substituted cysteine

or optionally N-substituted homocysteine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> Forms cyclic structure via sulfur atoms and a linker  
-(CH<sub>2</sub>-Ar<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>)-, where Ar<sub>1</sub> is an optionally substituted aryl

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)

<223> can be Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr), or  
Lys(iPr)

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> D-isomer

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)

<223> 2NaI

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)

<223> Along with the sulfur atom that is attached to is cysteine or  
homocysteine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)

<223> can be Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr),  
Lys(iPr), D-Arg, D-Dap, D-Dab, D-Orn, D-Lys, D-Dap(iPr),

D-Dab(iPr), D-Orn(iPr), D-Lys(iPr), or absent

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (9)

<223> can be Gly or absent

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (10)

<223> can be Lys, Phe, 2Nal, 1Nal, the D-isomer thereof, Gly, or absent

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (11)

<223> Lys, Gly or absent

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (11)

<223> terminal -OH group is replaced with -OR4 or -NHR5, wherein R4 and R5 is H, alkyl, optionally substituted aryl, or optionally substituted aralkyl

<400> 1

Xaa Tyr Xaa Arg Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1                      5                      10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Compound of Formula III

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)

<223> along with the sulfur atom that is attached thereto is 3-mercaptopropionic acid, optionally substituted cysteine, or optionally substituted homocysteine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> Forms cyclic structure via sulfur atoms and a linker -(CH2-Ar1-CH2)-, where Ar1 is an optionally substituted aryl

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)  
 <223> can be Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr), or  
  
 Lys(iPr)  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> 2NaI  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)  
 <223> along with the sulfur atom that is attached thereto is cysteine  
 or homocysteine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)  
 <223> along with the sulfur atom that is attached thereto is cysteine  
 or homocysteine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> can be Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap(iPr), Dab(iPr), Orn(iPr),  
  
 Lys(iPr), D-Arg, D-Dap, D-Dab, D-Orn, D-Lys, D-Dap(iPr),  
 D-Dab(iPr), D-Orn(iPr), D-Lys(iPr), or absent  
 <400> 2  
 Xaa Tyr Xaa Arg Xaa Gly Xaa Xaa  
 1 5  
 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> S-Paclitaxel  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> cyclic structure is formed between the alpha-amino of

phenylalanine

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)

<223> side-chain amino acid of lysine is substituted with iso-propyl

group

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> D-isomer

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)

<223> 2NaI

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (7)

<223> D-isomer

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)

<223> side-chain amino group is substituted with iso-propyl.

<400> 3

Phe Tyr Lys Arg Xaa Gly Gln Lys

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linked to paclitaxel

<220><221>

> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> cyclic structure is formed by formation of a di-sulfide linkage between sulfur atoms of two cysteine groups.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)

<223> side-chain amino group is substituted with isopropyl

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> NaI  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <400  
 > 4  
 Cys Tyr Lys Arg Xaa Gly Cys Lys  
 1 5  
 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> linked to paclitaxel  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)  
 <223> homocysteine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> cyclic structure is formed by formation of a di-sulfide linkage  
 between sulfur atoms of homocysteine and cysteine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> D-isome  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> 2NaI  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <400> 5  
 Xaa Tyr Lys Arg Xaa Gly Cys Lys  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> linked to paclitaxel  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> cyclic structure is formed by formation of a di-sulfide linkage

between sulfur atoms of cysteine and homocysteine

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> 2NaI  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)  
 <223> homocysteine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <400> 6  
 Cys Tyr Lys Arg Xaa Gly Xaa Lys

1 5  
 <210> 7

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> linked to paclitaxel  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> Forms cyclic structure via sulfur atoms and a linker  
 -(CH<sub>2</sub>-(1,2-Ph)-CH<sub>2</sub>)-.  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> 2NaI  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <400> 7  
 Cys Tyr Lys Arg Xaa Gly Cys Leu  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Example 1 statring material  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)  
 <223> protected with Mmt  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)  
 <223> protected with tBu

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> protected with Boc

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> D-isomer

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> protected with Pbf

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> 2NaI

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)  
 <223> protected with Boc

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)  
 <223> linked to -(mini-PEG6)-Cys(Trt)

<400> 8  
 Cys Tyr Lys Arg Xaa Cys Lys  
 1 5

<210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Reagent of Example 2  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)  
 <223> protected with Trt  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)  
 <223> protected with Mmt  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> protected with tBu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> protected with Boc  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> protected with Pbf  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)  
 <223> 2NaI  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> protected with Mmt  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)  
 <223> protected with Boc  
  
 <400> 9

Cys Cys Tyr Lys Arg Xaa Gly Cys Lys Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> reagent for example 4

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)

<223> protected with Trt

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> linker (mini-PEG6) is present between two cysteine groups

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)

<223> protected with Mmt

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)

<223> protected with tBu

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> side-chain amino group is substituted with isopropyl

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> protected with Boc

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)

<223> D-isomer

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)

<223> protected with Pbf

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (6)

<223> 2NaI

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> protected with Mmt  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)  
 <223> protected with Boc  
 <400> 10  
 Cys Cys Tyr Leu Arg Xaa Gly Cys Leu Gly  
 1 5 10  
 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reagent for example 5  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)  
 <223> protected with tBu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> protected with Boc  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> protected with Pbf  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)  
 <223> 2NaI  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)  
 <223> protected with OAl1  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl

<220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> protected with Boc  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(9)  
 <223> linker (mini-PEG6) is present between lysine and cysteine  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)  
 <223> protected with Trt  
 <400> 11  
 Phe Tyr Lys Arg Xaa Gly Gln Lys Cys Gly  
     1                    5                    10  
 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> reagent for Example 6  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)

<223> protected with Mmt  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)

<223> protected with tBu  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)  
 <223> protected with Boc  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> protected with Pbf  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)  
 <223> D-isomer  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)  
 <223> 2NaI  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
  
 <222> (7)  
 <223> protected with Mmt  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> protected with Boc  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)  
 <223> side-chain amino group is substituted with isopropyl  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)  
 <223> protected with Trt  
 <400> 12  
 Cys Tyr Lys Arg Xaa Gly Cys Lys Gly Cys  
 1 5 10