



등록특허 10-2728631



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월12일

(11) 등록번호 10-2728631

(24) 등록일자 2024년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/00 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)

C12N 9/10 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/00 (2013.01)

A61K 47/68 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2018-7020064

(22) 출원일자(국제) 2016년12월16일

심사청구일자 2021년12월13일

(85) 번역문제출일자 2018년07월13일

(65) 공개번호 10-2018-0095862

(43) 공개일자 2018년08월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/067165

(87) 국제공개번호 WO 2017/106643

국제공개일자 2017년06월22일

(30) 우선권주장

62/269,138 2015년12월18일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2015209426 A*

US20150017192 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

에자이 알앤디 매니지먼트 가부시키키가이샤

일본국 도쿄도 분쿄구 코이시가와 4초메 6반 10고

(72) 발명자

스피델, 자레드

미국 19335 펜실베이니아주 다우닝타운 와일드브
리어 로드 100

알본, 일

미국 19422 펜실베이니아주 블루 벨 위트페인 힐
스 2105

(74) 대리인

장수길, 이유리, 이석재

전체 청구항 수 : 총 16 항

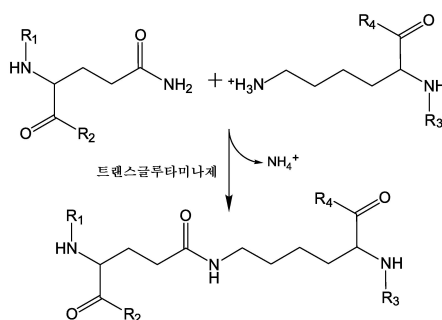
심사관 : 조원담

(54) 발명의 명칭 C-말단 리신 접합된 이뮤노글로불린

(57) 요약

접합된 이뮤노글로불린, 및 미생물 트랜스글루타미나제를 사용하여 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법이 본원에 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6811 (2017.08)

C12N 9/1044 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

C12Y 203/02013 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/528 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

이뮤노글로불린 및 아실 공여자 기질을 포함하며, 여기서

- a) 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하지만 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하고,
 - i) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 1개의 아미노산 잔기는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민, 또는 히스티딘이거나;
 - ii) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기 및 K447 후에 제2 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고; K447 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
 - iii) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제3 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 3개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
 - iv) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제4 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 4개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
 - v) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, K447 후에 제4 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제5 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 5개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제5 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는
 - vi) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고,
 - b) 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기 및 치료제 또는 진단제를 포함하고,
- 여기서 이뮤노글로불린의 C-말단 리신은 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합된 것인
접합된 이뮤노글로불린.

청구항 2

이뮤노글로불린 및 아실 공여자 기질을 포함하며, 여기서

- a) 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하지만 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하고,
- i) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 1개의 아미노산 잔기는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스

테인, 아스파라긴, 글루타민, 또는 히스티딘이거나;

ii) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기 및 K447 후에 제2 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고; K447 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

iii) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제3 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 3개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

iv) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제4 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 4개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

v) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, K447 후에 제4 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제5 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 5개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제5 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는

vi) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

b) C-말단 리신은 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합되며, 여기서 아실 공여자 기질은 추가로 반응성기를 포함하고,

c) 반응성기는 치료제 또는 진단제에 접합된 것인

접합된 이뮤노글로불린.

청구항 3

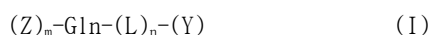
제1항 또는 제2항에 있어서, C-말단 리신이 이뮤노글로불린의 중쇄의 리신 447 (K447)인 접합된 이뮤노글로불린.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 이뮤노글로불린이 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하는 것인 접합된 이뮤노글로불린.

청구항 5

제1항에 있어서, 아실 공여자 기질이 1개의 화학식 (I) 또는 (II)에 따른 것인 접합된 이뮤노글로불린:



여기서

Z는 카복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고;

Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고;

각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고;

m은 0 내지 5의 정수이고;

n은 0 내지 5의 정수이고;

Y는 치료제 또는 진단제이다.

청구항 6

제5항에 있어서,

(i) 아실 공여자 기질이 화학식 (I)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; 여기서 L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), 에틸 아민 ($-NH((CH_2)_2)-$) 또는 프로필 아민 ($-NH((CH_2)_3)-$)이고; 여기서 n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이거나;

(ii) 아실 공여자 기질이 화학식 (I)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고, 여기서 L은 아미노산이거나; 또는

(iii) 아실 공여자 기질이 화학식 (II)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 1, 2 또는 3이고; 적어도 1개의 L은 Gly인 접합된 이류노글로불린.

청구항 7

제2항에 있어서, 아실 공여자 기질이 1개의 화학식 (III) 또는 (IV)에 따른 것인 접합된 이류노글로불린:



여기서

Z는 카르복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고;

Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고;

각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고;

m은 0 내지 5의 정수이고;

n은 0 내지 5의 정수이고;

X는 반응성 기이다.

청구항 8

제7항에 있어서,

(i) 아실 공여자 기질이 화학식 (III)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; 여기서 각각의 L은 독립적으로 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), 에틸 아민 ($-NH((CH_2)_2)-$) 또는 프로필 아민 ($-NH((CH_2)_3)-$)이고; 여기서 n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이거나;

(ii) 아실 공여자 기질이 화학식 (III)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고, 여기서 L은 아미노산이거나; 또는

(iii) 아실 공여자 기질이 화학식 (IV)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 1, 2 또는 3이고; 적어도 1개의 L은 Gly인 접합된 이류노글로불린.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 치료제가 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 화학요법제, 약물 작용제, 방사성 작용제, 세포독성제, 항생제, 소분자, 핵산 또는 폴리펩티드이거나; 또는

진단제가 형광단, 형광 염료, 방사성핵종 또는 효소인 접합된 이뮤노글로불린.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 이뮤노글로불린이

- (i) C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기 및 C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 2개의 아미노산 잔기를 갖거나;
- (ii) C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 3개의 아미노산 잔기를 갖거나;
- (iii) C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 4개의 아미노산 잔기를 갖거나;
- (iv) C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 5개의 아미노산 잔기를 갖거나;
- (v) C-말단 리신 후에 9개 미만의 아미노산 잔기를 갖거나; 또는
- (vi) C-말단 리신 후에 13개 미만의 아미노산 잔기를 갖는 것인 접합된 이뮤노글로불린.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 이뮤노글로불린이

- (i) IgG₁ 이뮤노글로불린이거나;
- (ii) IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 이뮤노글로불린이거나;
- (iii) IgA₁, IgA₂, 또는 IgM 이뮤노글로불린이거나;
- (iv) IgD 또는 IgE 이뮤노글로불린이거나;
- (v) 인간 이뮤노글로불린 또는 인간화 이뮤노글로불린이거나;
- (vi) 키메라 이뮤노글로불린 또는 비-인간 이뮤노글로불린이거나; 또는
- (vii) 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 것인 접합된 이뮤노글로불린.

청구항 12

제1항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법이며, 상기 방법은 이뮤노글로불린과, 미생물 트랜스글루타미나제 및 아실 공여자 기질을 인큐베이션하는 단계로서,

- a) 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하지만 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하고,
- i) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 1개의 아미노산 잔기는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민, 또는 히스티딘이거나;
- ii) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기 및 K447 후에 제2 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고; K447 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

iii) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제3 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 3개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

iv) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제4 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 4개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

v) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, K447 후에 제4 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제5 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 5개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제5 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는

vi) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

b) 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기 및 치료제 또는 진단제를 포함하고,

여기서 미생물 트랜스글루타미나제는 이뮤노글로불린의 C-말단 리신을 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합시켜

이에 의해 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 것인 단계

를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제2항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항의 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법이며, 상기 방법은

i) 이뮤노글로불린과, 미생물 트랜스글루타미나제 및 아실 공여자 기질을 인큐베이션하는 단계로서,

a) 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하지만 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하고,

I) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 1개의 아미노산 잔기는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민, 또는 히스티딘이거나;

II) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기 및 K447 후에 제2 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고; K447 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

III) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제3 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 3개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

IV) 여기서, 이뮤노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제4 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 4개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로

로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

V) 여기서, 이류노글로불린이 K447 후에 제1 아미노산 잔기, K447 후에 제2 아미노산 잔기, K447 후에 제3 아미노산 잔기, K447 후에 제4 아미노산 잔기, 및 K447 후에 제5 아미노산 잔기를 포함하는, K447 후에 5개의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 제5 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는

VI) 여기서, 이류노글로불린이 K447 후에 13개 미만의 아미노산 잔기를 포함하는 경우에, K447 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

b) 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기 및 반응성 기를 포함하고,

여기서 미생물 트랜스글루타미나제는 이류노글로불린의 C-말단 리신을 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합시키는 것인 단계, 및

ii) 치료제 또는 진단제를 아실 공여자 기질의 반응성 기에 접합시켜 이에 의해 접합된 이류노글로불린을 생성하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 아실 공여자 기질의 반응성 기가 클릭 화학에 의해 치료제 또는 진단제에 접합되는 것인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 미생물 트랜스글루타미나제가 스트렙토미세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*) 미생물 트랜스글루타미나제인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 미생물 트랜스글루타미나제가 스트렙토미세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*) 미생물 트랜스글루타미나제인 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2015년 12월 18일에 출원된 미국 가출원 번호 62/269,138에 대한 우선권을 주장하며, 그의 전체 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

기술 분야

[0004]

C-말단 리신 접합된 이뮤노글로불린 및 이를 생성하는 방법이 본원에 제공된다.

배경 기술

[0005]

모노클로날 항체의 유용성은 기본 연구에서 치료 및 진단 용도로 확장된다. 항체를 기능적 작용제에 접합시키는 능력은 그의 기능성을 더욱 확장시킨다. 접합된 항체의 제조는 통상적으로 모노클로날 항체 (mAb)의 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC) 상의 반응성 리신 시스테인 잔기에 링커, 약물 또는 다른 기능적 작용제를 접합시키는 것을 수반한다. 문헌 [Deonarain, et al., "Emerging formats for next-generation antibody drug conjugates",

Expert Opinion in Drug Discovery (2015), 10(5): 463-481]을 참조한다. 리신 접합은 전형적으로 숙신이미드 (NHS)-기반 또는 이소티오시아네이트-기반 화학에 의해 매개된다. 시스테인-기반 접합은 쇠간 디설피드 결합 중 일부를 파괴하여 유리 티올 측쇄를 생성하기 위해 항체의 부분 환원을 필요로 한다. 이어서 티올-반응성 기능적 작용제는 항체 상의 유리 티올 기와 반응하여 항체-약물 접합체 (ADC)를 생성할 수 있다. 이들 방법 둘 다는 무작위 위치에서의 약물 변형 및 약물-대-항체 (DAR) 비의 분포를 갖는 ADC의 불균질 혼합물로 이어지는 다중 리신 또는 시스테인의 변형을 야기한다.

[0006] 규정된 DAR을 갖는 균질 ADC 생성물을 생산하기 위한 방법으로서 부위-특이적 접합 기술을 사용하는 것에 대한 최근의 노력은 쌍형성되지 않은 시스테인의 조작, 비-천연 아미노산의 혼입, 및 부위-특이적 효소적 변형을 포함한 여러 방법을 발생시키고 있다. 이들 방법은 균질 생성물을 생산하지만, 이들 각각은 그의 단점을 갖는다. 시스테인-기반 접합은 쌍형성되지 않은 시스테인으로부터 캡핑 시스테인, 글루타티온, 또는 심지어 경쇄를 제거하기 위한 추가의 단계를 필요로 한다. 예를 들어, 문헌 [Junutula, et al., "Site-Specific Conjugation of a Cytotoxic Drug to an Antibody Improves Therapeutic Index", Nature Biotechnology, (2008) 26:925-932; Chen, et al., "Charge-based Analysis of Antibodies with Engineered Cysteines", MAbs (2009) 1(6): 563-571; Gomez, et al., "Effect of temperature, pH, dissolved oxygen, and hydrolysate on the formation of triple light chain antibodies in cell culture" Biotechnol Progress (2010), 26: 1438-1445]을 참조한다. 추가로, 시스테인-기반 접합체에 현재 사용되는 말레이미드-기반 화학의 열적 불안정성은 효력의 상실 또는 오프-타겟 독성의 우려를 높이는 것으로 입증되었다. 문헌 [Alley, et al., "Contribution of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates", Bioconjugate Chemistry (2008) 19(3): 759-765; Shen, et al., "Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates", Nature Biotechnology (2012) 30: 184-189]. 비-천연 아미노산의 혼입은 유전자 변형된 세포-기반 또는 무세포 시스템에서의 발현을 필요로 한다. 문헌 [Hallam, et al., "Unnatural Amino Acids in Novel Antibody Conjugates", Future Med. Chem. (2014) 6(11): 1309-1324]. 또한, 비천연 아미노산의 존재는 환자에서 면역원성 반응을 촉발할 수 있다. 그러나 부위-특이적 효소적 변형은 항체 서열에 잠재적으로 천연, 야생형 아미노산을 사용할 수 있고, 그에 의해 면역원성 가능성을 최소화할 수 있다. 또한, 전형적으로 단백질-변형 효소에 의해 형성되는 변형-후 결합은 매우 안정하다.

[0007] 단백질의 부위-특이적 효소적 변형은 글루타민의 γ -카르복시아미드 기 (아실 공여자)와 리신의 ϵ -아미노 기 (아실 수용자) 사이에 안정한 이소펩티드 결합의 형성을 촉매하는, 트랜스글루타미나제로 불리는 단백질 패밀리를 사용하여 연구되어왔다 (도 1 참조) (예를 들어, 문헌 [Yokoyama, et al., "Properties and Applications of Microbial Transglutaminase", Appl. Microbiol. Biotech. (2004) 64: 47-454; Strop, "Versatility of Microbial Transglutaminase", Bioconjugate Chemistry, (2014) 25(5): 855-862; Kieliszek et al., "Microbial Transglutaminase and its Application in the Food Industry", Folia Microbiol (2014) 59:241-250] 참조). 최근, 여러 그룹은 ADC를 생산하기 위한 수단으로서 트랜스글루타미나제를 사용하여 연구한 바 있다 (예를 들어, 문헌 [Josten et al., "Use of Microbial Transglutaminase for the Enzymatic Biotinylation of Antibodies", J. Immunol Methods, (2000) 240:47-54; Mindt et al., "Modification of Different IgG1 Antibodies via Glutamine and Lysine Using Bacterial and Human Tissue Transglutaminase", Bioconjugate Chemistry (2008) 19(1): 271-278; Jeger, et al., "Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase" Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2010) 49: 9995-9997; Strop et al., "Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates", Chem Biol (2013) 20(2):161-167; Dennler et al., "Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody-Drug Conjugates", Bioconjugate Chemistry (2014) 25(3): 569-578; Siegmund, et al., "Locked by Design: A Conformationally Constrained Transglutaminase Tag Enables Efficient Site-Specific Conjugation", Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2015) 54(45):13420-13424] 참조). 트랜스글루타미나제는 박테리아에서 인간에 걸친 범위의 유기체에서 구조적 및 기능적으로 관련된 것으로 발견되었지만, 각각은 특정 세포 과정에 수반된다. 박테리아 스트렙토미세스 모바라엔시스 (*Streptomyces mobaraensis*)로부터 단리된 미생물 트랜스글루타미나제 (미생물 트랜스글루타미나제)는 다양한 적용을 위해 단백질을 함께 가교시키기 위해 식품 산업 전반에서 광범위하게 사용되고 있다. 그의 낮은 제조 비용 외에도, 넓은 범위의 pH, 염, 및 온도 조건 하에 기능하는 그의 능력으로 인해 이는 매력적인 접합 기술이다.

[0008] 20년이 넘는 연구에도 불구하고, 미생물 트랜스글루타미나제의 기질 특이성은 분명하게 규정되지 않고 있다. 일반적으로, 소수성 또는 양으로 하전된 인접 잔기를 갖는 노출된 루프 상의 글루타민 또는 리신이 바람직한 경

향이 있다. 문헌 [Taguchi et al., "Substrate specificity analysis of microbial transglutaminase using proteinaceous protease inhibitors as natural model substrates", J. Biochem. (2000) 128:415-425; Sugimura et al., "Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from Streptomyces mobaraensis using a phage-displayed peptide library", Arch. Biochem. Biophys. (2008) 477:379-383; Tagami et al., "Substrate specificity of microbial transglutaminase as revealed by three-dimensional docking simulation and mutagenesis", Protein Eng. Des. Sel. (2009) 22:747-752]을 참조한다. 아실 공여자 글루타민의 콘텍스트가 아실 수용자 리신보다 더 중요하다는 것이 발견되었다. 예를 들어, 문헌 [Ohtsuka et al., "Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines", J. Agric. Food Chem. (2000) 48: 6230-6233; Ohtsuka et al., "Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors", Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000) 64: 2608-2613; Gundersen et al., "Microbial transglutaminase displays broad acyl-acceptor substrate specificity", Appl. Microbiol. Biotechnol. (2013) 98:219-230]을 참조한다.

[0009] 미생물 트랜스글루타미나제에 의한 아실 수용자 아민에 대한 보다 낮은 특이성으로 인해, 연구는 현재까지 오직 항체 글루타민 잔기의 아미드교환에만 초점을 맞춰왔다. 상기 언급된 문헌 [Josten et al., Mindt et al., Jeger et al., Strop et al., Dennler et al., 및 Siegmund et al.]을 참조한다. 인간 IgG는 평균 80개의 리신으로 구성되고, 이중 80-90%는 용매 노출되고 (Gautier et al., "Lysine Conjugated Properties in Human IgGs Studied by Integrating High-Resolution Native Mass Spectrometry and Bottom-Up Proteomics", Proteomics (2015) 15(16):2756-2765; 데이터는 제시되지 않음), IgG₁, IgG₂, IgG₃, 및 IgG₄의 C-말단 코돈은 리신 (Ellison et al., DNA (1981) 1:11-18; Ellison et al., ("Ellison et al., 2"), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, (1982) 79:1984-1988; Ellison et al., Nucleic Acid Res. (1982) 10:4071-4079)인 것으로 예측된다. 그러나, 혈청-유래 IgG는 리신이 결여되어 있다 (Wang et al., J. Immunol. (1980) 125:1048-1054; Edelman et al., Proc Natl Acad. Sci. USA (1969) 63:78-85; Frangione et al., Biochemistry (1980) 19:4304-4308; Pink et al., Biochem. J. (1970) 117:33-47). 동일한 것이 IgD에 대해 관찰되었다 (White et al., Science (1985) 228:733-737; Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1981) 78:504-508; Shinoda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:785-789). HEK293 및 CHO 세포에서 IgG₁의 재조합 발현은 또한 C-말단 Lys447이 결여된 단백질을 발생시킨다 (Ellison et al.; Harris et al., Eur. J. Biochem. (1990) 194:611-620; Harris, J. Chromatogr. A (1995) 705:129-134; Dick et al., Biotechnol. Bioeng. (2008) 100:1132-1143).

[0010] 지금까지, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 리신을 아미드교환하기 위해 아민 공여자-기반 기질을 사용하는 것이 IgG의 표면 상의 반응성 리신의 과다로 인해 불균질 ADC 생성물을 생성할 수 있다고 생각하였고 (Josten et al. 및 Jeger et al.), 따라서, 이뮤노글로불린 상의 리신 잔기를 아미드교환하기 위해 아민 공여자-기반 기질을 사용하는 것은 좌절되었다.

[0011] 따라서, 예측가능한 접합물을 갖는 접합체를 생성하기 위해 이뮤노글로불린의 부위-특이적 효소적 변형에 대한 필요가 존재한다. 이는 비교적 균질한 DAR을 갖는 ADC의 생성을 가능하게 할 것이다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 놀랍게도, 미생물 트랜스글루타미나제에 의한 야생형 이뮤노글로불린 리신의 어떠한 변형도 관찰되지 않으면서, C-말단 이뮤노글로불린 리신 잔기가 C-말단 아미노산 연장을 사용하여 카르복시펩티다제에 의한 절단으로부터 보호되었을 때, 미생물 트랜스글루타미나제가 아실 수용자로서 천연 C-말단 리신을 사용할 수 있다는 것을 개시한다. 놀랍게도, 미생물 트랜스글루타미나제를 사용한 C-말단 리신의 접합은 접합된 기능적 작용제의 부위-특이적 및 예측가능한 혼입으로 이어진다.

[0013] 한 측면에서, 이뮤노글로불린과, 미생물 트랜스글루타미나제 및 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제를 인큐베이션하는 것을 포함하는 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법이 본원에 개시되며, 여기서 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기를 포함하고, 여기서 기능적 작용제는 치료제 또는 진단제이고, 여기서 미생물 트랜스글루타미나제는 이뮤노글로불린의 C-말단 리신을 기능적 작용제의 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합시켜 이에 의해 접합된 이뮤노글로불린을 생성한다.

[0014] 또 다른 측면에서, i) 이뮤노글로불린과, 미생물 트랜스글루타미나제 및 아실 공여자 기질을 인큐베이션하는 단

계이며, 여기서 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기 및 반응성 기를 포함하고, 여기서 미생물 트랜스글루타미나제는 이뮤노글로불린의 C-말단 리신을 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합시키는 것인 단계, 및 ii) 기능적 작용제를 아실 공여자 기질의 반응성 기에 접합시켜 이에 의해 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 단계이며, 여기서 기능적 작용제는 치료제 또는 진단제인 단계를 포함하는, 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법이 본원에 개시된다.

[0015] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질의 반응성 기는 클릭 화학에 의해 기능적 작용제에 접합된다.

[0016] 한 실시양태에서, C-말단 리신은 이뮤노글로불린의 중쇄의 리신 447 (K447)이다.

[0017] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민 또는 히스티딘이다. 또 다른 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기는 프롤린, 아스파르트산, 글루탐산, 리신 또는 아르기닌은 포함하지 않는다.

[0018] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 1개의 화학식 (I) 또는 (II)에 따른 것이다:

[0019] $(Z)_m\text{-Gln-(L)}_n\text{-(Y)}$ (I)

[0020] $(Y)\text{-(L)}_n\text{-Gln-(Z)}_m$ (II)

[0021] 여기서 Z는 카르복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고; Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고; 각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고; m은 0 내지 5의 정수이고; n은 0 내지 5의 정수이고; Y는 기능적 작용제이다.

[0022] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (I)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; 여기서 L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG) ($-\text{O}((\text{CH}_2)_2)-$), 에틸 아민 ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_2)-$) 또는 프로필 아민 ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_3)-$)이고; 여기서 n은 0, 1, 2 또는 3이다. 한 실시양태에서, L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)이다. 또 다른 실시양태에서, L은 1개 이상의 아미노산 및 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (I)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고, 여기서 L은 아미노산이다. 한 실시양태에서, L은 Gly이고; m은 1이고; n은 1이다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (II)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 2, 3 또는 4이고; 적어도 1개의 L은 Gly이고; 적어도 1개의 L은 PEG 모이어티이다. 추가 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (II)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 4이고; 1개의 L은 Gly이고 나머지 3개의 L 기는 각각 PEG 모이어티이다.

[0023] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 1개의 화학식 (III) 또는 (IV)에 따른 것이다:

[0024] $(Z)_m\text{-Gln-(L)}_n\text{-(X)}$ (III)

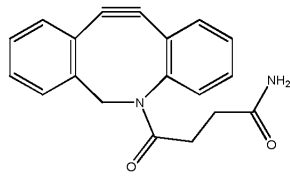
[0025] $(X)\text{-(L)}_n\text{-Gln-(Z)}_m$ (IV)

[0026] 여기서 Z는 카르복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고; Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고; 각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고; m은 0 내지 5의 정수이고; n은 0 내지 5의 정수이고; X는 반응성 기이다.

[0027] 한 실시양태에서, L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)이다. 또 다른 실시양태에서, n이 2-5일 때, 적어도 1개의 L은 1개 이상의 아미노산을 포함하고 또 다른 L은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티이다. 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (III)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; 여기서 L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG) ($-\text{O}((\text{CH}_2)_2)-$), 에틸 아민 ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_2)-$) 또는 프로필 아민 ($-\text{NH}((\text{CH}_2)_3)-$)이고; 여기서 n은 0, 1, 2 또는 3이다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (III)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기

이고, 여기서 L은 아미노산이다. 한 실시양태에서, L은 Gly이고; n은 1이고; m은 1이다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (IV)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 1, 2 또는 3이고; 적어도 1개의 L은 Gly이다.

[0028] 또 다른 실시양태에서, X는 (1R,8S,9s)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메탄올 (BCN),



(DBCO), 트랜스-시클로옥텐 (TCO), 아지도 (N_3), 알킨, 테트라진 메틸시클로프로펜, 노르보르넨, 히드라지드/히드라진, 및 알데히드로 이루어진 군으로부터 선택된 반응성 기이다.

[0029] 한 실시양태에서, 치료제는 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 화학요법제, 약물 작용제, 방사성 작용제, 세포독성제, 항생제, 소분자, 핵산 또는 폴리펩티드이다. 또 다른 실시양태에서, 진단제는 형광단, 형광 염료, 방사성핵종 또는 효소이다.

[0030] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기 및 C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 2개의 아미노산 잔기를 갖는다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고, 여기서 C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 리신 또는 아르기닌이다. 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0031] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 3개의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 4개의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0033] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 5개의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0034] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 9개 미만의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 13개 미만의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0036] 한 실시양태에서, 미생물 트랜스글루타미나제는 스트렙토미세스 모바라엔시스로부터의 것이다.

[0037] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 IgG₁ 이뮤노글로불린이다. 또 다른 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 이뮤노글로불린이다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 테일피스를 포함하지 않는 IgA₁, IgA₂, 또는 IgM 이뮤노글로불린이다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 IgD 또는 IgE 이뮤노글로불린이다.

[0038] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 인간 이뮤노글로불린 또는 인간화 이뮤노글로불린이다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 키메라 이뮤노글로불린 또는 비-인간 이뮤노글로불린이다.

[0039] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 2개의 중쇄 사이에 어떠한 분자내 가교도 존재하지 않는다.

[0040] 한 실시양태에서, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 1:1 내지 2:1이다.

[0041] 또 다른 측면에서, 이뮤노글로불린 및 기능적 작용제를 포함하는 접합된 이뮤노글로불린이 본원에 기재되며, 여기서 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, 기능적 작용제는 아실 공여자 기질을 포함하며, 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기를 포함하고, 기능적 작용제는 치료제 또는 진단제이며, 여기서 이뮤노글로불린의 C-말단 리신은 기능적 작용제의 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합된다.

[0042] 또 다른 측면에서, 이뮤노글로불린 및 기능적 작용제를 포함하는 접합된 이뮤노글로불린이 본원에 기재되며, 여기서 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, C-말단 리신은 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합되며, 여기서 아실 공여자 기질은 추가로 반응성 기를 포함하고, 반응성 기는 기능

적 작용제에 접합되며, 여기서 기능적 작용제는 치료제 또는 진단제이다.

[0043] 한 실시양태에서, C-말단 리신은 이류노글로불린의 중쇄의 리신 447 (K447)이다.

[0044] 한 실시양태에서, 이류노글로불린은 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민 또는 히스티딘이다.

[0045] 또 다른 실시양태에서, 이류노글로불린은 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, 여기서 C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기는 프롤린, 아스파르트산, 글루탐산, 리신 또는 아르기닌이 아니다.

[0046] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 1개의 화학식 (I) 또는 (II)에 따른 것이다:

[0047] $(Z)_m\text{-Gln-(L)}_n\text{-(Y)}$ (I)

[0048] $(Y)\text{-(L)}_n\text{-Gln-(Z)}_m$ (II)

[0049] 여기서 Z는 카르복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고; Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고; 각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고; m은 0 내지 5의 정수이고; n은 0 내지 5의 정수이고; Y는 기능적 작용제이다.

[0050] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (I)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; 여기서 L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG) $(\text{-O}((\text{CH}_2)_2)\text{-})$, 에틸 아민 $(\text{-NH}((\text{CH}_2)_2)\text{-})$ 또는 프로필 아민 $(\text{-NH}((\text{CH}_2)_3)\text{-})$ 이고; 여기서 n은 0, 1, 2 또는 3이다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (I)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고, 여기서 L은 아미노산이다. 한 실시양태에서, L은 Gly이고; m은 1이고; n은 1이다. 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (II)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 1, 2 또는 3이고; 적어도 1개의 L은 Gly이다. 한 실시양태에서, L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)이다. 또 다른 실시양태에서, L은 1개 이상의 아미노산 및 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)를 포함한다.

[0051] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 1개의 화학식 (III) 또는 (IV)에 따른 것이다:

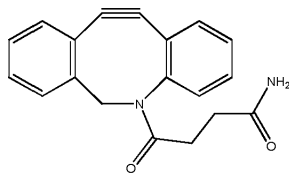
[0052] $(Z)_m\text{-Gln-(L)}_n\text{-(X)}$ (III)

[0053] $(X)\text{-(L)}_n\text{-Gln-(Z)}_m$ (IV)

[0054] 여기서 Z는 카르복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고; Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고; 각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고; m은 0 내지 5의 정수이고; n은 0 내지 5의 정수이고; X는 반응성 기이다.

[0055] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (III)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; 여기서 L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG) $(\text{-O}((\text{CH}_2)_2)\text{-})$, 에틸 아민 $(\text{-NH}((\text{CH}_2)_2)\text{-})$ 또는 프로필 아민 $(\text{-NH}((\text{CH}_2)_3)\text{-})$ 이고; 여기서 n은 0, 1, 2 또는 3이다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (III)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고, 여기서 L은 아미노산이다. 한 실시양태에서, L은 Gly이고; m은 1이고; n은 1이다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (IV)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 1, 2 또는 3이고; 적어도 1개의 L은 Gly이다. 한 실시양태에서, L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)이다. 또 다른 실시양태에서, n이 2-5일 때, 적어도 1개의 L은 1개 이상의 아미노산을 포함하고, 1개 이상의 L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)를 포함한다.

[0056] 한 실시양태에서, X는 (1R,8S,9s)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메탄올 (BCN),



(DBCO)

, 트랜스-시클로옥텐 (TCO), 아지도 (N_3), 알킨, 테트라진 메틸시클로프로펜, 노르보르넨, 히드라지드/히드라진, 및 알데히드로 이루어진 군으로부터 선택된 반응성 기이다.

[0057] 한 실시양태에서, 치료제는 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 화학요법제, 약물 작용제, 방사성 작용제, 세포독성제, 항생제, 소분자, 핵산 또는 폴리펩티드이다. 또 다른 실시양태에서, 진단제는 형광단, 형광 염료, 방사성핵종 또는 효소이다.

[0058] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기 및 C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 2개의 아미노산 잔기를 갖는다.

[0059] 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 리신 또는 아르기닌이다.

[0060] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 3개의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0061] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 4개의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0062] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기, 및 C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기를 포함하는, C-말단 리신 후에 5개의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글

루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린이 아니다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 리신, 시스테인, 트립토판, 아르기닌, 세린, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0063] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 9개 미만의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0064] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 13개 미만의 아미노산 잔기를 갖고, 여기서 C-말단 리신 후에 마지막 아미노산 잔기는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0065] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 IgG₁ 이뮤노글로불린이다. 또 다른 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 이뮤노글로불린이다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 테일피스를 포함하지 않는 IgA₁, IgA₂, 또는 IgM 이뮤노글로불린이다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 IgD 또는 IgE 이뮤노글로불린이다.
- [0066] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 인간 이뮤노글로불린 또는 인간화 이뮤노글로불린이다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 키메라 이뮤노글로불린 또는 비-인간 이뮤노글로불린이다.
- [0067] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 2개의 중쇄 사이에 어떠한 분자내 가교도 존재하지 않는다.
- [0068] 한 실시양태에서, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 1:1 내지 2:1이다.
- [0069] 한 실시양태에서, 기능적 작용제는 항체 또는 그의 항원-결합 부분이고, 여기서 이뮤노글로불린 및 기능적 작용제는 동일한 항원에 결합하거나 또는 상이한 항원에 결합한다.
- [0070] 또 다른 측면에서, 접합된 이뮤노글로불린을 코딩하는 핵산이 본원에 기재된다. 또 다른 측면에서, 핵산을 포함하는 플라스미드가 본원에 기재된다. 또 다른 실시양태에서, 플라스미드를 포함하는 단리된 세포가 본원에 기재된다.
- [0071] 또 다른 측면에서, 접합된 이뮤노글로불린 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 본원에 기재된다.
- [0072] 한 측면에서, 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 접합된 이뮤노글로불린이 본원에 기재된다.
- [0073] 한 실시양태에서, 방법은 아실 공여자 기질의 반응성 기에 기능적 작용제를 접합시키기 전에, 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합된 이뮤노글로불린을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 정제하는 단계는 크기-기반 방법, 예컨대 크로마토그래피 또는 투석여과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 정제하는 단계는 전하-기반 분리, 예컨대 음이온 교환 또는 양이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 정제하는 단계는 친화도-기반 단계, 예컨대 단백질 A 또는 단백질 G 크로마토그래피를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0074]

발명의 내용뿐만 아니라 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 관독할 때 추가로 이해된다. 개시된 방법 및 접합된 이뮤노글로불린을 예시하기 위한 목적으로, 도면에 예시적인 실시양태가 제시되지만; 방법 및 접합된 이뮤노글로불린이 개시된 구체적 실시양태로 제한되는 것은 아니다. 도면에서:

도 1은 트랜스글루타미나제 반응을 보여주며, 여기서 트랜스글루타미나제는 암모니아 분자의 방출을 수반하는 아실 공여자 글루타민과 아실 수용자 리신 사이의 이소펩티드 결합의 형성을 촉매한다.

도 2는 예시적인 Z-Gln-Gly 아실-공여자 기질의 구조를 보여준다.

도 3은 예시적인 Z-Gln-Gly 아실-공여자 기질의 일부를 합성하기 위한 가능한 경로를 보여준다.

도 4a, 4b 및 4c를 포함한 도 4는 인간 IgG₁ Fab 및 Fc 결정 구조에서 용매 노출된 리신을 보여준다; (a) Fab VH-CH1 및 V_κ-C_κ, (b) Fab VH-CH1 및 V_λ-C_λ, 및 (c) Fc CH2 및 CH3은 디스커버리 스튜디오 4.5(Discovery Studio 4.5)를 사용하여 1.4 Å 프로브 반경으로 결정되었고, 황색으로 강조표시되었다.

도 5는 인간 IgG₁ (서열식별번호: 40), 카파 (서열식별번호: 41), 및 람다 (서열식별번호: 42) 불변 도메인의 서열을 보여준다. 1FC1 (Fc_γ), 4F3F (CH1 및 C_κ), 및 4HK0(C_λ)에 기초한 용매 노출된 불변 도메인 리신은 적색으로 강조표시되고; 루프 내의 리신은 밑줄표시된다. 불변 도메인은 EU 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 6a, 6b, 6c, 6d, 6e 및 6f를 포함한 도 6은 아실 공여자 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 인큐베이션된 항체의 ESI-MS 분석을 보여준다. 항체를 50-배 물 과량의 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 1U/mL 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. IdeS 소화 및 환원 후, LC, Fd, 및 Fc 질량을 ESI-MS에 의해 결정하였다.

도 7은 항체 01 및 K-태그 미생물 트랜스글루타미나제 반응의 ESI-MS 분석을 보여준다. mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 탈글리코실화 및 환원 후, (a) 항체 01, (b) 항체 01-HC-K태그, 및 (c) 항체 01-LC-K태그의 HC 및 LC 질량을 ESI-MS에 의해 결정하였다.

도 8a, 8b 및 8c를 포함한 도 8은 항체 01의 C-말단 연장 ESI-MS 분석을 예시한다. (a) 항체 01 mAb, (b) 항체 01-L, 및 (c) 항체 01-LL을 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 37°C에서 밤새 인큐베이션하고, 질량을 도 7에서와 같이 ESI-MS에 의해 분석하였다.

도 9a-9b를 포함한 도 9는 Lys447에의 단일-단계 약물 접합을 예시한다. (a) 항체 01-L 및 (b) Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 37°C에서 밤새 인큐베이션한 항체 01-L을 IdeS로 소화시키고 DTT로 환원시켜 LC, Fd, 및 Fc 단편을 생성하였다. 샘플의 280 nm에서의 흡광도 (AU280) 및 총 이온 전류 (TIC)를 방법에서와 같이 역상 LC-MS에 의해 모니터링하였다.

도 10은 이량체 mAb의 SDS-PAGE를 보여준다. Z-Gln-Gly-N₃ 또는 Z-Gln-Gly-PEG₃-BCN과 아미드교환된 항체 01-L을 혼합하고, 22°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 샘플은 환원되었고, 4-12% 비스-트리스 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. HC-HC 이량체의 질량은 대략 110 kDa이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075]

개시된 방법 및 접합된 이뮤노글로불린은 본 개시내용의 일부를 형성하는 첨부 도면과 관련하여 하기의 상세한 설명을 참조하여 보다 용이하게 이해될 수 있다. 개시된 방법 및 접합된 이뮤노글로불린은 본원에 기재되고/거나 제시된 구체적 실시양태로 제한되지 않고, 본원에 사용된 용어는 단지 예로서 특정한 실시양태를 기재하고자 하는 것이며, 청구된 방법 또는 접합된 이뮤노글로불린을 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것을 이해하여야 한다.

[0076]

달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 가능한 메카니즘 또는 작용 방식 또는 개선 이유에 관한 임의의 설명은 단지 예시적인 것으로 의도되고, 개시된 방법 및 접합된 이뮤노글로불린은 임의의 이러한 제안된 메카니즘 또는 작용 방식 또는 개선 이유의 정확성 또는 부정확성에 의해 구속되지 않아야 한다.

[0077]

본문 전체에 걸쳐, 설명은 접합된 이뮤노글로불린 및 이를 생성하는 방법을 언급한다. 개시내용이 접합된 이뮤노글로불린과 연관된 특색 또는 실시양태를 기재하거나 청구하는 경우에, 이러한 특색 또는 실시양태는 이를 생성하는 방법에 동등하게 적용가능하다. 마찬가지로, 개시내용이 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법과 연

관된 특색 또는 실시양태를 기재하거나 청구하는 경우에, 이러한 특색 또는 실시양태는 접합된 이뮤노글로불린에 동등하게 적용가능하다.

- [0078] 특정한 수치에 대한 언급은, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한, 적어도 그러한 특정한 값을 포함한다. 값의 범위가 표현될 때, 또 다른 실시양태는 하나의 특정한 값으로부터 및/또는 다른 특정한 값까지 포함한다. 또한 범위에 명시된 값에 대한 언급은 그러한 범위 내의 각각의 및 모든 값을 포함한다. 모든 범위는 포괄적이고 조합가능하다.
- [0079] 값이 선행사 "약"의 사용에 의해 근사치로 표현된 경우, 특정한 값은 또 다른 실시양태를 형성한다는 것을 이해할 것이다.
- [0080] 명료함을 위해 본원의 별개의 실시양태의 문맥에서 기재된, 개시된 방법 및 접합된 이뮤노글로불린의 특정 특색은 또한 단일 실시양태에서 조합되어 제공될 수 있다는 것을 인지하여야 한다. 반대로, 간결함을 위해 단일 실시양태의 문맥에서 기재된, 개시된 방법 및 접합된 이뮤노글로불린의 다양한 특색은 또한 개별적으로 또는 임의의 하위조합으로 제공될 수 있다.
- [0081] 본원에 사용된 단수 형태는 복수 형태를 포함한다.
- [0082] 설명의 측면에서 다양한 용어가 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용된다. 이러한 용어는 달리 나타내지 않는 한 관련 기술분야에서의 그의 통상적인 의미로 주어져야 한다. 다른 구체적으로 정의된 용어는 본원에 제공된 정의와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.
- [0083] 용어 "약"은 수치 범위, 컷오프, 또는 구체적 값에 관하여 사용될 때 언급된 값이 열거된 값으로부터 최대 10% 만큼 달라질 수 있다는 것을 나타내기 위해 사용된다. 따라서, 용어 "약"은 명시된 값으로부터의 $\pm 10\%$ 이하의 변동, $\pm 5\%$ 이하의 변동, $\pm 1\%$ 이하의 변동, $\pm 0.5\%$ 이하의 변동, 또는 $\pm 0.1\%$ 이하의 변동을 포괄하기 위해 사용된다.
- [0084] "산성 아미노산"은 생리학적 pH에서 음전하를 나타내는 아미노산을 지칭한다. 유전자적으로 코딩된 소수성 아미노산은 아스파르테이트, 글루타메이트, 아스파라긴, 및 글루타민을 포함한다.
- [0085] 용어 "아실 공여자 기질"은 말단 아실 기를 갖는 기를 지칭한다. 바람직하게는, "아실 공여자 기질"은 글루타민 잔기를 포함한다. 아실 공여자 기질은 임의로 추가의 반응성 기를 함유할 수 있다. 제1 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 기능적 작용제에 공유 연결된다. 제2 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 기능적 작용제에 연결되지 않는다. 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기 및 반응성 기를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은, 본원에 추가로 기재된 바와 같은, 1개 이상의 링커를 포함한다. 임의의 상기 실시양태에서, 아실 공여자 기질과 기능적 작용제 사이, 또는 아실 공여자 기질과 반응성 기 사이에 임의로 링커가 존재한다.
- [0086] 본원에 사용된 용어 "항체"는 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)의, 4개의 폴리펩티드 쇄로 구성된 임의의 이뮤노글로불린 (Ig) 분자를 광범위하게 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 Ig 분자의 본질적 에피토프 결합 특색을 보유하는, 이뮤노글로불린 분자의 임의의 항원-결합 부분, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 지칭한다. 이러한 돌연변이체, 변이체 또는 유도체 항체 포맷은 관련 기술분야 및 본원에 논의된 비제한적 실시양태에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 키메라 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 비-인간 항체이다.
- [0087] 전장 항체에서, 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 초가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 이뮤노글로불린 분자는 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 하위부류의 것일 수 있다.
- [0088] 본원에 사용된 용어 항체의 "항원-결합 부분" (또는 간단히 "항체 부분")은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 1개 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것이 제시된 바 있다. 또한, 이러한 항체 실시양태는 2개 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합하는;

이중특이적, 이중 특이적, 또는 다중-특이적 포맷될 수 있다. 용어 항체의 "항원-결합 부분"에 포괄되는 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) 단일 가변 단편을 포함하는 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546, Winter et al., PCT 공개 WO 90/05144 A1, 본원에 참조로 포함됨); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 추가로, Fv 단편의 2개의 도메인, VL 및 VH는 개별 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여, VL 및 VH 영역이 쌍형성하여 1가 분자를 형성한 (단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨; 예를 들어, 문헌 [Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조) 단일 단백질쇄로 제조될 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다. 이러한 단일쇄 항체도 또한 용어 항체의 "항원-결합 부분"에 포괄되는 것으로 의도된다. 단일쇄 항체의 다른 형태, 예컨대 디아바디도 또한 포괄된다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드쇄 상에서 발현되지만, 동일쇄상의 2개의 도메인 사이에서 쌍형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인이 또 다른쇄의 상보적 도메인과 쌍형성하게 하여 2개의 항원 결합 부위를 생성한, 2가, 이중특이적 항체이다 (예를 들어, 문헌 [Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123] 참조). 이러한 항체 결합 부분은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)).

[0089] "염기성 아미노산"은 생리학적 pH에서 양전하를 나타내는 아미노산을 지칭한다. 유전자적으로 코딩된 소수성 아미노산은 히스티딘, 리신 및 아르기닌을 포함한다.

[0090] 본원에 사용된 용어 "생물학적 샘플"은 생체내 또는 시험관내에서 수득된 생물학적 조직 또는 유체 기원의 샘플을 포함한, 대상체로부터 수득된 샘플을 지칭한다. 이러한 샘플은 인간을 포함한 포유동물로부터 단리된 체액 (예를 들어 혈액, 혈장, 혈청, 유즙, 척수액, 복수 또는 소변), 기관, 조직, 분획 및 세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 생물학적 샘플은 조직을 포함한 생물학적 샘플의 절편 (예를 들어, 기관 또는 조직의 절편 부분)을 포함할 수 있다. 또한, 생물학적 샘플은 생물학적 샘플로부터의 추출물, 예를 들어 생물학적 유체 (예를 들어, 혈액 또는 소변)로부터의 항원을 포함할 수 있다.

[0091] 용어 "C-말단 리신"은 이류노글로불린의 중쇄의 C-말단 단부를 지칭한다. 바람직하게는, C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기가 존재한다. C-말단 리신 후에 단지 1개의 아미노산 잔기가 존재하는 (아미노산 위치 +1) 한 실시양태에서, C-말단 리신에 바로 인접한 아미노산 잔기는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 1개 초과인 아미노산 잔기가 C-말단 리신에 추가되는 경우에 (아미노산 위치 +1, +2 등), C-말단 리신에 바로 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산으로부터 선택될 수 있다. 2개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신에 추가되는 한 실시양태에서, C-말단 리신에 바로 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이고, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +2)는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 2개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신에 추가되는 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 제1 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 리신 또는 아르기닌이다.

[0092] 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 1개의 아미노산 잔기가 존재한다 (아미노산 위치 +1). 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신 후에 2개의 아미노산 잔기가 존재한다 (아미노산 위치 +1 및 +2). 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신 후에 3 (아미노산 위치 +1, +2 및 +3), 4 (아미노산 위치 +1, +2, +3 및 +4), 5 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4 및 +5), 6 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5 및 +6), 7 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6 및 +7), 8 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7 및 +8), 9 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8 및 +9), 10 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9 및 +10), 11 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10 및 +11), 12 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11 및 +12), 13 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12 및 +13), 14 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13 및 +14), 15 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14 및 +15), 16 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15 및 +16), 17 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10,

+11, +12, +13, +14, +15, +16 및 +17), 18 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17 및 +18), 19 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18 및 +19) 또는 20 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, +19 및 +20)개의 아미노산 잔기가 존재한다.

[0093] 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 아미노산 잔기는 GTYFQAYGT (서열식별번호: 1)를 포함하지 않는다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 아미노산 잔기는 GECTYFQAYGCTE (서열식별번호: 2)를 포함하지 않는다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 아미노산 잔기는 GENTYFQAYGNTE (서열식별번호: 3)를 포함하지 않는다.

[0094] 한 실시양태에서, C-말단 리신은 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄의 리신 447이다. 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신은 IgD 또는 IgE의 C-말단 리신이다. 또 다른 실시양태에서, 용어 "C-말단 리신"은 IgA₁, IgA₂ 또는 IgM의 테일 피스 전의 마지막 리신 잔기를 지칭한다. 한 실시양태에서, IgA₁, IgA₂, 또는 IgM의 테일 피스는 제거된다. 한 실시양태에서, IgA₁, IgA₂, 또는 IgM의 테일 피스는 제거되지 않는다. 항체에 대한 테일 피스의 서열이 하기 제시된다:

[0095] IgA₁ PTHVNVSVVMAEVDGTCY (서열식별번호: 4)

[0096] IgA₂ PTHVNVSVVMAEVDGTCY (서열식별번호: 4)

[0097] IgM PTLYNVSLVMSDTAGTCY (서열식별번호: 5)

[0098] 또 다른 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린의 중쇄의 C-말단으로부터 제거, 예를 들어, 결실될 수 있고, C-말단 리신 잔기, 이어서 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린에 부가될 수 있다. 예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄ 이뮤노글로불린의 아미노산 잔기 446 및 447이 결실될 수 있고, C-말단 리신, 이어서 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기가 부가될 수 있고, 여기서 미생물 트랜스글루타미나제는 이어서 이뮤노글로불린의 C-말단 리신을 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합시킬 수 있다. 다시 말해서, 이뮤노글로불린이 야생형 아미노산 위치 446 및 447을 제거하기 위해 돌연변이된 경우, C-말단 리신이 예를 들어 이뮤노글로불린의 아미노산 위치 446에 존재할 수 있다. 1개 이상의 추가의 아미노산 잔기가 이어서 C-말단 리신에, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 아미노산 위치 +1, +2, +3, +4 등에서 부가될 수 있다. 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린의 중쇄의 C-말단으로부터 제거, 예를 들어, 결실될 수 있고, C-말단 리신 잔기, 이어서 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린에, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 아미노산 위치 +1, +2, +3, +4 등에서 부가될 수 있다.

[0099] 또 다른 실시양태에서, CH3 도메인이 이뮤노글로불린의 중쇄의 C-말단에서 제거되고, C-말단 리신 잔기, 이어서 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린에 부가될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, CH2 도메인 및 CH3 도메인 둘 다가 이뮤노글로불린의 중쇄의 C-말단에서 제거되고, C-말단 리신 잔기, 이어서 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린에 부가될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 힌지 영역, CH2 도메인, 및 CH3 도메인이 이뮤노글로불린의 중쇄의 C-말단에서 제거되고, C-말단 리신 잔기, 이어서 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린에 부가될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인, 및 CH3 도메인이 이뮤노글로불린의 중쇄의 C-말단에서 제거되고, C-말단 리신 잔기, 이어서 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기가 이뮤노글로불린에 부가될 수 있다.

[0100] 용어 "클릭 화학"은 고수율의, 고도로-선택적인, 신뢰가능하고 깨끗한 단백질 합성 및/또는 접합을 위한 특정한 반응을 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [King et al., "Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions - Past and Present Trends", Bioconjug. Chem., (2014) 25(5): 825-839; McKay et al., "Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation", Chem. Biol., (2014) 21(9): 1075-1101]을 참조한다.

[0101] 용어 "키메라화", "키메라", "키메라 항체" 등의 용어는 하나의 공급원 또는 종으로부터의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 즉, 항원-결합 영역 및 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린을 지칭한다. 이들 일부는 통상적인 기술 (예를 들어, 합성)에 의해 화학적으로 함께 연결되거나, 또는 유전 공학 기술을 사용하여 인접 폴리펩티드로서 제조될 수 있다 (예를 들어, 키메라 항체의 단백질 일부를 코딩하는 DNA를 발현시켜 인접 폴리펩티드 쌍을 생산할 수 있음). 본 개시 내용에 포괄되는 다른 형태의 "키메라 이뮤노글로불린"은 부류 또는 하위부류가 원래 이뮤노글로불린의 것으로

부터 변형되거나 변화된 것이다 (또한 "부류-전환된 이뮤노글로불린"으로도 지칭됨). 개시내용 전체에 걸쳐, 키메라 이뮤노글로불린은 "xi"로 지정된다. 본원에서, "키메라 이뮤노글로불린" 등의 용어는 항체를 생성하는데 사용된 과정보다는 이뮤노글로불린의 서열을 지칭한다.

[0102] 본원에 사용된, "Lys447" 또는 "리신 447"은 이뮤노글로불린의 중쇄 불변 영역의 아미노산 위치 447의 리신 잔기를 지칭하고 (EU 넘버링 시스템을 사용하여 넘버링된 바와 같음), 이는 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgD, 및 IgE에서의 C-말단 코돈이다.

[0103] 본원에 사용된 "기능적 작용제"는 치료적, 진단적, 또는 다른 기능적 특성(들)을 갖는 작용제를 지칭한다. 한 실시양태에서, 기능적 작용제는 치료제일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 기능적 작용제는 진단제일 수 있다. 기능적 작용제는 대분자 또는 소분자일 수 있다. 대분자 기능적 작용제는 항체 및 그의 항원-결합 부분을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 소분자 기능적 작용제는 화학요법제, 세포독성제, 항생제, 생물학적 과정을 조절할 수 있는 다른 유기 화합물 (예를 들어, 약물), 및 폴리펩티드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0104] 용어 "인간화", "인간화 이뮤노글로불린" 등의 용어는 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역" (CDR)이 모 이뮤노글로불린의 것과 비교하여 상이한 특이성의 이뮤노글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 이뮤노글로불린을 지칭한다. 대부분의 경우에, 인간화 이뮤노글로불린은 인간 이뮤노글로불린 (수용자 이뮤노글로불린)이며, 여기서 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기는 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 중 (공여자 이뮤노글로불린) 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 추가변 영역으로부터의 잔기로 대체된다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 FWR 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 이뮤노글로불린은 수용자 이뮤노글로불린 또는 공여자 이뮤노글로불린에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 이뮤노글로불린 성능을 추가로 정밀화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 이뮤노글로불린은 적어도 1개 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FWR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 임의로, 인간화 이뮤노글로불린은 또한 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; 및 Neuberger, M. S., et al., Nature 314 (1985) 268-270]을 참조한다. 개시내용 전체에 걸쳐, "인간화 이뮤노글로불린"은 "zu"로 지정된다. 본원에서, "인간화 이뮤노글로불린" 등의 용어는 이뮤노글로불린을 생성하는데 사용된 과정보다는 이뮤노글로불린의 서열을 지칭한다.

[0105] 용어 "진단제"는 생체내 영상화 연구 예컨대 CT, MRI 및 X선 및/또는 시험관내 영상화 연구에 유용할 수 있는 화합물을 지칭한다. 진단제의 비제한적 예는 형광단, 형광 염료, 방사성핵종, 및 효소를 포함한다.

[0106] 용어 "공여자 이뮤노글로불린"은 인간화 이뮤노글로불린을 위해 그의 가변 영역, CDR, 또는 다른 그의 기능적 단편 또는 유사체의 아미노산 서열을 기여하여, 공여자 이뮤노글로불린의 항원 특이성 및 중화 활성 특징을 갖는 인간화 이뮤노글로불린을 제공하는 비-인간 이뮤노글로불린을 지칭한다.

[0107] 용어 "수용자 이뮤노글로불린"은 인간화 이뮤노글로불린을 위해 그의 중쇄 및/또는 경쇄 프레임워크 영역 및/또는 그의 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 제공하는, 공여자 이뮤노글로불린에 대해 이중인 이뮤노글로불린을 지칭한다. 수용자 이뮤노글로불린은 임의의 포유동물로부터 유래될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 수용자 이뮤노글로불린은 인간에서 비-면역원성이다. 바람직하게는 수용자 이뮤노글로불린은 인간 이뮤노글로불린이다.

[0108] "인간화"는 인간화 이뮤노글로불린을 생성하는 과정을 지칭하고, 인 실리코 인간화, 인간 이뮤노글로불린으로의 종/숙주 CDR 조작, 상응하는 인간 프레임워크 영역과 매칭시키기 위한 키메라 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 잔기의 치환 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 상기 특징을 갖는 인간화 이뮤노글로불린을 생성하기 위한 임의의 과정을 포함한다.

[0109] 본원에 사용된 "이뮤노글로불린"은 카파 및 람다 경쇄 및 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 중쇄를 포함하는 이뮤노글로불린 유전자에 의해 실질적으로 코딩된, 1개 이상의 폴리펩티드로 이루어진 단백질을 지칭한다. 전장 이뮤노글로불린 "경쇄" (약 25 Kd 또는 214개 아미노산)는 NH₂-말단에서 가변 영역 유전자 (약 110개 아미노산) 및 COOH - 말단에서 카파 또는 람다 불변 영역 유전자에 의해 코딩된다. 전장 이뮤노글로불린 "중쇄" (약 50 Kd 또는 446개 아미노산)는 가변 영역 유전자 (약 116개 아미노산) 및 다른 상기 언급된 불변 영역 유전자 중 하나, 예를 들어, 감마 (약 330개 아미노산을 코딩함)에 의해 유사하게 코딩된다. "이뮤노글로불린"은 (a) 이뮤노글로불린 폴리펩티드, 즉, 달리 명시되지 않는 한, 모든 이뮤노글로불린 이소형 (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD,

및 IgY), 부류 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂), 하위부류, 및 각각의 이소형의 다양한 단량체 및 중합체 형태를 포함한, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 이뮤노글로불린 패밀리 of 폴리펩티드; 및 (b) 항원에 면역특이적으로 결합하는 이러한 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 보존적으로 치환된 변이체를 포함한다. 이뮤노글로불린은 일반적으로, 예를 들어, 문헌 [Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)]에 기재되어 있다.

[0110] 본원에 개시된 이뮤노글로불린의 한 형태는 항체의 기본 구조 유닛으로 구성된다. 예를 들어, 항체는 사량체를 포함할 수 있고, 각각이 1개의 경쇄 및 1개의 중쇄를 갖는 쌍인 2개의 동일한 쌍의 이뮤노글로불린 쇄로 이루어질 수 있다. 일반적으로, 각각의 쌍에서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 함께 항원에 대한 결합을 담당하고, 불변 영역은 항체 이펙터 기능을 담당한다.

[0111] 항체에 더하여, 이뮤노글로불린은 예를 들어 전장 이뮤노글로불린의 항원-결합 단편 또는 부분, 예컨대 Fv, Fab, (Fab')₂ 및 Fv 단편을 포함한, 다양한 다른 형태; 및 대안적 항체 포맷 예컨대 몇가지 예를 들어 단일 쇄 이뮤노글로불린 (scFv 및 scFab), 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 및 다중특이적 항체로 존재할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [James D. Marks, Antibody Engineering, Chapter 2, Oxford University Press (1995) (Carl K. Borrebaeck, Ed.)]을 참조한다.

[0112] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 Fab 단편을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 CH3 도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 중쇄를 포함할 수 있다.

[0113] 본원에 사용된 용어 "면역특이적으로"는 이뮤노글로불린이 생성된 항원에 특이적으로 결합하고 다른 펩티드 또는 단백질에는 특이적으로 결합하지 않는 이뮤노글로불린의 능력을 지칭한다. 이뮤노글로불린이 생성된 항원에 면역특이적으로 결합하는 이뮤노글로불린은 다른 폴리펩티드 또는 단백질에 결합하지 않을 수 있거나, 또는 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 면역검정, 비아코어 또는 다른 검정에 의해 결정 시, 이뮤노글로불린이 생성된 항원보다 더 낮은 결합 친화도로 다른 폴리펩티드 또는 단백질에 결합할 수 있다. 이뮤노글로불린은, 실험 기술, 예컨대, 비제한적으로, 방사선면역검정 (RIA) 및 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)을 사용하여 결정 시, 그것이 임의의 교차-반응성 항원보다 더 높은 결합 친화도로 항체에 결합하는 경우에, 이뮤노글로불린이 생성된 항원에 면역특이적으로 결합한다 (예를 들어, 항체 특이성에 관한 논의에 대해 문헌 [Paul, ed., Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989)] 참조).

[0114] 본원에 사용된 "링커"는 이뮤노글로불린을 (아실 공여자 기질을 통해) 기능적 작용제 또는 반응성 기에 연결하기 위한, 직쇄 또는 분지쇄일 수 있는, 스페이서를 지칭한다. 이러한 링커는 절단가능할 수 있거나 (예를 들어, 산 불안정성 또는 프로테아제 절단가능) 또는 비-절단가능할 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티이다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 1개 이상의 아미노산 및 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)를 포함한다.

[0115] 용어 "모노클로날 항체"는 그의 생산 방법이 아닌, 임의의 진행 또는 원핵 세포 클론을 포함한 단세포 클론, 또는 파지 클론으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체는 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체로 제한되지 않는다.

[0116] "천연"은 이뮤노글로불린이 유래된 종으로부터의 야생형 이뮤노글로불린 서열을 지칭한다.

[0117] 본원에 사용된, "퍼센트 동일성" 등의 용어는 2개 이상의 핵산, 폴리뉴클레오티드, 단백질 또는 폴리펩티드 사이의 서열 관계를 기재하는데 사용되고, (a) 참조 서열, (b) 비교 윈도우, (c) 서열 동일성 및 (d) 서열 동일성의 백분율을 포함한 용어의 문맥에서 그와 관련하여 이해된다.

[0118] (a) "참조 서열"은 서열 비교를 위한 기초로서 사용되는 규정된 서열이다. 참조 서열은 명시된 서열의 하위세트 또는 전체일 수 있고; 예를 들어, 전장 cDNA 또는 유전자 서열의 절편, 또는 완전한 cDNA 또는 유전자 서열일 수 있다. 폴리펩티드의 경우, 참조 폴리펩티드 서열의 예시적인 길이는 적어도 약 16개 아미노산, 적어도 약 20개 아미노산, 적어도 약 25개 아미노산, 적어도 약 35개 아미노산, 적어도 약 50개 아미노산, 또는 적어도 약 100개 아미노산을 포함한다. 핵산의 경우, 참조 핵산 서열의 예시적인 길이는 적어도 약 50개 뉴클레오티드, 적어도 약 60개 뉴클레오티드, 적어도 약 75개 뉴클레오티드, 적어도 약 100개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 300개 뉴클레오티드, 또는 그쯤 또는 그 사이의 임의의 정수를 포함한다.

[0119] (b) "비교 윈도우"는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 인접한, 명시된 절편에 대한 참조를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열은 참조 서열과 비교될 수 있고, 비교 윈도우 내 폴리뉴클레오티

드 또는 폴리펩티드 서열의 부분은 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열 (부가, 치환 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 부가, 치환 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 예시적인 비교 윈도우는 적어도 20개의 인접 뉴클레오티드 또는 아미노산 길이일 수 있고, 임의로 30, 40, 50, 100개 또는 그 초과일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열에 갭이 포함됨으로 인해 참조 서열과 높은 유사성인 것으로 오해를 유발하는 것을 피하기 위해, 갭 페널티가 전형적으로 도입되고, 매칭 개수에서 차감된다는 것을 이해한다.

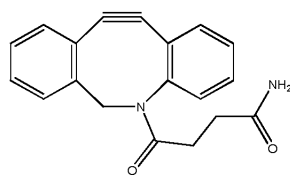
[0120] (c) 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 문헌 [Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2: 482, 1981]의 국부 상동성 알고리즘에 의해; 문헌 [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443, 1970]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해; 문헌 [Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 2444, 1988]의 유사성 검색 방법에 의해; 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 인텔리제네틱스(Intelligenetics)의 PC/유전자 프로그램 내 CLUSTAL, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 및 미국 위스콘신주 매디슨 7 사이언스 드라이브 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group) (GCG)의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지 내 TFASTA를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 이들 알고리즘의 컴퓨터 구현에 의해 수행될 수 있고; CLUSTAL 프로그램은 문헌 [Higgins and Sharp, Gene, 73: 237-244, 1988; Corpet, et al., Nucleic Acids Research, 16:881-90, 1988; Huang, et al., Computer Applications in the Biosciences, 8:1-6, 1992; 및 Pearson, et al., Methods in Molecular Biology, 24:7-331, 1994]에 널리 기재되어 있다. 데이터베이스 유사성 검색에 사용될 수 있는 프로그램의 BLAST 패밀리는: 뉴클레오티드 데이터베이스 서열에 대한 뉴클레오티드 질의 서열을 위한 BLASTN; 단백질 데이터베이스 서열에 대한 뉴클레오티드 질의 서열을 위한 BLASTX; 단백질 데이터베이스 서열에 대한 단백질 질의 서열을 위한 BLASTP; 뉴클레오티드 데이터베이스 서열에 대한 단백질 질의 서열을 위한 TBLASTN; 및 뉴클레오티드 데이터베이스 서열에 대한 뉴클레오티드 질의 서열을 위한 TBLASTX를 포함한다. 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1995]을 참조한다. 상기 프로그램의 새로운 버전 또는 새로운 프로그램은 모두 의심의 여지없이 미래에 이용가능하게 될 것이고, 본 개시내용과 함께 사용될 수 있다.

[0121] (d) "퍼센트 동일성"은 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하는 것에 의해 결정된 값을 의미하며, 여기서 비교 윈도우 내 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열 (부가, 치환 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 부가, 치환 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 둘 다의 서열에서 나타나는 위치의 수를 결정하여 매칭되는 위치의 수를 산출하고, 매칭되는 위치의 수를 비교 윈도우 내의 전체 위치의 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다.

[0122] "제약 유효량"은 대상체를 치료하는 이뮤노글로불린의 양을 지칭한다.

[0123] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에의 투여를 위한 본원에 기재된 바와 같은 이뮤노글로불린을 위한 제약 제제의 성분을 지칭한다. 예를 들어, 제약상 허용되는 담체는 리포솜-기반, 지질-기반 및/또는 나노-입자-기반일 수 있다.

[0124] 본원에 사용된 용어 "반응성 기"는 다른 화합물, 예컨대 기능적 작용제와 반응하여 적어도 1개의 공유 결합을 형성할 수 있는 화학적 관능기를 지칭한다. 한 실시양태에서, 반응성 기는 클릭 화학 커플링 반응에서 반응성이다. 반응성 기의 비제한적 예는 (1R,8S,9s)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메탄올 (BCN),



(DBCO)

, 트랜스-시클로옥텐 (TCO), 아지도 (N_3), 알킨, 테트라진 메틸시클로프로펜, 노르보르넨, 히드라지드/히드라진, 및 알데히드를 포함한다.

[0125] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 또는 비-인간 유기체를 지칭한다. 따라서, 본원에 기재된 방법, 이뮤노글로불린 및 접합된 이뮤노글로불린은 인간 및 수의학적 질환 및 상태 둘 다에 적용가능하다. 대상체는 질환 또는 상태에 대해 의료 관리를 받고 있는 "환자", 즉 살아있는 인간 또는 비-인간 유기체, 또는 병리상태의 징후 또는 특정한 상태의 존재/부재에 대해 조사받고 있는 규정되지 않은 질병을 갖는 인간 또는 비-인간 유기체일 수 있다.

- [0126] "치환"은 1개의 아미노산 잔기의 또 다른 것으로의 대체를 지칭한다. "치환"은, 예를 들어, 아미노산 잔기를 코딩하는 1개 이상의 DNA 염기 쌍에서의 미스센스 돌연변이 또는 1개의 아미노산을 또 다른 것으로 교환하기 위해 단백질을 조작하는 것을 포함한다.
- [0127] 본원에 사용된 "치료하는" 등의 용어는 질환 증상의 중증도 및/또는 빈도를 감소시키는 것, 질환 증상 및/또는 상기 증상의 기저 원인을 제거하는 것, 질환 증상 및/또는 그의 기저 원인의 빈도 또는 가능성을 감소시키는 것, 및 질환에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 유발된 손상을 개선시키거나 복원하는 것을 지칭한다.
- [0128] 용어 "치료제"는 상태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있는 대분자 또는 소분자를 의미한다. 치료제는 의학적 상태의 1종 이상의 증상을 앓고 있는 대상체에서 이를 치료하거나, 발병을 방지하거나, 진행을 늦추거나, 또는 그를 호전시키기 위해 투여될 수 있다. 치료제는 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 화학요법제, 방사성 작용제, 세포독성제, 항생제 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 치료제는 소분자이다. 또 다른 실시양태에서, 치료제는 폴리펩티드이다.
- [0129] 본원에 사용된 "와 90% 동일"은 참조 항목 (예를 들어, 생물학적 서열)과의 적어도 90% 동일, 91% 동일, 92% 동일, 93% 동일, 94% 동일, 95% 동일, 96% 동일, 97% 동일, 98% 동일, 99% 동일, 또는 100% 동일을 포괄한다.
- [0130] 하기 약어가 개시내용 전체에 걸쳐 사용된다: 항체 약물 접합체 (ADC); 약물-대-항체 비 (DAR); 프레임워크 영역 (FWR); 상보성 결정 영역 (CDR); 아우리스타틴 F (AuF); 가변 중쇄 영역 (VH); 가변 경쇄 영역 (VL); 가변 카파 (V κ); 감마 불변 영역 (C γ); 카파 불변 영역 (C κ); 모노클로날 항체 (mAb); EU 넘버링 시스템을 사용하여 넘버링된 바와 같은, 이뮤노글로불린의 중쇄의 아미노산 위치 447의 리신 (Lys447).
- [0131] 접합된 이뮤노글로불린의 생성
- [0132] 이뮤노글로불린과, 미생물 트랜스글루타미나제 및 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제를 인큐베이션하는 단계이며, a) 여기서 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, b) 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기를 포함하고, c) 여기서 기능적 작용제는 치료제 또는 진단제이고, 여기서 미생물 트랜스글루타미나제는 이뮤노글로불린의 C-말단 리신을 기능적 작용제의 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합시켜 이에 의해 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 것인 단계를 포함하는, 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법이 본원에 개시된다.
- [0133] 또한, i) 이뮤노글로불린과, 미생물 트랜스글루타미나제 및 아실 공여자 기질을 인큐베이션하는 단계이며, a) 여기서 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 포함하고, b) 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기 및 반응성기를 포함하고, 여기서 미생물 트랜스글루타미나제는 이뮤노글로불린의 C-말단 리신을 아실 공여자 기질의 글루타민 잔기에 접합시키는 것인 단계, 및 ii) 기능적 작용제를 아실 공여자 기질의 반응성기에 접합시켜 이에 의해 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 단계이며, 여기서 기능적 작용제는 치료제 또는 진단제인 단계를 포함하는, 접합된 이뮤노글로불린을 생성하는 방법이 본원에 개시된다.
- [0134] 접합은 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제를 용해 용액 중에 용해시키고, 용해된 기능적 작용제를 접합 완충제 중에서 이뮤노글로불린 및 미생물 트랜스글루타미나제와 인큐베이션하는 것에 의해 수행될 수 있다. 접합은 또한 아실 공여자 기질을 용해 용액 중에 용해시키고, 아실 공여자 기질을 접합 완충제 중에서 이뮤노글로불린 및 미생물 트랜스글루타미나제와 인큐베이션하는 것에 의해 수행될 수 있다.
- [0135] 수-불용성 기능적 작용제 및 아실 공여자 기질을 위한, 적합한 용해 용액은 유기, 수-혼화성 용매 예컨대 디메틸설폭시드 (DMSO)를 포함한다. 수-가용성 기능적 작용제 및 아실 공여자 기질을 위한, 적합한 용해 용액은 물 또는 완충 수용액, 예컨대 포스페이트-완충 염수, pH 7.2 (1 x PBS) 또는 DPBS를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0136] 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질의 적합한 농도는 약 10 μ M 내지 약 800 mM, 약 10 mM 내지 약 100 mM, 약 25 mM 내지 약 100 mM, 약 40 mM 내지 약 100 mM, 약 55 mM 내지 약 100 mM, 약 70 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 90 mM, 약 10 mM 내지 약 75 mM, 약 10 mM 내지 약 60 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 10 mM 내지 약 30 mM을 포함한다.
- [0137] 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질의 농도는 약 10 μ M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질의 농도는 약 25 μ M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질의 농도는 약 50 μ M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질의 농도는 약 100 μ M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질의 농도는 약 250 μ M

[illegible]

[0138] 이뮤노글로불린의 적합한 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 약 5 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 약 10 mg/ml 내지 약 20 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 15 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 12 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 5 mg/ml, 또는 약 0.1 mg/ml 내지 약 2 mg/ml를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 0.1 mg/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 0.5 mg/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 1 mg/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 2 mg/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 5 mg/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 10 mg/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 15 mg/ml일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린의 농도는 약 20 mg/ml일 수 있다.

[0139] 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 적합한 비는 약 1:1 내지 100:1을 포함한다. 한 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 약 25:1 내지 약 75:1이다. 또 다른 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 약 40:1 내지 약 60:1이다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 1:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 2:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 3:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 4:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 5:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 6:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 7:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 8:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 9:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 10:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 11:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 12:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 13:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 14:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 15:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 16:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불

린의 비는 17:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 18:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 19:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 20:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 25:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 30:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 35:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 40:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 45:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 50:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 60:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 70:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 80:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 90:1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질:이뮤노글로불린의 비는 100:1일 수 있다.

[0140] 인큐베이션은, 몇가지 예를 들어, DPBS, 1xPBS, pH 7.2, 인산나트륨, 인산칼륨, 붕산나트륨, 트리스 및 HEPES를 포함한 다수의 적합한 접합 완충제 중에서 수행될 수 있다. 접합 완충제의 농도는 약 5 mM 내지 약 2 M, 약 5 mM 내지 약 1 M, 약 5 mM 내지 약 500 mM, 약 5 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 100 mM, 약 20 mM 내지 약 100 mM, 약 30 mM 내지 약 100 mM, 약 45 mM 내지 약 100 mM, 약 60 mM 내지 약 100 mM, 약 75 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 90 mM, 약 10 mM 내지 약 75 mM, 약 10 mM 내지 약 60 mM, 약 10 mM 내지 약 45 mM, 또는 약 10 mM 내지 약 30 mM을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 10 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 20 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 30 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 40 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 50 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 60 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 70 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 80 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 90 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 100 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 250 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 500 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 750 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 1 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 1.25 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 1.5 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 1.75 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 농도는 약 2 M일 수 있다.

[0141] 접합 완충제는 염화나트륨을 추가로 포함할 수 있다. 염화나트륨의 적합한 농도는 약 0 mM 내지 약 2 M, 약 0 mM 내지 약 1 M, 약 1 M 내지 약 2 M, 약 500 mM 내지 약 1.5 M, 약 25 mM 내지 약 500 mM, 약 50 mM 내지 약 500 mM, 약 75 mM 내지 약 500 mM, 약 100 mM 내지 약 500 mM, 약 150 mM 내지 약 500 mM, 약 200 mM 내지 약 500 mM, 약 250 mM 내지 약 500 mM, 약 300 mM 내지 약 500 mM, 약 350 mM 내지 약 500 mM, 약 400 mM 내지 약 500 mM, 약 0 mM 내지 약 400 mM, 약 0 mM 내지 약 350 mM, 약 0 mM 내지 약 300 mM, 약 0 mM 내지 약 250 mM, 약 0 mM 내지 약 200 mM, 약 0 mM 내지 약 150 mM, 약 0 mM 내지 약 100 mM, 약 0 mM 내지 약 50 mM, 또는 약 0 mM 내지 약 25 mM을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 25 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 50 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 75 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 100 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 150 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 200 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 250 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 300 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 350 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 400 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 500 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 750 mM일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 1 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 1.25 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 1.5 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 1.75 M일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염화나트륨의 농도는 약 2 M일 수 있다.

[0142] 접합 완충제의 pH는 약 4 내지 약 9일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 5 내지 약 8일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 6 내지 약 7일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 4일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 4.5일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 5일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 5.5일 수 있다. 일부 실시양

태에서, 접합 완충제의 pH는 약 6.0일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 6.5일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 6.6일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 6.7일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 6.8일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 6.9일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.0일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.2일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.3일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.4일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.5일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.6일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.7일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.8일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 7.9일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 8.0일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 8.1일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 8.2일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 8.3일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 8.4일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 8.5일 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 완충제의 pH는 약 9일 수 있다.

[0143] 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질의 접합 완충제 중 용해를 용이하게 하기 위해, 접합 완충제 중 유기, 수-혼화성 용매의 최종 농도는 약 0% 내지 약 20%, 약 2% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 20%, 약 8% 내지 약 20%, 약 11% 내지 약 20%, 약 16% 내지 약 20%, 약 0% 내지 약 18%, 약 0% 내지 약 15%, 약 0% 내지 약 12%, 약 0% 내지 약 10%, 약 0% 내지 약 8%, 약 0% 내지 약 6%, 또는 약 0% 내지 약 2%일 수 있다.

[0144] 접합 완충제는 접합 완충제 중 티올-반응성 화합물의 용해를 용이하게 하기 위해 프로필렌 글리콜을 추가로 포함할 수 있다. 프로필렌 글리콜의 적합한 농도는 약 1% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 50%, 약 30% 내지 약 50%, 약 40% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 30%, 또는 약 10% 내지 약 20%를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로필렌 글리콜의 농도는 약 1% 또는 약 5%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로필렌 글리콜의 농도는 약 10%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로필렌 글리콜의 농도는 약 20%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로필렌 글리콜의 농도는 약 30%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로필렌 글리콜의 농도는 약 40%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로필렌 글리콜의 농도는 약 50%일 수 있다.

[0145] 접합 완충제는 접합 완충제 중 접합된 이뮤노글로불린의 용해를 용이하게 하기 위해 비-이온성 세제를 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 비-이온성 세제는 폴리소르베이트-20 또는 폴리소르베이트-80을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 비-이온성 세제의 적합한 농도는 약 0% 내지 약 1%, 약 0.1% 내지 약 1%, 약 0.3% 내지 약 1%, 약 0.5% 내지 약 1%, 약 0.7% 내지 약 1%, 약 0% 내지 약 0.8%, 약 0% 내지 약 0.6%, 약 0% 내지 약 0.4%, 또는 약 0% 내지 약 0.2%를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.1%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.2%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.3%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.4%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.5%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.6%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.7%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.8%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 0.9%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 세제의 농도는 약 1.0%일 수 있다.

[0146] 인큐베이션은 약 30분 내지 약 48시간 동안, 약 1시간 내지 약 48시간 동안, 약 2시간 내지 약 24시간 동안, 약 24시간 내지 약 48시간 동안, 약 30시간 내지 약 48시간 동안, 약 36시간 내지 약 48시간 동안, 약 42시간 내지 약 48시간 동안, 약 2시간 내지 약 42시간 동안, 약 2시간 내지 약 36시간 동안, 약 2시간 내지 약 30시간 동안, 약 2시간 내지 약 24시간 동안, 약 2시간 내지 약 18시간 동안, 약 2시간 내지 약 12시간 동안, 약 30분 내지 약 1시간 동안, 약 30분 내지 약 2시간 동안, 또는 약 2시간 내지 약 6시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 약 1시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 약 1.5시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 2시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 6시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 12시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 18시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 24시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 30시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 36시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 42시간 동안 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 48시간 동안 수행될 수 있다.

[0147] 인큐베이션 온도는 약 4℃ 내지 약 50℃, 약 18℃ 내지 약 37℃, 약 20℃ 내지 약 37℃, 약 22℃ 내지 약 37℃,

약 24℃ 내지 약 37℃, 약 26℃ 내지 약 37℃, 약 28℃ 내지 약 37℃, 약 30℃ 내지 약 37℃, 약 32℃ 내지 약 37℃, 약 34℃ 내지 약 37℃, 약 18℃ 내지 약 34℃, 약 18℃ 내지 약 32℃, 약 18℃ 내지 약 30℃, 약 18℃ 내지 약 28℃, 약 18℃ 내지 약 26℃, 또는 약 18℃ 내지 약 24℃일 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 4℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 18℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 20℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 22℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 24℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 26℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 28℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 30℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 32℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 34℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 37℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션은 50℃에서 수행될 수 있다.

[0148] 비혼입된 기능적 작용제 또는 아실 공여자 기질은 G-25 수지, G-50 수지, 바이오겔 P10 또는 범위 5,000-10,000 Da의 배제 한계를 갖는 다른 수지를 포함하나 이에 제한되지는 않는 수많은 적합한 수지를 사용한 탈염 크로마토그래피에 의해 집합된 이뮤노글로불린으로부터 분리될 수 있다. 크로마토그래피는 규모에 따라 칼럼 포맷 또는 회전-칼럼 포맷으로 수행될 수 있다. 탈염에 적합한 완충제는 예를 들어 DPBS, 1xPBS, 인산나트륨, 인산칼륨, 붕산나트륨, 트리스를 포함하거나, 또는 HEPES-기반 완충제가 1x PBS를 대체할 수 있다.

[0149] 제1 실시양태에서, 글루타민 잔기를 포함하는 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 아실 공여자 기질을 통해 C-말단 리신에 접합된다. 이러한 제1 실시양태에서, 기능적 작용제는 이뮤노글로불린과의 접합 전에 아실 공여자 기질의 반응성 기를 기능적 작용제와 반응시킴으로써 아실 공여자 기질과 조합된다. 제2 실시양태에서, 글루타민 잔기 및 반응성 기를 포함하는 아실 공여자 기질이 먼저 이뮤노글로불린에 접합되고, 이어서 반응성 기가 기능적 작용제에 연결된다.

[0150] 아실 공여자 기질은 링커, "L"을 포함할 수 있다. 링커는 비-절단가능한 링커 또는 절단가능한 링커일 수 있다. 예시적인 링커는, 예를 들어, 디술피드 함유 링커, 아세탈-기반 링커, 및 케탈-기반 링커를 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 비-절단가능한 링커일 수 있다. 적합한 비-절단가능한 링커는 1개 이상의 아미노산, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 알킬을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 PEG를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 절단가능한 링커일 수 있다. 적합한 절단가능한 링커는, 예를 들어, 발린-시트룰린-파라 아미노벤질을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 디술피드 함유 링커일 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 아세탈-기반 링커일 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 케탈-기반 링커일 수 있다. 링커는 또한, 단독의 또는 또 다른 링커 예컨대 1개 이상의 PEG 기와 조합된, 1개 이상의 아미노산일 수 있다.

[0151] 글루타민 잔기를 포함하는 아실 공여자 기질은 기능적 작용제 내에 존재할 수 있거나, 그의 일부일 수 있거나, 또는 그에 부착될 수 있다. 적합한 기능적 작용제는 예를 들어 형광단, 형광 염료, 폴리펩티드, 이뮤노글로불린, 항생제, 핵산, 방사성핵종, 화학적 링커, 소분자, 킬레이트화제, 지질, 핵산 (예컨대 DNA 또는 RNA) 및 약물을 포함한다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 형광단을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 형광 염료를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 이뮤노글로불린을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 항생제를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 핵산 (예컨대 DNA 또는 RNA)을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 방사성핵종을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 소분자를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 킬레이트화제 (예를 들어, 특히 DOTA, CHX-A"-DTPA, NOTA)를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 지질을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 약물을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 상기 열거된 기능적 작용제 중 임의의 것의 조합을 포함할 수 있다.

[0152] 아실 공여자 기질 (즉, 제1 아실 공여자 기질)은 제2 아실 공여자 기질 또는 링커에 결합될 수 있고, 제2 아실 공여자 기질 또는 링커는 제2 중쇄 가변 영역 및 제2 경쇄 가변 영역을 갖는 제2 이뮤노글로불린에 결합되어 있는 것이고, 제2 중쇄 가변 영역은 C-말단 리신을 가지며, 여기서 C-말단 리신은 리신 후에 적어도 1개의 아미노산 잔기를 갖는다. 예를 들어, 제1 아실 공여자 기질 및 제2 아실 공여자 기질은 각각 제1 및 제2 기능적 작용제로서 제1 및 제2 화학적 링커를 가질 수 있다. 제1 및 제2 화학적 링커는, 예를 들어 클릭 화학에 의하는 것을 포함하여, 수많은 적합한 수단에 의해 서로 결합될 수 있다.

[0153] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제는 화학식 (I) 또는 (II) 중 1개에 따른 것이다:

[0154] $(Z)_m\text{-Gln-(L)}_n\text{-(Y)}$ (I)

[0155] $(Y)-(L)_n-Gln-(Z)_m$ (II)

[0156] 여기서 Z는 카르복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고; Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고; 각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고; m은 0 내지 5의 정수이고; n은 0 내지 5의 정수이고; Y는 기능적 작용제이다.

[0157] 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (III) 또는 (IV) 중 1개에 따른 것이다:

[0158] $(Z)_m-Gln-(L)_n-(X)$ (III)

[0159] $(X)-(L)_n-Gln-(Z)_m$ (IV)

[0160] 여기서

[0161] Z는 카르복실벤질옥시 (CBZ) 기 또는 아미노산 잔기이고; Gln은 글루타민 아미노산 잔기이고; 각각의 L은 독립적으로 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있거나; 또는 각각의 L은 임의로 및 독립적으로 아미노산 잔기이고; m은 0 내지 5의 정수이고; n은 0 내지 5의 정수이고; X는 반응성 기이다.

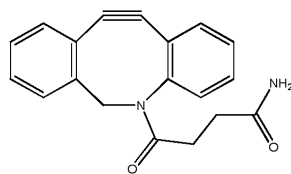
[0162] 한 실시양태에서, Z는 CBZ 기이다. 또 다른 실시양태에서, Z는 아미노산 잔기이다.

[0163] 한 실시양태에서, L은 아미노산 잔기이다. 한 실시양태에서, n은 2-5이고, 각각의 L은 독립적으로 아미노산 잔기이다. 또 다른 실시양태에서, L은 1 내지 20개의 탄소 원자의 직쇄형 또는 분지형 링커이며, 여기서 탄소 원자 중 1개 이상은 임의로 및 독립적으로 질소, 산소 또는 황 원자로 대체될 수 있고, 여기서 각각의 탄소 및 질소 원자는 임의로 치환될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, L은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티이다. 또 다른 실시양태에서, n은 2-5이고, 1개 이상의 L은 1개 이상의 아미노산을 포함하고, 1개 이상의 추가의 L 기는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG)를 포함한다.

[0164] 한 실시양태에서, m은 0이다. 또 다른 실시양태에서, m은 1이다. 또 다른 실시양태에서, m은 2이다. 또 다른 실시양태에서, m은 3이다. 또 다른 실시양태에서, m은 4이다. 또 다른 실시양태에서, m은 5이다.

[0165] 한 실시양태에서, n은 0이다. 또 다른 실시양태에서, n은 1이다. 또 다른 실시양태에서, n은 2이다. 또 다른 실시양태에서, n은 3이다. 또 다른 실시양태에서, n은 4이다. 또 다른 실시양태에서, n은 5이다.

[0166] 한 실시양태에서, X는 (1R,8S,9s)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메탄올 (BCN)이다. 또 다른 실시양태에서, X는



(DBCO)

이다. 또 다른 실시양태에서, X는 트랜스-시클로옥텐 (TCO)이다. 또 다른 실시양태에서, X는 아지도 (N_3)이다. 또 다른 실시양태에서, X는 알킨이다. 또 다른 실시양태에서, X는 테트라진 메틸시클로프로판이다. 또 다른 실시양태에서, X는 노르보르넨이다. 또 다른 실시양태에서, X는 히드라지드/히드라진이다. 또 다른 실시양태에서, X는 알데히드이다.

[0167] 한 실시양태에서, 화학식 (I)에 따른 아실 공여자 기질의 경우, Z는 CBZ 기이고; L은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), 에틸 아민 ($-NH((CH_2)_2)-$) 또는 프로필 아민 ($-NH((CH_2)_3)-$)이고; n은 0, 1, 2 또는 3이다.

[0168] 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (I)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고 L은 아미노산이다. 한 실시양태에서, L은 Gly이다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, m은 1이고 n은 1이다.

[0169] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (II)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 1, 2 또는 3이고; 적어도 1개의 L은 Gly이다.

[0170] 한 실시양태에서, 화학식 (III)에 따른 아실 공여자 기질의 경우, Z는 CBZ 기이고; L은 폴리에틸렌 글리콜 모이

어터 (PEG) ($-O((CH_2)_2)-$), 에틸 아민 ($-NH((CH_2)_2)-$) 또는 프로필 아민 ($-NH((CH_2)_3)-$)이고; n은 0, 1, 2 또는 3이다.

[0171] 또 다른 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (III)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고 L은 아미노산이다. 한 실시양태에서, L은 Gly이다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, m은 1이고 n은 1이다.

[0172] 한 실시양태에서, 아실 공여자 기질은 화학식 (IV)에 따른 것이고, 여기서 Z는 CBZ 기이고; m은 1이고; n은 1, 2 또는 3이고; 적어도 1개의 L은 Gly이다.

[0173] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 1 내지 20개의 아미노산 잔기를 갖는다. 1개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 부가된 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접하여 부가된 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민, 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 1개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 부가된 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접하여 부가된 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 프롤린, 아스파르트산 또는 글루탐산이 아니다. 1개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 부가된 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접하여 부가된 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 리신 또는 아르기닌이 아니다.

[0174] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 2개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1 및 +2)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 3개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, 및 +3)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 4개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, 및 +4)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 5개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4 및 +5)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 6개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, 및 +6)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 7개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, 및 +7)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 8개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, 및 +8)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 9개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, 및 +9)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 10개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, 및 +10)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 11개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, 및 +11)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 12개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, 및 +12)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 13개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, 및 +13)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 14개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, 및 +14)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 15개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, 및 +15)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 16개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, 및 +16)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 17개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, 및 +17)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 18개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, 및 +18)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 19개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, 및 +19)를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 20개의 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, +8, +9, +10, +11, +12, +13, +14, +15, +16, +17, +18, +19, 및 +20)를 갖는다.

[0175] 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 9개 미만의 아미노산 잔기를

갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 13개 미만의 아미노산 잔기를 갖는다. 한 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 C-말단 리신 (예를 들어, Lys447) 후에 부가된 하기 서열은 갖지 않는다: GTYFQAYGT (서열식별번호: 1), GECTYFQAYGCTE (서열식별번호: 2) 또는 GENTYFQAYGNTE (서열식별번호: 3).

- [0176] C-말단 리신 후에 2개 이상의 아미노산 잔기가 부가되었거나 존재하는 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 부가되었거나 존재하는 마지막 아미노산 잔기 (즉, C-말단 리신에서 가장 멀리 떨어진 부가된 아미노산 잔기)는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. C-말단 리신 후에 2개 이상의 아미노산 잔기가 부가되었거나 존재하는 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 부가되었거나 존재하는 마지막 아미노산 잔기는 리신 또는 아르기닌이 아니다.
- [0177] 개시된 방법은 인간화 이뮤노글로불린에 대해 수행될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 인간화 이뮤노글로불린일 수 있다.
- [0178] 개시된 방법은 인간 이뮤노글로불린에 대해 수행될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 인간 이뮤노글로불린일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 비-인간 이뮤노글로불린일 수 있다.
- [0179] 한 실시양태에서, 개시된 방법은 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ 이뮤노글로불린에 대해 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 방법은 IgG₁ 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 IgG₂ 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 IgG₃ 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 IgG₄ 이뮤노글로불린에 대해 수행된다.
- [0180] 한 실시양태에서, 개시된 방법은 IgA₁, IgA₂ 또는 IgM 이뮤노글로불린에 대해 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 방법은 IgA₁ 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 IgA₂ 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 IgM 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, IgA 또는 IgM 이뮤노글로불린은 테일 피스를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, IgA 또는 IgM 이뮤노글로불린은 테일 피스가 제거되었다.
- [0181] 한 실시양태에서, 방법은 IgD 또는 IgE 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 IgD 이뮤노글로불린에 대해 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 IgE 이뮤노글로불린에 대해 수행된다.
- [0182] 본원에 기재된 방법의 경우에, 한 실시양태에서, 미생물 트랜스글루타미나제는 악티노마두라 종(*Actinomadura* sp.) T-2, 바실루스 시르쿨란스(*Bacillus circulans*) BL32, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 포자, 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 엔테로박터 종(*Enterobacter* sp.) C2361, 프로비덴시아 종(*Providencia* sp.) C1112, 스트렙토베르티실리움 모바라엔세(*Streptoverticillium mobaraense*) (일명 스트렙토미세스 모바라엔시스), 스트렙토미세스 플라텐시스(*Streptomyces platensis*) M5218, 스트렙토미세스 히그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*), 스트렙토미세스 리비단스(*Streptomyces lividans*), 스트렙토미세스 리비단스 JT46/pAE053, 스트렙토미세스 리디쿠스(*Streptomyces lydicus*), 스트렙토미세스 플라텐시스(*Streptomyces platensis*), 스트렙토미세스 시오얀시스(*Streptomyces sioyansis*), 스트렙토베르티실리움 그리세오카르네움(*Streptoverticillium griseocarneum*), 스트렙토베르티실리움 라다카눔(*Streptoverticillium ladakanum*) NRRL-3191, 스트렙토베르티실리움 종 s-8112 또는 스트렙토코쿠스 수이스(*Streptococcus suis*)로부터의 것이다. 한 실시양태에서, 미생물 트랜스글루타미나제는 스트렙토미세스 모바라엔시스로부터의 것이다.
- [0183] 본원에 기재된 방법의 경우에, 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 메디카고 사티바(*Medicago sativa*), 베타 불가리스(*Beta vulgaris*), 헬리안투스 투베로수스(*Helianthus tuberosus*), 제아 메이스(*Zea mays*), 글리시네 맥스(*Glycine max*), 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*), 클라미도모나스 레인하르티이(*Chlamydomonas reinhardtii*), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*), 오리자 사티바(*Oryza sativa*), 및 로스마리누스 오피시날리스 엘(*Rosmarinus officinalis* L)로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터 단리된다.
- [0184] 본원에 기재된 방법의 경우에, 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 포유동물로부터의 것이고, 트랜스글루타미나제 1에서 7 및 인자 XIII으로부터 단리된다.

- [0185] 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 본원에 기재된 미생물 트랜스글루타미나제와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 스트렙토미세스 모바라엔시스로부터의 미생물 트랜스글루타미나제와 적어도 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 트랜스글루타미나제 효소는 아지노모토(Ajinomoto)® 또는 제디라(Zedira) (제품 번호 T001)로부터 구입할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 정제된다. 또 다른 실시양태에서, 트랜스글루타미나제는 제조합적으로 발현되고, 후속해서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 정제된다.
- [0186] 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 0.1 유닛/mL 내지 약 250 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 1 유닛/mL 내지 약 25 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 1 유닛/mL 내지 약 25 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 0.1 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 0.5 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 1 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 5 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 10 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 15 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 20 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 25 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 50 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 75 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 100 유닛/mL의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 트랜스글루타미나제 효소는 본원에 기재된 방법에 약 150 유닛/mL, 200 유닛/mL, 또는 250 유닛/mL의 농도로 존재한다.
- [0187] 본원에 제공된 방법의 경우에, 한 실시양태에서, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 약 1:1 내지 약 2:1이다. 한 실시양태에서, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 약 1:1 내지 약 2:1이다. 한 실시양태에서, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 약 1:1이다. 한 실시양태에서, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 약 2:1이다. 한 실시양태에서, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 공지되어 있고, 본원에 개시된 방법을 따라 일관되게 재현가능하다. 본원에 사용된 바와 같은 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 조성물 중 항체의 풀에서의 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 접합 비의 평균에 기초하여 계산된다.
- [0188] 본원에 제공된 실시양태에서, 적어도 2개의 추가의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 존재하고, 적어도 2개의 추가의 아미노산 잔기 중 1개가 리신을 포함하는 경우에, 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비는 리신인 추가의 아미노산 잔기의 수에 기초하여 증가된다. 예를 들어, 2개의 추가의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 존재하고, 추가의 아미노산 잔기 중 1개가 또한 리신인 경우, 2개의 리신 잔기가 존재하여, 4개의 아미드교환 부위를 갖고 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비가 약 2:1 내지 약 4:1인 항체가 생성된다. 또 다른 예로서, 5개의 추가의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 존재하고, 추가의 아미노산 잔기 중 2개가 리신인 경우에, 3개의 (총) 리신 잔기가 존재하여, 6개의 아미드교환 부위를 갖고 기능적 작용제 대 이뮤노글로불린의 비가 약 2:1 내지 약 6:1인 항체가 생성된다.
- [0189] 접합된 이뮤노글로불린
- [0190] 또한, 본원에 개시된 이뮤노글로불린 중 임의의 것을 포함하는 접합된 이뮤노글로불린이 본원에 개시되며, 여기서 C-말단 위치의 리신 (예를 들어, 위치 447의 리신, 또는 "Lys447")은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기를 갖고, 아실 공여자 기질을 포함하는 기능적 작용제에 접합되고, 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기를 포함한다. 추가의 실시양태는 본원에 개시된 이뮤노글로불린 중 임의의 것을 포함하는 접합된 이뮤노글로불린을 포함하며, 여기서 C-말단 위치의 리신 (예를 들어, 위치 447의 리신, 또는 "Lys447")은 C-말단 리신 후에 적어도 1개의 추가의 아미노산 잔기를 갖고, 아실 공여자 기질에 접합되고, 여기서 아실 공여자 기질은 글루타민 잔기 및 반응성 기를 포함하고, 여기서 반응성 기는 아실 공여자 기질의 이뮤노글로불린에의 접합 후에 기능적 작용제와 반응할 수 있다.
- [0191] 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이

소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민 또는 히스티딘을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 글리신을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 알라닌을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 발린을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 류신을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 이소류신을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 메티오닌을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 페닐알라닌을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 티로신을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 트립토판을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 세린을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 트레오닌을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 시스테인을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 아스파라긴을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 글루타민을 포함한다. 한 실시양태에서, C-말단 리신에 인접한 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 히스티딘을 포함한다. 한 실시양태에서, 1개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 추가된 경우, C-말단 리신에 인접한 추가된 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 프롤린, 아스파르트산, 글루탐산, 리신 또는 아르기닌이 아니다.

[0192] 또 다른 실시양태에서, 1개 초과인 아미노산이 C-말단 리신에 추가된 경우, 마지막 추가된 아미노산 (즉, 추가된 아미노산 잔기의 C-말단에 위치한 아미노산)은 리신 또는 아르기닌을 제외한 임의의 아미노산일 수 있다. 예를 들어, 2개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 추가된 경우에, 서열은 C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1) 및 C-말단 리신 후에 제2 아미노산 (아미노산 위치 +2)을 포함하며, 여기서 C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1)는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기이고, 여기서 C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +2)는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 리신 또는 아르기닌이다. 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +2)는 리신 또는 아르기닌이 아니다.

[0193] 또 다른 예로서, 5개의 아미노산 잔기가 C-말단 리신 후에 추가된 경우에 (아미노산 위치 +1, +2, +3, +4 및 +5), 서열은 C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +1), C-말단 리신 후에 제2 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +2), C-말단 리신 후에 제3 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +3), C-말단 리신 후에 제4 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +4) 및 C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +5)를 포함한다. C-말단 리신 후에 제1 아미노산 잔기는 아스파르트산, 글루탐산 또는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 잔기일 수 있다. C-말단 리신 후에 제2, 제3, 및 제4 아미노산 잔기는 임의의 아미노산일 수 있다. 그러나, C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +5)는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린, 세린, 프롤린, 트레오닌, 알라닌, 티로신, 히스티딘, 글루타민, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 트립토판, 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제5 아미노산 잔기 (아미노산 위치 +5)는 리신 또는 아르기닌이 아니다. 또 다른 실시양태에서, C-말단 리신 후에 제1, 제2, 제3 또는 제4 아미노산 잔기(들) (아미노산 위치 +1, +2, +3 및/또는 +4)는 각각 리신 또는 아르기닌일 수 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, 이류노글로불린은 인간화 이류노글로불린일 수 있다. 다른 실시양태에서, 이류노글로불린은 인간 이류노글로불린이다. 또 다른 실시양태에서, 이류노글로불린은 키메라 이류노글로불린이다.

[0195] 글루타민 잔기 및 반응성기를 포함하는 아실 공여자 기질은 또한 링커, "L"을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 글루타민 잔기를 포함하는 아실 공여자 기질을 함유하는 기능적 작용제는 기능적 작용제와 분자의 아실 공여자 기질 부분 사이에 링커를 가질 수 있다. 링커는 비-절단가능한 링커 또는 절단가능한 링커일 수 있다. 예시적인 링커는, 예를 들어, 디설피드 함유 링커, 아세탈-기반 링커, 및 케탈-기반 링커를 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 비-절단가능한 링커일 수 있다. 적합한 비-절단가능한 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 알킬을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 PEG를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 절단가능한 링커일 수 있다. 적합한 절단가능한 링커는, 예를 들어, 발린-시트룰린-과라 아미노벤질을 포함한다. 일부 측면에서, 링커는 디설피드 함유 링커일 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 아세탈-기반 링커일 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 케탈-기반 링커일 수 있다.

- [0196] 본 발명의 접합된 이뮤노글로불린은 기능적 작용제를 포함한다. 적합한 기능적 작용제는 예를 들어 치료제 또는 진단제를 포함한다. 적합한 기능적 작용제는 예를 들어 형광단, 형광 염료, 폴리펩티드, 이뮤노글로불린, 항생제, 핵산, 방사성핵종, 화학적 링커, 소분자, 킬레이트화제, 지질 및 약물을 포함한다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 형광단을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 형광 염료를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 이뮤노글로불린을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 항생제를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 핵산 (예컨대 DNA 또는 RNA)을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 방사성핵종을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 소분자를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 킬레이트화제 (예를 들어, 특히 DOTA, CHX-A"-DTPA, NOTA)를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 지질을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 약물을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 상기 열거된 기능적 작용제 중 임의의 것의 조합을 포함할 수 있다.
- [0197] 따라서, 개시된 접합된 이뮤노글로불린은 이뮤노글로불린-형광단 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-형광 염료 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-폴리펩티드 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-이뮤노글로불린 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-항생제 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-핵산 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-방사성핵종 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-화학적 링커 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-소분자 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-킬레이트화제 C-말단 리신 접합체, 이뮤노글로불린-지질 C-말단 리신 접합체, 및 이뮤노글로불린-약물 C-말단 리신 접합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0198] 본원에 개시된 이뮤노글로불린 중 임의의 것은 본원에 개시된 기능적 작용제 중 임의의 것에 접합될 수 있다. 예를 들어, 접합된 이뮤노글로불린은 형광단, 형광 염료, 폴리펩티드, 이뮤노글로불린, 항생제, 핵산, 방사성핵종, 화학적 링커, 소분자, 킬레이트화제, 지질 또는 약물을 포함할 수 있다.
- [0199] 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린은 소분자 항신생물제, 예컨대 아우리스타틴에 접합될 수 있다. 일부 측면에서, 기능적 작용제는 아우리스타틴 F (AuF)일 수 있다. 따라서, 개시된 접합된 이뮤노글로불린은 아우리스타틴 F에 접합된 상기 개시된 이뮤노글로불린 중 임의의 것 (AuF Lys447 접합체)을 포함한다.
- [0200] 제약 조성물
- [0201] 또한 제약 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 개시된 이뮤노글로불린 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 개시된 접합된 이뮤노글로불린 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 접합된 이뮤노글로불린 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다.
- [0202] 이뮤노글로불린을 코딩하는 핵산 분자 및 이를 포함하는 숙주 세포
- [0203] 또한, 본원에 개시된 이뮤노글로불린 중 임의의 것을 코딩하는 핵산 분자가 본원에 제공된다. 예로서, 한 실시양태에서, 핵산 분자는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 이뮤노글로불린을 코딩하고, 여기서 경쇄 가변 영역은 C-말단 위치에 리신 (예를 들어, 위치 447 또는 "Lys447") 및 C-말단 리신 후에 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 세린, 트레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민 및 히스티딘으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산을 갖는다.
- [0204] 또한 개시된 핵산 분자 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포가 개시된다. 적합한 숙주 세포는 몇가지 예를 들어 포유동물 세포, 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0205] 하기 실시예는 본원에 개시된 실시양태 중 일부를 추가로 설명하기 위해 제공된다. 본 실시예는 개시된 실시예를 제한하는 것이 아니라, 예시하기 위한 것으로 의도된다.
- [0206] 실시예
- [0207] 실시예 1: 물질 & 방법
- [0208] 돌연변이유발
- [0209] 돌연변이는 스트라타진(Stratagene)의 퀵체인지 XL을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 생성하였다. 목적하는 돌연변이를 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0210] 형질감염 및 안정한 세포주 생성

- [0211] 에피펙타민(ExpiFectamine)으로 형질감염될 세포의 각 밀리리터에 대해, 333.3 ng HC 플라스미드 및 333.3 ng LC 플라스미드를 50 μ L 옵티-MEM (써모피셔(ThermoFisher)) 중에서 5 -10분 동안 인큐베이션하였다. 마찬가지로, 2.67 μ L 에피펙타민을 50 μ L Opti-MEM 중에서 인큐베이션하였다. 에피펙타민 용액을 DNA 혼합물에 첨가하고, 실온에서 20-30분 동안 인큐베이션하였다. DNA:에피펙타민 혼합물을 와류시키면서 세포에 첨가하고, 125 rpm에서 진탕하면서 37 $^{\circ}$ C, 8% CO₂에서 인큐베이션하였다. 다음날, 세포 mL당 5 μ L의 인헨서 1 및 50 μ L의 인헨서 2를 형질감염체에 첨가하고, 또 다른 7-10일 동안 연속 인큐베이션하였다.
- [0212] 형질감염 1 내지 3일 후 형질감염체 1 mL를 5 μ g/mL 블라스티시딘 및 400 μ g/mL 제오신 (인비보젠 (Invivogen))이 담긴 T75 플라스크 내의 14 mL DMEM에 첨가하여 항체를 발현하는 안정한 풀을 선택하였다. 약물-저항성 세포를 전면생장물로 성장시킨 후, 배지를 24 내지 48시간 동안 프리스타일 293 발현 배지로 대체하였다. 플라스크를 두드리 세포를 물리적으로 떨어뜨리고 (트립신처리하는 낮은 생존율을 야기함, 데이터는 제시되지 않음), 이어서 125-mL 진탕 플라스크 내 30 mL 프리스타일 293 발현 배지에 6×10^5 개 세포/mL로 시딩하였다. 배양물을 125 rpm에서 진탕하면서 8% CO₂ 중 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션하였다.
- [0213] mAb 생산
- [0214] 안정하게-형질감염된 세포주 풀을 프리스타일 293 발현 배지에 0.6 내지 1×10^6 개 세포/mL로 시딩하였다. 세포를 125 rpm에서 진탕하면서 37 $^{\circ}$ C, 8% CO₂에서 인큐베이션하였다. 배양물이 1×10^6 개 세포/mL의 밀도에 도달하고 2일 후, 배양물에 최종 농도 10 g/L 셀렉트 소이톤 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)), 5 mM 발레르산 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich)), 및 1:100 CD 리피드 콘센트레이트 (써모피셔)를 공급하였다. 세포 생존율이 50% 미만일 때 (7-10일), 배양물을 베크만 JLA8.1000 로터에서 8000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하였다. 이어서 상청액을 0.2 μ m PES 필터를 통해 여과하고, 정제시 까지 4 $^{\circ}$ C 또는 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.
- [0215] mAb 정제
- [0216] mAb는 2가지 방법 중 1가지를 사용하여 정제하였다. 10 mL 미만의 mAb 상청액의 경우, 단백질 A 수지를 사용하는 배치 정제 방법을 사용하여 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 25 mL를 초과하는 mAb 상청액은 사전-패킹된 단백질 A 칼럼을 사용하여 정제하였다.
- [0217] 배치 정제
- [0218] Prosep-vA 고용량 단백질 A 수지 (밀리포어(Millipore))를 DPBS로 평형화하고, 100 μ L를 3 내지 6 mL의 샘플에 첨가하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 내지 밤새 인큐베이션한 후, 수지를 1 mL DPBS로 3회 세척하고, 18,000 x g에서 30초 동안 원심분리하였다. 400 μ L 0.1 M 글리신, pH 2.9를 첨가한 후 18,000 x g에서 30초 동안 원심분리하여 샘플을 수지로부터 용리시켰다. 샘플을 1 M 트리스, pH 8.0 40 μ L로 중화시켰다. 0.5 mL 아미콘 울트라 (Amicon Ultra), 10k 컷오프 필터 (밀리포어)를 사용하여 18,000 x g에서 3 내지 5분 동안의 원심분리에 의해 샘플을 ~ 100 μ L로 농축시켜 완충제를 교환하였다. 농축된 샘플을 400 μ L DPBS 중에 희석한 후, 원심분리하였다. 과정을 총 4회 반복하였다.
- [0219] 칼럼 정제
- [0220] 단백질 A 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare))을 20 mM 인산나트륨, 10 mM EDTA, pH 7.2 10 칼럼 부피 (CV)로 평형화하였다. 이어서, 샘플을 로딩한 다음, 미결합 물질을 평형 완충제 10 CV로 세척하였다. 0.1 M 글리신, pH 2.9 5 CV를 사용하여 샘플을 용리하였다. mAb를 함유하는 분획을 풀링하고, MWCO 20K 슬라이드-A-라이저 (써모피셔)를 사용하여 DPBS 중 투석하였다.
- [0221] Z-Gln-Gly 기질 합성
- [0222] Z-Gln-Gly-OH를 바켄(Bachem)에서 구입하고, Z-Gln-Gly-CAD-비오틴은 제디라에서 구입하였다 (도 2).
- [0223] Z-Gln-Gly-펜타플루오로페닐 에스테르 (Z-Gln-Gly-PFP) 합성은 문헌 [Pasternack et al. {Pasternack, 1997 15 /id}]으로부터 변형을 가하여 행하였다 (도 3). Z-Gln-Gly-OH (328.8 mg, 0.975 mmol) 및 펜타플루오로페놀 (시그마, 183.3 mg, 0.996 mmol)을 10 mL N,N'-디메틸포름아미드 (DMF) 중에 용해시켰다. 이어서 EDAC-HCl (시그마, 201 mg, 1.04 mmol)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 N₂ 하에 2시간 동안 인큐베이션하였다. 차가운 디에틸 에테르 100 mL를 반응물에 첨가하고, 밤새 -80 $^{\circ}$ C에서 침전시켰다. 조 생성물을 원심분리에 의해 수집하

고, 20 mL 60°C 메탄올로부터 재결정화하였다. 최종 생성물을 차가운 디에틸 에테르로 세정하고, N₂ 스트림 상에서 건조시켰다. 최종 수율은 219.04 mg (44.7%)이었다. ESI-MS (0.1% 포름산 중 50% 아세트니트릴 중 직접 주입) m/z 504.0 ([M+H], 86%), 526.0 ([M+Na], 100%), 542.0 ([M+K], 22%).

[0224] Z-Gln-Gly-프로필 아지드 (Z-Gln-Gly-N₃)

[0225] Z-Gln-Gly-PFP (21.24 mg, 4.22×10^{-5} mol) 및 아지도프로필아민 (클릭 케미스트리 툴즈(Click Chemistry Tools), DMF 중 0.91 M 원액 42.2 μ L, 3.84×10^{-5} mol)을 DMF 0.42 mL 최종 부피 중에 용해시켰다. 반응물을 N₂ 하에 실온에서 밤새 교반하였다. 생성물을 H₂O 중 0.1% 포름산/아세트니트릴 중 0.1% 포름산 이동상을 사용하여 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물을 진공 건조시켰다. 최종 수율은 10.7 mg (60.4%)이었다. ESI-MS (구배 정제) m/z 420.2 ([M+H], 100%), 442.1 ([M+Na], 32%).

[0226] Z-Gln-Gly-PEG₃-엔도-비시클로노닌 (Z-Gln-Gly-PEG₃-BCN)

[0227] Z-Gln-Gly-PFP (18.4 mg, 3.66×10^{-5} mol) 및 엔도-비시클로[6,1,0]논-4-인-9-일-PEG₃-아민 (콘쥬-프로브 (Conju-Probe), DMF 중 0.27 M 원액 175 μ L, 4.75×10^{-5} mol)을 0.37 mL 최종 부피의 DMF 중에 용해시켰다. 반응물을 N₂ 하에 실온에서 밤새 교반하였다. 생성물을 H₂O 중 0.1% 포름산/아세트니트릴 중 0.1% 포름산 이동상을 사용하여 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물을 진공 건조시켰다. 최종 수율은 0.6 mg (2%)이었다. ESI-MS (구배 정제) m/z 688.2 ([M+H], 100%), 710.2 ([M+Na], 69%).

[0228] Z-Gln-Gly-PEG₂-아우리스타틴 F (Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF)

[0229] Z-Gln-Gly-PFP (22.2 mg, 4.37×10^{-5} mol)를 0.85 mL DMF 중에 용해시키고, 1,2-에틸렌디아민 (2.3×10^{-5} L, 3.5×10^{-4} mol)을 첨가하고, 혼합하였다. 반응물을 N₂ 하에 실온에서 밤새 교반하였다. 생성물을 H₂O 중 0.1% 포름산/아세트니트릴 중 0.1% 포름산 이동상을 사용하여 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물을 진공 건조시켰다. Z-Gln-Gly-NH₂의 최종 수율은 3.8 mg (23%)이었다. ESI-MS (구배 정제) m/z 380.1 ([M+H], 100%). Z-Gln-Gly-NH₂ (3.8 mg, 1.01×10^{-5} mol) 및 NHS-PEG₂-AuF (10.3 mg, 1.03×10^{-5} mol)를 0.2 mL DMF 중에 용해시켰다. 트리에틸아민 (14 μ L, 1×10^{-4} mol)을 첨가하고, 반응물을 N₂ 하에 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 반응물의 절반을 H₂O 중 0.1% 포름산/아세트니트릴 중 0.1% 포름산 이동상을 사용하여 HPLC에 의해 정제하였다. 생성물을 진공 건조시켰다. CBZ-Gln-Gly-PEG₂-AuF의 최종 수율은 3.8 mg (60%)이었다. ESI-MS (구배 정제) m/z 634.0 ([M+H]²⁺, 100%), 645.1([M+Na]²⁺, 45%). 1267.0 ([M+H], 16%).

[0230] 미생물 트랜스글루타미나제 반응

[0231] 100 μ g/mL 내지 2.5 mg/mL 농도 범위의 mAb를 DPBS 중에서 1 U/mL 미생물 트랜스글루타미나제 (제디라)와 함께, 785 μ M Z-Gln-Gly-비오틴 (제디라), Z-Gln-Gly-N₃, Z-Gln-Gly-BCN, 또는 Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF와 37°C에서 적어도 16시간 동안 인큐베이션하였다.

[0232] 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC)/mAb 접합의 ESI-MS 분석

[0233] 정제된 항체를 DPBS 중 1 mg/mL로 희석하였다 (1.0 mg/mL 미만의 샘플이 원래 농도로 남아있는 경우). 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 함유하는 반응물을 제바 스핀 탈염 칼럼을 사용하여 탈염하였다. 이어서 mAb를 PNGase F (NEB)를 사용하여 탈글리코실화하거나, 또는 IdeS (프로메가(Promega))에 의해 Fab'₂ 및 Fc 단편으로 소화시켰다. mAb를 탈글리코실화하기 위해, G7 완충제 (5 또는 10 μ L) 및 PNGase F (1 또는 2 μ L)를 mAb (50 또는 100 μ L)에 첨가하였다. 반응물을 디스커버 마이크로웨이브(Discover microwave) (CEM)에서 2 사이클 동안 인큐베이션하였다: 1.) 마이크로웨이브 전력 10 W, 37°C, 10분, 이어서 3-5분 동안 대기; 2.) 마이크로웨이브 전력 2 W, 37°C, 10분. 디티오프레이톨 (DTT)을 20 mM의 최종 농도로 첨가한 다음, 60°C에서 3분 동안 인큐베이션하여 탈글리코실화된 샘플의 일부를 환원시켰다. Fab'₂ 및 Fc 단편을 생성하기 위해, IdeS 50U/ μ L를 mAb 0.5 mg/mL에 첨가하고, 37°C에서 0.5-1시간 동안 인큐베이션하였다. 상기와 같이 환원시킨 항체 01-C를 제외하

고, IdeS 샘플은 환원시키지 않았다.

- [0234] 이어서 샘플을 워터스 액퀴티(Waters Acquity) UPLC 및 Q-ToF 프리미어 질량 분광계를 사용하여 분석하였다. 샘플 (각각 0.5-2 μg)을 65°C에서 MassPrep 마이크로 탈염 칼럼에 주입하고, 95%의 이동상 A 중 5분 평형, 10분 구배 (5-90% B), 및 95%의 이동상 A 중 10분 재-평형, 0.05 mL/분으로 칼럼에서 용리시켰다. 이동상 A는 물 중 0.1% 포름산이다. 이동상 B는 아세토니트릴 중 0.1% 포름산이다. Q-ToF 질량 분광계는 양이온, V-모드, 500-4000 m/z 범위에서의 검출로 실행시켰다. 소스 파라미터는 하기와 같다: 모세관 전압, 2.25 kV (무손상 항체)-2.50 kV (환원된 항체); 샘플링 콘 전압, 65.0 V (무손상 항체) 또는 50.0 V (환원된 항체); 소스 온도, 100°C; 탈용매화 온도, 250°C; 탈용매화 기체 유동, 550 L/hr. 단백질 피크를 매스링스 MaxEnt 1 함수를 사용하여 디콘볼루션하였다.
- [0235] 역상 액체 크로마토그래피 (LC)-MS
- [0236] 항체 01-L (1mg/mL)을 50-배 물 과량의 Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF와 함께 1U/mL TGase의 존재 하에 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. mAb를 상기와 같이 IdeS에 의해 Fab'₂ 및 Fc 단편으로 소화시키고, DTT로 환원시켰다. 샘플을 워터스 얼라이언스(Waters Alliance) HPLC 및 SQD 및 PDA 검출기를 사용하여 분석하였다. 샘플 (0.5-2 μg)을 65°C에서 프로테오믹스(Proteomix) RP-1000 칼럼 (4.6X50mm, 세팍스(Sepax))에 주입하였다. LC, Fc, 및 Fd 단편의 분리는 75% 이동상 A (물 중 0.1% TFA) 중 1.5분 평형, 및 13.5-분 구배 [25-65% 이동상 B (아세토니트릴 중 0.1% TFA)], 유량 1 mL/분에 의해 일어났다.
- [0237] SQD 질량 분광계는 양이온, V-모드, 200-2000 m/z 범위에서의 검출로 실행시켰다. 소스 파라미터는 하기와 같다: 모세관 전압, 3.00kV; 샘플링 콘 전압, 40°C; 소스 온도, 120°C; 탈용매화 온도, 250°C; 탈용매화 기체 유동, 800 L/hr. 스캔 시간, 1초. 단백질 피크를 매스링스 MaxEnt 1 함수에 의해 디콘볼루션하였다. PDA 검출기는 280nm로 설정되었다.
- [0238] 실시예 2: IgG 항체 상의 용매 노출된 리신의 분석
- [0239] IgG1-카파 Fab (항체 01, 4F3F), IgG1-람다 Fab (4HK0), 및 IgG1 Fc (1FC1)의 결정 구조를 잠재적 아실 수용자 부위에 대해 검사하였다. 미생물 트랜스글루타미나제가 루프 내 용매-노출된 기질 글루타민 및 리신을 선호하는 경향이 있기 때문에 {Spolaore, 2012 17 /id}, 용매 노출된 리신을 디스커버리 스튜디오 v4.5를 사용하여 1.4 Å 프로브 반경으로 강조표시하였다 (도 4). 항체 01 VH에서 7개의 용매 노출된 리신이 존재하였고, 3개는 루프 내였다. 상이한 가변 영역 패밀리의 사용 및 체성 과다돌연변이로 인해 mAb 사이에서 리신의 수가 다를 수 있으므로, 5종의 다른 항체의 VH 영역 내 리신의 용매 노출을 또한 4F3F 구조에서의 잔기의 유사한 위치에 기초하여 분석하였다. 이들 VH 영역은 잠재적으로 1-5개의 용매 노출된 리신을 함유하였고, 1 또는 2개가 루프 내에 존재하였다. 항체 01 V_K에서는 6개의 용매 노출된 리신이 존재하였고, 4개는 루프 내였다. 4종의 다른 항체로부터의 V_K 영역은 잠재적으로 3-5개의 용매 노출된 리신을 함유하였고, 2개는 루프 내였다. 항체 05는 람다 쇠를 사용하며, 리신의 용매 노출은 4HK0의 결정 구조를 사용하여 경쇄의 서열 유사성에 기초하여 결정하였다. 항체 05는 잠재적으로 V_L 도메인 내에 2개의 용매 노출된 리신을 가졌고, 오직 1개만이 루프 내였다.
- [0240] CH1 및 카파, Fc, 및 람다의 불변 도메인을 각각 4F3F, 1FC1, 및 4HK0의 결정 구조를 사용하여 분석하였다. IgG₁ 불변 도메인은 23개의 용매 노출된 리신을 가졌고, 13개는 루프 내였다. 카파 불변 영역은 8개의 리신을 가졌고, 5개는 루프 내였다. 람다는 6개의 용매 노출된 리신을 가졌고, 절반이 루프 내였다. 총, 분석된 항체는 mAb당 루프 내 용매 노출된 리신이 42 내지 50개 범위였다.
- [0241] 미생물 트랜스글루타미나제가 IgG 항체 상의 천연 리신 잔기를 아미드교환할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 항체를 50-배 물 과량의 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 1 U/mL 미생물 트랜스글루타미나제와 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 샘플을 IdeS로 소화시키고 DTT로 환원시키고, LC, Fd, 및 Fc 단편의 질량을 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 샘플은 탈글리코실화되지 않았고, G0F (+1445 Da) 및 G1F (+1608 Da) 당형태에 상응하는 2개의 질량 피크가 각각의 Fc에 대해 관찰되었다. 항체 04는 또한 VH에서 N-연결된 글리코실화 부위를 함유하고, 2개의 글리칸 중, G2FS 및 G2FS2가 관찰되었다. Fc에 대해 관찰된 질량 및 이론적 질량 사이의 -130 내지 -132 Da 차이에 의해 입증되는 바와 같이, 모든 샘플은 C-말단 리신 (128 Da)이 결여되었다. 상이한 항체에 42-50개의 잠재적 아실 수용자 리신이 존재하지만, HC 및 LC 중 어떠한 것도 아실 공여자 기질에 의해 변형되지 않았다 (도 6, 표 1).

[0242] 표 1 - 아실 공여자 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 인큐베이션된 항체의 ESI-MS 분석

ZQG-CAD-비오틴: +631 Da

	LC			Fd				Fc			
	계산치	관찰치	Δ질량	계산치	관찰치	글리칸	Δ질량	계산치	글리칸	관찰치	Δ질량
항체 02	23751	23750	-1	25073	25071		-2	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25360	-131
항체 03	23478	23478	0	26097	26097		0	25388	G0F	25258	-130
								25551	G1F	25420	-131
항체 01	23216	23213	-3	25072	25069		-3	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25359	-132
항체 04	23532	23530	-2	27566	27564	G2FS	-2	25296	G0F	25166	-130
				27857	27855	G2FS2	-2	25459	G1F	25327	-132
항체 05	22655	22653	-2	26340	26337		-3	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25360	-131
항체 06	23472	23470	-2	25383	25381		-2	25328	G0F	25198	-130
								25491	G1F	25359	-132

[0243]

[0244] 표 1: LC, Fd, 및 Fc의 질량이 도 6에서 ESI-MS에 의해 결정되었다. 아미노산 서열에 의해 결정된 각각의 단편의 이론적 질량을 관찰된 질량에서 차감하여 질량에서의 변화 (Δ질량)를 결정하였다. Δ질량 -128 Da은 Lys447의 절단으로 인한 것이다. Fc는 1 또는 2개의 올리고사카라이드, G0F 또는 G1F로 글리코실화되었다.

[0245] 항체 01 HC 또는 LC의 C 말단에 유전자 융합된 2개의 공지된 리신 아실 수용자 부위 (GGSTKHKIPGGS (서열식별번호: 6); {Takazawa, 2004 23 /id})를 갖는 펩티드를 함유하는, 생성된 2개의 양성 대조군 (각각 HC-K태그 또는 LC-K태그)을 또한 분석하였다. K태그 mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 인큐베이션하였다. 샘플을 PNGase F에 의해 탈글리코실화하고 DTT로 환원시켰다. 중쇄 및 경쇄의 질량을 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. LC-K태그 mAb는 K태그에서의 2개의 리신의 변형과 일치하게, 최대 2개의 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 분자로 변형되었다 (도 7, 표 2).

[0246] 표 2 - C-말단 K-태그의 아미드교환

Z-Gln-Gly-CAD-비오틴: +631 Da

LC	계산치	관찰치	Δ질량	# 비오틴	% 집합
항체 01	23216	23216	0	0	0.0%
HC-K태그	23216	23216	0	0	0.0%
LC-K태그	24323	24953	630	1.00	19.0%
	24323	25584	1261	2.00	81.0%

[0247]

HC	계산치	관찰치	Δ질량	# 비오틴	% 집합
항체 01	48937	48810	-127	0	0.0%
HC-K태그	50044	50671	627	0.99	18.7%
	50044	51306	1262	2.00	42.6%
	50044	51938	1894	3.00	38.6%
	50044	52570	2526	4.00	3.1%
LC-K태그	48809	48811	2	0	0.0%

[0248]

[0249] HC 및 LC의 질량이 도 7에서 ESI-MS에 의해 결정되었다. 아미노산 서열에 의해 결정된 각각의 단편의 이론적 질량을 관찰된 질량에서 차감하여 질량에서의 변화 (Δ질량)를 결정하였다. Δ질량 -128 Da은 Lys447의 절단으로 인한 것이고, Δ질량 +631 Da은 1개의 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴의 부가를 나타낸다. 질량에서의 변화를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴의 질량으로 나누어 HC 또는 LC에 접합된 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 분자의 수를 결정하였다. 단일 HC 또는 LC 피크의 신호 강도를 샘플 내 모든 HC 또는 LC 피크의 강도의 합으로 나누어 집합의 백분율을 결정하였다.

[0250] HC에의 K태그의 부가는 놀랍게도 단지 2개가 아닌, 최대 3개의 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 분자의 HC에의 부가를 발생시켰다. K태그에는 단지 2개의 리신만이 존재하기 때문에, mAb 내의 리신이 제3 아실 수용자 부위이다. K태그와의 근접성을 고려하면, 가장 가능한 mAb 리신 수용자 부위는 중쇄 Lys447이다.

[0251] 실시예 3: 단일 아미노산 연장은 Lys447의 아미드교환에 충분하다

[0252] Lys447은 전형적으로 HEK293 및 CHO 세포에서 재조합 IgG 발현 동안 카르복시펩티다제 B에 의해 절단된다 {Harris, 1990 7 /id;Harris, 1995 6 /id;Dick, 2008 3 /id}. 그러나, HC C 말단에의 K태그의 부가는 Lys447의 제거를 차단하여 미생물 트랜스글루타미나제가 아실 수용자 부위로서 Lys447을 사용하는 것을 가능하게 한다. 미생물 트랜스글루타미나제가 K태그없이 아실 수용자로서 Lys447을 사용할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 항체 01의 C 말단에 1 또는 2개의 류신을 부가하여 (각각 항체 01-HC-L 또는 항체 01-HC-LL) Lys447의 절단을 차단하였다. 정제된 mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 인큐베이션하고, 탈글리코실화된 HC의 질량을 분석하였다. 실제로, 1 또는 2개의 류신의 부가는 Lys447을 유지시켰고, HC는 Lys447의 아미드교환과 일치하게 단일 아실 공여자 기질로 변형되었다 (도 8; 표 3).

[0253] 표 3 - C-말단 류신을 갖는 항체 01의 아미드교환

Z-Gln-Gly-CAD-비오틴: +631 Da

C 말단		계산치	관찰치	Δ질량	% 집합
항체 01	...SPGK	48937	48803	-134	0.0%
항체 01-HC-L	...SPGK-L	49050	49674	624	100.0%
항체 01-HC-LL	...SPGK-LL	49164	49788	624	100.0%

[0254]

[0255] HC 및 LC의 질량을 ESI-MS에 의해 결정하였다. mAb에 대한 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴의 퍼센트 집합 (Δ질량=631 Da)을 표 2에서와 같이 결정하였다.

[0256] C-말단 류신을 2종의 다른 mAb에 부가하였다. 야생형 및 돌연변이체 mAb를 미생물 트랜스글루타미나제 및 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴과 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 각각의 샘플의 Fc 단편을 상기와 같이 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 항체 01과 같이, C-말단 류신의 부가는 돌연변이체의 아미드교환을 발생시켰지만, 야생형 mAb는 그렇지 않았다 (표 4).

[0257] 표 4 - C-말단 류신을 갖는 모노클로날 항체의 아미드교환

Z-Gln-Gly-CAD-비오틴: +631Da

C 말단		글리칸	계산치	관찰치	Δ질량	% 집합
항체 10	...SPGK	25346	1445	25218	-128	0.0%
		25509	1608	25379	-130	
항체 11	...SPGK-L	25441	1445	26071	630	100.0%
		25604	1608	26233	629	
항체 12	...SPGK	25491	1608	25360	-131	0.0%
		25653	1770	25523	-130	
항체 13	...SPGK-L	25441	1445	26071	630	100.0%
		25604	1608	26232	628	

[0258]

[0259] mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 37℃에서 밤새 인큐베이션한 다음, IdeS로 소화시켜 Fab 및 Fc 단편을 생성하였다. IdeS-생성된 Fc 단편의 질량을 ESI-MS에 의해 도 6에서와 같이 분석하고, Z-Gln-Gly-CAD-비오틴에의 퍼센트 집합 (Δ질량=631 Da)을 표 2에서와 같이 결정하였다.

[0260] 다른 아미노산이 Lys447의 절단을 차단할 수 있는지 및 이들이 미생물 트랜스글루타미나제에게 적절한 컨텍스트를 제공하여 Lys447을 변형시키는지 여부를 결정하기 위해, 나머지 아미노산을 단일-잔기 연장으로서 C 말단에 부가하였다. Z-Gln-Gly-CAD-비오틴을 사용한 미생물 트랜스글루타미나제에 의한 변형에 대해 샘플을 분석하였다. Fc 단편의 질량을 상기와 같이 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 놀랍지 않게도, 추가의 C-말단 리신 또는 아르기닌은 이들이 카르복시펩티다제 B에 대한 기질이기 때문에 Lys447의 절단을 보호하지 못했다 (표 5). 나머지 아미노산 중, C-말단 프롤린 및 산성 잔기만이 기질에의 100% 집합을 용이하게 하지 않았다. Z-Gln-Gly-CAD-비오틴에의 집합 (+631 Da)과 연관된 평균 +628 Da 이동에 더하여, +400 Da의 질량 이동이 또한 관찰되었다. 이는 아마도 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴의 합성 또는 이후의 분해로부터의 Z-Gln-Gly-CAD의 낮은 백분율로 인한 것이다.

[0261] 표 5 - Lys447의 아미드교환에 대한 C-말단 아미노산의 효과

Z-Gln-Gly-CAD: +404 Da
Z-Gln-Gly-CAD-비오틴: +631 Da

C 말단	글리칸	계산치	관찰치	Δ질량	백분율	총 집합
...SPGK	G0F	25328	25197	-131	55.1%	0.0%
	G1F	25491	25360	-131	44.9%	
...SPGK-G	G0F	25385	26013	628	31.4%	100.0%
	G0F	25385	25785	400	20.2%	
	G1F	25548	26175	627	26.9%	
	G1F	25548	25954	406	21.6%	
...SPGK-A	G0F	25399	26027	628	44.3%	100.0%
	G0F	25399	25800	401	13.2%	
	G1F	25562	26189	627	42.5%	
...SPGK-V	G0F	25427	26055	628	46.2%	100.0%
	G0F	25427	25827	400	15.6%	
	G1F	25590	26217	627	38.2%	
...SPGK-L	G0F	25441	26069	628	64.1%	100.0%
	G0F	25441	25841	400	10.6%	
	G1F	25604	26231	627	25.3%	
...SPGK-I	G0F	25441	26069	628	46.4%	100.0%
	G0F	25441	25841	400	15.4%	
	G1F	25604	26232	628	38.1%	
...SPGK-M	G0F	25459	26087	628	44.3%	100.0%
	G0F	25459	25858	399	13.9%	
	G1F	25622	26249	627	41.8%	
...SPGK-P	G0F	25425	25422	-3	36.7%	37.2%
	G1F	25588	25584	-4	26.1%	
	G0F	25425	26053	628	20.1%	
	G1F	25588	26216	628	17.0%	
...SPGK-F	G0F	25475	26103	628	48.1%	100.0%
	G0F	25475	25875	400	15.5%	
	G1F	25638	26265	627	36.4%	
...SPGK-Y	G0F	25491	26120	629	50.3%	100.0%
	G0F	25491	25892	401	14.5%	
	G1F	25654	26281	627	35.1%	
...SPGK-W	G0F	25514	26142	628	49.4%	100.0%
	G0F	25514	25915	401	11.5%	
	G1F	25677	26304	627	39.2%	
...SPGK-S	G0F	25415	26044	629	47.6%	100.0%
	G0F	25415	25815	400	14.2%	
	G1F	25578	26205	627	38.2%	
...SPGK-T	G0F	25429	26057	628	47.4%	100.0%
	G0F	25429	25829	400	12.8%	
	G1F	25592	26219	627	39.8%	
...SPGK-C	G0F	25431	25431	0	8.4%	91.6%
	G0F	25431	26062	631	75.1%	
	G1F	25594	26224	630	16.5%	
...SPGK-N	G0F	25442	26070	628	41.2%	100.0%
	G0F	25442	25842	400	16.6%	
	G1F	25605	26232	627	42.2%	
...SPGK-Q	G0F	25456	26084	628	56.3%	100.0%
	G0F	25456	25856	400	8.7%	
	G1F	25619	26246	627	35.0%	
...SPGK-D	G0F	25443	25441	-2	42.3%	24.0%
	G1F	25606	25603	-3	33.7%	
	G0F	25443	26072	629	12.1%	

[0262]

...SPGK-E	G1F	25606	26233	627	11.9%	34.7%
	G0F	25457	25455	-2	28.0%	
	G1F	25620	25617	-3	37.3%	
	G0F	25457	26085	628	20.3%	
...SPGK-H	G1F	25620	26248	628	14.4%	100.0%
	G0F	25465	26094	629	49.2%	
	G0F	25465	25865	400	11.6%	
...SPGK-K	G1F	25628	26256	628	39.1%	0.0%
	G0F	25456	25197	-259	50.6%	
	G1F	25619	25359	-260	49.4%	
...SPGK-R	G0F	25465	25197	-268	53.6%	0.0%
	G1F	25628	25359	-269	46.4%	

[0263]

[0264]

mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 37℃에서 밤새 인큐베이션한 다음, IdeS로 소화시켜 Fab 및 Fc 단편을 생성하였다. IdeS-생성된 Fc 단편의 질량을 ESI-MS에 의해 도 6에서와 같이 분석하고 (테이터는 제시되지 않음), Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 Z-Gln-Gly-CAD에의 퍼센트 집합 (각각 Δ질량=631 Da 및 404 Da)을 표 2에서와 같이 결정하였다.

[0265]

추가로 단일 리신 또는 아르기닌 C-말단 아미노산의 절단으로 인해, Lys447에서의 아미드교환에 대한 어느 하나의 아미노산의 효과를 평가할 수 없었다. 따라서, 류신을 리신 및 아르기닌 변이체의 C-말단에 추가하였다.

또한, 추가의 C-말단 류신의 효과를 또한 프롤린, 아스파르테이트, 및 글루타메이트 변이체를 사용하여 조사하였다. 추가의 류신은 시험된 모든 C-말단 변이체의 아미드교환에 대해 긍정적 효과를 가졌다 (표 6). 리신 또는 아르기닌의 절단을 차단함으로써, Lys447은 100% 아미드교환되었다. 추가로, KL 변이체에서 추가의 리신이 또한 아미드교환되어, 4개의 아미드교환 부위를 갖는 항체가 생성되었다. C-말단 류신은 또한 프롤린 변이체의 아미드교환을 61.3%로 증가시켰고, 산성 잔기 변이체는 중간 정도로 아미드교환되었다 (표 6).

[0266] 표 6 - Lys447의 아미드교환에 대한 2종의 C-말단 아미노산의 효과

Z-Gln-Gly-CAD-비오틴: +631 Da

C 말단	글리칸	계산치	관찰치	Δ질량	백분율	총 접합
...SPGK-L	G0F	25441	26072	631	77.3%	100.0%
	G1F	25604	26235	631	22.7%	
...SPGK-KL	G0F	25569	26831	1262	62.0%	100.0%
	G0F	25732	26993	1261	38.0%	
...SPGK-RL	G1F	25597	26229	632	57.5%	100.0%
	G1F	25760	26391	631	42.5%	
...SPGK-PL	G0F	25538	25538	0	25.0%	61.3%
	G0F	25701	25701	0	13.8%	
	G1F	25538	26169	631	29.1%	
	G1F	25701	26332	631	32.2%	
...SPGK-DL	G0F	25556	25556	0	47.8%	24.0%
	G0F	25719	25719	0	28.2%	
	G1F	25556	26187	631	11.5%	
	G1F	25719	26349	630	12.5%	
...SPGK-EL	G0F	25570	25570	0	40.6%	28.6%
	G0F	25733	25733	0	30.7%	
	G1F	25570	26203	633	14.0%	

[0267]

[0268] 표 6: mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 37°C에서 밤새 인큐베이션한 다음, IdeS로 소화시켜 Fab 및 Fc 단편을 생성하였다. IdeS-생성된 Fc 단편의 질량을 ESI-MS에 의해 도 6에서와 같이 분석하고 (데이터는 제시되지 않음), Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 Z-Gln-Gly-CAD에의 퍼센트 접합 (각각 Δ질량=631 Da 및 404 Da)을 표 2에서와 같이 결정하였다.

[0269] 실시예 4: 다양한 항체 이소형의 C-말단 리신의 아미드교환

[0270] CH3 (또는 IgE 및 IgM의 경우 CH4)의 C-말단 잔기는 모든 인간 이소형의 경우에 리신이다 (표 7). 따라서, 이러한 리신이 다른 이소형에 대한 접합 부위로서 사용될 수 있다는 것이 가능하다. 항체 01의 IgG₂, IgG₃, 및 IgG₄ 버전을 추가의 C-말단 류신 또는 아스파르테이트를 갖는 것 또는 없는 것으로 제조하였다. mAb를 미생물 트랜스글루타미나제 및 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴과 37°C에서 밤새 인큐베이션하고, Fc 단편의 질량을 상기와 같이 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. IgG₁과 같이, C-말단 리신은 추가의 C-말단 잔기가 존재하지 않으면 HEK293 세포에서 발현 동안 제거되었다 (표 8). 야생형 IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄, 또는 C-말단 아스파르테이트를 갖는 경우에는 어떠한 아미드교환도 관찰되지 않았지만, C-말단 류신은 mAb의 아미드교환을 용이하게 하였다.

[0271] 표 7 - 상이한 인간 이소형의 CH3 또는 CH4 C-말단 코돈의 정렬

```

IgG1 ...LSLSPGK*
IgG2 ...LSLSPGK*
IgG3 ...LSLSPGK*
IgG4 ...LSLSLGK*
IgA1&2 ...IDRLAGKPTH...
IgD ...VSVNPGK*
IgE ...TDHGPMK*
IgM ...VDKSTGKPTL...
    
```

[0272]

[0273] CH3 (IgE 및 IgM의 경우 CH4)의 C-말단 코돈을 정렬하였다. IgA 및 IgM의 테일피스의 3개의 N-말단 코돈을 포함시켰다.

[0274] 표 8 - C-말단 류신을 갖는 IgG₂, IgG₃, 및 IgG₄의 아미드교환

Z-Gln-Gly-CAD-비오틴: +631Da					
C 말단	글리칸	계산치	관찰치	Δ질량	% 집합
IgG ₂ ...SPGK	G0F	25362	25232	-130	0.0%
	G1F	25525	25394	-131	
IgG ₂ -L ...SPGK-L	G0F	25475	26104	629	100.0%
	G1F	25638	26266	628	
IgG ₂ -D ...SPGK-D	G0F	25477	25475	-2	23.2%
	G1F	25640	25637	-3	
	G0F	25477	26106	629	
	G1F	25640	26268	628	
IgG ₃ ...SPGK	G0F	25396	25266	-130	0.0%
	G1F	25559	25428	-131	
IgG ₃ -L ...SPGK-L	G0F	25509	26138	629	100.0%
	G1F	25672	26300	628	
IgG ₃ -D ...SPGK-D	G0F	25511	25509	-2	24.7%
	G1F	25674	25671	-3	
	G0F	25511	26140	629	
	G1F	25674	26302	628	
IgG ₄ ...SPGK	G0F	25344	25214	-130	0.0%
	G1F	25507	25376	-131	
IgG ₄ -L ...SLGK-L	G0F	25457	25455	-2	81.9%
	G1F	25620	25616	-4	
	G0F	25457	26086	629	
	G1F	25620	26248	628	
IgG ₄ -D ...SPGK-D	G0F	25459	25457	-2	16.8%
	G1F	25622	25619	-3	
	G0F	25459	26087	628	
	G1F	25622	26250	628	

[0275]

[0276] mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 37℃에서 밤새 인큐베이션한 다음, IdeS로 소화시켜 Fab 및 Fc 단편을 생성하였다. IdeS-생성된 Fc 단편의 질량을 ESI-MS에 의해 도 6에서와 같이 분석하고 (테이터는 제시되지 않음), Z-Gln-Gly-CAD-비오틴에의 퍼센트 집합 (Δ질량=631 Da)을 표 2에서와 같이 결정하였다.

[0277] 실시예 5: 아실 공여자 기질

[0278] C-말단 리신의 집합의 1가지 유용성은 부위-특이적 ADC의 제조를 위한 것이다. C-말단 리신의 기능적 작용제의 집합은 2가지 방법 중 1가지에 의해 이루어질 수 있다. 제1의, 2-단계 방법은 반응성 기 예컨대 BCN, DBCO, TCO, 아지도 (N₃), 알킨, 테트라진 또는 말레이미드를 갖는 합성된 아실 공여자에 대한 C-말단 리신의 미생물 트랜스글루타미나제 집합을 필요로 할 것이다. 제2 단계는 예를 들어 구리-무함유 클릭 화학 또는 티올-반응성 화학을 사용한, 반응성 기예의 기능적 작용제의 집합을 수반할 것이다. 따라서, 아미노-PEG3-BCN 또는 아미노프로필-N₃이 방법 섹션에 상술된 바와 같이 Z-Gln-Gly의 히드록실 기에 부가되었다. 항체 01-HC-L을 상기와 같이 Z-Gln-Gly, Z-Gln-Gly-CAD-비오틴, Z-Gln-Gly-N₃ 또는 Z-Gln-Gly-PEG3-BCN 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 인큐베이션하였다. 샘플을 탈염시키고, 탈글리코실화하고, 환원시키고, ESI-MS에 의해 분석하여, mAb에의 기질의 부가를 결정하였다. 모든 4종의 기질은 항체 01-HC-L에 효율적으로 집합되었다 (표 9).

[0279] 표 9 - Lys447에의 다양한 관능기의 집합

	Da	계산치	관찰치	Δ질량	백분율
Z-Gln-Gly-N ₃	+402	49050	49048	-2	9.2%
		49050	49447	397	90.8%
Z-Gln-Gly-PEG ₃ -BCN	+670	49050	49717	667	100.0%
Z-Gln-Gly	+320	49050	49047	-3	1.9%
		49050	49367	317	98.1%
Z-Gln-Gly-CAD-비오틴	+631	49050	49047	-3	22.8%
		49050	49677	627	77.2%

[0280]

[0281] mAb를 Z-Gln-Gly-CAD-비오틴 및 미생물 트랜스글루타미나제와 37℃에서 밤새 인큐베이션한 다음, IdeS로 소화시켜 Fab 및 Fc 단편을 생성하였다. IdeS-생성된 Fc 단편의 질량을 ESI-MS에 의해 도 6에서와 같이 분석하고 (테

이터는 제시되지 않음), 다양한 기질에의 퍼센트 접합을 표 2에서와 같이 결정하였다.

[0282] 제2 방법은 아실 공여자 기를 갖는 기능적 작용제가 합성되는 단일 접합 단계를 수반한다. 이러한 방법은 PEG2-아우리스타틴 F 상에 Z-Gln-Gly 기를 합성함으로써 (Z-Gln-Gly-PEG2-AuF) 시험하였다. Z-Gln-Gly-PEG2-AuF를 항체 01-L 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. IdeS에 의한 소화 및 DTT에 의한 환원 후, 280 nm에서의 흡광도를 모니터링하고, 역상 LC-MS에 의해 분석하였다. 항체 01-L에 대해 3개의 피크가 관찰되었다 (도 9). 각각의 피크의 질량을 ESI-MS에 의해 분석하였고, 제1 피크가 LC, 제2가 Fc, 및 제3이 Fd인 것으로 결정되었다. Z-Gln-Gly-PEG2-AuF 및 미생물 트랜스글루타미나제와 함께 인큐베이션된 항체 01-L에 대해 제4 피크가 관찰되었다. 이러한 피크는 Fd 피크에서 완전히 분리될 수 없었지만, 피크의 대부분의 면적 (도 9b, 삽도)은 Fc 및 Fc-Z-Gln-Gly-PEG₂-AuF 피크의 총 면적의 75.4%인 것으로 결정되었다 (표 10). 따라서, 1.58 초과의 DAR이 달성되었다.

[0283] 표 10 - Lys447에의 아우리스타틴 F의 단일-단계 접합

화합물	피크 면적			% 화합물/Fc	DAR
	Fc	Fc+화합물	총		
Z-Gln-Gly-PEG2-AuF	780	2398	3178	75.4	1.5

[0284] mAb를 아실 공여자 기질 및 미생물 트랜스글루타미나제와 37℃에서 밤새 인큐베이션한 다음, IdeS로 소화시키고 DTT로 환원시켜 LC, Fc, 및 Fd 단편을 생성하였다. Fc+화합물의 UV 280 피크 면적을 도 9의 Fc 및 Fc+화합물 피크의 총 면적으로 나누어 퍼센트 접합을 계산하였다.

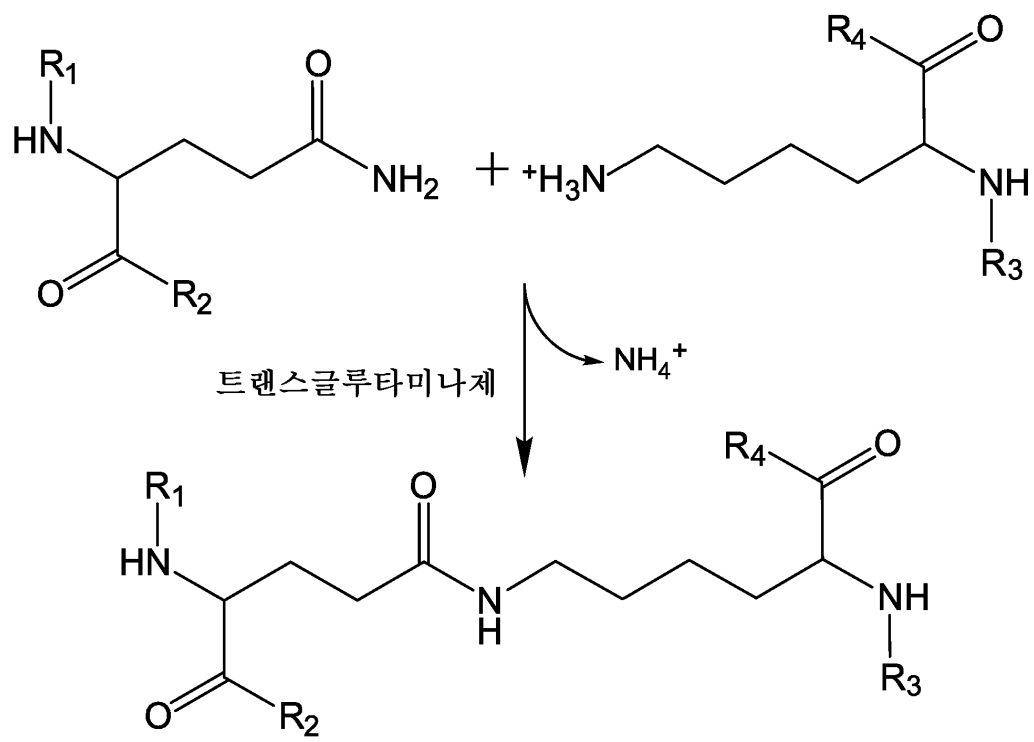
[0286] 실시예 6: 이량체 항체 분자의 생성

[0287] 이뮤노글로불린의 C-말단 리신에의 관능기 부가의 또 다른 유용성은 이량체 mAb-mAb 분자의 생성이다. 예를 들어, BCN-접합된 mAb는 구리-무함유 클릭 화학을 사용하여 N₃-접합된 mAb에 접합될 수 있다. 따라서, 동부피의 Z-Gln-Gly-N3 또는 Z-Gln-Gly-PEG3-BCN 항체 01-HC-L 반응물을 혼합하고, 22℃에서 밤새 인큐베이션되게 하였다. 환원된 반응물을 4-12% 비스-트리스 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 이량체화된 HC (~110 kDa)에 대해 분석하였다 (도 10). 실제로, BCN 및 N3에 의해 변형된 중쇄는 이량체 중쇄 분자를 형성하였다.

[0288] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 바람직한 실시양태에 수많은 변화 및 변형이 이루어질 수 있고 이러한 변화 및 변형은 본 발명의 취지로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 첨부된 청구범위는 이러한 모든 동등한 변경을 본 발명의 진실한 취지 및 범주 내에 속하는 것으로서 포괄하는 것으로 의도된다.

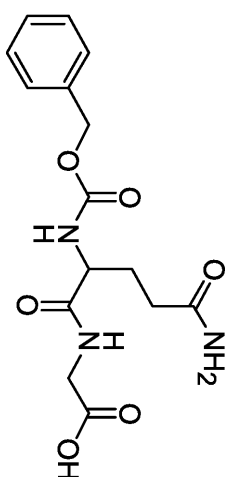
도면

도면1

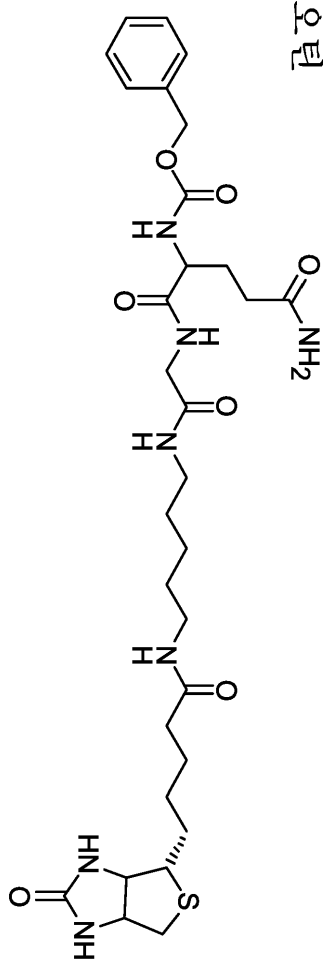


도면2i

Z-Gln-Gly-OH

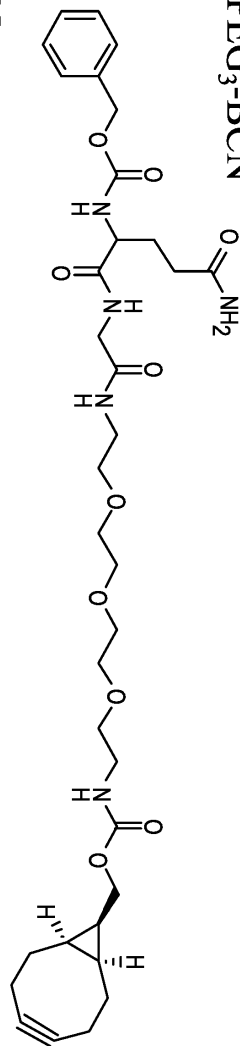


Z-Gln-Gly-CAD-비오틴

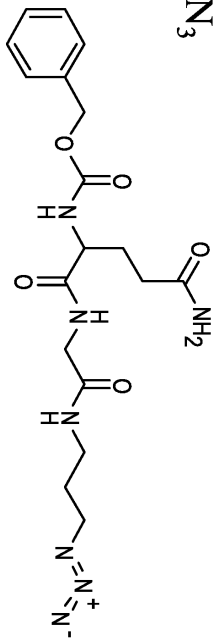


도면2ii

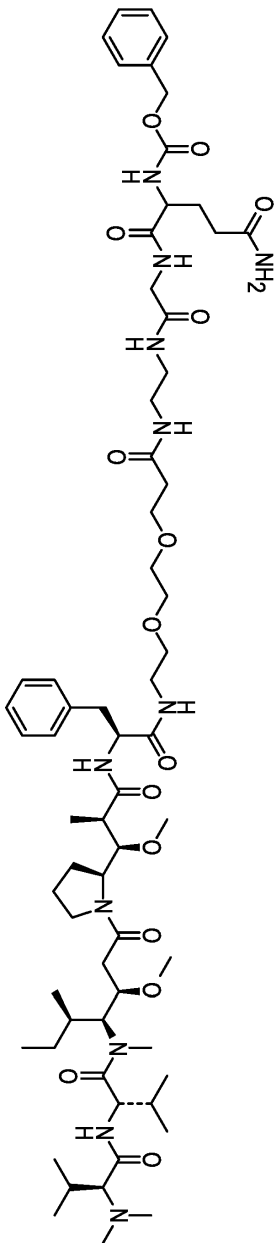
Z-Gln-Gly-PEG₃-BCN



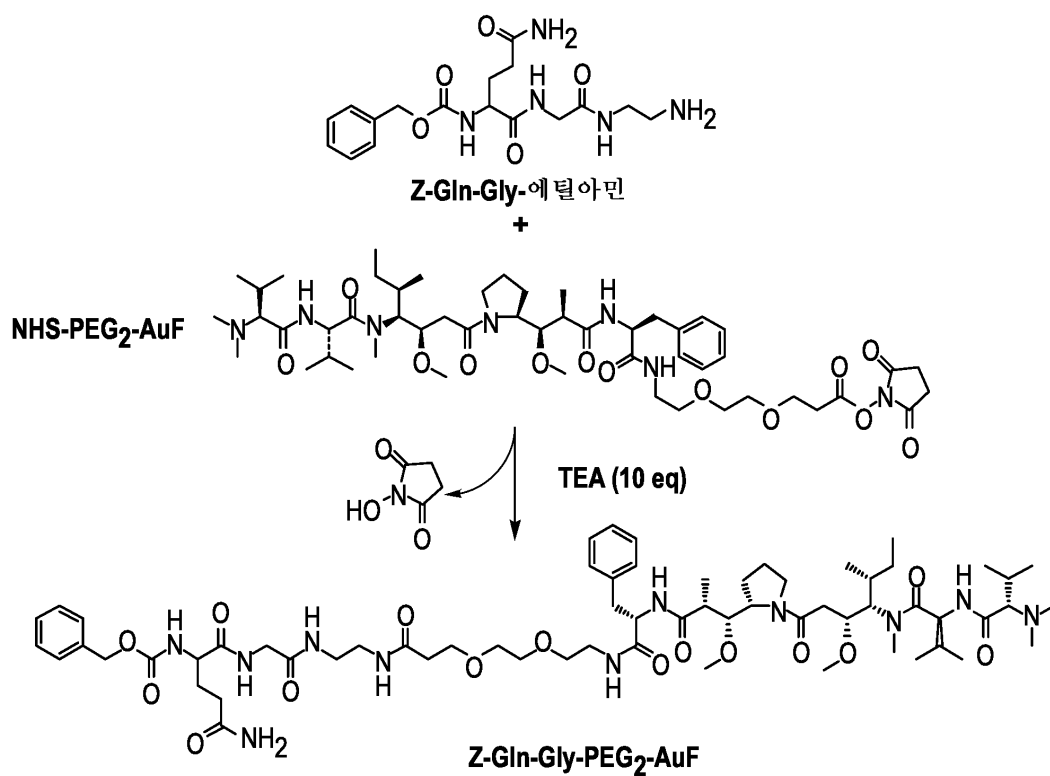
Z-Gln-Gly-N₃



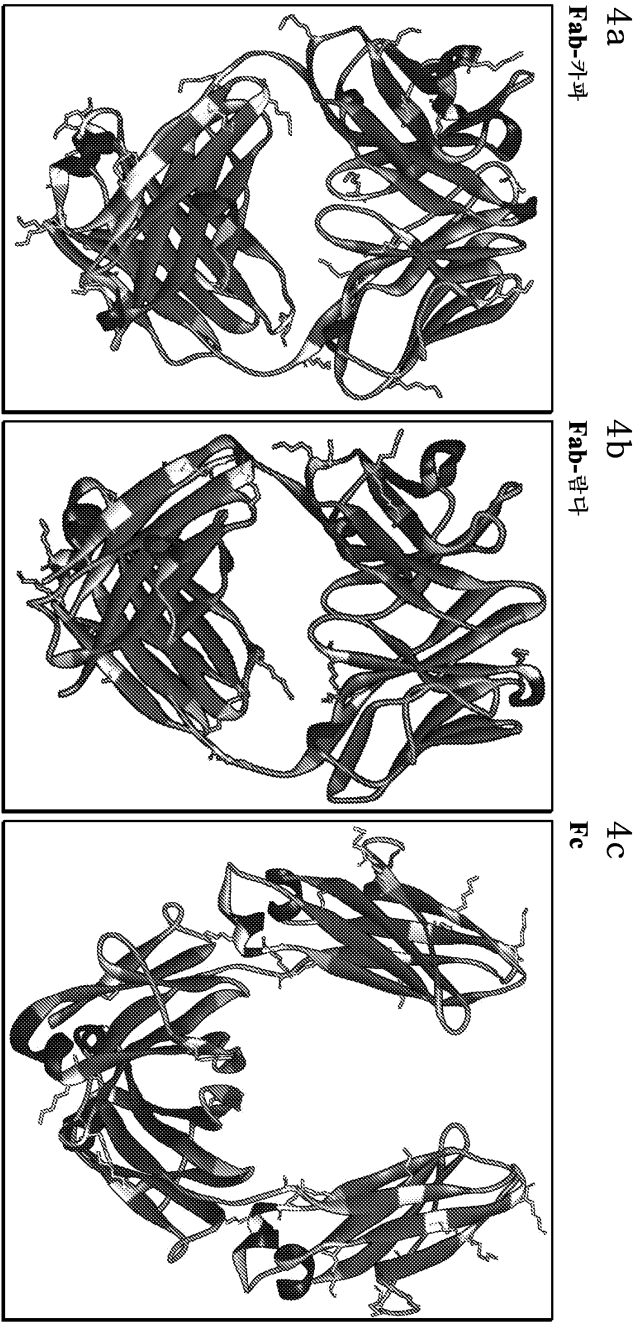
Z-Gln-Gly-PEG₂-아우라 스타틴 F



도면3ii



도면4



hu Cy

118

ASTKGPVFP LAPSSKSTSG GTALGCIWK DYEPYTVS WNSGALTSKV HTPAVLQSS GLXSLSSVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP

218

KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVELFPKP KDTIMISRTF EVTCVVDVS HEDPEVKENW YVDGVEYHNA KTKPREQYN STYRVSVLT VILHQDWLNGK

318

EYCKK/KNKA LPPIEKITIS KAKGPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LKKGYPSPDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSEFLY SKLTVDKSRW

418

447

QCGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSPGK

hu Ck

108

RTVAAPSVFI FPPSDEQIKS GTASVCLLN NEYPREAKVQ WKVNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSL TLTISKADYE KHKVACEVT HQGLSPVTK

208

SENRGEC

hu CA

110

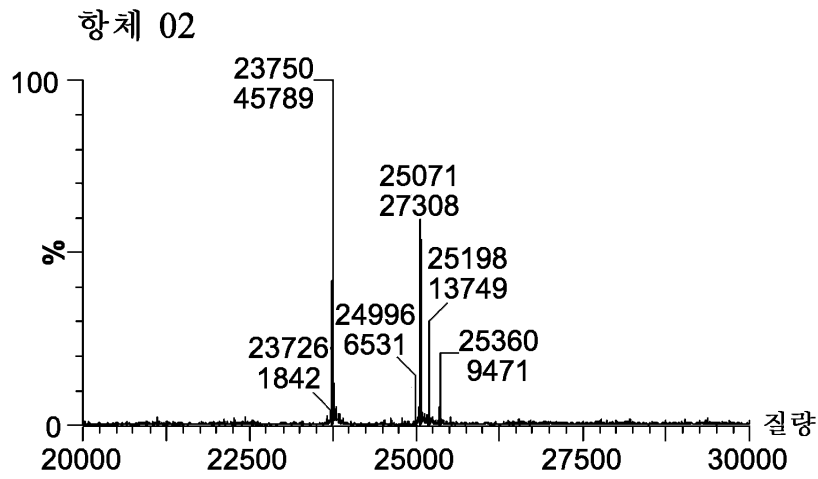
GQPKAAPSVT LFPSSSEELQ ANKATIVCLI SDEYPGAVTV AWKADSSPVK AGVEITTPSK QSNKKYAASS YLSLTPEDMK SHKSYSCQVT HEGSTVETV

210

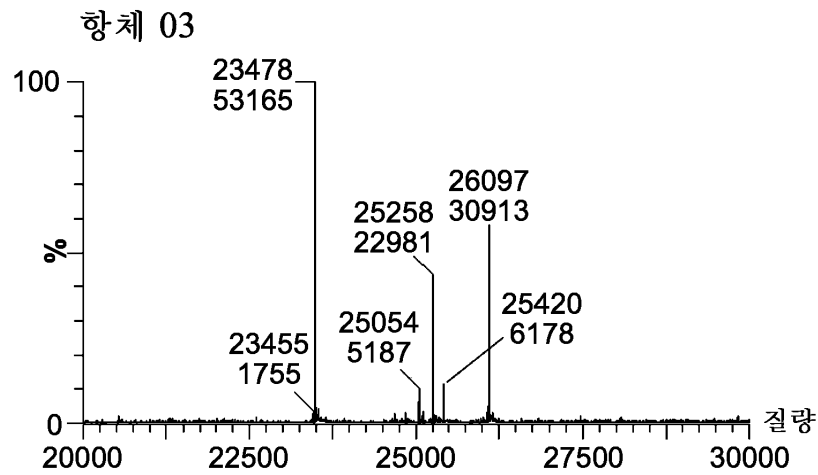
APT ECS

도면5

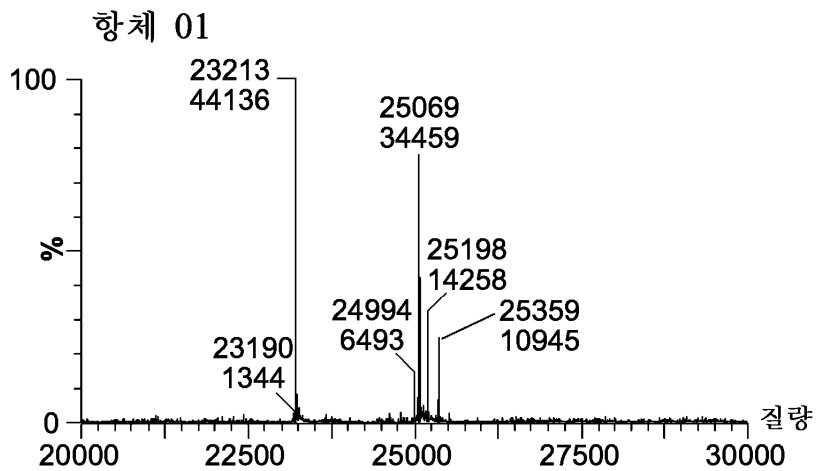
도면6a



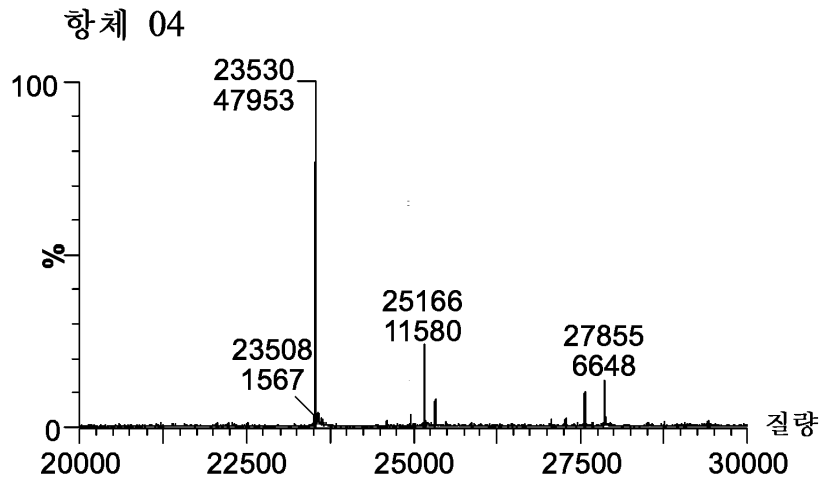
도면6b



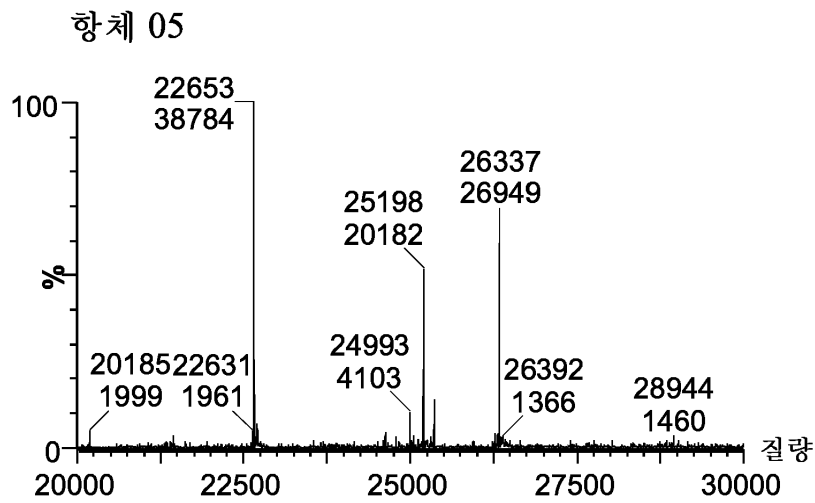
도면6c



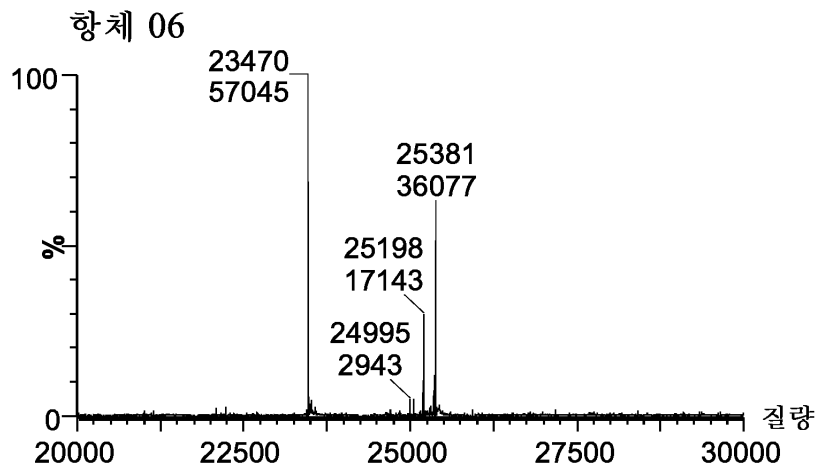
도면6d



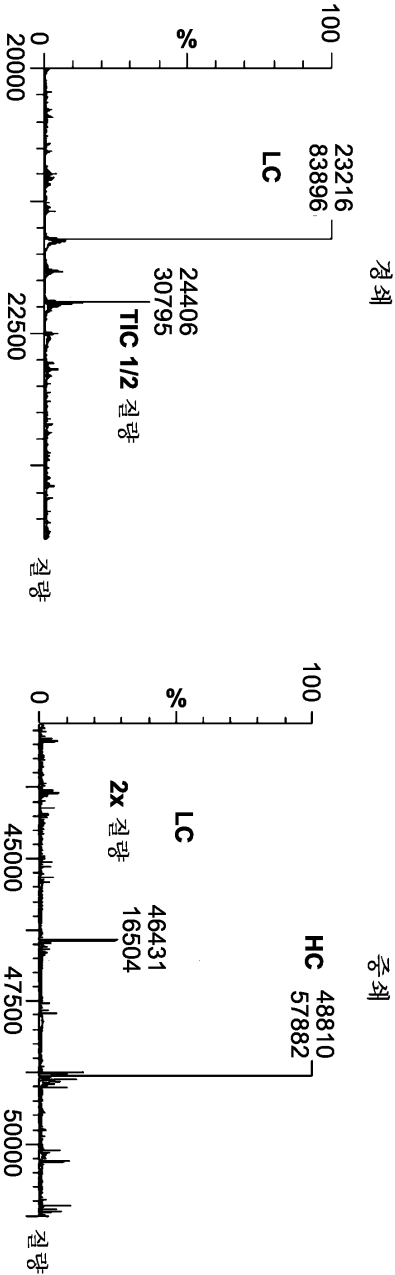
도면6e



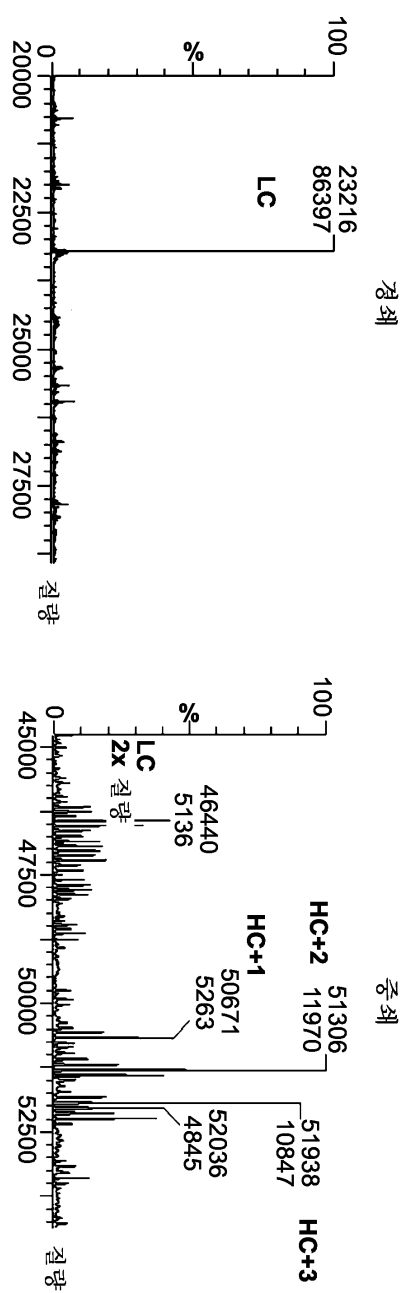
도면6f



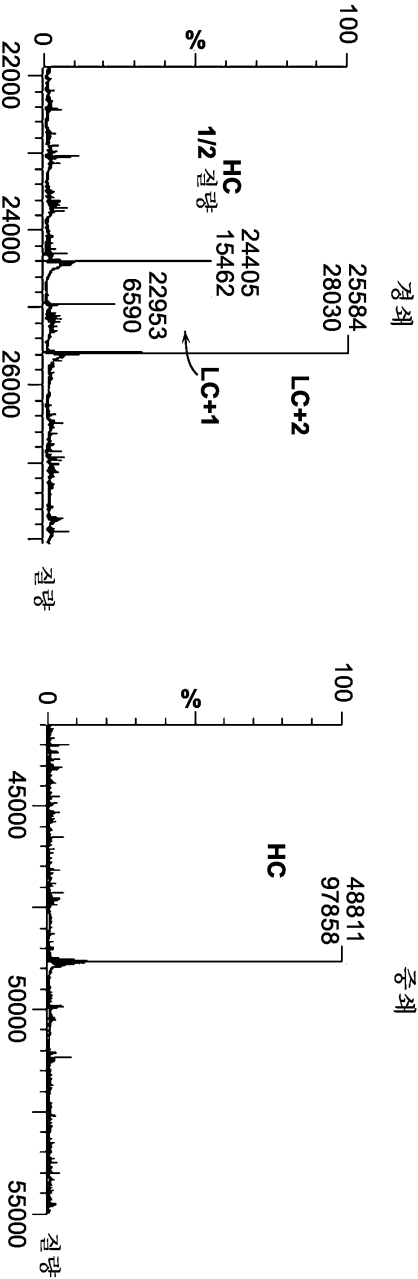
도면7a



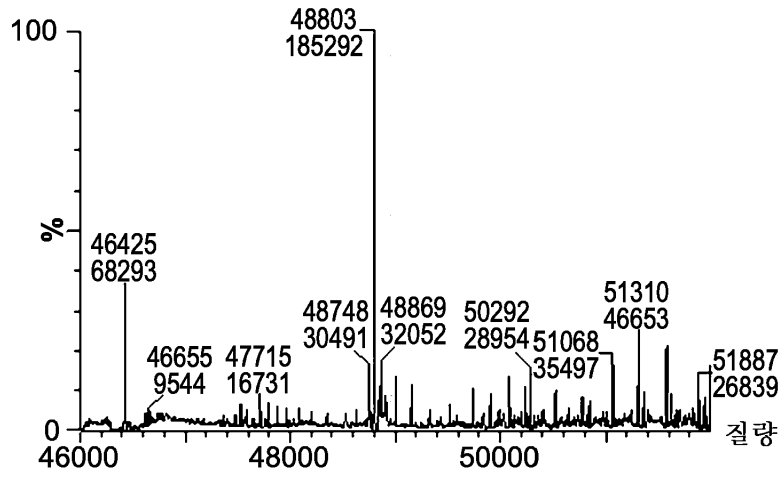
도면7b



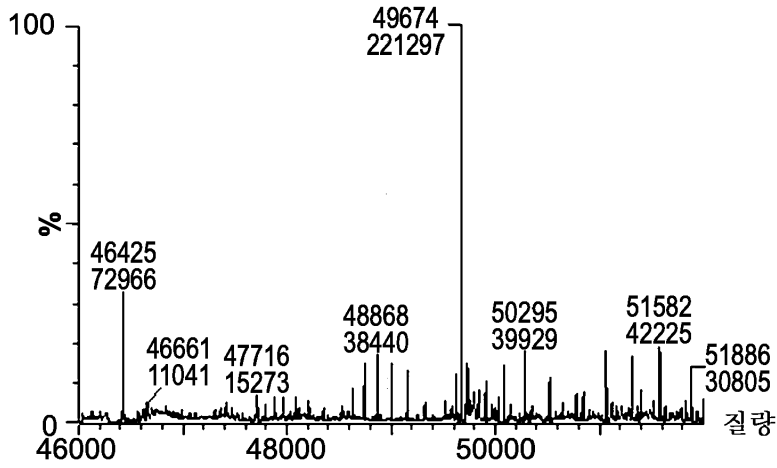
도면7c



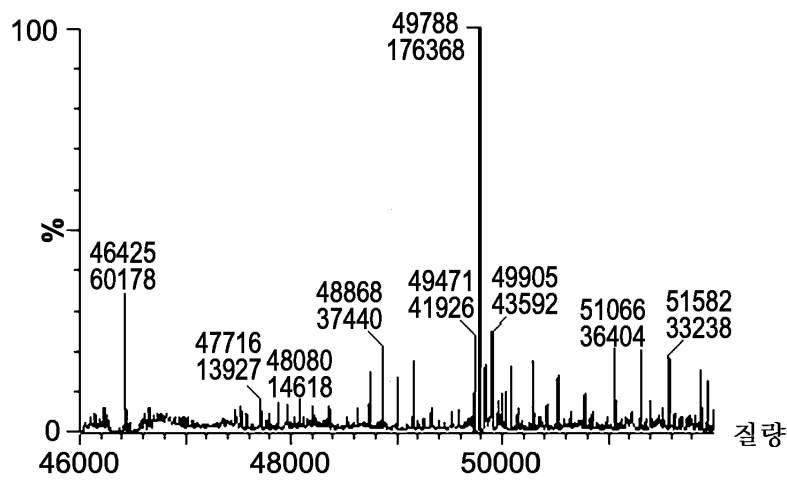
도면8a



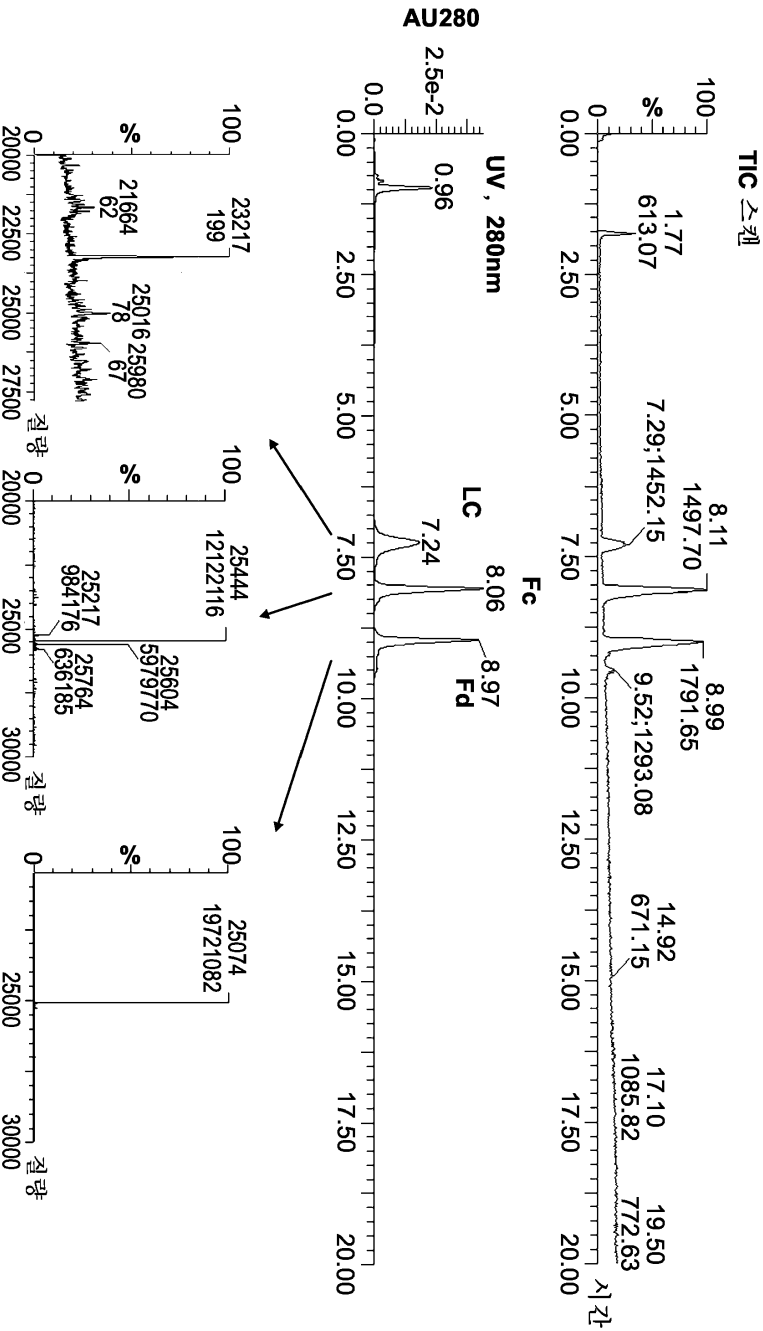
도면8b



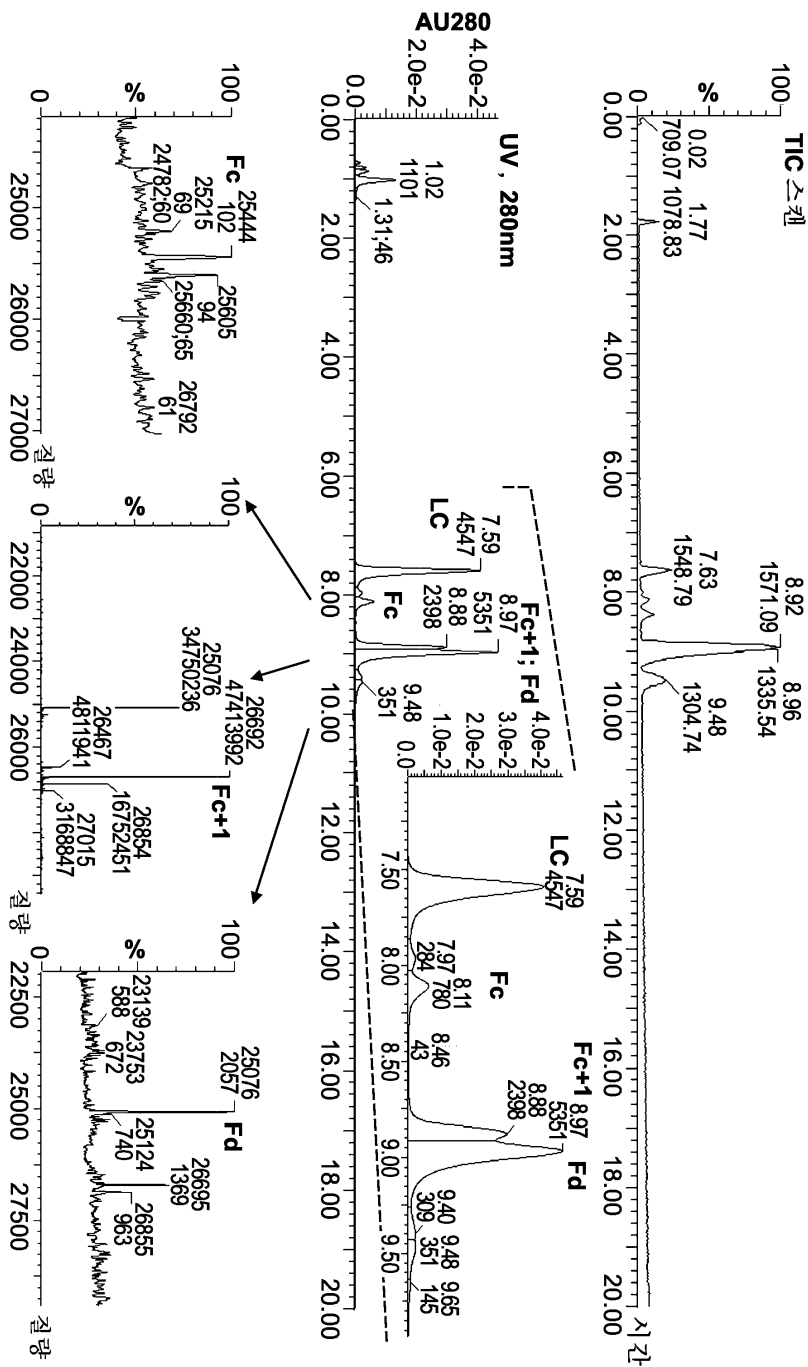
도면8c



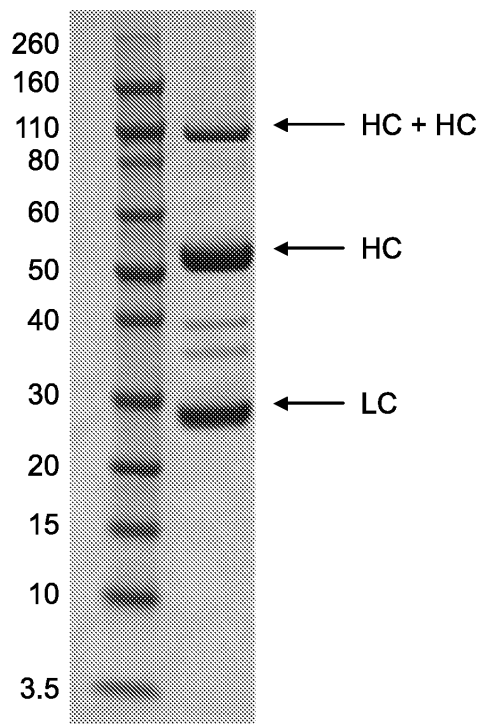
도면9a



도면9b



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MORPHOTEK, INC.

<120> C-TERMINAL LYSINE CONJUGATED IMMUNOGLOBULINS

<130> 118557-03820

<140> PCT/US2016/067165

<141> 2016-12-16

<150> 62/269,138

<151> 2015-12-18

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

Gly Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Thr

1 5

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

Gly Glu Cys Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 3

Gly Glu Asn Thr Tyr Phe Gln Ala Tyr Gly Asn Thr Glu

1 5 10

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr

1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr

1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

Gly Gly Ser Thr Lys His Lys Ile Pro Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Pro Gly Lys

1

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

Ser Pro Gly Lys Leu

```

1             5
<210> 9
<
211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 9
Ser Pro Gly Lys Leu Leu
1             5
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 10
Ser Pro Gly Lys Gly
1             5
<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        peptide"
<400> 11
Ser Pro Gly Lys Ala
1             5
<210> 12
<211> 5

```

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

Ser Pro Gly Lys Val

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

Ser Pro Gly Lys Ile

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

Ser Pro Gly Lys Met

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 15

Ser Pro Gly Lys Pro

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 16

Ser Pro Gly Lys Phe

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 17

Ser Pro Gly Lys Tyr

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 18

Ser Pro Gly Lys Trp

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

Ser Pro Gly Lys Ser

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 20

Ser Pro Gly Lys Thr

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 21

Ser Pro Gly Lys Cys

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 22

Ser Pro Gly Lys Asn

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 23

Ser Pro Gly Lys Gln

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 24

Ser Pro Gly Lys Asp

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25
 Ser Pro Gly Lys Glu
 1 5
 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 26
 Ser Pro Gly Lys His
 1 5
 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 27
 Ser Pro Gly Lys Lys
 1 5
 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 28
 Ser Pro Gly Lys Arg
 1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29

Ser Pro Gly Lys Lys Leu

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

Ser Pro Gly Lys Arg Leu

1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

Ser Pro Gly Lys Pro Leu

1 5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 32
 Ser Pro Gly Lys Asp Leu
 1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 33
 Ser Pro Gly Lys Glu Leu
 1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Val Ser Val Asn Pro Gly Lys

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Thr Asp His Gly Pro Met Lys

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu

1 5 10

<210> 40

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
		80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

1	5	10	15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp			
20	25	30	
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro			
35	40	45	
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn			
50	55	60	
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys			
65	70	75	80
Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val			
85	90	95	
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
100	105		