



(12) 등록특허공보(B1)

(24) 등록일자 2020년07월22일

- (73) 특허권자
이뮤노젠 아이엔씨
미국 02451-1477 메사추세츠주 윌섬 윈터 스트리트 830
- (72) 발명자
켈로그, 브렌다 에이.
미합중국 02155 매사추세츠 메드퍼드 그린리프 예비뉴 54
- 싱, 라제바**
미합중국 01701 매사추세츠 프래밍햄 레인우드 예비뉴 40
- 체리, 라비 브이.제이.**
미합중국 02461 매사추세츠 뉴턴 윈체스터 스트리트 174
- (74) 대리인
정대섭, 조용환

심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 조합 방법

본 발명은 항체와 같은 세포 결합제를 이펙터 그룹(예를 들어, 세포독성제) 또는 리포터 그룹(예를 들어, 방사성 핵종)과 접합시키는 방법을 기재하는데, 상기 방법에 의하여 리포터 또는 이펙터 그룹이 먼저 이작용성 링커와 반응되고 이후 혼합물이 정제하지 않고 세포 결합제와의 접합 반응에 이용된다. 본 발명에 기재된 방법은 항체와 (뒷면에 계속)

[illegible]

같은 세포 결합체와 이펙터 또는 리포터 그룹의 안정하게-연결된 접합체의 제조에 유리하다. 이 접합 방법은 고 수율로 사슬 간 가교 및 비활성화 링커 잔기가 없는 높은 순도 및 동종성의 접합체를 고수율로 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 39/42 (2013.01)

A61K 47/6803 (2017.08)

A61K 47/6863 (2017.08)

A61K 47/6891 (2017.08)

C07K 16/46 (2013.01)

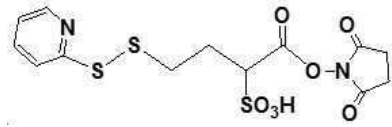
명세서

청구범위

청구항 1

용액 중의 정제된 접합체 제조 방법이고, 여기서 상기 접합체는 항체 또는 이의 단편에 연결된 티올-포함 세포 독성제를 포함하고, 상기 제조 방법은

(a) 티올-포함 세포독성제를 다음 화학식으로 표시되는 이작용성 링커 시약과 접촉시켜,



링커를 티올-포함 세포독성제에 공유적으로 부착시키고 상기 이작용성 링커 시약에 비하여 과잉 티올-포함 세포 독성제가 사용되며, 이에 의하여 결합된 링커를 가지는 티올-포함 세포독성제를 포함하는 미정제 제1 혼합물을 제조하는 단계,

(b) 미정제 제1 혼합물을 항체 또는 이의 단편과 반응시켜 제2 혼합물을 제조하여, 항체 또는 이의 단편을, 결합된 링커를 가지는 티올-포함 세포독성제에 접합시키는 단계, 및

(c) 제2 혼합물을 접선 흐름 여과, 투석, 겔 여과, 흡착 크로마토그래피, 선택적 침전 또는 이들의 조합을 거치게 하여 정제된 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (b)는 4 내지 9의 pH의 용액에서 수행됨을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계 (b)의 제2 혼합물에는 분자 내 또는 분자 간 반응으로 인하여 형성된 바람직하지 않은 가교되고, 수화된 화학종이 없음을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 티올-포함 세포독성제는 메이탄시노이드, 탁산, 또는 CC1065에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 티올-포함 세포독성제는 메이탄시노이드임을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서, 메이탄시노이드는 DM1임을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 메이탄시노이드는 DM4임을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서, 항체 및 이의 단편은 단일클론 항체임을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 항체 및 이의 단편은 인간 또는 인간화 단일클론 항체임을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 항체 및 이의 단편은 MY9, 항-B4, C242, 또는 EpCAM, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, EphA 수용체, EphB 수용체, EGFR, EGFRvIII, HER2, HER3, 메소텔린, 크립토, 및 알파_v베타₃, 알파_v베타₅, 및 알파_v베타₆ 인테그린으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 항원에 결합되는 항체임을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 인간 또는 인간화 단일클론 항체는 huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CNTO 95, B-B4, 트라스투주맵, 페르투주맵, 비바투주맵, 시브로투주맵, 또는 리톡시맵, 또는 EphA2 수용체, CD38, 및 IGF-IR으로 이루어진 군에서 선택된 항원에 결합하는, 인간 또는 인간화 항체임을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제2항에 있어서, 상기 단계(b)에서 용액의 pH는 5 내지 8.7 인 것을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 19

제2항에 있어서, 상기 단계(b)에서 용액의 pH는 6.5 내지 8.5 인 것을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 20

제6항에 있어서, 단계 (a)와 (b) 사이에서, 미정제 제1혼합물의 과잉 메이탄시노이드를 퀀칭 시약으로 퀀칭하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 퀀칭 시약은 4-말레이미도부티르산, 3-말레이미도프로피온산, 또는 N-에틸말레이미드, 아이오도아세트아미드, 또는 아이오도아세트아미도프로피온산으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용액 중의 정제된 접합체 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2009년 6월 3일에 출원된 미국 가출원 제61/183,774호의 우선권을 주장하고, 상기 가출원의 전체 개시는 본 명세서에 명백하게 참조로 포함된다.

[0002] 발명의 분야

[0003] 본 발명은 이작용성 링커를 통하여 항체 또는 이의 단편과 같은 세포 결합제에 이펙터(effector) 그룹(예를 들어, 세포독성제) 또는 리포터(reporter) 그룹(예를 들어, 방사성표지)를 결합시키는 신규한 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는, 본 발명은 분자 내 또는 분자 간 반응으로 인하여 형성된 바람직하지 않은 가교된 화학종 또는 바람직하지 않은 수화된 화학종의 형성을 야기하는 단계가 공정에서 제거되도록, 이작용성 링커(linker)를 통하여 세포 결합제(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)에 이펙터 그룹(예를 들어, 메탄탄시노이드) 또는 리포터 그룹(예를 들어, 방사성표지)를 결합시키는 신규한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 발명의 배경

[0005] 항체와 같은 세포 결합제와 소형 세포독성제 또는 세포독성 단백질과 같은 이펙터 그룹의 접합체(conjugate)는 항암 치료에의 개발에서 매우 큰 관심사이다 (Richart, A. D., and Tolcher, A. W., 2007, Nature Clinical Practice, 4, 245-25). 이러한 접합체는 종양 세포의 세포 표면에 발현된 항원에 대하여 선택된 항체의 높은 특이성으로 인하여 종양-특이성이다. 종양 세포에 특이적 결합을 하면, 항체-세포독성제 접합체는 표적 암 세포 내에 내포되고 분해되고, 이에 의하여 미세소관 동역학 또는 DNA 복제와 같은 필수적인 세포 기능을 억제하여 암 세포의 사멸을 유발하는 활성 세포독성제를 방출한다. 접합체의 내포화 및 가공 시 혈장 내에서 접합체의 바람직한 안정성을 유지하면서 세포 내로 작용제의 전달을 향상시키려는 목표로, 다양한 링커가 항체와 세포독성제를 연결시키기 위하여 사용되어 왔다. 이러한 링커에는 세포 내 티올, 발린-시트룰린 연결과 같은 분열성 펩타이드 링커, 및 티오에테르 연결과 같은 비분열성 링커와의 환원 속도에 영향을 미치도록, 여러 상이한 입체 장애 정도를 가지게 디설파이드 링커가 포함된다 (Widdison, W., et al., J. Med. Chem., 2006, 49, 4392-4408; Erickson, H., et al, Cancer Res., 2006, 66, 4426-4433).

[0006] 항체와 같은 세포 결합제와 표지 또는 리포터 그룹의 접합체는 암 환자의 종양-영상화 적용분야, 다양한 질환의 진단을 위한 면역검사 적용분야, 방사성 핵종-리간드 접합체를 이용하는 암 치료법, 및 단백질, 펩타이드, 및 올리고뉴클레오타이드와 같은 생활성 작용제의 정제를 위한 친화성 크로마토그래피 적용분야에 유용하다. 세포-결합제와 결합하는 표지 또는 리포터 그룹에는 형광단, 및 친화성 표지, 예컨대 바이오틴이 포함된다.

[0007] 항체(Ab)와 같은 세포-결합제와 비환원성 연결(예컨대 티오에테르 연결)을 통하여 연결된 이펙터 그룹(예를 들어, 세포독성제) 또는 리포터 그룹(예를 들어, 방사성표지)의 종래 접합 방법은 항체와의 개별적인 두 반응 단계를 사용하고, 정제 단계의 이용을 필요로 한다. 첫 번째 반응 단계에서, 항체가 둘의 상이한 반응기(예를 들어, X 및 Y)를 보유하는 이중작용성 링커와 반응한다. 예를 들어, 한 접근법에서, 항체의 반응성 잔기(예컨대 라이신 아미노 잔기)와 이중작용성 시약의 X 반응기(예컨대 N-하이드록시석신이미드 에스테르)의 반응이 하나 이상의 항체의 반응성 잔기(예컨대 라이신 아미노 잔기)에서 링커와 Y 반응기의 혼성을 야기한다. 초기에 변형된 항체 생성물은 다음 단계가 일어날 수 있기 전에 과잉의 링커 또는 수화된 링커 시약으로부터 정제되어야 한다. 두 번째 반응 단계에서, Y 반응기(예컨대 말레이미드 또는 할로아세트아미드)를 포함하는 링커-변형된 항체가 티올과 같은 반응기를 포함하는 이펙터 그룹(C)(예를 들어, 세포독성제)과 같은 이펙터와 반응하여 항체-이펙터 접합체를 생성하고, 이는 추가의 정제 단계에서 다시 정제된다 (예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호, 또는 제5,024,834호 참조). 따라서, 상기 공정에서, 최소한 둘의 정제 단계가 필요하다.

[0008] 항체를 이펙터 또는 리포터 그룹과 결합시키기 위하여 둘의 반응 및 정제 단계를 포함하는 또 다른 접근법은 항체의 티올 잔기(2-이미노티올란과 같은 티올-생성 시약을 사용한 항체의 변형을 통하거나, 비천연 시스테인 잔기를 혼성하기 위한 돌연변이 유발을 통하거나, 천연 디설파이드 결합의 환원을 통하여 생성됨)와 Y 반응기(예컨대 말레이미드 또는 할로아세트아미드)를 포함하는 이중작용성 링커 Y-L-Y의 반응을 이용한다.

[0009] 말레이미드(또는 할로아세트아미드)와 같은 반응기 Y를 항체 또는 펩타이드에 혼성하는 것의 주요 단점은 항체 또는 펩타이드의 천연 히스티딘, 라이신, 타이로신, 또는 시스테인 잔기와 분자 내 또는 분자 간 반응(Papini,

A. et al., Int. J. Pept. Protein Res., 1992, 39, 348-355; Ueda, T. et al., Biochemistry, 1985, 24, 6316-6322), 및 Y 말레이미드기의 수성 비활성화를 겪는 반응성 말레이미드(또는 할로아세트아미드)기의 경향이 다. 이펙터 또는 리포터 그룹 C와의 두 번째 반응 전의, 항체에 혼성된 말레이미드(또는 할로아세트아미드)기 Y와 항체의 천연 히스티딘, 라이신, 또는 시스테인 잔기의 원하지 않는 분자 내 또는 분자 간 반응, 및 Y 말레이미드기의 수성 비활성화는 가교된 단백질 또는 이중 접합체를 발생시키고 이펙터 또는 리포터 그룹 C와의 두 번째 반응의 효율을 낮춘다. 초기에 혼성된 기 Y(예컨대 말레이미드기)와 항체 또는 펩타이드의 천연기(예컨대 히스티딘, 라이신, 타이로신, 또는 시스테인), 또는 수성 비활성화에 의하여 생성된 비활성 말레이미드 잔기의 바람직하지 않은 반응으로부터 생성된 가교된 단백질 또는 펩타이드인 이중 접합체 생성물은 원하는 동종 접합체 생성물보다 열등한 활성 및 안정성을 가질 것이다.

[0010] 디설파이드 연결을 통하여 항체를 티올-포함 세포독성제에 결합시키기 위한 공정이 이전에 설명되었다 (예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호, 제6,441,163호, 미국 특허 공개공보 제2007/0048314 A1호 참조). 이러한 공정은 항체와 이중작용성 시약의 초기 반응, 이어서 항체와 티올-포함 세포독성제의 두 번째 반응을 포함한다. 대안의 공정이 미국 특허 제6,441,163 B1호에 기재되는데, 여기서 세포독성제의 디설파이드-연결된 반응성 에스테르가 우선 정제된 다음 항체와 반응하지만, 항체와의 반응 전에 티올기-포함 세포독성제로부터 출발하는 추가의 반응 및 정제 단계를 포함한다.

[0011] 세포 결합체의 접합체를 제조하기 위한 현재의 공정의 추가 단점은 두 정제 단계의 필요성인데, 이는 전체 수율을 낮추고 또한 공정을 규모 확대에 대하여 성가시고 비경제적으로 만든다.

[0012] 상기의 관점에서, 실질적으로 높은 순도이며 성가신 단계를 피하고 사용자의 시간과 비용을 줄여 제조될 수 있는, 개선된 세포-결합체-약물 복합체 조성물 제조 방법을 개발할 필요가 당해 분야에 존재한다. 본 발명은 이러한 방법을 제공한다. 이를 비롯한 본 발명의 다른 장점, 또한 본 발명의 추가적인 특징이 본 명세서에 제공된 발명의 설명으로부터 명백할 것이다.

발명의 내용

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 티올-포함 세포독성제(예를 들어, 메이탄시노이드)와 이중- 또는 동종-이작용성 시약(예를 들어, 분열성 또는 비분열성 링커)의 직접 반응을 이용하고 이어서 미정제 반응 혼합물과 세포 결합체(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)의 혼합하여, 이에 의하여 더욱 효과적이고, 높은 수율을 가지며, 규모 확대를 위하여 수정 가능한 공정에 의하여 비환원성, 티오에테르-연결된 접합체를 생성하여, 화학식 C-L-CBA의 비환원성 티오에테르-연결된 접합체를 제조하는 접합 방법을 설명하고, 여기서 C가 이펙터 그룹 또는 표지기 분자(예를 들어, 세포독성제 또는 방사성표지)를 나타내고, L은 링커이고 CBA가 세포 결합체(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)이다. 또 다른 중요한 장점은 이러한 접합 방법이 사슬 간 단백질 가교 또는 비활성화 잔기(예를 들어, 말레이미드 또는 할로아세트아미드 잔기)가 없는 티오에테르-연결된 비환원성 접합체를 산출한다는 것이다. 본 출원에 개시된 신규한 방법은 상기 화학식에 의하여 나타나는 임의의 접합체의 제조에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 메이탄시노이드 DM1 (또는 DM4) 및 말레이미드-PEG_n-NHS 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합을 나타낸다.

도 2는 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 환원 SDS-PAGE를 나타낸다. 각각의 샘플 레인(lane)은 10 μg 단백질을 포함했고; 겔은 쿠마시 블루로 염색되었다. 레인 1 및 2는 분자량 마커를 포함했다. 레인 3은 Ab당 6.1 DM4를 포함하는 전통적인 2-단계 방법에 의하여 제조된 접합체를 포함했다. 레인 4는 Ab당 6.2 DM4를 포함하는 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체를 포함했다.

도 3은 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 단백질 랩칩 전기영동을 나타낸다. A. Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 접합체의 환원 조건하의 단백질 랩칩 전기영동 (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent Protein 230 키트). 레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 합성된 Ab-PEG₄-Mal-DM4, 6.2 D/Ab; 레인 3: 2 단계 접합 방법을 이용하여 합성된 Ab-PEG₄-Mal-DM4, 6.1 D/Ab; 레인 4: 비접합 Ab (각각의 레인에 0.24 마이크로그램의 총 단백질). 상부 마커,

시스템 피크 및 하부 마커 밴드는 키트로부터 첨가된 외부 마커를 나타낸다. B. 단백질 랩칩 전기영동으로부터 단백질 밴드의 정량화.

도 4는 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 MS를 나타낸다. A. Ab당 6.1 DM4를 포함하고 전통적인 2-단계 방법에 의하여 제조된 접합체의 MS. 접합체의 상당한 이종성(heterogeneity)으로 인하여 MS 피크가 잘 분해될 수 없다. B. Ab당 6.2 DM4를 포함하고 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체의 MS. 접합체의 동종성(homogeneity)으로 인하여, MS 피크가 잘 분해되었다.

도 5는 CanAg 항원-발현 COLO205 세포에 대한 (본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된) 항체당 6.7 DM1를 포함하는 항-CanAg 항체-PEG₄-Mal-DM1 접합체의 결합 대 비변형 항체의 결합을 나타낸다. 결합은 형광 단위로 측정되었다.

도 6은 (본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된) 항체당 6.7 DM1를 포함하는 항-CanAg 항체-PEG₄-Mal-DM1 접합체의 CanAg 항원-발현 COLO205 세포에 대한 시험관 내 세포독성을 나타낸다. 접합체가 COLO205 세포에 첨가되었고, 접합체와 함께 5 일의 연속 배양 후, WST-8 검사를 이용하여 세포의 생존력이 측정되었다. 접합체의 특이성을 증명하기 위한 대조군 실험이 표적 암 세포에 대한 접합체의 결합 및 세포독성을 차단하기 위하여 과잉의 비접합 항-CanAg 항체를 이용하여 수행되었다.

도 7은 DM1 (또는 DM4) 및 말레이미드-설폰-NHS 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합을 나타낸다.

도 8은 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(설폰-Mal)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 환원 SDS-PAGE를 나타낸다. 각각의 샘플 레인은 10 μ g 단백질을 포함했고; 겔은 쿠마시 블루로 염색되었다. 레인 1은 분자량 마커를 포함했다. 레인 3 및 5는 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조되고 각각 Ab당 3.6 및 5.6 DM1을 포함하는 접합체를 포함했다. 레인 2 및 4는 전통적인 2-단계 방법에 의하여 제조되고 각각 Ab당 4.0 및 5.7 DM1을 포함하는 접합체를 포함했다.

도 9는 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(설폰-Mal)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 단백질 랩칩 전기영동을 나타낸다. A. Ab-(설폰-Mal)-DM1 접합체의 환원 조건하의 단백질 랩칩 전기영동 (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent 단백질 230 키트). 레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 비접합 Ab; 레인 3: 2 단계 접합 방법을 이용하여 합성된 Ab-설폰-Mal-DM1, 5.7 D/Ab; 레인 4: 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 합성된 Ab-설폰-Mal-DM1, 5.6 D/Ab; 웰당 0.22 마이크로그램의 총 단백질이 로딩되었다. 상부 마커, 시스템 피크 및 하부 마커 밴드는 키트로부터 첨가된 외부 마커를 나타낸다 (웰당 0.24 마이크로그램의 총 단백질). B. 단백질 랩칩 전기영동으로부터 단백질 밴드의 정량화.

도 10은 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항체-(설폰-Mal)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 접합 방법에 의하여 제조된 접합체의 LC-MS 비교를 나타낸다. A. 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 3.6 DM1/Ab을 포함하는 접합체의 MS가 1-6 DM1-보유 불연속 접합체 피크를 가지는 동종 접합체를 나타낸다. B. 전통적인 2-단계 접합 방법에 의하여 제조된 4.0 DM1/Ab를 가지는 접합체의 MS. 전통적인 2-단계 방법에 의하여 제조된 접합체의 MS가 접합체, 및 수화되거나 가교된 링커를 포함하는 접합체(예컨대 2 DM1, 추가로 하나의 L, 2L, 및 3L을 포함하는 접합체)에 상응하는 피크를 나타내고, 이는 이중 생성물을 명시한다.

도 11은 CanAg 항원-발현 COLO205 세포에 대한 (본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된) 항체당 5.6 DM4를 포함하는 항-CanAg 항체-설폰-Mal-DM1 접합체의 결합 대 비변형 항체의 결합을 나타낸다. 결합은 형광 단위로 측정되었다.

도 12는 (본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된) 항체당 5.6 DM4를 포함하는 항-CanAg 항체-설폰-Mal-DM1 접합체의 CanAg 항원-발현 COLO205 세포에 대한 시험관 내 세포독성을 나타낸다. 접합체가 COLO205 세포에 첨가되었고, 접합체와 함께 5 일의 연속 배양 후, WST-8 검사를 이용하여 세포의 생존력이 측정되었다. 접합체의 특이성을 증명하기 위한 대조군 실험이 표적 암 세포에 대한 접합체의 결합 및 세포독성을 차단하기 위하여 과잉의 비접합 항-CanAg 항체를 이용하여 수행되었다.

도 13은 DM1 (또는 DM4) 및 설폰-NHS SMCC 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합을 나타낸다.

도 14는 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(SMCC)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 환원 SDS-PAGE를 나타낸다. 각각의 샘플 레인은 10 마이크로그램의 총 단백질을 포함했고; 겔

은 쿠마시 블루로 염색되었다. 레인 1은 분자량 마커를 포함했고, 레인 2는 비접합 Ab를 포함했고, 레인 3은 Ab당 3.1 DM1를 포함하는 전통적인 2-단계 방법에 의하여 제조된 접합체를 포함하고, 레인 4는 Ab당 3.1 DM1을 포함하는 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체를 포함한다.

도 15는 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(SMCC)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 단백질 랩칩 전기영동을 나타낸다. A. Ab-SMCC-DM1 접합체의 환원 조건하의 단백질 랩칩 전기영동 (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent 단백질 230 키트). 레인 1: 분자량 마커; 레인 2: 본 특허에 기재된 방법을 이용하여 합성된 Ab-SMCC-DM1, 3.1 D/Ab; 레인 3: 비접합 Ab; 레인 4: 2 단계 접합 방법을 이용하여 합성된 Ab-SMCC-DM1, 3.1 D/Ab; (각각의 레인에 0.24 마이크로그램의 총 단백질). 상부 마커, 시스템 피크 및 하부 마커 밴드는 키트로부터 첨가된 외부 마커를 나타낸다. B. 단백질 랩칩 전기영동으로부터 단백질 밴드의 정량화.

도 16은 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항체-(SMCC)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 접합 방법에 의하여 제조된 접합체의 LC-MS 비교를 나타낸다. A. Ab당 3.1 DM1을 포함하는 연속 2-단계 방법에 의하여 제조된 접합체의 MS. 각각의 주요 접합체 피크는 수화되고 가교된 링커 단편의 존재로 인하여 관련된 측면 피크를 가진다. B. Ab당 3.1 DM1을 포함하는 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체의 MS. 접합체의 동종성으로 인하여, MS 피크가 잘 분해되었다.

도 17은 전통적인 2-단계 방법에 의한 접합 동안 사슬 간 가교 및 말레이미드 비활성화에 대하여 제안된 메커니즘을 나타낸다.

도 18은 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(설폰-Mal)-DM4 접합체 및 항체 접합 반응 전에 4-말레이미도부티르산을 이용하는 유리 DM4 티올의 퀀칭(초기 DM4 + NHS-설폰-Mal 이중작용성 시약 커플링 반응 후)의 비환원 SDS PAGE를 나타낸다. 각각의 샘플은 10 μ g 단백질을 포함했고; 겔은 쿠마시 블루로 염색되었다. 레인 1 및 5는 분자량 마커를 포함했다. 레인 2는 Ab 단백질을 포함했다. 레인 3은 4-말레이미도부티르산의 첨가 없이 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체를 포함했다. 레인 4는 초기 DM4 + NHS-설폰-Mal 이중작용성 시약 후 (항체 접합 단계 전) 4-말레이미도부티르산을 첨가하여 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체를 포함했다.

도 19는 DM1 (또는 DM4) 및 SPDB 링커의 반응 혼합물을 이용하는 항체의 디설파이드-연결된 접합체의 제조를 나타낸다.

도 20은 SPDB와 NHS-PEG₄-Mal 링커 두 가지 모두 및 DM1 (또는 DM4)의 미정제 반응 혼합물과의 항체 접합을 통한, 디설파이드- 및 비분열성 PEG₄-Mal 링커 두 가지를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 나타낸다.

도 21은 (SPDB와 NHS-PEG₄-Mal 링커 두 가지 모두 및 DM1 또는 DM4)의 미정제 반응 혼합물과 항체의 접합에 의하여 제조된 디설파이드- 및 비분열성 PEG₄-Mal 링커 두 가지를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체의 MS를 나타낸다.

도 22는 DM1 (또는 DM4) 및 SMCC 링커의 반응 혼합물을 사용하는 항체의 결합을 나타낸다.

도 23은 항체당 평균 3.1 DM1을 포함하는, 본 발명에 기재된 방법에 의하여 SMCC를 이용하여 제조된 항체-SMCC-DM1 접합체의 MS를 나타낸다.

도 24는 DM1 (또는 DM4) 및 SSNPB 링커의 반응 혼합물을 이용하는 항체의 디설파이드-연결된 접합체의 제조를 나타낸다.

도 25는 지방족 선행 탄소 사슬을 포함하는 이중작용성 링커 및 DM1 (또는 DM4)의 반응 혼합물의 항체의 접합을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

이제 본 발명의 특정 구체예에 관하여 상세하게 언급될 것이고, 이들의 실시예가 첨부되는 구조 및 화학식에서 나타난다. 비록 본 발명이 열거된 구체예와 관련하여 기재될 것이기는 하지만, 이들이 본 발명을 이러한 구체예

로 제한하도록 의도하지 않음이 이해될 것이다. 반면에, 본 발명은 청구범위에 의하여 정의된 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 균등물을 포괄하도록 의도된다. 당업자는 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 균등한 많은 방법 및 물질을 인식할 것이고, 이들은 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다.

- [0018] 본 발명은 티올-포함 이펙터 그룹(예를 들어, 세포독성제) 또는 리포터 그룹(예를 들어, 방사성표지)와 세포 결합제(예를 들어, 항체)를 접합하는 신규한 방법을 설명하고, 여기서 티올-기 포함 이펙터 또는 리포터가 유기, 수성, 또는 혼합된 유기/수성 용매에서 이작용성 링커 시약과 먼저 반응하고, 유기, 수성 또는 혼합된 유기/수성 용매에서 미정제 반응 혼합물과 세포 결합제의 반응이 이어진다.
- [0019] 약어 범위
- [0020] 도식 및 실시예의 기재에서 사용된 약어는 다음과 같다:
- [0021] C = 이펙터 또는 리포터 그룹 (예를 들어, 세포독성제 또는 방사성표지)
- [0022] L = 링커 (예를 들어, 분열성 또는 비분열성 링커)
- [0023] X = 아민-반응기 (예를 들어, N-하이드록시석신이미드 에스테르 (NHS 에스테르), 설폰-NHS 에스테르, p-니트로 페놀 에스테르, 테트라플루오로설포네이트 페닐 에스테르, 1-하이드록시-2-니트로-벤젠-4-설폰산 에스테르)
- [0024] Y = 말레이미드, 또는 할로아세트아미드 (아이오도아세트아미드, 브로모아세트아미드)
- [0025] Y_b는 반응성 혼합 디설파이드기 (예를 들어, 2-피리딜디티오, 4-피리딜디티오, 2-니트로-피리딜디티오, 5-니트로-피리딜디티오, 2-카르복시-5-니트로-피리딜디티오)
- [0026] X' = 아미드 연결
- [0027] Y' = 티오에테르 (R-S-R') 또는 셀레노에테르 (R-Se-R') 연결
- [0028] Y_b' = 디설파이드 (R-S-S-R') 연결
- [0029] 본 발명의 한 구체예에서, 세포-결합제와 이펙터 또는 리포터 분자의 티오에테르-연결된 접합체의 제조를 위한 공정이 기재되고, 이 공정은 다음 단계를 포함한다: a) 수성 용매, 유기 용매, 또는 혼합된 유기/수성 반응 혼합물에서 화학식 **X-L-Y**의 이중이작용성 링커를 티올-포함 이펙터 또는 리포터 분자 **C**(예를 들어, 메이탄시노이드 또는 방사성핵종)와 접촉시키는 단계, 이는 화학식 **X-L-Y'-C**의 중간 생성물을 산출함; b) 정제하지 않고 반응 혼합물을 항체(**Ab**)와 같은 세포-결합제와 혼합하여 화학식 **Ab-(X'-L-Y'-C)_m**의 접합체를 생성하는 단계, 여기서 L은 치환되거나 치환되지 않은 1-10 개의 탄소 원자를 보유하는 선형, 분지형 또는 환형 알킬, 알케닐, 또는 알킬닐기, 단순 또는 치환된 아릴 단위 (알킬, 알콕시, 할로젠, 니트로, 플루오로, 카르복시, 설포네이트, 포스페이트, 아미노, 카르보닐, 피페리디노에서 선택되는 치환기) 또는 폴리에틸렌 글리콜 포함 단위 (바람직하게는 1-500 PEG 스페이서, 또한 더욱 바람직하게는 1-24 PEG 스페이서, 또한 더욱더 바람직하게는 2-8 PEG 스페이서); **X** 및 **Y**는 N-하이드록시석신이미드 에스테르 및 말레이미드 또는 할로아세트아미드와 같은 아민 또는 티올-반응기이고; **Ab**는 항체이고; **m**은 1-20의 정수이고; **X'**은 항체와 반응 시 변형된 X 부위(예를 들어, 아미드 연결)이고; **Y'**은 예를 들어, 세포독성제 또는 방사성표지인 이펙터 또는 리포터 그룹과 반응 시 변형된 Y 부위(예를 들어, 티오에테르 연결)임; 및 c) 접선 흐름 여과, 투석, 또는 크로마토그래피(예를 들어, 겔 여과, 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피) 또는 이들의 조합에 의한 접합체의 정제 단계. 바람직하게는, Y는 말레이미드 또는 할로아세트아미드에서 선택되는 티올-반응기이다. 바람직하게는, L은 1-6 개의 탄소 또는 2-8 PEG 스페이서를 가지는 선형 또는 분지형 알킬기이다. 바람직하게는, C는 메이탄시노이드, CC-1065 유사체, 탁산, DNA-결합제에서 선택되는 세포독성제이고, 더욱 바람직하게는 메이탄시노이드이다.
- [0030] 화학식 1 및 2에서 나타나는 이러한 반응 시퀀스는:
- [0031] $X-L-Y + C \rightarrow X-L-Y'-C$ (1)
- [0032] $Ab + X-L-Y'-C(\text{반응 1로부터 미정제됨}) \rightarrow Ab-(X'-L-Y'-C)_m$ (2)
- [0033] 중간 생성물 **X-L-Y'-C**의 어떠한 정제도 포함하지 않고, 그러므로 이를 항체와 직접 혼합하는 장점을 제공하여 (미정제 중간 생성물이 항체에 첨가되거나, 항체가 미정제 중간 생성물에 첨가됨) 방법을 결합에 유리하게 만드는데, 성가신 정제 단계의 필요성을 제거하기 때문이다. 중요하게도, 이 방법은 전통적인 2 단계 반응 및 정제 시퀀스에 의하여 제조된 접합체에서 관찰되는 사슬 간 단백질 가교 및 비활성화 말레이미드 잔기와는 대조적으

로, 사슬 간 단백질 가교 또는 비활성화 말레이미드 잔기를 가지지 않는 동종 접합체를 산출한다.

[0034] 반응 1은 수성 용매, 유기 용매, 또는 유기/수성 반응 혼합물 중의 고농도의 이중이작용성 링커, X-L-Y, 및 이펙터 또는 리포터 그룹 C에서 수행되어, 전통적인 2 단계 반응 및 정제 시퀀스에 의하여 제조된 접합체에 대한 수성 용액 중의 더 낮은 농도보다 더 빠른 반응 속도를 야기할 수 있다.

[0035] 반응 1에서 생성된 중간 생성물 X-L-Y'-C는 냉동된 상태로 미정제되어, 저온에서 적절한 낮은 pH(예를 들어, pH ~4-6)의 수성 용매에, 유기 용매에, 또는 혼합된 유기/수성 혼합물에, 또는 동결건조된 상태로 연장된 기간 동안 저장될 수 있고, 나중에 최종 접합 반응을 위하여 약 4-9의 더 높은 pH 값에서 항체 용액과 혼합될 수 있어, 이 반응 시퀀스에 편리함을 더한다. 중간 생성물이 세포 결합체와 혼합하기 전 필요한 대로 유기 용매 또는 수성 완충제, 또는 유기 용매와 수성 완충제의 혼합물로써 희석될 수 있다. 수치와 관련하여 본 명세서에서 사용된 용어 "약"은 모든 숫자 및 이로부터의 작은 변동을 포함하여 이러한 모든 숫자를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 중간 생성물 X-L-Y'-C와 항체의 반응은 약 4 내지 약 pH 9의 pH 값에서, 바람직하게는 약 5 내지 8.7의 pH 범위에서, 더욱 바람직하게는 약 6.5 내지 약 8.5의 pH 범위에서, 예컨대 pH 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 및 8.5에서, 그 안의 pH 범위 또는 그로부터 약간의 변동에서 수행될 수 있다. 약 6.5 내지 8.5의 선호되는 pH 범위에서 항체와 중간 생성물 X-L-Y'-C의 반응에 사용되는 완충제는 포스페이트 및 HEPES 완충제와 같이 이 pH 범위 주위의 pKa 값을 가지는 완충제이다. 이러한 바람직한 완충제는 일차 또는 이차 아미노기, 또는 링커 X(예컨대 N-하이드록시석신이미드 에스테르)와 반응할 수 있는 다른 반응기를 가지지 않아야 한다.

[0036] 미정제 혼합물이 항체에 첨가되기 전에 모든 Y 기(예컨대 말레이미드)가 반응됨을 보장하도록 이중이작용성 링커 X-L-Y에 대하여 화학양론 또는 약간 과잉의 C가 첫 번째 반응에서 사용되었다. 퀀칭(quenching) 시약(예컨대 4-말레이미도부티르산, 3-말레이미도프로피온산, 또는 N-에틸말레이미드, 또는 아이오도아세트아미드, 또는 아이오도아세트아미도프로피온산)을 사용한 선택적인 추가 처리가 수행되어 임의의 미반응 C가 항체와 혼합하기 전에 퀀칭되어 천연 항체 디설파이드기와의 임의의 원하지 않는 티올-디설파이드 상호교환 반응을 최소화하는 것을 보장할 수 있다. 극성의 하전된 티올-퀀칭 시약(예컨대 4-말레이미도부티르산 또는 3-말레이미도프로피온산)으로 퀀칭하면, 과잉의 미반응 C가 공유적으로-연결된 접합체로부터 쉽게 분리될 수 있는 극성의 하전된 부가물로 전환된다. 선택적으로, 최종 반응 혼합물 2가 정제 전에 친핵체, 예컨대 아미노기 포함 친핵체(예를 들어, 라이신, 타우린, 하이드록실아민)로 처리되어 임의의 미반응 링커(X-L-Y'-C)를 퀀칭한다.

[0037] 메이탄시노이드(DMx) 및 이중이작용성 링커의 미정제 초기 반응 혼합물과 항체의 반응을 위한 대안 방법은 (DMx-링커 반응이 완료되면) DMx 및 이중이작용성 링커의 초기 반응 혼합물을 낮은 pH(pH ~5)에서 항체와 혼합하고 이어서 접합 반응을 위하여 pH를 약 6.5-8.5로 증가시키기 위하여 완충제 또는 염기를 첨가하는 것을 포함한다.

[0038] 이러한 새로운 방법이 세포독성 메이탄시노이드 약물과의 항체 접합체의 제조에 적용된다. 이 방법을 이용하여 제조된, 반응 시퀀스 1-2에 개략된 항체-메이탄시노이드 접합체는 예기치 않게도 환원 SDS-PAGE, 단백질 랩집 전기영동, 및 질량 분석법에 의한 특성결정에 기초하여, 전통적인 2 단계 반응 및 정제 시퀀스에 의하여 제조된 접합체에 비하여 동종성에 있어 훨씬 더 우수했다. 반응 시퀀스 1-2를 포함하는 본 발명에 기재된 접합 방법은 또한 임의의 중간 정제 단계를 필요로 하지 않고, 그러므로 전통적인 2-단계 방법보다 현저하게 더 편리하다.

[0039] 본 발명의 두 번째 구체예에서, 세포-결합체와 이펙터 또는 리포터 분자의 티오에테르-연결된 접합체의 제조를 위한 다음 단계를 포함하는 공정이 기재된다: a) 수성 용매, 유기 용매, 또는 혼합된 수성/유기 반응 혼합물에서 화학식 Y-L-Y의 동종이작용성 링커를 티올- 또는 아민-포함 이펙터 또는 리포터 그룹 C(예컨대 세포독성제)와 접촉시켜 Y-L-Y'-C를 산출하는 단계, b) 수성 용액 또는 수성/유기 혼합물에서 정제하지 않고 반응 혼합물을 항체와 혼합하여 화학식 Ab-(Y'-L-Y'-C)_m의 접합체를 생성하는 단계, 여기서 L은 앞에서 정의한 바와 같고; Y는 말레이미드 또는 할로아세트아미드, 또는 N-하이드록시석신이미드 또는 설포 N-하이드록시석신이미드와 같은 티올- 또는 아민-반응기이고; Ab는 항체이고; m은 1 내지 20의 정수이고; Y'은 항체와의 반응 시 변형된 Y 부위(예컨대 티오에테르 또는 아미드 연결) 또는 세포독성제 또는 이펙터 또는 리포터 그룹과의 반응 시 변형된 Y 부위(예컨대 티오에테르 또는 아미드 연결)임, 및 c) 접선 흐름 여과, 투석, 또는 크로마토그래피 (겔 여과, 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피) 또는 이들의 조합에 의한 접합체의 정제. 화학식 3 및 4에서 나타나는 반응 시퀀스는:

[0040] $Y-L-Y + C \rightarrow Y-L-Y'-C$ (3)

- [0041] $Ab + Y-L-Y'-C$ (반응 3으로부터 미정제됨) $\rightarrow Ab-(Y'-L-Y'-C)_m$ (4)
- [0042] 중간 생성물 $Y-L-Y'-C$ 의 어떠한 정제도 포함하지 않고, 그러므로 접합을 위하여 유리한 방법이다.
- [0043] 세 번째 구체예에서, 세포 결합제와 이펙터 또는 리포터 분자의 디설파이드-연결된 접합체의 제조를 위한 다음 단계로 구성되는 공정이 기재된다: a) 수성 용매, 유기 용매 또는 혼합된 유기/수성 반응 혼합물에서 이펙터 또는 리포터 그룹 C(예컨대 세포독성제)와 화학식 $X-L-Y_b$ 의 이중이작용성 링커를 접촉시켜 중간 생성물 $X-L-Y_b'-C$ 를 산출하는 단계; b) 수성 용액 또는 수성/유기 혼합물에서 정제하지 않고 반응 혼합물을 항체와 혼합하여 화학식 $Ab-(X'-L-Y_b'-C)_m$ 의 접합체를 생성하는 단계, 여기서 L은 앞에서 기재된 바와 같고; Y_b 는 피리딜 디설파이드 또는 니트로-피리딜 디설파이드와 같은 반응성 디설파이드이고; X는 *N*-하이드록시석신이미드 에스테르 또는 설포 *N*-하이드록시석신이미드 에스테르와 같은 아민-반응기이고; Ab는 항체이고; m은 1 내지 20의 정수이고; X'는 항체와의 반응 시 변형된 X 부위(예컨대 아마이드 연결)이고; Y_b' 는 세포독성제 또는 이펙터 또는 리포터 그룹과의 반응 시 변형된 Y_b 부위 디설파이드)임; c) 접선 흐름 여과, 투석, 또는 크로마토그래피 (겔 여과, 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피) 또는 이들의 조합에 의한 접합체의 정제. 화학식 5 및 6에서 나타나는 반응 시퀀스는:
- [0044] $X-L-Y_b + C \rightarrow X-L-Y_b'-C$ (5)
- [0045] $Ab + X-L-Y_b'-C$ (반응 5로부터 미정제됨) $\rightarrow Ab-(X-L-Y_b'-C)_m$ (6)
- [0046] 네 번째 구체예에서, 두 가지 유형의 링커 - 비분열성(티오에테르 연결) 및 분열성(디설파이드 연결)을 사용하는, 다음 단계를 포함하는 항체와 이펙터 또는 리포터 그룹의 접합체 제조 공정이 기재된다: a) $X-L-Y$ 및 $X-L-Y_b$ 링커를 세포독성제 C와 접촉시켜 화학식 $X-L-Y'-C$ 및 $X-L-Y_b'-C$ 의 중간 화합물을 생성하는 단계, b) 반응식 7-9에 명시되는 바와 같이 정제하지 않고 반응 혼합물을 항체와 연속으로 또는 동시에 혼합하여:
- [0047] $X-L-Y + C \rightarrow X-L-Y'-C$ (7)
- [0048] $X-L-Y_b + C \rightarrow X-L-Y_b'-C$ (8)
- [0049] $Ab + X-L-Y'-C + X-L-Y_b'-C$ (7-8로부터 미정제됨)
- [0050] $\rightarrow Ab-(X'-L-Y'-C)_m(X'-L-Y_b'-C)_{m'}$ (9)
- [0051] $Ab-(X'-L-Y'-C)_m(X'-L-Y_b'-C)_{m'}$ 을 생성하는 단계, 여기서 X, L, Y', C, Y_b' , 및 m의 정의는 위에 주어진 것과 같고, m'은 1 내지 20의 정수임; 및 c) 접선 흐름 여과, 투석, 또는 크로마토그래피 (겔 여과, 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피) 또는 이들의 조합에 의한 접합체의 정제. 이러한 두 가지의 링커 이펙터 중간체($X-L-Y'-C$ 및 $X-L-Y_b'-C$)가 정제하지 않고 여러 상이한 순서로 (먼저 $X-L-Y'-C$ 이후 $X-L-Y_b'-C$, 또는 먼저 $X-L-Y_b'-C$ 이후 $X-L-Y'-C$ 또는 동시에) 다양한 비율로 항체와 혼합된다.
- [0052] 반응 1, 3, 5, 및 7-8은 수성 용매, 유기 용매, 또는 유기/수성 반응 혼합물 중의 고농도의 이작용성 링커 ($X-L-Y$, $X-L-Y_b$, 또는 $Y-L-Y$) 및 이펙터 또는 리포터 그룹 C에서 수행되어 시약의 용해도가 제한되는 전통적인 2 단계 반응 및 정제 시퀀스에 의하여 제조된 접합체에 대한 수성 용액 중 더 낮은 농도에서보다 더 빠른 반응 속도를 야기할 수 있다.
- [0053] 반응 1, 3, 5, 및 7-8에서 생성된 중간 생성물 $X-L-Y'-C$, 또는 $Y-L-Y'-C$, 또는 $X-L-Y_b'-C$ 는 냉동된 상태로 미정제되어, 저온에서 적절한 pH의 수성 용매에, 유기 용매에, 또는 혼합된 유기/수성 혼합물에, 또는 동결건조된 상태로 연장된 기간 동안 저장될 수 있고, 나중에 최종 접합 반응을 위하여 항체 용액에 첨가될 수 있어, 이 반응 시퀀스에 편리함을 더한다.
- [0054] 미정제 혼합물이 항체에 첨가되기 전에 모든 Y 기(예컨대 말레이미드)가 반응됨을 보장하도록 이중이작용성 링커 $X-L-Y$, 또는 $Y-L-Y$, 또는 $X-L-Y_b$ 에 대하여 화학양론 또는 약간 과잉의 C가 첫 번째 반응에서 사용되었다. 퀴칭 시약(예컨대 4-말레이미도부티르산, 또는 3-말레이미도프로피온산, 또는 *N*-에틸말레이미드, 또는 아이오도아세트아미드, 또는 아이오도아세트산)을 사용한 선택적인 추가 처리가 수행되어 C의 임의의 미반응 기(예컨대 티올)가 항체에 첨가하기 전에 퀴칭되어 천연 항체 디설파이드기와의 임의의 원하지 않는 티올-디설파이드 상호교

환 반응을 최소화하는 것을 보장할 수 있다. C와 이작용성 링커의 초기 반응 후, 하전된 극성의 티올-퀀칭 시약을 이용하는 과잉 C의 퀀칭이, 과잉 C를 겔 여과, 투석, 또는 TFF에 의하여 공유적으로-연결된 접합체로부터 쉽게 분리될 수 있는 매우 극성이고 수용성인 부가물로 전환한다. 최종 접합체 생성물은 임의의 비-공유결합적 연결된 C를 포함하지 않는다. 선택적으로, 정제 전에 최종 반응 혼합물 **2**, **4**, **6**, 및 **9**가, 아미노기 포함 친핵체 (예를 들어, 라이신, 타우린, 하이드록실아민)와 같은 친핵체로 처리되어 임의의 미반응 링커(X-L-Y'-C, Y-L-Y'-C, 또는 X-L-Y_b'-C)를 퀀칭한다.

[0055] DMx 및 이작용성 링커의 미정제 초기 반응 혼합물과 항체의 대안의 반응 방법은 낮은 pH(pH ~5)에서 DMx 및 이작용성 링커의 초기 반응 혼합물(DMx-링커 반응의 완료 시)과 항체의 혼합에 이어 접합 반응을 위하여 pH를 약 6.5-8.5로 증가시키기 위한 완충제 또는 염기의 첨가를 포함한다.

[0056] 정제 없이 둘 이상의 상이한 이펙터로부터 유도된 둘 이상의 링커-이펙터 그룹 중간체를 항체에 연속으로 또는 동시에 첨가하여, 하나 이상 유형의 이펙터 그룹의 다중 복사체가 항체에 접합될 수 있다.

[0057] **이펙터 그룹(들)**

[0058] 용어 이펙터 그룹 또는 이펙터 분자는 용어 본 명세서에서 사용된 "**이펙터 그룹(들)**" 또는 "이펙터 분자(들)"와 상호교환적으로 사용되고, 세포독성제를 포함하도록 의도된다. 특정 관점에서, 이펙터 그룹 또는 분자가 다양한 길이의 스페이서 팔에 의하여 부착되어 잠재적인 입체 장애를 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 정제 없이 둘 이상의 상이한 이펙터로부터 유도된 둘 이상의 링커-이펙터 그룹 중간체를 항체에 연속으로 또는 동시에 첨가하여, 하나 이상 유형의 이펙터 그룹의 다중 복사체가 항체에 결합될 수 있다.

[0059] 본 발명에서 사용될 수 있는 세포독성제는 화학요법제 또는 화학요법제의 구조적 유사체를 포함한다. "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화합물이다. 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예컨대 티오테과 및 사이클로포스파미드 (CYTOXANTM); 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로셀판 및 피로셀판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 메틸라멜라민 및 에틸렌이민; 아세토제닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레센, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CBI-TMI 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코닥티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나프진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤펜, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 엔다인 항생제 (예를 들어 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신.감마1 및 칼리키아미신 세트 I, 예를 들어, Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994) 참조; 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오킴지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 엔다인 항생 발색단), 아클라시노마이신, 액티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린; 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-1-노르류신, 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 니토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페프로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예컨대 메토평렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시딘, 6-아자우리딘, 카르모피, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코사이드; 아미노레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포미딘; 엘립티늄 아세테이트; 에포티론; 에토글루시트; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토잔트론; 모피다물; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카르바진; PSK ; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨;

미토라클; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파크리탁셀 (TAXOL, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 및 독세탁셀 (TAXOTERE, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실; 잼시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 플래티늄 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 플래티늄; 에토포사이드 (VP-16); 이포스파마이드; 미토마이신 C; 미토잔트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머레이즈 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미타인(DMFO); 레티노산; 카페시타빈; 및 상기한 것의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다. 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예컨대 예를 들어 타목시펜, 랄록시펜, 아로마테이즈 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY1 17018, 오나프리스톤, 및 토레미펜 (파레스톤)을 포함하는 항-에스트로겐; 및 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤라이드, 및 고세렐린; siRNA 및 상기한 것의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 또한 이 정의에 포함된다. 본 발명에서 사용될 수 있는 다른 화학요법제가 미국 공개공보 제20080171040호 또는 미국 공개공보 제20080305044호에 개시되고, 이들의 전체가 참조로 포함된다.

[0060] 바람직한 구체예에서, 화학요법 세포독성제는 본질적으로 소형 분자 세포독성제이다. "소형 분자 약물"은 예를 들어 100 내지 1500, 더욱 적절하게는 120 내지 1200, 바람직하게는 200 내지 1000의 분자량을 가질 수 있는 유기, 무기, 또는 유기금속 화합물을 지칭하기 위하여 본 명세서에서 광범하게 사용되고, 전형적으로는 약 1000 미만의 분자량을 가진다. 본 발명의 소형 분자 세포독성제는 약 1000 미만의 분자량을 가지는 올리고핵타이드 및 다른 생분자를 포괄한다. 소형 분자 세포독성제는 당해 분야에, 특히 예컨대 W005058367A2, 유럽 특허 출원 공보 제85901495호 및 제8590319호, 및 미국 특허 제4,956,303호에 특성이 잘 기술되고, 이들의 전체가 참조로 포함된다.

[0061] 바람직한 소형 분자 세포독성제는 세포-결합제에 대한 연결을 허용하는 것이다. 본 발명은 공지 세포독성제 뿐만 아니라 공지될 수 있는 세포독성제를 포함한다. 특히 바람직한 소형 분자 세포독성제는 세포독성제를 포함한다.

[0062] 세포독성제는 세포의 사멸을 야기하거나, 세포 사멸을 유발하거나, 일부 방식에서 세포 생존력을 감소시키는 임의의 화합물일 수 있고, 여기서 각각의 세포독성제는 티올 모이어티를 포함한다.

[0063] 바람직한 세포독성제는 메이탄시노이드 화합물, 탄산 화합물, CC-1065 화합물, 다우노루비신 화합물 및 독소루비신 화합물, 피롤로벤조디아제핀 이합체, 칼리키아마이신, 아우리스타틴 및 이들의 유사체 및 유도체이고, 이들 중 일부가 아래에 설명된다.

[0064] 반드시 소형 분자인 것은 아닌 siRNA와 같은 다른 세포독성제가 또한 본 발명의 범위 내에 포괄된다. 예를 들어, siRNA가 올리고뉴클레오타이드의 변형에 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 본 발명의 가교제에 연결될 수 있다 (예를 들어 미국 특허 공개공보 제20050107325호 및 제20070213292호 참조). 따라서 3' 또는 5'-포스포로미다이트 형태의 siRNA가 하이드록실 작용기를 보유하는 가교제의 한 말단과 반응하여 siRNA와 가교제 사이에 에스테르 결합을 제공한다. 유사하게 siRNA 포스포라미다이트와 말단 아미노기를 보유하는 가교제의 반응이 아민을 통하여 siRNA에 대한 가교제의 연결을 야기한다. siRNA는 미국 특허 공개공보: 제20070275465호, 제20070213292호, 제20070185050호, 제20070161595호, 제20070054279호, 제20060287260호, 제20060035254호, 제20060008822호, 제20050288244호, 제20050176667호에 상세히 기재되고, 이들은 본 명세서에 전체가 참조로 포함된다.

[0065] *메이탄시노이드*

[0066] 본 발명에서 사용될 수 있는 메이탄시노이드는 당해 분야에 공지이고, 공지 방법에 따라 천연 공급원으로부터 분리될 수 있거나 공지 방법에 따라 합성적으로 제조될 수 있다.

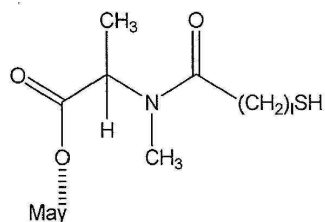
[0067] 적절한 메이탄시노이드의 예에는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체가 포함된다. 적절한 메이탄시놀 유사체의 예에는 변형된 방향족 고리를 가지는 것 및 다른 위치에서 변형된 것이 포함된다.

[0068] 변형된 방향족 고리를 가지는 메이탄시놀의 적절한 유사체의 구체적인 예에는 다음이 포함된다:

[0069] (1) C-19-테클로로 (미국 특허 제4,256,746호) (안사미토신 P2의 LAH 환원에 의하여 제조됨);

[0070] (2) C-20-하이드록시 (또는 C-20-테메틸) +/-C-19-테클로로 (미국 특허 제4,361,650호 및 제4,307,016호) (스트렙토마이신 또는 액티노마이신을 이용하는 탈메틸화 또는 LAH를 이용하는 탈염소화에 의하여 제조됨); 및

- [0071] (3) C-20-테메톡시, C-20-아실옥시 ($-\text{OCOR}$), +/-테클로로 (미국 특허 제4,294,757호) (아실 염화물을 이용하는 아실화에 의하여 제조됨).
- [0072] 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀의 적절한 유사체의 구체적인 예에는 다음이 포함된다:
- [0073] (1) C-9-SH (미국 특허 제4,424,219호) (메이탄시놀과 H_2S 또는 P_2S_5 의 반응에 의하여 제조됨);
- [0074] (2) C-14-알콕시메틸 (테메톡시/ CH_2OR) (미국 특허 제4,331,598호);
- [0075] (3) C-14-하이드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH_2OH 또는 CH_2OAc) (미국 특허 제4,450,254호) (*Nocardia*로부터 제조됨);
- [0076] (4) C-15-하이드록시/아실옥시 (미국 특허 제4,364,866호) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 전환에 의하여 제조됨);
- [0077] (5) C-15-메톡시 (미국 특허 제4,313,946호 및 제4,315,929호) (활도수(*Trewia nudiflora*)로부터 분리됨);
- [0078] (6) C-18-N-테메틸 (미국 특허 제4,362,663호 및 제4,322,348호) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의하여 제조됨); 및
- [0079] (7) 4,5-테옥시 (미국 특허 제4,371,533호) (메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의하여 제조됨).
- [0080] 본 발명에서 유용한 티올-포함 메이탄시노이드의 합성이 미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호, 및 미국 특허 공개공보 제20040235840호에 완전히 개시된다.
- [0081] C-3 위치, C-14 위치, C-15 위치 또는 C-20 위치에서 티올 모이어티를 가지는 메이탄시노이드는 모두 유용할 것으로 기대된다. C-3 위치가 바람직하고 메이탄시놀의 C-3 위치가 특히 바람직하다. 또한 N-메틸-알라닌-포함 C-3 티올 모이어티 메이탄시노이드, 및 N-메틸-시스테인-포함 C-3 티올 모이어티 메이탄시노이드, 및 각각의 유사체가 바람직하다.
- [0082] 본 발명에서 유용한 N-메틸-알라닌-포함 C-3 티올 모이어티 메이탄시노이드 유도체의 구체적인 예는 화학식 **M1**, **M2**, **M3**, **M6** 및 **M7**에 의하여 나타난다.



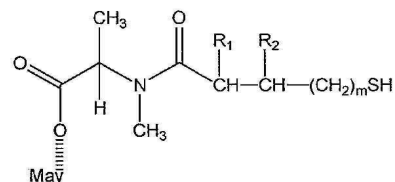
[0083]

[0084] **M1**

[0085] 여기서:

[0086] l 은 1 내지 10의 정수이고;

[0087] May는 메이탄시노이드이다.



[0088]

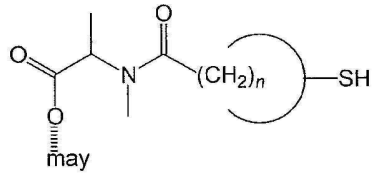
[0089] **M2**

[0090] 여기서:

[0091] R_1 및 R_2 는 H, CH_3 또는 CH_2CH_3 이고, 동일하거나 상이할 수 있고;

[0092] m 은 0, 1, 2 또는 3이고;

[0093] May은 메이탄시노이드이다.



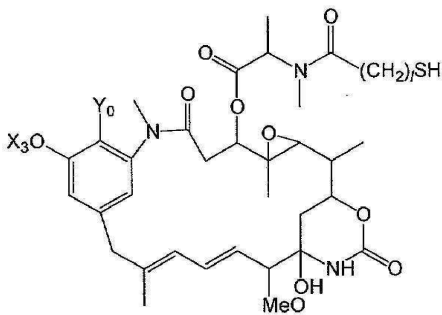
[0094]

[0095] **M3**

[0096] 여기서:

[0097] n 은 3 내지 8의 정수이고;

[0098] May는 메이탄시노이드이다.



[0099]

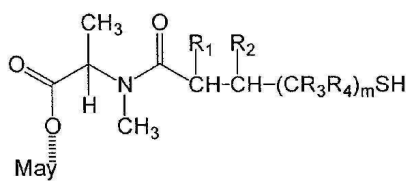
[0100] **M6**

[0101] 여기서:

[0102] l 은 1, 2 또는 3이고;

[0103] Y_0 은 Cl 또는 H이고;

[0104] X_3 는 H 또는 CH_3 이다.



[0105]

[0106] **M7**

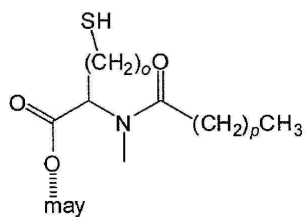
[0107] 여기서:

[0108] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 는 H, CH_3 또는 CH_2CH_3 이고, 동일하거나 상이할 수 있고;

[0109] m 은 0, 1, 2 또는 3이고;

[0110] May는 메이탄시노이드이다.

[0111] 본 발명에 유용한 N-메틸-시스테인-포함 C-3 티올 모이어티 메이탄시노이드 유도체의 구체적인 예가 화학식 **M4** 및 **M5**에 의하여 나타난다.



[0112]

[0113]

M4

[0114]

여기서:

[0115]

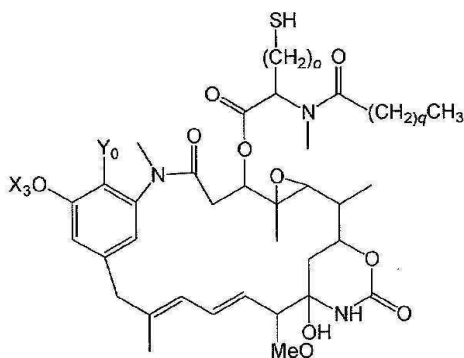
o 는 1, 2 또는 3이고;

[0116]

p 는 0 내지 10의 정수이고;

[0117]

May는 메이탄시노이드이다.



[0118]

[0119]

M5

[0120]

여기서:

[0121]

o 는 1, 2 또는 3이고;

[0122]

q 는 0 내지 10의 정수이고;

[0123]

Y_0 는 Cl 또는 H이고;

[0124]

X_3 는 H 또는 CH_3 이다.

[0125]

바람직한 메이탄시노이드는 미국 특허 제5,208,020호; 제5,416,064호; 제6,333,410호; 제6,441,163호; 제6,716,821호; 제RE39,151호 및 제7,276,497호에 기재된 것이다.

[0126]

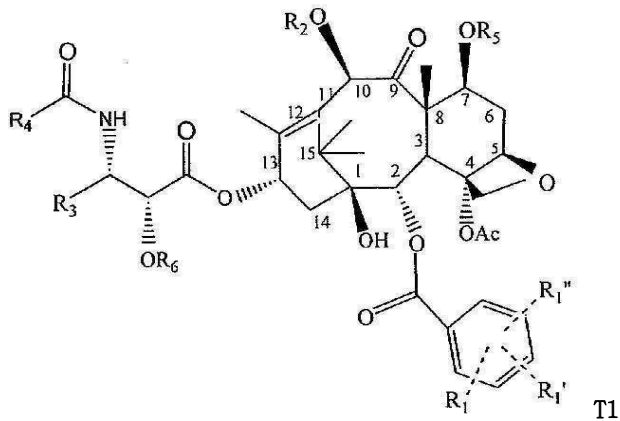
탄산

[0127]

본 발명에 따른 세포독성제는 또한 탄산일 수 있다.

[0128]

본 발명에서 사용될 수 있는 탄산은 티올 모이어티를 포함하도록 변형되었다. 본 발명에서 유용한 일부 탄산은 아래 나타나는 화학식 **T1**을 가진다:



[0129]

[0130]

바람직한 탁소이드는 미국 특허 제6,340,701호; 제6,372,738호; 제6,436,931호; 제6,596,757호; 제6,706,708호; 제7,008,942호; 제7,217,819호 및 제7,276,499호에 기재된 것이다.

[0131]

CC-1065 유사체

[0132]

본 발명에 따른 세포독성제는 또한 CC-1065 유사체일 수 있다.

[0133]

본 발명에 따르면, CC-1065 유사체는 A 아단위 및 B 또는 B-C 아단위를 포함한다. 바람직한 CC-1065 유사체는 미국 특허 제5,475,092호; 제5,595,499호; 제5,846,545호; 제6,534,660호; 제6,586,618호; 제6,756,397호 및 7,049,316호에 기재된 것이다.

[0134]

다우노루비신/독소루비신 유사체

[0135]

본 발명에 따른 세포독성제는 또한 다우노루비신 유사체 또는 독소루비신 유사체일 수 있다.

[0136]

본 발명의 다우노루비신 및 독소루비신 유사체는 티올 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. 티올 모이어티를 가지는 본 발명의 변형된 독소루비신/다우노루비신 유사체가 WO 01/38318에 기재된다. 변형된 독소루비신/다우노루비신 유사체가 공지 방법에 따라 합성될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,146,064호 참조).

[0137]

아우리스타틴은 아우리스타틴 E, 아우리스타틴 EB(AEB), 아우리스타틴 EFP(AEFP), 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)를 포함하고, 미국 특허 제5,635,483호, Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999); Molecular Cancer Therapeutics, vol. 3, No. 8, pp. 921-932 (2004); 미국 특허 출원공보 제11/134826호, 미국 특허 공개공보 제20060074008호, 제2006022925호에 기재된다.

[0138]

본 발명에 따른 세포독성제에는 당해 분야에 공지인 (미국 특허 제7,049,311호; 제7,067,511호; 제6,951,853호; 제7,189,710호; 제6,884,799호; 제6,660,856호) 피롤로벤조디아제핀 이합체가 포함된다.

[0139]

유사체 및 유도체

[0140]

세포독성제 분야의 당업자는 본 명세서에 기재된 세포독성제 각각이, 결과적인 화합물이 출발 화합물의 특이성 및/또는 활성을 여전히 유지하는 방식으로 변형될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 당업자는 또한 이러한 화합물 중 다수가 본 명세서에 기재된 세포독성제 대신에 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 세포독성제는 본 명세서에 기재된 화합물의 유사체 및 유도체를 포함한다.

[0141]

리포터 그룹(들)

[0142]

용어 리포터 그룹 또는 리포터 분자는 상호교환적으로 사용되고, 본 명세서에서 사용된 용어 "리포터 그룹(들)" 또는 "리포터 분자(들)"는 진단 또는 치료 목적을 위하여 시약의 특이적 친화성 부분에 의하여 특이적 물질 또는 세포에 전달되는 물질을 지칭하고; 상기 진단 또는 치료 목적의 예는 방사성동위원소, 상자성(paramagnetic) 조영제, 및 항암제이다. 다양한 표지 또는 리포터 그룹이 암 환자에서의 종양-영상화 적용분야, 다양한 질환의 진단을 위한 면역검사 적용분야, 방사성 핵종-리간드 접합체를 이용하는 암 치료법, 및 단백질, 펩타이드, 및 올리고뉴클레오타이드와 같은 생활성 작용제의 정제를 위한 친화성 크로마토그래피 적용분야에 유용하다. 세포-결합제와 접합되는 표지 또는 리포터 그룹에는 형광단, 및 친화성 표지, 예컨대 바이오틴이 포함된다. 이러한 리포터 그룹 참조는 미국 특허 공개공보 제2007/0092940호에서 찾을 수 있다. 예를 들어 바이오틴 또는 플루오레세인을 포함하는 리포터 그룹은 또한 PEG 접합체 모이어티에 부착될 수 있다. 다수의 적절한 리포터 그룹이 당해 분야, 예를 들어, 미국 특허 제4,152,411호 및 Hirschfeld 미국 특허 제4,166,105호, 미국 특허

제5,223,242호, 미국 특허 제5,501,952호, 미국 특허 공개공보 제20090136940호에 공지이고, 이들의 전체가 참조로 포함된다.

[0143] 링커

[0144] 접합체는 시험관 내 방법에 의하여 제조될 수 있다. 약물을 세포-결합체에 연결시키기 위하여, 연결 그룹(linking group)이 사용된다. 적절한 연결 그룹이 당해 분야에 공지이고 비분열성 또는 분열성 링커를 포함한다. 비분열성 링커는 세포독성제를 세포-결합체에 안정한 공유적 방식으로 연결시킬 수 있는 임의의 화학적 모이어티이다. 비분열성 링커는 산-유발 분열, 광-유발 분열, 펩티다이즈-유발 분열, 에스테레이즈-유발 분열, 및 디설파이드 결합 분열에 실질적으로 내성이다. 비분열성 링커의 예에는 약물, 리포터 그룹 또는 세포 결합체와의 반응을 위하여 N-석신이미딜 에스테르, N-설포석신이미딜 에스테르 모이어티, 말레이미도- 또는 할로아세틸-기초 모이어티를 가지는 링커가 포함된다. 말레이미도-기초 모이어티를 포함하는 가교 시약에는 N-석신이미딜 4-(말레이미도메틸)-사이클로헥산카르복실레이트(SMCC), SMCC의 "장쇄" 유사체(LC-SMCC)인 N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)-사이클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트), K-말레이미도운데칸산 N-석신이미딜 에스테르(KMUA), γ -말레이미도부티르산 N-석신이미딜 에스테르(GMBS), ϵ -말레이미도카프로산 N-하이드록시석신이미드 에스테르(EMCS), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르(MBS), N-(α -말레이미도아세트옥시)-석신이미드 에스테르(AMAS), 석신이미딜-6-(β -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트(SMPH), N-석신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-부티레이트(SMPB), 및 N-(p-말레이미도페닐)이소시아네이트(PMPI)가 포함된다. 할로아세틸-기초 모이어티를 포함하는 가교 시약에는 N-석신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), N-석신이미딜 아이오도아세테이트(SIA), N-석신이미딜 브로모아세테이트(SBA), 및 N-석신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트(SBAP)가 포함된다.

[0145] 비분열성 링커를 형성하는, 황 원자가 결핍된 다른 가교 시약이 또한 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 이러한 링커는 디카르복실산 기초 모이어티로부터 유도될 수 있다. 적절한 디카르복실산 기초 모이어티에는, 아래 나타나는 일반식의 α, ω -디카르복실산이 포함되지만 이에 제한되지 않고:

[0146] $\text{HOOC-X}_l\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$

[0147] 여기서 X는 2 내지 20 개의 탄소 원자를 가지는 선형 또는 분지형 알킬, 알케닐, 또는 알키닐기이고, Y는 3 내지 10 개의 탄소 원자를 보유하는 사이클로알킬 또는 사이클로알케닐기이고, Z는 6 내지 10 개의 탄소 원자를 보유하는 치환되거나 치환되지 않는 방향족 기, 또는 헤테로 원자가 N, O 또는 S에서 선택되는 치환되거나 치환되지 않은 헤테로환형 기이고, l, m, 및 n은 각각 0 또는 1이고, 단서 조건으로 l, m, 및 n이 동시에 모두 영이 아니다.

[0148] 본 명세서에 개시된 비분열성 링커 중 다수가 미국 특허 공개공보 제20050169933호에 상세히 기재된다.

[0149] 분열성 링커는 온화한 조건, 즉 세포독성제의 활성이 영향받지 않는 조건하에 분열될 수 있는 링커이다. 많은 공지 링커가 이 카테고리에 속하고 아래에 기재된다.

[0150] 산-분해성 링커는 산성 pH에서 분열성인 링커이다. 예를 들어, 엔도솜 및 라이소솜과 같은 특정 세포 내 구획이 산성 pH(pH 4-5)를 가지고, 산-분해성 링커를 분열시키기에 적절한 조건을 제공한다.

[0151] 광-분해성인 링커는 신체 표면 및 빛에 접근 가능한 신체 공동에서 유용하다. 더욱이, 적외선이 조직을 관통할 수 있다.

[0152] 일부 링커가 펩티다이즈에 의하여 분열될 수 있다. 단지 특정 펩타이드만이 세포 내부 또는 외부에서 쉽게 분열되는데, 예를 들어 Trouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982), Umamoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989), 및 리소솜-하이드롤레이즈 분열성 발린-시트룰린 연결(미국 특허 제6,214,345 B1호)를 참조하라. 더욱이, 펩타이드는 화학적으로 한 아미노산의 카르복실레이트와 두 번째 아미노산의 .알파.-아미노기 사이의 아미드 결합인 펩타이드 결합 및 .알파.-아미노산으로 구성된다. 카르복실레이트와 라이신의 .엡실론.-아미노기 사이의 결합과 같은 다른 아미드 결합은, 펩타이드 결합으로 이해되지 않고 비분열성으로 간주된다.

[0153] 일부 링커가 에스테레이즈에 의하여 분열될 수 있다. 또한 단지 특정 에스테르만이 세포 내부 또는 외부에 존재하는 에스테레이즈에 의하여 분열될 수 있다. 에스테르는 카르복실산과 알코올의 축합에 의하여 형성된다. 단순 에스테르는 지방족 알코올과 같은 단순 알코올과 소형 환형 및 소형 방향족 알코올을 사용하여 생성된 에스테르이다. 예를 들어, 본 발명의 발명자들은 메이탄신의 C-3에서 에스테르를 분열시키는 에스테레이즈를 발견하지

못했는데, 에스테르의 알코올 성분인 메이탄시놀이 매우 크고 복잡하기 때문이다.

- [0154] 바람직한 분열성 링커 분자에는 예를 들어, N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP) (예를 들어, Carlsson et al, Biochem. J, 173: 723-737 (1978) 참조), N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) (예를 들어, 미국 특허 제4,563,304호 참조), N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP) (예를 들어, CAS 등록 번호 341498-08-6 참조), 및 전체가 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,913,748호에 기재되는 것과 같은 다른 반응성 가교제가 포함된다.
- [0155] 본 발명에서 사용될 수 있는 다른 링커는 하전된 링커 또는 친수성 링커를 포함하고, 미국 특허 출원공보 제 12/433,604호 및 제12/433,668호 각각에 기재되며, 이들은 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0156] **세포 결합제**
- [0157] 본 발명에서 사용된 세포-결합제는 암 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단백질(예를 들어, 면역글로불린 및 비-면역글로불린 단백질)이다. 이러한 세포-결합제는 다음을 포함한다:
- [0158] -다음을 포함하는 항체:
- [0159] -표면처리된(resurfaced) 항체 (미국 특허 제5,639,641호);
- [0160] -인간화 또는 완전 인간 항체 (인간화 또는 완전 인간 항체는 huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CD38, IGF-IR, CNTO 95, B-B4, 트라스투주맵, 비바투주맵, 시브로투주맵, 및 리툽시맵에서 선택되지만 이에 제한되지 않는다 (예를 들어, 미국 특허 제5,639,641호, 제5,665,357호, 및 제7,342,110호, 국제 특허 출원 제WO 02/16,401호, 미국 특허 공개공보 제20060045877호, 미국 특허 공개공보 제20060127407호, 미국 특허 공개공보 제20050118183호, Pedersen et al, (1994) *J. Mol. Biol.* **235**, 959-973, Roguska et al., (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 91, 969-973, Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al, *Eur. J. Cancer*, **31A**: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol*, 12: 1193-1203 (1994), and Maloney et al., *Blood*, 90: 2188-2195 (1997) 참조); 및
- [0161] - 표적 세포에 선호적으로 결합하는 sFv, Fab, Fab', 및 F(ab')₂와 같은 항체의 단편 (Parham, J. *Immunol.* 131:2895-2902 (1983); Spring et al, J. *Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960));
- [0162] 추가적인 세포-결합제는 다음으로 예시되지만 이에 제한되지 않는 다른 세포 결합 단백질 및 폴리펩타이드를 포함한다:
- [0163] -안키린 반복 단백질 (DARPs; Zahnd et al., J. Biol. Chem., 281, 46, 35167-35175, (2006); Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23, 1257-1268) 또는 예를 들어, 미국 특허 공개 공보 제20070238667호; 미국 특허 제7,101,675호; WO/2007/147213; WO/2007/062466에 기재된 안키린-유사 반복 단백질 또는 합성 펩타이드);
- [0164] - 인터페론 (예를 들어 α , β , γ);
- [0165] - 림포카인, 예컨대 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- [0166] - 호르몬, 예컨대 인슐린, TRH(티로트로핀 방출 호르몬), MSH(멜라닌세포-자극 호르몬), 안드로겐 및 에스트로겐과 같은 스테로이드 호르몬; 및
- [0167] - 성장 인자 및 집락 자극 인자, 예컨대 EGF, TGF- α , IGF-1, G-CSF, M-CSF 및 GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984)).
- [0168] 세포 결합제가 항체인 경우, 이는 막통과 분자 (예를 들어 수용체) 또는 리간드, 예컨대 성장 인자일 수 있고 폴리펩타이드인 항원에 결합한다. 대표적인 항원에는 분자, 예컨대 레닌; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬을 포함하는 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 난포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 vmc, 인자 IX, 조직 인자(TF), 및 폰 빌레브란트 인자; 항-응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방 이노 인자; 폐 표면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키네이스 또는 인간 소면 또는 조직-형 플라스미노겐 활성화제(t-PA); 보메신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 엔케팔리네이즈; RANTES(발현되고 분비되는 T-세포 활성화시 정상적으로 조절됨); 인간 대식세포 염증성 단백질(MIP-1-알파); 혈

청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 필러-억제 물질; 틸렉신 A-사슬; 틸렉신 B-사슬; 프로틸렉신; 마우스 고나도트로핀-관련 펩타이드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타메이즈; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련 항원 (CTLA), 예컨대 CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 상피 성장 인자(VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 골 유래 신경영양 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6(NT-3, NT4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 NGF- β 과 같은 신경 성장 인자; 혈소판 유래 성장 인자(PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 상피 성장 인자(EGF); 전환 성장 인자(TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, 또는 TGF- β 5를 포함하는 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); 데스(1-3)-IGF-I (또는 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 및 CD40; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 뼈 형성 단백질(BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 집락 자극 인자 (CSF), 예를 들어, M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF; 인터루킨 (ILs), 예를 들어, IL-1 내지 IL-10; 수퍼옥사이드 디스뮤티레이즈; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 예를 들어, HIV 피막의 일부와 같은 바이러스성 항원; 수송 단백질; 귀환 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예컨대 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM, 이중이합 인간 인테그린 수용체의 알파-V 아단위; 종양 관련 항원, 예컨대 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 및 앞에서 나열된 폴리펩타이드의 단편이 포함된다.

[0169] 본 발명에 포함되는 항체를 위한 바람직한 항원에는 CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, 및 CD46; ErbB 수용체 군의 일원, 예컨대 EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 세포 접착 분자, 예컨대 LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, 알파4/베타7 인테그린, 및 알파 또는 베타 아단위를 포함하는 알파 v/베타3 인테그린(예를 들어 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 성장 인자, 예컨대 VEGF; 조직 인자 (TF); TGF- β ; 알파 인터페론 (알파-IFN); 인터루킨, 예컨대 IL-8; IgE; 혈액형 항원 Apo2, 사망 수용체; flk2/flt3 수용체; 비만(OB) 수용체; mpl 수용체; CTLA-4; 단백질 C 등이 포함된다. 이 중에서 가장 바람직한 표적은 IGF-IR, CanAg, EGF-R, EphA2, MUC1, MUC 16, VEGF, TF, CD 19, CD20, CD22, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD138, CA6, Her2/neu, CRIPTO (대부분의 인간 유방암 세포에서 상승된 수준으로 생성되는 단백질), 알파 v/베타3 인테그린, 알파 v/베타5 인테그린, TGF- β , CD11a, CD 18, Apo2 및 C24이다.

[0170] 단일클론 항체 기법은 단일클론 항체 형태의 특이적 세포-결합체의 제조를 허용한다. 관심 항원, 예컨대 완전 (intact) 표적 세포, 표적 세포로부터 분리된 항원, 전체 바이러스, 약독화(attenuated) 전체 바이러스, 및 바이러스 코트 단백질과 같은 바이러스 단백질로써 마우스, 래트, 햄스터 또는 임의의 다른 포유류 면역화하여 제조된 단일클론 항체를 생성하기 위한 기법이 당해 분야에 특히 공지이다. 민감화 인간 세포가 또한 사용될 수 있다. 단일클론 항체를 생성하는 또 다른 방법은 sFv(단일 사슬 가변 영역), 특히 인간 sFv의 파지 라이브러리 사용이다 (예를 들어, Griffiths et al, 미국 특허 제5,885,793호; McCafferty et al, WO 92/01047; Liming et al, WO 99/06587 참조)

[0171] 적절한 세포-결합체의 선택은 표적화될 특정 세포 군집에 의존하는 선택의 문제이지만, 적절한 것이 입수 가능하면 일반적으로 선호적으로 표적 세포에 결합하는 단일클론 항체 및 이의 단편이 바람직하다.

[0172] 예를 들어, 단일클론 항체 My9는 급성 골수성 백혈병(AML) 세포에서 발견되는 CD33 항원에 특이적이고 (Roy et al. *Blood* 77:2404-2412 (1991)), AML 환자 치료에 사용될 수 있는 쥐 IgG_{2a} 항체이다. 유사하게, 단일클론 항체 항-B4는 B 세포 상의 CD 19 항원에 결합하고 (Nadler et al, *J. Immunol.* 131:244-250 (1983)), 표적 세포가 비호지킨 림프종 또는 만성 림프성 백혈병에서와 같이 이러한 항원을 발현하는 병든 세포 또는 B 세포일 경우 사용될 수 있는 쥐 IgG₁이다. 유사하게, 항체 N901은 소세포 폐 암종 세포 및 신경내분비 기원의 다른 종양 세포에서 발견되는 CD56에 결합하는 쥐 단일클론 IgG₁ 항체 (Roy et al. *J Nat. Cancer Inst.* 88:1136-1145 (1996)), CanAg 항원에 결합하는 huC242 항체, HER2/neu에 결합하는 트라스투주맙, 및 EGF 수용체에 결합하는 항-EGF 수용체 항체이다.

[0173] 정제 방법

[0174] 본 발명의 접합체, 즉 최종 생성물은 임의의 미반응 또는 비접합 이펙터 또는 리포터 분자, 또는 미반응 링커 또는 비접합의 수화된 링커를 제거하기 위하여 정제된다. 정제 방법은 접선 흐름 여과(TFF, 교차 흐름 여과, 한 외여과, 또는 정용여과로도 공지임), 겔 여과, 흡착 크로마토그래피, 선택적 침전, 또는 이들의 조합일 수 있다. 흡착 크로마토그래피 방법에는 이온-교환 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 소수성 전하 유도 크로마토그래피(HCIC), 혼합 방식 이온 교환 크로마토그래피,

고정 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC), 염료 리간드 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 및 역상 크로마토그래피가 포함된다. 예를 들어, 화학식 2에 기재된 접합체 $Ab-(X'-L-Y'-C)_n$ 이 미반응 C 또는 미반응/수화된 링커 X-L-Y 또는 X-L-Y'-C로부터 정제된다. 유사하게, 화학식 4, 6, 및 9에 기재된 접합체가 정제된다. 이러한 정제 방법은 당업자에게 공지이고, 예를 들어, 미국 특허 공개공보 제2007/0048314호에서 발견될 수 있다.

[0175] **접합체 중의 바람직하지 않은 수화된 링커 또는 단백질 가교**

[0176] 단백질과 반응성 말레이미드 또는 할로아세트아미드 잔기를 포함하는 이중작용성 링커의 초기 반응을 이용하는 전통적인 접합 방법은 다음 두 가지의 주요 단점을 겪는다: (i) 이펙터 또는 리포터 분자와의 반응 전에 항체에 혼성된 링커의 수성 비활성화로 인하여 접합체 생성물이 수화된 링커로 구성될 수 있다; (ii) 말레이미드 (또는 할로아세트아미드)기와 단백질 또는 펩타이드의 천연 히스티딘, 라이신, 타이로신, 또는 시스테인 잔기의 반응으로 인한 접합체의 사슬 간 또는 사슬 내 가교 (A. Papini et al., Int. J. Pept. Protein Res., 1992, 39, 348-355; T. Ueda et al., Biochemistry, 1985, 24, 6316-6322). 이러한 항체 중의 사슬 간 가교는 중사슬 (heavy chain)와 경사슬(light chain) 사이, 또는 두 중사슬 사이에 다양한 비환원성 공유성 연결을 야기할 것인데, 두 중사슬 사이의 연결은 중사슬과 경사슬 밴드에서 계산되는 것보다 더 큰 분자량의 밴드로서 환원 SDS-PAGE 분석에서 명백할 것이다. 이러한 항체 중 사슬 간 또는 사슬 내 가교는 항체 이외에 연결된 리포터 또는 이펙터 그룹의 예상 질량과 상이한 비정상 질량의 피크로서 MS에 의하여 또한 명백할 것이다. 전통적인 접합 방법과는 달리, 이 출원서에 기재된 방법은 실질적인 사슬 간 가교 또는 수화된 링커가 없는 큰 동종성의 접합체를 야기한다.

[0177] 본 명세서 및 다음 실시예에 인용된 모든 참고문헌은 명백하게 전체가 참조로 포함된다.

[0178] **실시예**

[0179] 단지 예시적인 다음의 실시예는 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0180] **실시예 1. 본 방법 (도 1) 대 전통적인 2-단계 방법에 의한 이중작용성 링커 말레이미드-PEG_n-NHS를 이용하는 항체와 세포독성제 DM1/DM4의 접합.**

[0181] DM1 [N' -데아세틸- N'' -(3-머캅토-1-옥소프로필)-메이탄신], 또는 DM4 [N' -데아세틸- N'' -(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)메이탄신] (DMx) 티올 및 말레이미드-PEG_n-NHS 이중작용성 링커의 스탁 용액을 N,N'-디메틸아세트아미드 (DMA)에서 30-60 mM의 농도로 제조했다. 링커 및 DMx 티올을 최대 50% v/v의 200 mM 석시네이트 완충제, 2 mM EDTA, pH 5.0를 포함하는 DMA에서 함께 혼합하여 1.6:1의 DMx 대 링커의 몰비 및 15 mM의 DMx 최종 농도를 제공했다. 혼합 후, 반응 혼합물을 1-4 h 동안 방치한 다음 분취량의 반응 혼합물을 10 배 희석하고, 이의 흡광도를 302-320 nm에서 측정하여 $302\text{ nm} = 620\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, 및 $\epsilon_{320\text{ nm}} \sim 450\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ 의 말레이미드 흡광계수(ϵ)를 이용하여 임의의 잔류하는 미반응 말레이미드의 존재를 결정했다. (반응 혼합물을 항체에 첨가하는 것과 동시에 바람직한 링커-DMx 시약의 형성 및 링커 말레이미드의 완전한 소멸을 증명하기 위하여, 나중에 302 nm 및 252 nm에서의 흡광도 모니터링으로써 냉동된 분취량의 반응 혼합물의 추가적 역상 HPLC 분석을 수행했다). 추가의 말레이미드가 UV에 의하여 나타나지 않을 경우, 분취량의 반응 혼합물을 정제하지 않고 4 mg/ml Ab, 90% 포스페이트 완충제/10% DMA, pH 7.5의 최종 접합 조건하에 포스페이트 완충제에 섞인 항체의 용액(pH 7.5)에 첨가했다. 접합 반응이 주위 온도에서 2h 동안 진행되도록 했다. pH 7.5 포스페이트 완충제에서 평형된 G25 겔 여과 컬럼을 이용하거나, 집선 흐름 여과(TFF)를 이용하여 과잉의 소형-분자 DMx 및 링커 반응물로부터 Ab-DMx 접합체를 정제했다. 접합 혼합물을 4°C에서 2 일 동안 pH 7.5 완충제에서 추가로 유지시켜 항체 비공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 항체에 부착된 임의의 DMx 화학종을 해리시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석한 다음 0.22 μm 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체의 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DMx 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 중 Ab 분자당 DMx 분자의 수(평균)를 측정했다.

[0182] 몇 가지의 상이한 반응 조건이 DMx 티올과 이중작용성 말레이미드-PEG₄-NHS 시약의 초기 반응에 사용되었다: DM4 티올 몰당 1.5 몰당량의 유기 염기(예를 들어 N,N'-디이소프로필 에틸아민, DIPEA, 또는 A-메틸모르폴린)를 포함하는 50% DMA/50% 수성 200 mM 석시네이트 완충제 pH 5.0, 2 mM EDTA (v/v); 또는 60% DMA/40% 200 mM 석시네이트 완충제 pH 5.0, 2 mM EDTA (v/v); 또는 100% DMA.

[0183] 한 일련의 실험에서, DMx 대 말레이미드-PEG₄-NHS 링커(Pierce Endogen으로부터 구입)의 몰당량이 1.2 - 2.4로

다양했고, 반응 시간이 30 분이었다. 정제된 접합체에 대하여 측정된 DMx/Ab의 수를 링커당 DMx의 첨가된 당량의 함수로서 측정했다. 1.2 - 2.0 당량의 DM1/링커의 조건이 동일한 DMx/Ab 부하를 가지는 접합체를 제공했고, 이는 링커의 NHS 에스테르 측에서의 DMx 티올의 바람직하지 않은 반응이 심각한 문제가 아님을 나타낸다. 최종 접합체에 존재하는 가교의 양을 가교된 오염물의 존재가 DM1/링커 비율이 증가함에 따라 현저하게 감소함을 나타내는 환원 SDS PAGE에 의하여 또한 분석했다.

[0184] DMx 티올과 항체의 임의의 원하지 않는 반응을 방지하기 위하여, 말레이미드 또는 할로아세트아미드 시약(예컨대 말레이미도부티르산, 또는 말레이미도프로피온산, 또는 *N*-에틸말레이미드, 또는 아이오도아세트아미드, 또는 아이오도아세트산)을 이용하는 한 선택적인 퀀칭 단계를, 초기 DMx 및 이중이작용성 링커 반응의 완료 후(반응 혼합물을 항체에 첨가하기 전)에 도입하여 과잉의 DMx 티올기를 퀀칭했다.

[0185] DMx 및 이중이작용성 링커의 미정제 초기 반응 혼합물과 항체의 대안 반응 방법은 낮은 pH(pH ~5)에서 DMx 및 이중이작용성 링커의 초기 반응 혼합물과(DMx-링커 반응의 완료 시) 항체의 혼합에 이어 접합 반응을 위하여 pH를 6.5-8.5로 증가시키기 위한 완충제 또는 염기의 첨가를 포함했다.

[0186] 본 발명에 기재된 접합 방법과의 비교를 위하여 항체-PEG₄-Mal-DM1 또는 DM4 접합체를 전통적인 2 단계 접합 방법에 의하여 제조했다. pH 7.5 포스페이트 완충제(50 mM 포타슘 포스페이트, 50 mM 소듐 클로라이드, 2 mM EDTA, pH 7.5) 및 5% DMA 중의 8 mg/ml 농도의 인간화 항체를 과잉의 이중이작용성 말레이미드-PEG₄-NHS 링커 시약(Pierce Endogen로부터 구입)을 사용하여 변형시켰다. 25°C에서 2 h 후, 변형된 항체를 G25 크로마토그래피에 의하여 겔 정제하여 과잉의 미반응 미혼성 링커를 제거했다. 정제된 Ab의 회수를 280 nm에서 UV 흡광도에 의하여 결정했다. 말레이미드에 비하여 과잉으로 첨가되는 공지량의 티올(예컨대 2-머캅토에탄올)을 첨가하여 변형된 항체 중 말레이미드 잔기와 반응시켜 적은 분취량의 변형된 항체를 이용한 다음, DTNB 시약을 이용하여 Ellman 검사에 의하여 잔류하는 티올을 검사하여, 변형된 Ab 중 연결된 말레이미드기의 수를 결정했다 (412 nm = 14150 M⁻¹ cm⁻¹의 TNB 티올레이트 흡광계수; Riddles, P. W. et al, Methods Enzymol., 1983, 91, 49-60; Singh, R., Bioconjugate Chem., 1994, 5, 348-351). 변형된 Ab와 DM1 또는 DM4 티올의 결합을 95% 포스페이트 완충제 pH 7.5 (50 mM 포타슘 포스페이트, 50 mM 소듐 클로라이드, 2 mM EDTA, pH 7.5) 및 5% DMA로 구성된 반응 혼합물 중 2.5 mg/ml의 Ab 농도에서 수행했다. Ab 상에 연결된 말레이미드 몰당 과잉의 1.7 몰당량의 DM1 또는 DM4 티올을 첨가했다. 25°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, 접합체를 0.22 μm 여과기를 이용하여 멸균 여과하고, 포스페이트 완충제 pH 7.5(50 mM 포타슘 포스페이트, 50 mM 소듐 클로라이드, 2 mM EDTA, pH 7.5)에서 평형된 G25 컬럼에 의하여 과잉의 미반응 DM1 또는 DM4로부터 겔 정제했다. 정제된 접합체를 포스페이트 완충제 pH 7.5(50 mM 포타슘 포스페이트, 50 mM 소듐 클로라이드, 2 mM EDTA, pH 7.5)에서 4°C에서 2 일 동안 유지시켜 항체 비공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 항체에 부착된 임의의 DM1 또는 DM4 화학종을 해리시켰다. 추후 접합체를 2 일 동안 히스티딘/글라이신 완충제 pH 5.5(130 mM 글라이신/10 mM 히스티딘, pH 5.5)에서 투석하고, 0.22 μm 여과기를 이용하여 멸균 여과했다. 이러한 두 과정에서 DM1/DM4 및 Ab에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하고 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하여 최종 접합체 중 Ab 분자당 DM1 또는 DM4 분자의 수를 측정했다.

[0187] 환원 SDS PAGE를 4-12% Bis Tris Gel을 포함하는 NuPage 전기영동 시스템(Invitrogen)을 이용하여 접합체 및 항체 샘플에 대하여 수행했다. 열 변성 및 환원된 샘플을 10 μg/레인으로 로딩했다. 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 접합체의 환원 SDS-PAGE는 주요 밴드로서 단지 예상된 중사슬 및 경사슬 밴드(각각 50 kDa 및 25 kDa)만을 나타냈다 (도 2). 반면에, 전통적인 2-단계 접합 방법에 의하여 제조된 접합체는 추측컨대 각각 사슬 간 가교된 화학종 HL, H₂, H₂L, 및 H₂L₂에 상응하는 75, 100, 125, 및 150 kDa의 분자량의 바람직하지 않은 가교된 밴드를 나타냈다 (도 2).

[0188] 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항체-PEG₄-Mal-DM4 접합체의 단백질 랩칩 전기영동 분석(환원 조건하)은 (총 단백질의) 58 및 30% 퍼센티지의 예상된 중사슬 및 경사슬 밴드를 나타냈고, 이는 각각 65 및 30%의 비접합 항체에 대한 것과 유사하다 (도 3). 반면에, 전통적인 2-단계 접합 방법을 이용하여 제조된 접합체는 각각 단지 16 및 8%의 중사슬 및 경사슬 밴드 및 추측컨대 사슬 간 가교로 인한 94-169 kDa 범위의 더 큰 분자량의 주요 밴드를 나타냈다. 정량적 단백질 랩칩 분석에 기초하여, 이 출원서에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체가 종래의 2-단계 공정을 이용하여 제조된 것보다 훨씬 더 우수하다 (도 3).

[0189] 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체의 MS 분석은 항체 분자당 증가된 메이탄시노이드 분자 수를 보유하는 항체에 대하여 분리된 DMx-항체 접합체 피크를 나타냈다 (도 4). 반면에, 전통적인 2-단계 방법을 이용

하여 수득된 접합체의 MS는 거의 분리되지 않았고 추측컨대 가교 또는 비활성화 말레이미드 링커로 인한 접합체 제조의 비동종성을 암시했다. 그러므로 MS에 기초하여 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 접합체가 전통적인 2-단계 방법에 의하여 합성된 것보다 더 우수하다.

[0190] 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항-CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 접합체의 결합을 항원-발현 COLO205 세포를 이용하여 흐름 세포측정(flow cytometry)에 의하여 측정했고, 비접합 항체와 유사한 것으로 발견되었으며 접합이 항체의 결합에 해로운 영향을 미치지 않음을 암시했다 (도 5). 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항-CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 접합체의 세포독성 활성이 CanAg 항원을 발현하는 COLO205 결장암 세포를 이용하여 시험관 내에서 측정되었다 (도 6). 항원-발현 암 세포를 태아 소 혈청을 포함하는 세포 배양 배지에서 96 웰 플레이트에 약 1000 세포/웰로 두었고, 다양한 농도의 Ab-DMx 접합체에 노출시켰다. 접합체에 5 일 동안 노출시킨 후, 각각의 웰에 잔류하는 생존 가능 세포를 WST-8 검사(Dojindo Molecular Technologies)를 이용하여 측정했다. 도 6에 나타나는 바와 같이, 본 방법을 이용하여 제조된 항-CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 접합체는 CanAg 항원-발현 COLO205 결장암 세포에 대하여 저농도에서 매우 강력했다. 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항-CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 접합체의 세포독성은, 과잉의 비접합 항체의 첨가에 의하여 차단될 수 있는 것과 같이 COLO205 세포에 특이적이었다.

[0191] 실시예 2. 본 방법 (도 7) 대 전통적인 연속 2-단계 방법에 의한 말레이미드-설폰-NHS 링커를 이용하는 항체와 DM1/DM4의 접합.

[0192] DMx 티올 및 말레이미드-설폰-NHS 이중작용성 링커의 스탁 용액을 *N,N*-디메틸아세트아미드(DMA)에서 30-60 mM의 농도로 제조했다. 링커 및 DMx 티올을 최대 40 % v/v의 200 mM 석시네이트 완충제, 2 mM EDTA, pH 5.0를 포함하는 DMA에서 함께 혼합하여 1.6의 DMx 대 링커의 비율 및 15 mM의 DMx 최종 농도를 제공했다. 혼합 후, 반응물을 1-4 h 동안 방치한 다음 분취량의 반응 혼합물을 10 배로 희석하여 반응의 완료 및 말레이미드의 부재 평가를 위하여 302-320 nm에서 흡광도를 측정했다. (반응 혼합물을 항체에 첨가하는 것과 동시에 바람직한 링커-DMx 시약의 형성 및 링커 말레이미드의 완전한 소멸을 증명하기 위하여, 나중에 302 nm 및 252 nm에서의 흡광도 모니터링으로써 냉동된 분취량의 반응 혼합물의 추가적 역상 HPLC 분석을 수행했다). 추가의 말레이미드가 UV에 의하여 나타나지 않을 경우, 분취량의 반응 혼합물을 4 mg/ml Ab, 90% 포스페이트 완충제/10% DMA, pH 7.5의 최종 접합 조건하에 포스페이트 완충제(pH 7.5)에 섞인 항체의 혼합물에 첨가했다. 접합 반응이 주위 온도에서 2 h 동안 진행되도록 했다. pH 7.5 포스페이트 완충제에서 평형된 G25 겔 여과 컬럼을 이용하거나, 겔선 흐름 여과에 의하여 과잉의 미반응 DMx 및 비접합 링커 생성물로부터 Ab-DMx 접합체를 정제했다. 접합체를 4°C에서 2 일 동안 pH 7.5 완충제에서 유지시켜 비공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 항체에 부착된 임의의 DMx 화학종을 해리시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석한 다음 0.22 μ m 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DMx 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 중 Ab 항체 분자당 DMx 분자의 수(평균)를 결정했다.

[0193] 비교를 위하여, 전통적인 2-단계 접합 방법을 이용하여 Ab-설폰-Mal-DMx 접합체를 제조했다. pH 7.5 포스페이트 완충제/5% DMA 완충제 중 8 mg/ml 농도의 항체(Ab)를 과잉의 이중작용성 말레이미드-설폰-NHS 링커를 사용하여 변형시켰다. 반응이 20°C에서 2 h 동안 진행되도록 한 다음, 변형된 Ab를 G25 크로마토그래피를 이용하여 과잉의 미반응 링커로부터 정제했다. 280 nm에서 UV 흡광도에 의하여 정제된 Ab의 회수를 결정했다. 말레이미드에 비하여 과잉으로 첨가되는 공지량의 티올(예컨대 2-머캅토에탄올)을 첨가하여 변형된 항체 중 말레이미드 잔기와 반응시켜 적은 분취량의 변형된 항체를 이용한 다음, DTNB 시약을 이용하여 Ellman 검사에 의하여 잔류하는 티올을 검사하여, 변형된 Ab 중 연결된 말레이미드기의 수를 결정했다 ($412 \text{ nm} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 TNB 티올레이트 흡광계수; Riddles, P. W. et al, Methods Enzymol., 1983, 91, 49-60; Singh, R., Bioconjugate Chem., 1994, 5, 348-351). 변형된 Ab와 DMx의 접합을 Ab 중 연결된 말레이미드의 몰당 첨가된 1.7 몰당량의 DMx 티올을 포함하는 95% pH 7.5 포스페이트 완충제/5% DMA(v/v) 중 2.5 mg/ml의 항체 농도에서 수행했다. 반응물을 8-24 h 동안 18°C에서 방치하고, 접합체를 G25 크기-배제 크로마토그래피를 통하여 과잉의 미반응 DMx로부터 분리했다. 정제 후 접합체를 4°C에서 2 일 동안 pH 7.5 완충제에서 유지시켜 비공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 항체에 부착된 임의의 DMx 화학종을 해리시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석한 다음 0.22 μ m 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DMx 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 중 Ab 분자당 DMx 분

자의 수를 결정했다.

[0194] 환원 SDS PAGE를 NuPage 4 -12% Bis Tris Mini Gel 및 NuPAGE MOPS SDS 러닝 완충제를 포함하는 NuPage 전기영동 시스템(Invitrogen)을 이용하여 접합체 및 항체 샘플(10 μ g/레인)을 이용하여 수행했다 (도 8). 75, 125, 및 150 kDa의 분자량을 가지는 겔 상의 밴드가 사슬 간 가교된 화학종(각각 HL, H₂L 및 H₂L₂)을 나타냈다. ~4 DM1/Ab(각각 본 방법에 의한 레인 3, 및 전통적인 2-단계 접합 방법에 의한 레인 2) 및 ~6 DM1/Ab(각각 본 방법에 의한 레인 5, 및 전통적인 2-단계 접합 방법에 의한 레인 4)를 포함하는 Ab-설포-Mal-DM1 접합체의 비교가 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체(레인 3 및 5)가 전통적인 2-단계 방법에 의하여 제조된 접합체(레인 2 및 4)보다 훨씬 더 적은 부분의 고분자량 가교된 화학종을 가짐을 명확하게 나타낸다.

[0195] 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항체-설포-Mal-DM1 접합체의 단백질 랩칩 전기영동 분석(환원 조건 하)은 (총 단백질의) 70 및 28% 퍼센티지의 중사슬 및 경사슬 주요 밴드를 나타냈고, 이는 각각 70 및 30%의 비접합 항체에 대한 것과 유사하다 (도 9). 반면에, 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체는 각각 단지 53 및 23%의 중사슬 및 경사슬 밴드, 및 추측컨대 사슬 간 가교로 인한 99-152 kDa 범위의 더 큰 분자량의 주요 밴드를 나타냈다. 정량적 단백질 랩칩 분석에 기초하여, 이 출원서에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체가 종래의 2-단계 공정을 이용하여 제조된 것보다 사슬 간 가교 결핍 측면에서 훨씬 더 우수하다 (도 9).

[0196] 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조 그리고 전통적인 2 단계 방법에 의하여 제조된 유사한 약물 부하를 가지는 Ab-설포-mal-DM1 접합체를 크기 배제 LC/MS 분석으로 비교했다 (도 10). 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된 접합체는 Ab-(링커-DMx)_n와 동일한 질량을 가지는 예상 피크 분포만을 포함하는 바람직한 MS 스펙트럼을 나타낸다. 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 경우, 스펙트럼의 주요 피크는 모두 바람직한 Ab-(링커-DMx)_n 모이어티 이외에 하나 이상의 수화되거나 가교된 링커 단편을 포함한다. 전통적인 2-단계 반응 시퀀스에서 말레이미드의 사슬 간 가교 또는 수성 비활성화의 추정 메커니즘이 도 17에 나타나고, 이에 의하여 항체와 이중이작용성 링커의 초기 반응에서 유래한 혼성된 말레이미드 (또는 할로아세트아미드) 잔기가 분자 내 (또는 분자 간) 히스티딘, 라이신, 타이로신, 또는 시스테인 잔기와 반응하여 사슬 간 가교를 야기할 수 있거나, 초기에 혼성된 말레이미드 (또는 할로아세트아미드) 잔기가 비활성화 될 수 있어 (예컨대 가수분해성 말레이미드 고리 분열 또는 말레이미드에 대한 수성 첨가에 의하여) 티올-보유 이펙터 또는 리포터 그룹과의 빠른 반응이 불가능하게 된다. 따라서 LC-MS 분석은 본 발명에 기재된 방법이 항체에 부착된 수화 또는 가교된 링커 단편을 거의 포함하지 않거나 전혀 포함하지 않는 동종 접합체 제조의 장점을 가짐을 명확하게 나타낸다.

[0197] 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된, 항체 분자당 5.6 메이탄시노이드 부하(평균)를 가지는 항-CanAg Ab-설포-Mal-DM1 접합체의 결합을 항원-발현 COLO205 세포를 이용하는 흐름 세포측정에 의하여 측정했고, 비접합 항체와 유사한 것으로 발견되었으며 접합이 표적 항원에 대한 항체의 결합에 영향을 미치지 않음을 암시했다 (도 11). 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항-CanAg Ab-설포-Mal-DM1 접합체의 세포독성 활성이 CanAg 항원을 발현하는 COLO205 결합암 세포를 이용하여 시험관 내에서 측정되었다 (도 12). 항원-발현 암 세포를 태아 소혈청을 포함하는 세포 배양 배지에서 96 웰 플레이트에 약 1000 세포/웰로 두었고, 다양한 농도의 Ab-DMx 접합체에 노출시켰다. 접합체에 5 일 동안 노출시킨 후, 잔류하는 생존 가능 세포를 WST-8 검사(Dojindo Molecular Technologies)를 이용하여 측정했다. 도 12에 나타나는 바와 같이, 본 방법을 이용하여 제조된 항-CanAg Ab-설포-Mal-DM1 접합체는 CanAg 항원-발현 COLO205 결합암 세포에 대하여 저농도에서 매우 강력했다. 이러한 접합체의 세포독성은 과잉의 비접합 항체를 사용한 경쟁에 의하여 차단될 수 있는 것과 같이 특이적이었다.

[0198] 본 발명에 기재된 방법을 이용하는 대안의 접합 방법은 DMx 티올과 항체의 임의의 원하지 않는 반응을 방지하기 위하여, 초기 DMx 및 이중이작용성 링커 반응의 완료 후(반응 혼합물을 항체에 첨가하기 전) 말레이미드 또는 할로아세트아미드 시약(예컨대 A-말레이미도부티르산, 또는 3-말레이미도프로피온산, 또는 N-에틸말레이미드, 또는 아이오도아세트아미드, 또는 아이오도아세트산)을 이용하여 과잉의 DMx 티올기를 퀀칭하는 퀀칭 단계를 포함했다. 구체적인 실시예에서, 초기 DMx 및 이중이작용성 링커 반응이 완료된 다음 (반응 혼합물을 항체에 첨가하기 전), 접합 반응 동안 DMx 티올과 항체의 임의의 원하지 않는 반응을 방지하기 위하여, 4-말레이미도부티르산을 첨가하여 과잉의 DMx 티올기를 퀀칭했다. 이중이작용성 시약의 말레이미드기에 대한 원하는 DM4 티올 커플링이 완료되면, 과잉의 DM4 (3 mM)를 포함하는 DM4 및 설포-Mal-NHS 이중이작용성 시약의 반응 혼합물에 2-배물 과잉의 4-말레이미도부티르산(6 mM)을 주위 온도에서 20 분 동안 반응 혼합물에 첨가하여 초기 커플링 반응으로부터 잔류하는 DM4를 퀀칭했다. 반응 혼합물을 정제하지 않고, 분취량을 4 mg/ml Ab, 90% 수성 포스페이트 완충제/10% MA, pH 7.5의 최종 접합 조건하에 포스페이트 완충제(pH 7.5)에 섞인 항체의 용액에 혼합했다. 접합 반응이 주위 온도에서 2 h 동안 진행되도록 했다. 항체-DM4 접합체를 pH 7.5 포스페이트 완충제에서 평형된

G25 겔 여과 컬럼을 이용하여 과잉의 소형-분자 DM4 및 링커 반응물로부터 정제했다. 접합 혼합물을 4℃에서 2 일 동안 pH 7.5 완충제에서 더욱 유지시켜 항체 비공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 항체에 부착된 임의의 DMx 화학종을 해리시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석하고 0.22 μ m 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DM4 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 중 Ab 분자당 DM4 분자의 평균 수를 측정했다. 4-12% Bis Tris Gel을 포함하는 NuPage 전기영동 시스템(Invitrogen)을 이용하여 비환원 SDS PAGE에 의하여 접합체 샘플을 분석했다. 열 변성된 샘플을 10 μ g/레인으로 로딩했다. 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 접합체의 비환원 SDS-PAGE(퀀칭 없음)는 경사슬 밴드(~25 kDa) 및 절반-항체 밴드(중-경 사슬; ~75 kDa)의 증거를 나타냈다 (도 18). 반면에, 본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 (과잉의 DMx 티올을 차단하기 위하여) 4-말레이미도부티르산으로 처리된 접합체는 이러한 바람직하지 않은 밴드를 현저하게 더 적은 양으로 가졌다 (비변형 항체 샘플에 필적하는 수준). (항체와의 결합 전) 초기 DMx 및 이중이작용성 반응 혼합물의 4-말레이미도부티르산과 같은 티올-퀀칭 시약에 의한 퀀칭의 또 다른 장점은 항체 접합 반응 동안 "유리" DMx (DM1 또는 DM4) 화학종이 없고 따라서 정제 후 최종 접합체가 "유리" 또는 비접합 DMx 화학종을 포함하지 않는다는 것이다. 4-말레이미도부티르산(또는 다른 극성 티올-퀀칭 시약)을 포함하는 DMx-부가물은 DMx보다 더욱 수용성이므로 따라서 공유적으로 연결된 항체-DMx 접합체로부터 더욱 쉽게 분리될 수 있다.

[0199] 실시예 3. 설폰-NHS-SMCC 링커를 이용한 항체와 메이탄시노이드(DM1/DM4)의 접합 (도 13).

[0200] DM1 또는 DM4 티올(DMx) 및 설폰-NHS 기를 포함하는 설폰-SMCC 이중이작용성 링커(Pierce Endogen으로부터 구입; 도 13)의 스탁 용액을 30-60 mM의 농도로 DMA에서 제조했다. 링커 및 DM1 또는 DM4 티올을 최대 40% v/v의 수성 200 mM 석시네이트 완충제, 2 mM EDTA, pH 5.0를 포함하는 DMA에서 함께 혼합하여 1.6:1의 DM1 또는 DM4 (DMx) 대 링커의 비율 및 6 mM의 DMx 최종 농도를 제공했다. 혼합 후, 반응물을 1-4 h 동안 주위 온도에서 방치한 다음 분취량의 반응 혼합물을 10-배로 희석하여 302-320 nm에 흡광도를 측정하여 모든 말레이미드가 반응했는지를 평가했다. (반응 혼합물을 항체에 첨가하는 것과 동시에 바람직한 설폰-NHS-링커-Mal-DMx 시약의 형성 및 링커 말레이미드의 완전한 소멸을 증명하기 위하여, 302 nm 및 252 nm에서의 모니터링으로써 냉동된 분취량의 반응 혼합물의 추가적 역상 HPLC 분석을 나중에 수행했다). 추가의 말레이미드가 UV에 의하여 나타나지 않을 경우, 분취량의 반응물을 4 mg/ml Ab, 90% 포스페이트 완충제(수성)/10% DMA (v/v), pH 7.5의 최종 접합 조건 하에 포스페이트 완충제(pH 7.5)에 섞인 항체의 수성 용액에 첨가했다. 접합 반응이 주위 온도에서 2 h 동안 진행되도록 했다. Ab-DMx 접합체를 pH 7.5 포스페이트 완충제(수성)에서 평형된 G25 겔 여과 컬럼을 이용하여 과잉의 미반응 시약 및 과잉의 DMx로부터 정제했다. 접합체를 4℃에서 2 일 동안 pH 7.5 완충제에서 유지시켜 비공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 Ab에 부착된 임의의 DMx 화학종을 해리시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석한 다음 0.22 μ m 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DMx 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 중 Ab 분자당 DMx 분자의 수를 측정했다.

[0201] 비교를 위하여, Ab-SMCC-DMx 접합체를 전통적인 2-단계 접합 방법을 이용하여 제조했다. 95% pH 6.5 포스페이트 완충제/5% DMA 완충제 중 8 mg/ml 농도의 항체(Ab)를 설폰-NHS 기를 포함하는 과잉의 이작용성 설폰-SMCC 링커(Pierce Endogen으로부터 구입)로써 변형시켰다. 반응이 25℃에서 2 h 동안 진행되도록 한 다음 G25 크로마토그래피를 이용하여 과잉의 미반응 링커로부터 변형된 Ab를 정제했다. 정제된 Ab의 회수를 280 nm에서의 UV 흡광도에 의하여 결정했다. 말레이미드에 비하여 과잉으로 첨가되는 공지량의 티올(예컨대 2-머캅토에탄올)을 첨가하여 변형된 항체 중 말레이미드 잔기와 반응시켜 적은 분취량의 변형된 항체를 이용한 다음, DTNB 시약을 이용하여 Ellman 검사에 의하여 잔류하는 티올을 검사하여, 변형된 Ab 중 연결된 말레이미드기의 수를 결정했다 (412 nm = 14150 M⁻¹ cm⁻¹의 TNB 티올레이트 흡광계수; Riddles, P. W. et al., Methods Enzymol., 1983, 91, 49-60; Singh, R., Bioconjugate Chem., 1994, 5, 348-351). Ab의 연결된 말레이미드 몰당 첨가된 1.7 몰당량의 DM1 또는 DM4 티올을 포함하는 95% pH 6.5 포스페이트 완충제/5% DMA (v/v) 중 2.5 mg/ml의 항체 농도에서 변형된 Ab와 DM1 또는 DM4의 결합을 수행했다. 반응물을 8-24 h 동안 18℃에서 방치하고 접합체를 G25 크로마토그래피를 통하여 과잉의 미반응 DM1 (또는 DM4)로부터 분리했다. 정제 후 접합체를 4℃에서 2 일 동안 pH 6.5 완충제에 유지시켜 임의의 약하게 연결된 DM1/DM4 화학종을 가수분해시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석한 다음 0.22 μ m 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DM1/DM4 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 중 Ab 분자당 DM1/DM4 분자의 수를 측정했다.

[0202] 환원 SDS PAGE를 NuPage 4 -12% Bis Tris Mini Gel 및 NuPAGE MOPS SDS 러닝 완충제를 포함하는 NuPage 전기영

동 시스템(Invitrogen)을 이용하여 접합체 및 항체 샘플($10 \mu\text{g}/\text{레인}$)에 대하여 수행했다 (도 14). 75, 125, 및 150 kDa의 분자량을 가지는 겔 상의 밴드가 사슬 간 가교된 화학종(각각 HL, H_2L 및 H_2L_2)을 나타냈다. 3.1 D/Ab를 포함하는 Ab-SMCC-DM1 접합체(각각 본 방법에 의한 레인 4, 및 전통적인 2-단계 방법에 의한 레인 3)의 비교가 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된 접합체(레인 4)가 전통적인 2 단계 방법에 의하여 제조된 접합체(레인 3)보다 더 적은 고분자량의 가교된 화학종을 가짐을 명확하게 나타낸다.

[0203] 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 항체-SMCC-DM1 접합체의 단백질 랩칩 전기영동 분석(환원 조건 하)은 (총 단백질의) 67 및 30% 퍼센티지의 중사슬 및 경사슬 주요 밴드를 나타냈고, 이는 각각 68 및 30%의 비접합 항체에 대한 것과 유사하다 (도 15). 반면에, 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체는 각각 단지 54 및 24%의 중사슬 및 경사슬 밴드, 및 추측컨대 사슬 간 가교로 인한 96-148 kDa 범위의 더 큰 분자량의 주요 밴드를 나타냈다. 정량적 단백질 랩칩 분석에 기초하여, 이 출원서에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체가 종래의 2-단계 공정을 이용하여 제조된 것보다 사슬 간 가교 결핍 측면에서 훨씬 더 우수하다 (도 15).

[0204] 본 발명에 기재된 방법을 통하여, 그리고 전통적인 2 단계 방법에 의하여 제조된 유사한 약물 부하를 가지는 Ab-SMCC-DM1 접합체를 크기 배제 LC/MS 분석으로 비교했다 (도 16). 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된 접합체는 Ab-(링커-DMx)_n와 동일한 질량을 가지는 예상 피크 분포만을 포함하는 바람직한 MS 스펙트럼을 나타낸다. 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조되는 접합체의 경우, 스펙트럼은 바람직한 Ab-(링커-DMx)_n 화학종에 더하여 비활성화 말레이미드 및 가교된 링커 단편을 포함하는 추가의 화학종을 포함하는 화학종들의 불균질 혼합물을 나타낸다. 전통적인 2-단계 반응 시퀀스에서 사슬 간 가교 및 말레이미드 비활성화의 추정 메커니즘이 도 17에 나타나고, 이에 의하여 항체와 이중이작용성 링커의 초기 반응에서 유래한 혼성된 말레이미드 (또는 할로아세트아미드 잔기)가 분자 내 (또는 분자 간) 히스티딘, 라이신, 타이로신, 또는 시스테인 잔기와 반응하여 사슬 간 가교를 야기할 수 있거나, 초기에 혼성된 말레이미드 (또는 할로아세트아미드) 잔기가 티올-보유 DM1 또는 DM4 (DMx) 작용제와의 반응 단계 전에 말레이미드 잔기의 가수분해 또는 수화에 의하여 비활성화될 수 있다. 따라서 LC-MS 분석은 본 발명에 기재된 방법이 항체에 부착된 비활성화 말레이미드 또는 가교된 링커 단편을 거의 포함하지 않거나 전혀 포함하지 않는 동종 접합체 제조의 장점을 가짐을 명확하게 나타낸다.

[0205] 실시예 4. 본 방법에 의한 항체와 DM1/DM4(DMx)와 분열성 디설파이드 링커의 접합 (도 19).

[0206] DM1 또는 DM4 티올(DMx) 및 이중이작용성 링커 4-(2-피리딜디티오)부탄산-N-하이드록시석신이미드 에스테르(SPDB)를 포함하는 스탁 용액을 30-60 mM의 농도로 DMA에서 제조했다. 링커 및 DMx 티올을 최대 40% v/v의 수성 200 mM 석시네이트 완충제, 2 mM EDTA, pH 5.0를 포함하는 DMA에서 함께 혼합하여 1.6:1의 DM1 또는 DM4(DMx) 대 링커의 비율 및 8 mM의 DMx 최종 농도를 제공했다. 혼합 후, 반응물을 1 h 동안 주위 온도에서 방치한 다음 분취량의 반응물을 4 mg/ml Ab, 90% 포스페이트 완충제(수성)/ 10% DMA (v/v), pH 7.5의 최종 접합 조건하에 포스페이트 완충제(pH 7.5)에 섞인 항체의 수성 용액에 첨가했다. 접합 반응이 주위 온도에서 2 h 동안 진행되도록 했다. pH 7.5 포스페이트 완충제(수성)에서 평형된 G25 겔 여과 컬럼을 이용하여 Ab-DMx 접합체를 과잉의 미반응 시약 및 과잉의 DMx로부터 정제했다. 접합체를 4°C에서 2 일 동안 pH 7.5 완충제에서 유지시켜 비공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 Ab에 부착된 임의의 DMx 화학종을 해리시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석한 다음 0.22 μm 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DMx 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 상의 Ab 분자당 DMx 분자의 수를 측정했다.

[0207] 실시예 5. 본 발명을 이용한 디설파이드- 및 비분열성 링커 모두를 포함하는 항체-DM1/DM4(Ab-DMx) 접합체의 제조 (도 20).

[0208] DM1 또는 DM4 티올(DMx) 및 NHS-PEG_n-말레이미드 이중이작용성 링커의 스탁 용액을 N,N-디메틸아세트아미드(DMA)에서 30-80 mM의 농도로 제조했다. NHS-PEG₄-말레이미드 링커 및 DMx 티올을 최대 40% v/v의 200 mM 석시네이트 완충제, 2 mM EDTA, pH 5.0를 포함하는 DMA에서 함께 혼합하여 1.6:1의 DMx 대 링커의 몰비 및 8.0 mM의 DMx 최종 농도를 제공했다. 반응 혼합물을 2 h 동안 주위 온도에서 반응하도록 방치했다. 별도의 유사한 반응에서, SPDB 링커 및 DMx 티올을 함께 혼합하고 1 h의 반응 시간을 제외하고 NHS-PEG₄-말레이미드 반응에 대하여 이용된 조건과 유사한 방식으로 반응시켰다. 정제하지 않고 두 반응의 완료 후, 같은 부피의 PEG₄-Mal-DM4 혼합물 및 SPDB-DM4 혼합물을 조합했다. 분취량의 조합된 반응 혼합물을 4 mg/ml Ab, 90% 포스페이트 완충제(수성)/10% DMA (v/v), pH 7.5의 최종 접합 조건하에 정제하지 않고 포스페이트 완충제(pH 7.5)에 섞인 항체의

용액에 첨가했다. 접합 반응이 주위 온도에서 2 h 동안 진행되도록 했다. pH 7.5 포스페이트 완충제(수성)에서 평형된 G25 겔 여과 컬럼을 이용하여 과잉의 미반응 시약 및 과잉의 DMx로부터 Ab-DMx 접합체를 정제했다. 접합체를 4℃에서 2 일 동안 pH 7.5 완충제에서 유지시켜 공유적으로 또는 분해성 연결을 통하여 Ab에 부착된 DMx 화학종을 해리시켰다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 5.5 히스티딘/글라이신 완충제로 투석한 다음 0.22 μ m 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DMx 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 상의 Ab 분자당 DMx 분자의 수를 측정했다.

[0209] 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된 Ab-(혼합된 SPDB 및 PEG₄-Mal 링커)-DMx 접합체를, 디설파이드 연결을 환원시키기 위한 접합체의 DTT(디티오프레이톨) 처리 전 및 후에 항체당 DMx (D/A) 비율을 비교하여 Ab에 대한 분열성 대 비분열성 링커의 혼성 퍼센트를 결정하기 위하여 테스트했다. DTT 환원 동안 7.5로 반응 pH를 유지하기 위하여, 먼저 접합체를 250 mM HEPES 완충제 pH 7.5로 투석했다. 이후 접합체를 25 mM DTT와 20 분 동안 37℃에서 반응시켜 환원시켰다. DTT 반응 후, 방출된 DMx 및 DTT를 250 mM HEPES 완충제 pH 7.5에서 평형된 G25 겔 여과 컬럼을 이용하여 반응 혼합물로부터 분리했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DMx 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 정제된 생성물 중 Ab 분자당 DMx 분자의 평균 수를 측정했다. DTT-처리된 접합체의 D/A 및 비-DTT 처리된 접합체의 D/A 간의 비율을 비분열성 연결을 통하여 Ab에 부착된 DMx의 퍼센트를 계산하기 위하여 이용했다. 두 가지의 추가 샘플인 Ab-SPDB-DM4 및 Ab-PEG₄-Mal-DM4 접합체를 각각 양성 및 음성 대조군으로서 DTT로 처리했다. DTT 처리 전 및 후의 D/A 비율을 비교하여, 대조군 비분열성 Ab-PEG₄-Mal-DM4 접합체는 대략 결합된 모든 링커(93%)가 예상한 대로 비분열성을 발견했음을 나타냈다. 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된, 비분열성 및 디설파이드 링커 모두를 포함하는 Ab-(혼합된 SPDB 및 PEG₄Mal 링커)-DMx 접합체는 완전히 분열성 링커로 구성되는 Ab-SPDB-DMx 접합체로부터의 DMx 손실 양에 대하여 DTT 처리에 의하여 분해된 41% 더 적은 DMx를 가졌다. 이는 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된 Ab-(혼합된 SPDB 및 PEG₄-Mal)-DMx 접합체가 대략 40% 비분열성 및 60% 분열성 링커로 구성됨을 증명했다. 비분열성 및 분열성 링커 시약의 초기 비율을 변화시켜, 메이탄시노이드 또는 다른 이펙터와 항체의 접합체가 상이한 비율의 비분열성 및 분열성 링커를 가지도록 제조될 수 있다. 도 21은 디설파이드 링커(SPDB) 및 비분열성 링커(PEG) 모두를 통하여 연결된 항체 분자당 평균 3.5 메이탄시노이드 분자를 포함하는 항체로 이루어진 앞에 기재된 탈글리코실화 접합체의 질량 스펙트럼을 나타낸다. MS는 분열성 및 비분열성 링커 모두를 보유하는 불연속 접합체 화학종을 나타낸다 (도 21). 예를 들어, D2-PEG-SPDB로 명시된 접합체 피크가 하나의 디설파이드-연결된 메이탄시노이드 분자 및 하나의 비분열성 티오에테르-연결된 메이탄시노이드 분자를 보유하고; D3-PEG-2SPDB로 명시된 접합체 피크가 둘의 디설파이드-연결된 메이탄시노이드 분자 및 하나의 비분열성 티오에테르-연결된 메이탄시노이드 분자를 보유하고; D3-2PEG-SPDB로 명시된 접합체 피크가 하나의 디설파이드-연결된 메이탄시노이드 분자 및 둘의 비분열성 티오에테르-연결된 메이탄시노이드 분자를 보유한다.

[0210] **실시예 6. SMCC 링커를 이용한 항체와 메이탄시노이드의 접합 (도 22).**

[0211] DM1 티올 및 SMCC 이중이작용성 링커(Pierce)의 스탁 용액을 DMA에서 30-60 mM의 농도로 제조했다. 링커 및 DM1 티올을 최대 50% v/v의 수성 200 mM 석시네이트 완충제, 2 mM EDTA, pH 5.0를 포함하는 DMA에서 함께 혼합하여 1.4:1 몰당량의 DM1 대 링커의 비율 및 1 내지 6 mM의 DM1 최종 농도를 제공했다. 혼합 후, 반응을 최대 4 h 동안 주위 온도에서 방치한 다음 분취량의 반응 혼합물을 10-배로 희석하여, 모든 말레이미드가 티올과 반응했는지를 평가하기 위하여 302-320 nm에서 흡광도를 측정했다. 추가의 말레이미드가 UV에 의하여 나타나지 않을 경우, 분취량의 반응물을 2.5 mg/ml Ab, 70-80% 포스페이트 완충제 (수성)/30-20% DMA (v/v)의 최종 접합 조건하에 포스페이트 완충제(pH 7.5-8.5)에 섞인 항체의 수성 용액에 첨가했다. 접합 반응을 주위 온도에서 3 h 동안 진행시켰다. Ab-DM1 접합체를 pH 7.4 포스페이트 완충제(수성)에서 평형된 G25 겔 여과 컬럼을 이용하여 과잉의 미반응 또는 수화된 시약 및 과잉의 DM1으로부터 정제했다. 이후 최종 보관을 위하여 접합체를 하룻밤 동안 pH 7.4 포스페이트 완충제(수성)로 투석한 다음 0.22 μ m 여과기를 통하여 여과했다. 252 및 280 nm에서 접합체 흡광도를 결정하고 이러한 두 파장에서 DM1 및 항체에 대하여 공지인 흡광계수를 이용하여 최종 접합체 중 Ab 분자당 DM1 분자의 수를 측정했다. 유사하게, DM4 티올 및 SMCC과 항체의 접합체가 제조될 수 있다. SMCC 링커를 이용한 항체와 DM1 또는 DM4의 이러한 접합체는 티오에테르 비분열성 링커를 포함한다.

[0212] 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된 Ab-SMCC-DM1 접합체를 탈글리코실화 복합체의 MS 분석에 의하여 특성 결정했다 (도 23). 본 발명에 기재된 방법을 통하여 제조된 접합체는 Ab-(링커-DM1)_n과 동일한 질량을 가지는 예상 피크 분포를 포함하는 바람직한 MS 스펙트럼을 나타낸다.

[0213] 실시예 7. 이중이작용성 디설파이드-포함 링커(SSNPB, SPP)를 이용한 메이탄시노이드와 항체의 접합체.

[0214] 디설파이드 포함 이중이작용성 링커 SSNPB (*N*-설포석신이미딜-4-(5-니트로-2-피리딜디티오)부티레이트) 및 SPP (*N*-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트)가 실시예 4에서 SPDB 링커에 대하여 기재된 것과 유사한 방법에 의하여 디설파이드-연결된 항체- 메이탄시노이드 접합체를 제조하기 위하여 사용될 수 있다. SPDB를 이용하여 제조된 디설파이드-연결된 접합체의 구조(도 19)가 SSNPB로써 제조된 접합체의 구조(도 24)와 동일하다. SPDB를 이용하여 제조된 디설파이드-연결된 접합체의 MS가 항체에 부착된 상이한 수의 메이탄시노이드 분자에 상응하는 질량 값을 가지는 불연속 피크를 나타냈다.

[0215] 실시예 8. 선형 알킬 탄소 사슬을 포함하는 비분열성 링커를 포함하는 메이탄시노이드와 항체의 접합체.

[0216] 선형 알킬 탄소 사슬을 포함하는 비분열성 링커를 포함하는 접합체를 실시예 6에서 SMCC 링커에 대하여 기재한 방법과 유사하게 메이탄시노이드 및 선형 알킬 탄소 사슬을 포함하는 이중이작용성 링커의 반응 혼합물을 이용하여 제조했다. 예를 들어, 도 26에 나타나는 것과 같이 인간화 항체와 DM1의 접합체를 BMPS (N-[β-말레이미도 프로필옥시]석신이미드 에스테르) 또는 GMBS ((*N*-[γ-말레이미도부틸옥시]석신이미드 에스테르) 링커를 이용하여 제조했다. 60% DMA/40% (v/v) 200 mM 석시네이트 완충제, pH 5에 BMPS 또는 GMBS(8 mM) 및 DM1 티올(10.4 mM)을 포함하는 초기 반응 혼합물이 15 분에 체크했을 때 말레이미드 모이어티의 완전한 반응을 나타냈다 (302-320 nm에서 말레이미드 흡광도 쇠퇴에 기초). 이러한 반응 혼합물을 따로 두 부분의 30 분으로, 항체에 8 몰당량으로 첨가된 총 링커를 포함하는 인간화 항체 용액 20% DMA (v/v)를 포함하는 80% 수성 EPPS 완충제, pH 8.1에 2.5 mg/ml로 첨가했다. 접합체 혼합물을 4 h 후 겔 정제하고 2 차례의 투석을 거치게 했다. 3.8 및 5.1의 DM1/항체 비율을 가지는 접합체를 71-75% 회수, 및 고 단량체 %(96.2-97.6%)가 되도록 제조했다. GMBS 또는 BMPS를 사용하여 제조된 이러한 접합체는 HISEP HPLC 분석에 의하여 비접합 유리 약물을 나타내지 않았다. 도 25에 나타나는 바와 같이, 선형 알킬 사슬을 포함하는 비분열성 링커를 포함하는 유사한 접합체가 AMAS(N-[β-말레이미도아세톡시]석신이미드 에스테르) 또는 EMCS(N-[β-말레이미도카프로일옥시]석신이미드 에스테르) 또는 설포-N-하이드록시석신이미드 에스테르(설포-GMBS, 설포-EMCS)를 이용하여 제조될 수 있다. 표 1은 본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체 선택에 대한 단량체 %를 나타내고, 이들 모두는 크기-배제 크로마토그래피 분석에 의하여 고 단량체 %를 나타냈다. 비교를 위하여, 단량체 %가 또한 전통적인 2-단계 접합 방법에 의하여 (항체와 이중이작용성 링커의 초기 반응에 이어서 메이탄시노이드 티올과의 반응에 의하여) 제조된 접합체에 대하여 나타난다.

[0217] 표 1. 본 출원서에 기재된 방법에 의하여 제조된 접합체 대 전통적인 2-단계 접합 방법에 의하여 제조된 접합체에 대한 선택에 대한 단량체 %

표 1

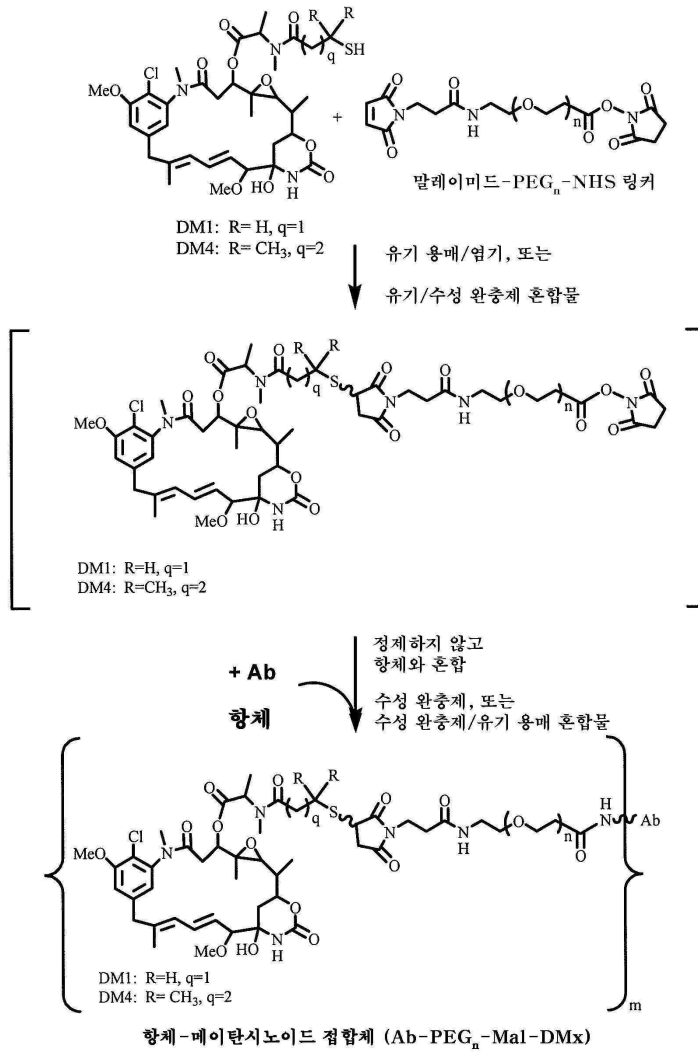
접합체	D/A	접합 방법	% 단량체
Ab-PEG ₄ -Mal-DM1	6.6	본 발명	99.0
Ab-PEG ₄ -Mal-DM1	6.8	2-단계	98.0
Ab-설포-Mal-DM1	3.6	본 발명	99.0
Ab-설포-Mal-DM1	4.0	2-단계	96.7
Ab-SMCC-DM1	4.0	본 발명	98.6
Ab-SMCC-DM1	3.8	2-단계	97.0
Ab-PEG ₄ -Mal-DM4	6.2	본 발명	96.9
Ab-PEG ₄ -Mal-DM4	6.1	2-단계	84.5
Ab-SPDB-DM4	4.1	본 발명	99.4
Ab-SPDB-DM4	3.9	2-단계, 1-반응기	95.7

도면

도면1

FIG. 1

DM1 (또는 DM4) 및 말레이미드-PEG_n-NHS 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합

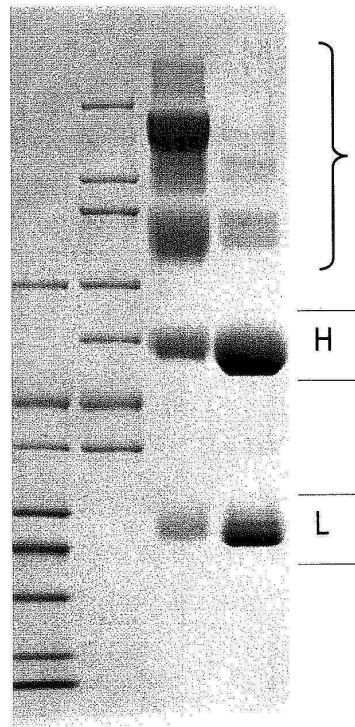


도면2

FIG. 2

본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 접합체
대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 환원 SDS-PAGE

레인: 1 2 3 4



레인 3의 주요 밴드는
사슬 간 가교된 밴드

도면3

FIG. 3A

본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(PEG₄-Mal)-DM4
접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 단백질
겔 전기영동

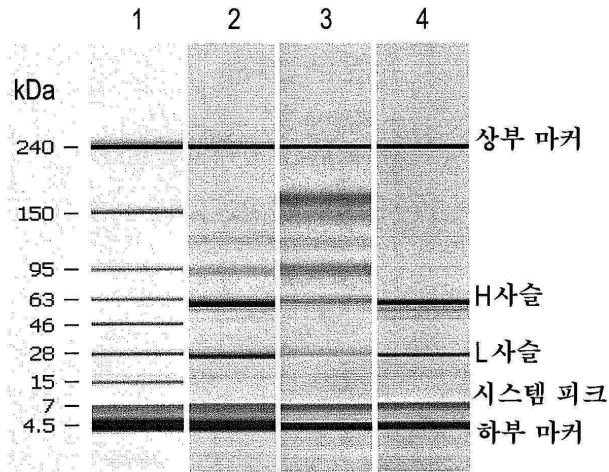


FIG. 3B

		로딩된 총 단백질 질량의 %		
밴드 MW (kDa)		비결합 Ab	Ab-PEG4-Mal-DM4 본 방법	Ab-PEG4-Mal-DM4 2 단계
L 사슬	17	1	2	1
	27	30	30	8
	56	4	2	-
H 사슬	61	65	58	16
	94	-	6	26
	122	-	2	7
	147	-	-	12
	169	-	-	31

도면4

FIG. 4A

본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(PEG4-Mal)-DM4
접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 MS
(탈글리코실화 접합체 샘플이 MS에 의하여 분석되었다)

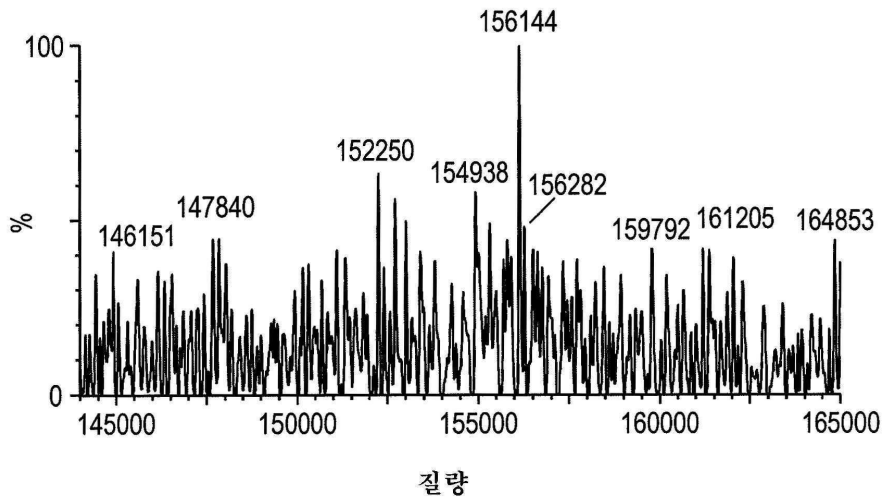
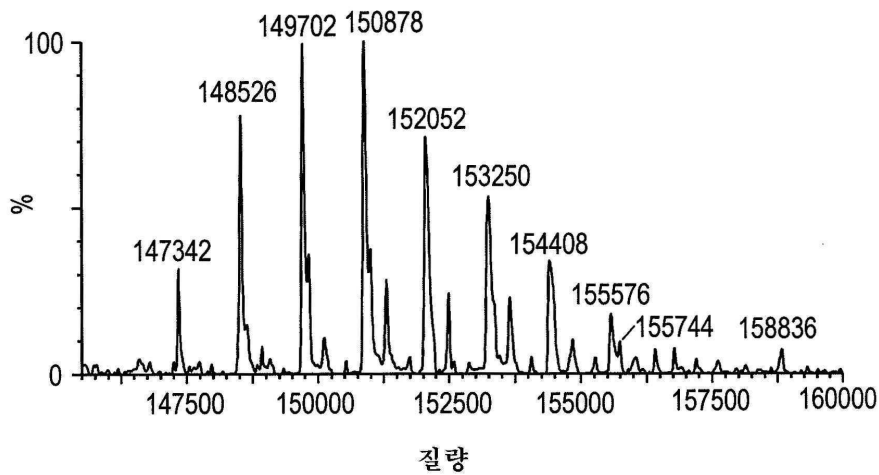


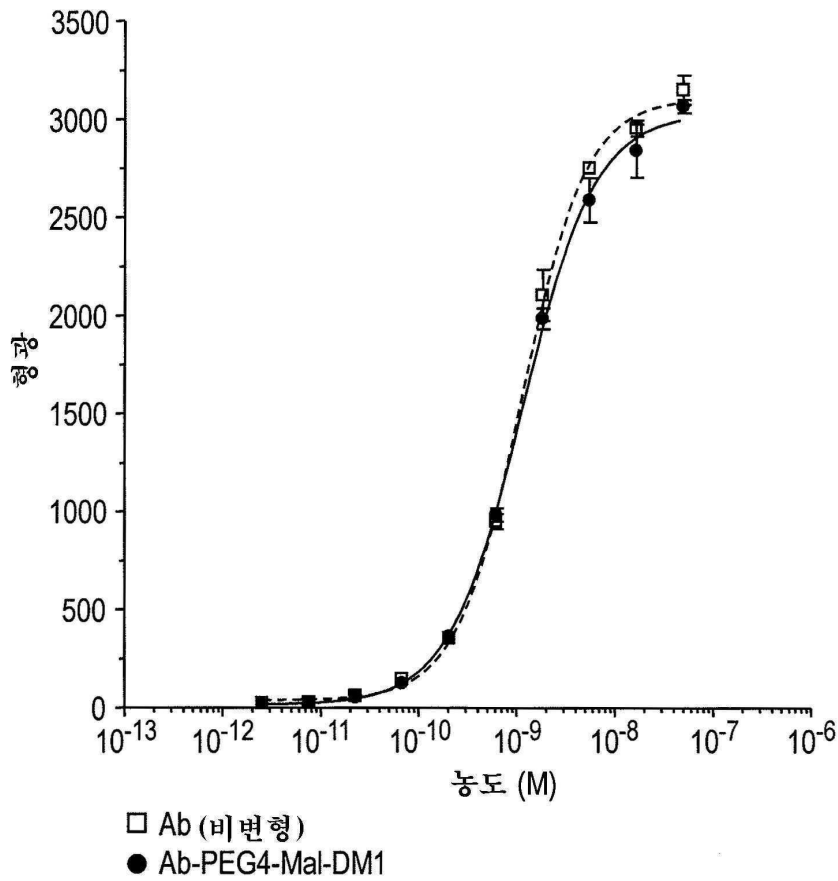
FIG. 4B



도면5

FIG. 5

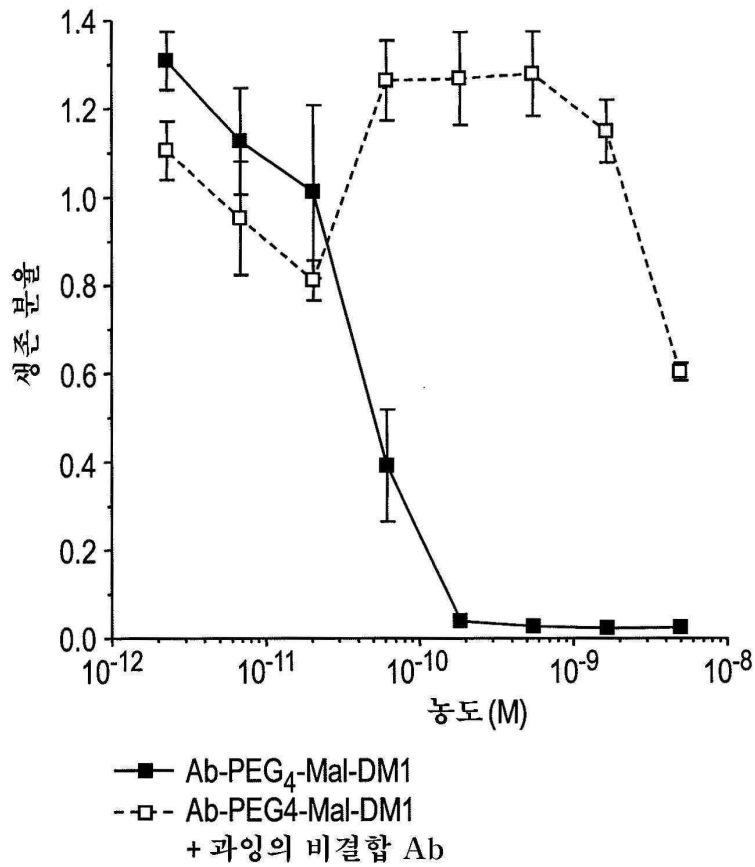
CanAg 항원-발현 COLO205 세포에 대한 (본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된) 항체당 6.7 DM1를 포함하는 항-CanAg 항체-PEG₄-Mal-DM1 접합체의 결합 대 비변형 항체의 결합



도면6

FIG. 6

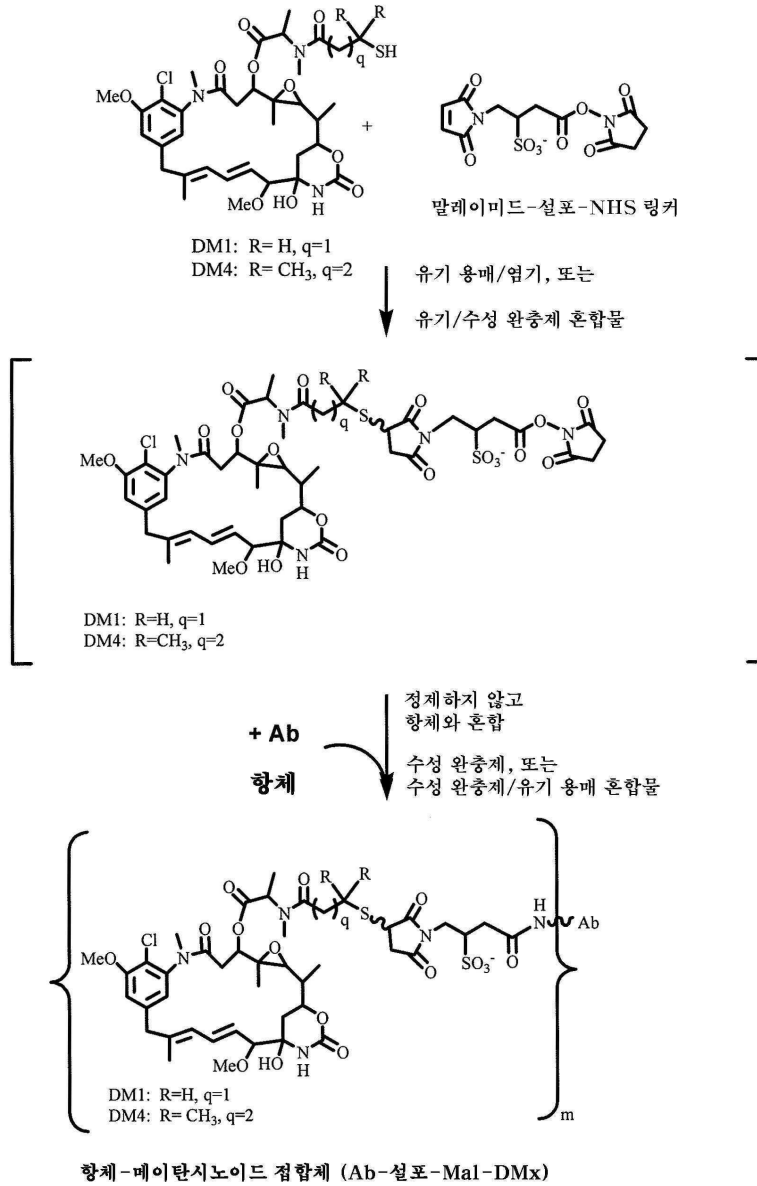
(본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된) 항체당 6.7 DM1을 포함하는
항-CanAg 항체-PEG₄-Mal-DM1 접합체의 CanAg 항원-발현
COLO205 세포에 대한 시험관 내 세포독성



도면7

FIG. 7

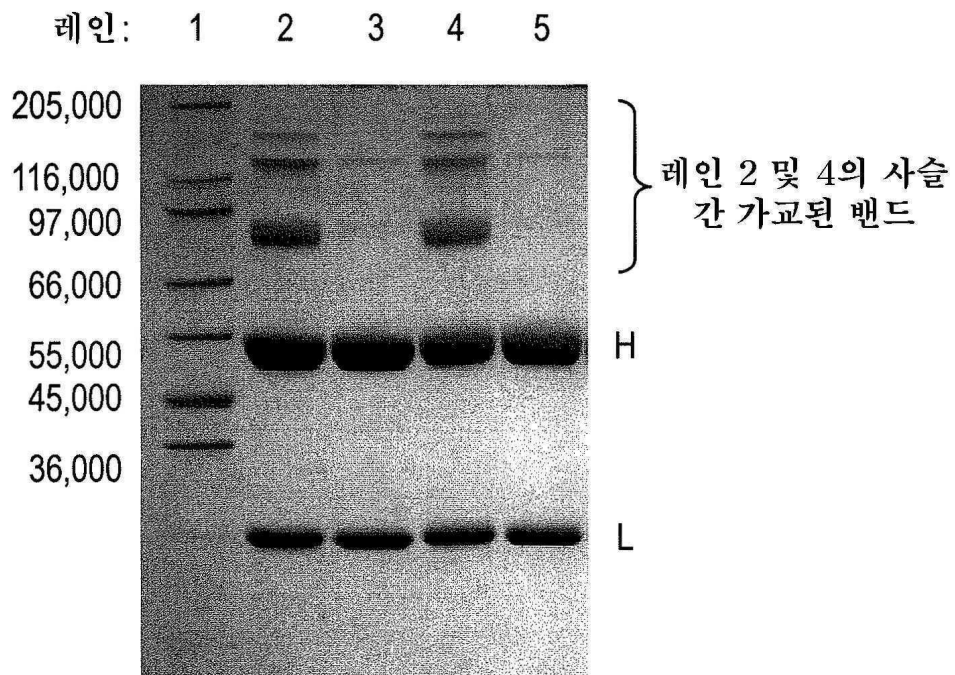
DM1 (또는 DM4) 및 말레이미드-설폰-NHS 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합



도면8

FIG. 8

본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(세포-
Ma1)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여
제조된 접합체의 환원 SDS-PAGE



도면9

FIG. 9A

본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 항체-(설폰-Mal)-DM1
접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 단백질
랩칩 전기영동

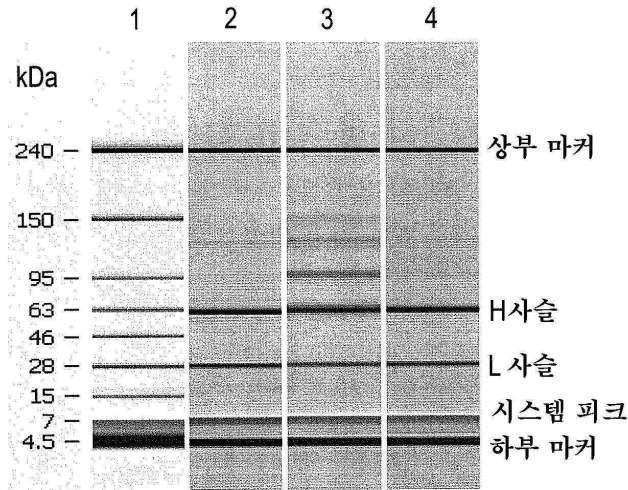


FIG. 9B

		로딩된 총 단백질 질량의 %		
밴드 MW (kDa)		비결합 Ab	Ab-Sulfo-Mal-DM1 2 단계	Ab-Sulfo-Mal-DM1 본 방법
L 사슬	18	-	-	1
	29	30	23	28
H 사슬	62	70	53	70
	99	-	15	1
	130	1	7	1
	152	-	3	-

도면10

FIG. 10A

본 발명에 기재된 방법에 의하여 제조된 Ab-(3-설폰-Mal)-DM1 접합체 (3.6 D/Ab)

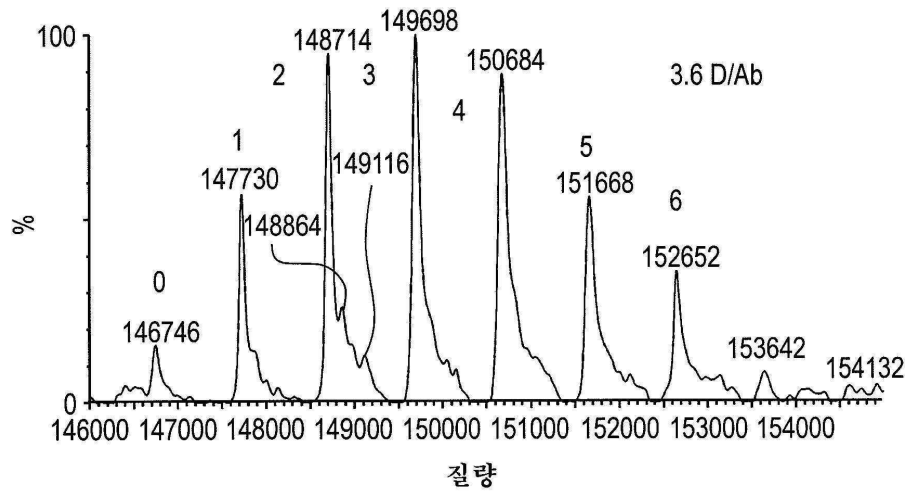
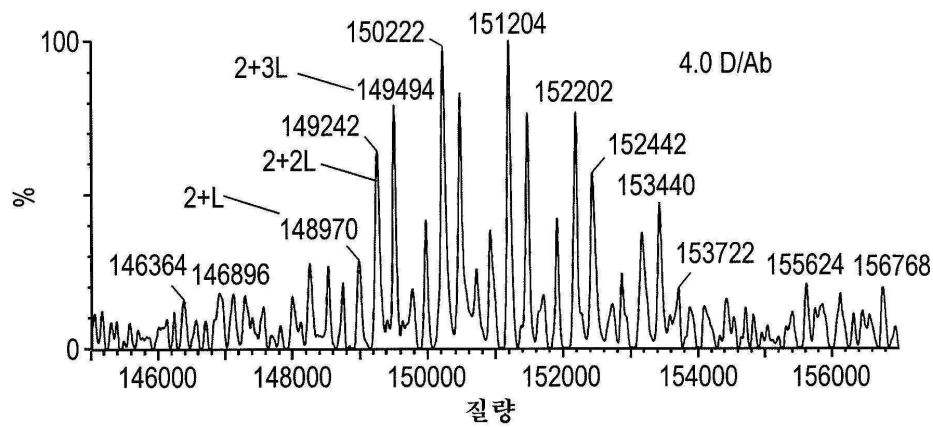


FIG. 10B

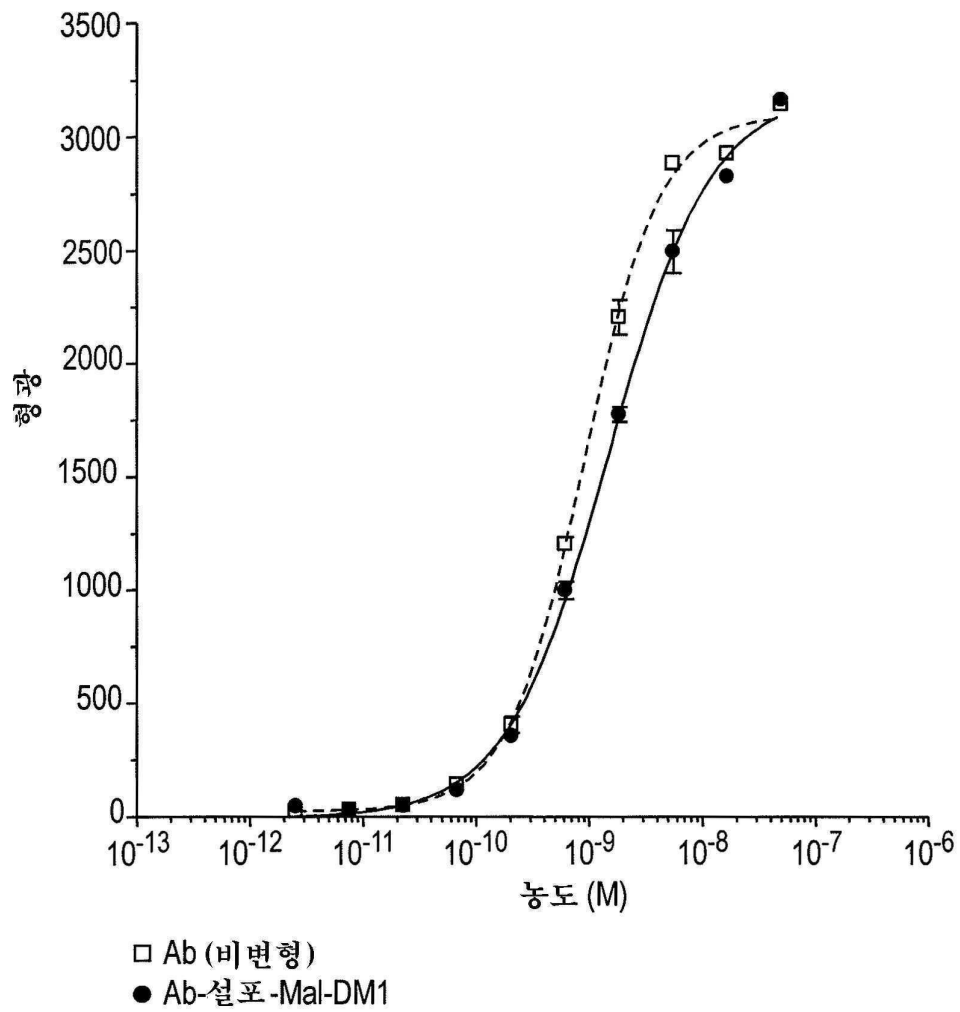
Ab-(3-설폰-Mal)-DM1 접합체 (4.0 D/Ab)
전통적인 2-단계 방법



도면11

FIG. 11

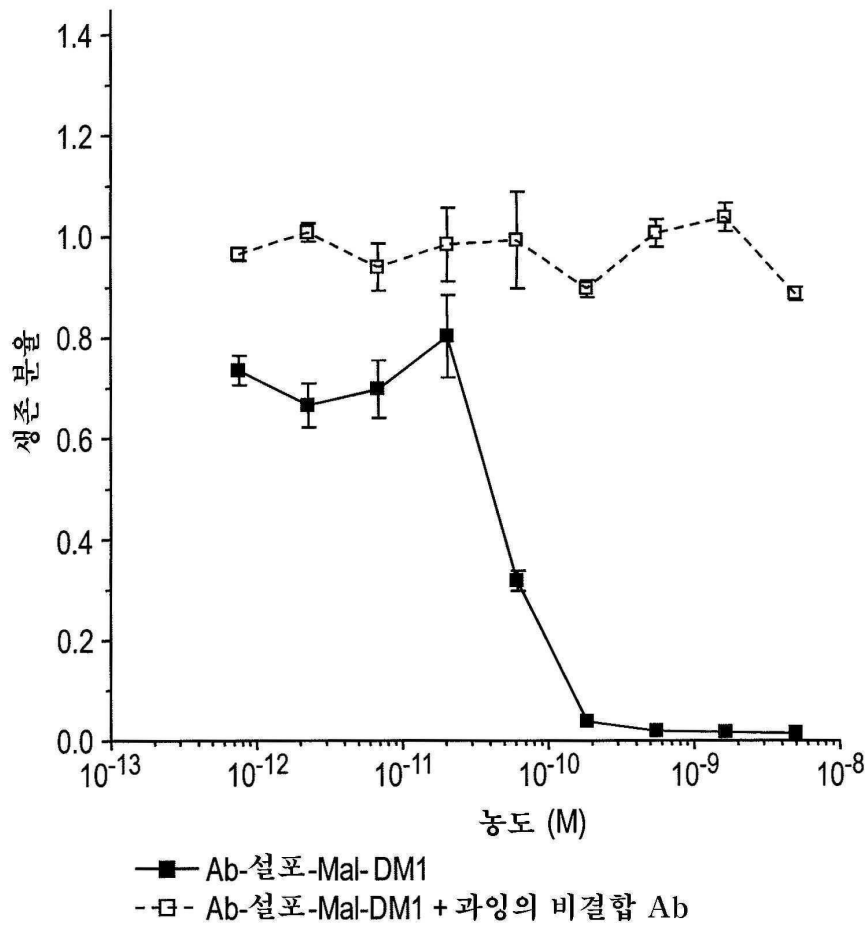
CanAg 항원-발현 COLO205 세포에 대한 (본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된) 항체당 5.6 DM1를 포함하는 항-CanAg 항체-설포-Mal-DM1 접합체의 결합 대 비변형 항체의 결합



도면12

FIG. 12

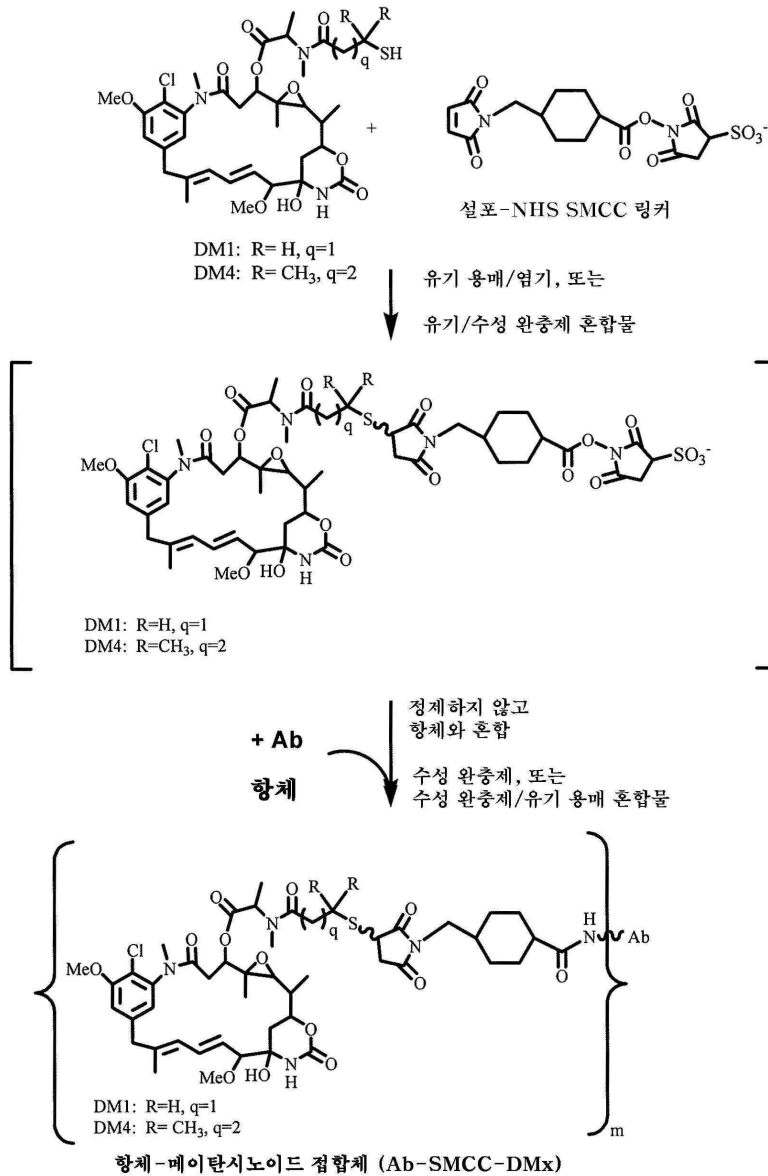
(본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된) 항체당 5.6 DM1을 포함하는
항-CanAg 항체-세포-Mal-DM1 접합체의 CanAg 항원-발현
COLO205 세포에 대한 시험관 내 세포독성



도면13

FIG. 13

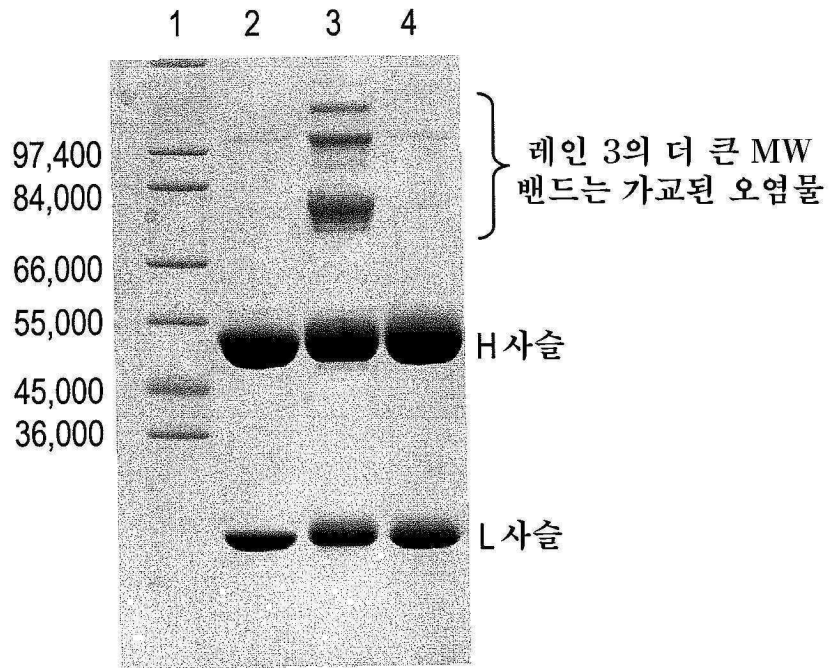
DM1 (또는 DM4) 및 설폰-NHS SMCC 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합



도면14

FIG. 14

본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(SMCC)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 환원 SDS-PAGE



도면15

FIG. 15A

본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 항체-(SMCC)-DM1 접합체 대 전통적인 2-단계 방법을 이용하여 제조된 접합체의 단백질 랩칩 전기영동

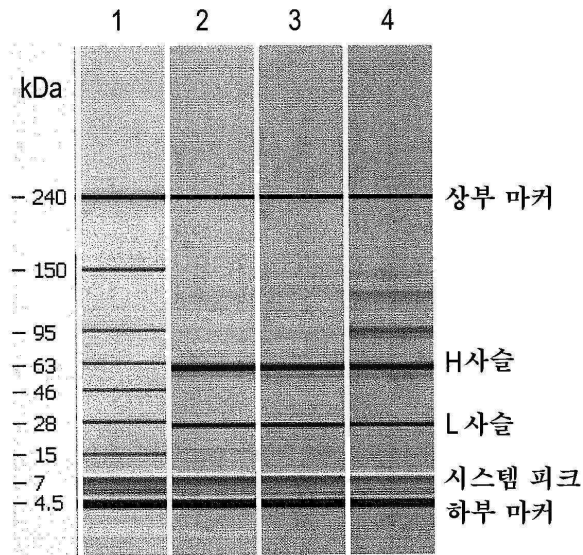


FIG. 15B

		로딩된 총 단백질 질량의 %		
밴드 MW (kDa)		Ab-SMCC-DM1 본 방법	비결합 Ab	Ab-SMCC-DM1 2 단계
L 사슬	27	30	30	24
	56	2	2	2
H 사슬	61	67	68	54
	96	1	-	12
	129	1	-	6
	148	-	-	2

도면16

FIG. 16A

전통적인 2 단계 방법으로써 제조된
Ab SMCC-DM1, 3.1 D/Ab

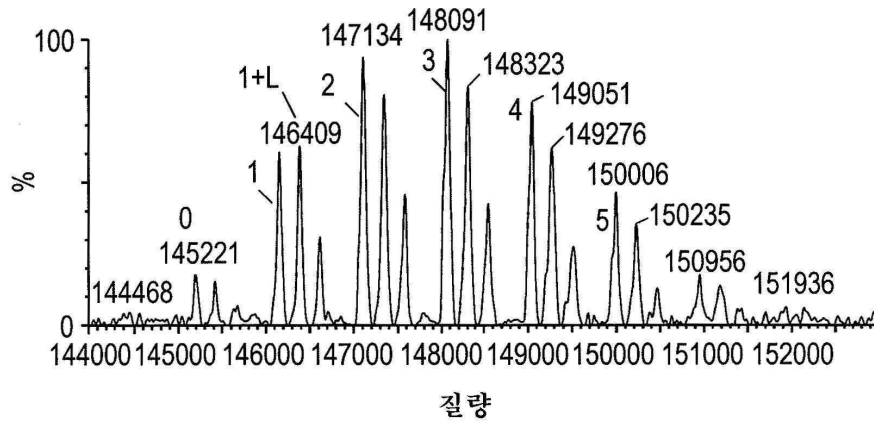
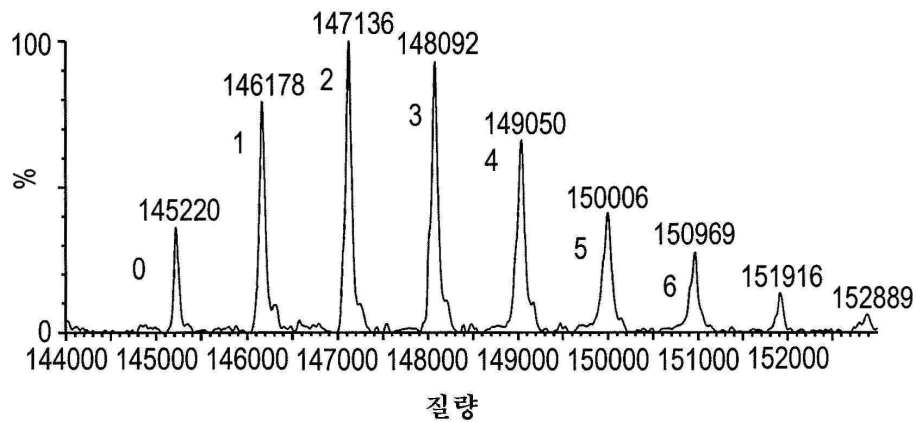


FIG. 16B

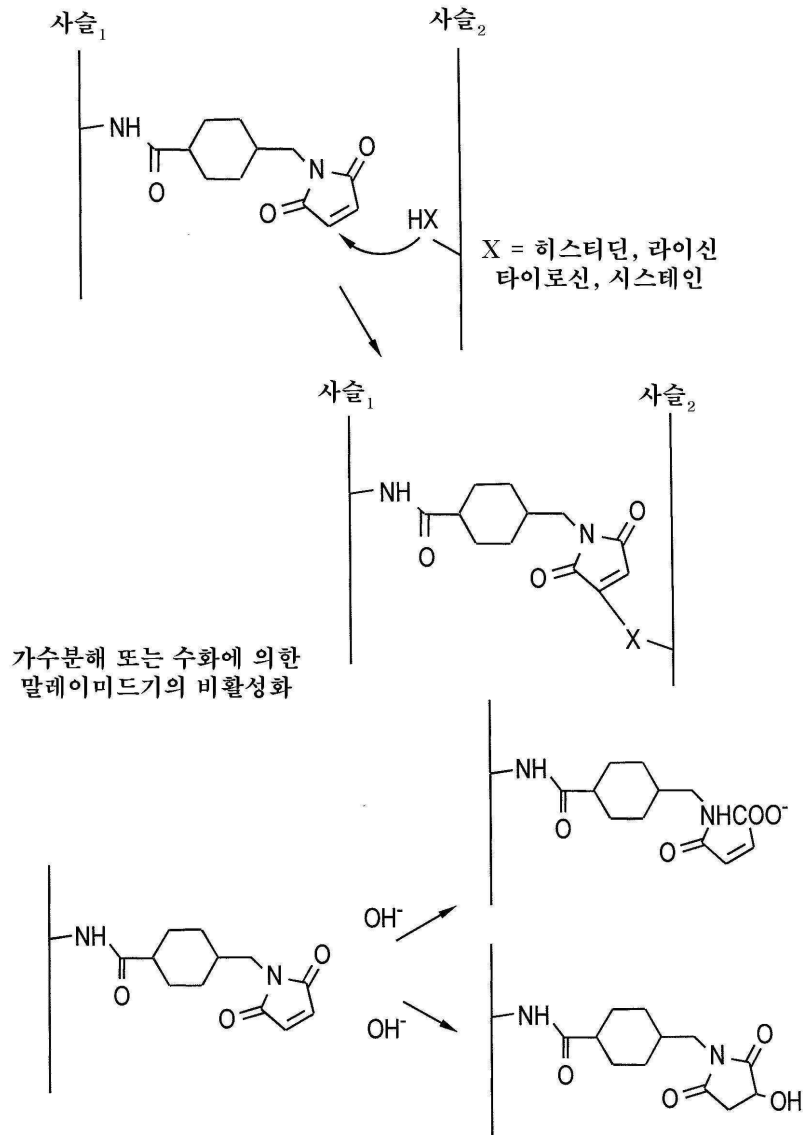
본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된
Ab-(SMCC)-DM1, 3.1 D/Ab



도면17

FIG. 17

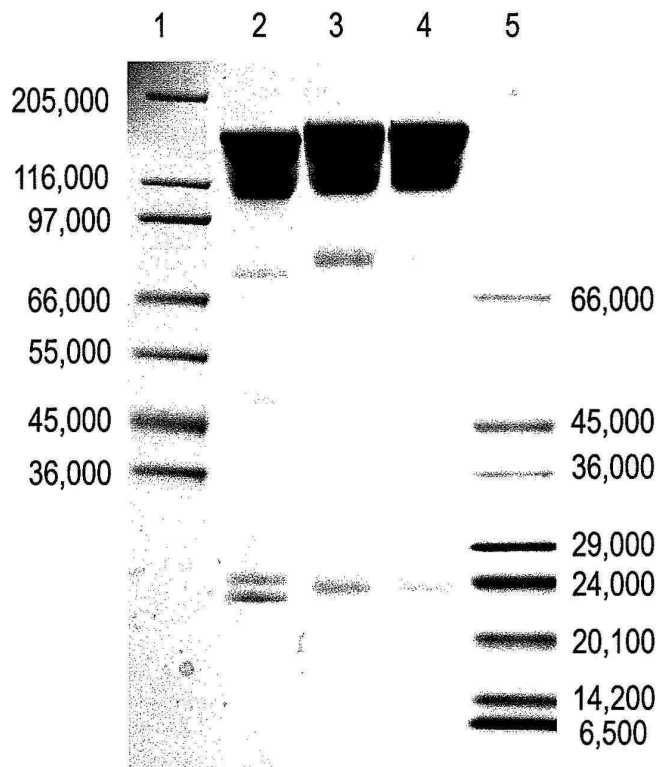
전통적인 2-단계 방법에 의한 접합 동안 사슬 간 가교 및 말레이미드
비활성화에 대하여 제안된 메커니즘



도면18

FIG. 18

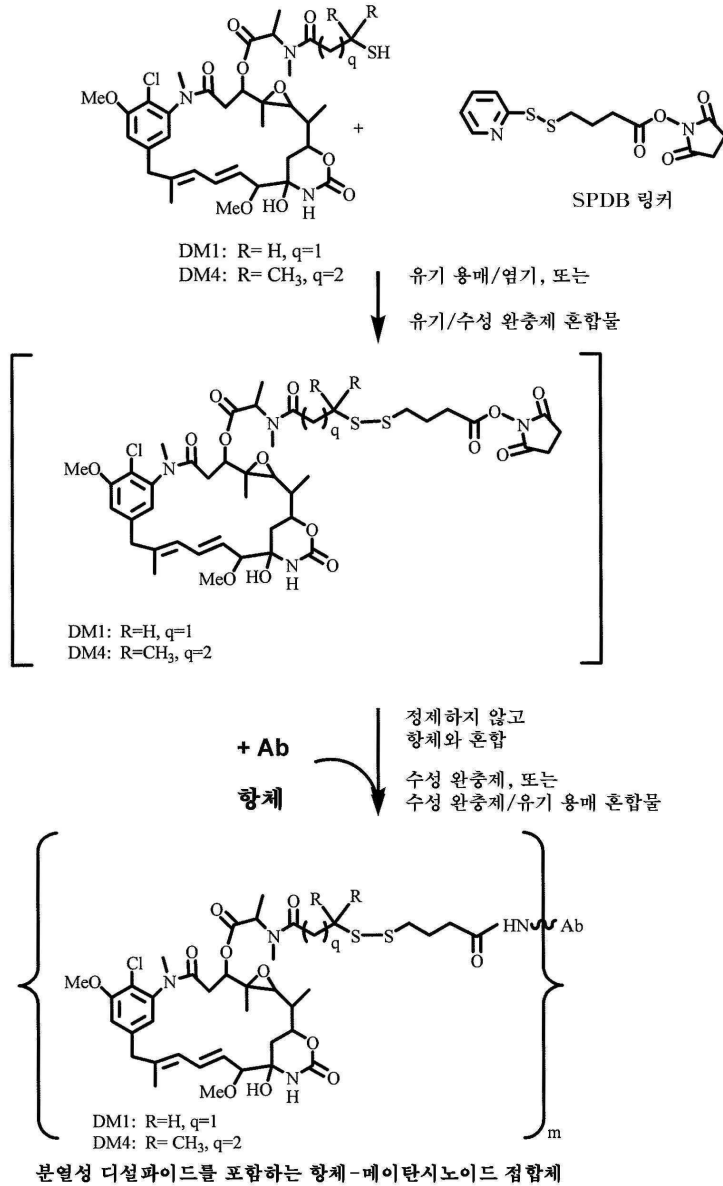
본 발명에 기재된 방법을 이용하여 제조된 Ab-(설폰-Mal)-DM4 접합체 및 항체 접합 반응 전에 4-말레이미도부티르산을 이용하는 유리 DM4 티올의 퀀칭(초기 DM4 + NHS-설폰-Mal 이중이작용성 시약 커플링 반응 후)의 비환원 SDS PAGE



도면19

FIG. 19

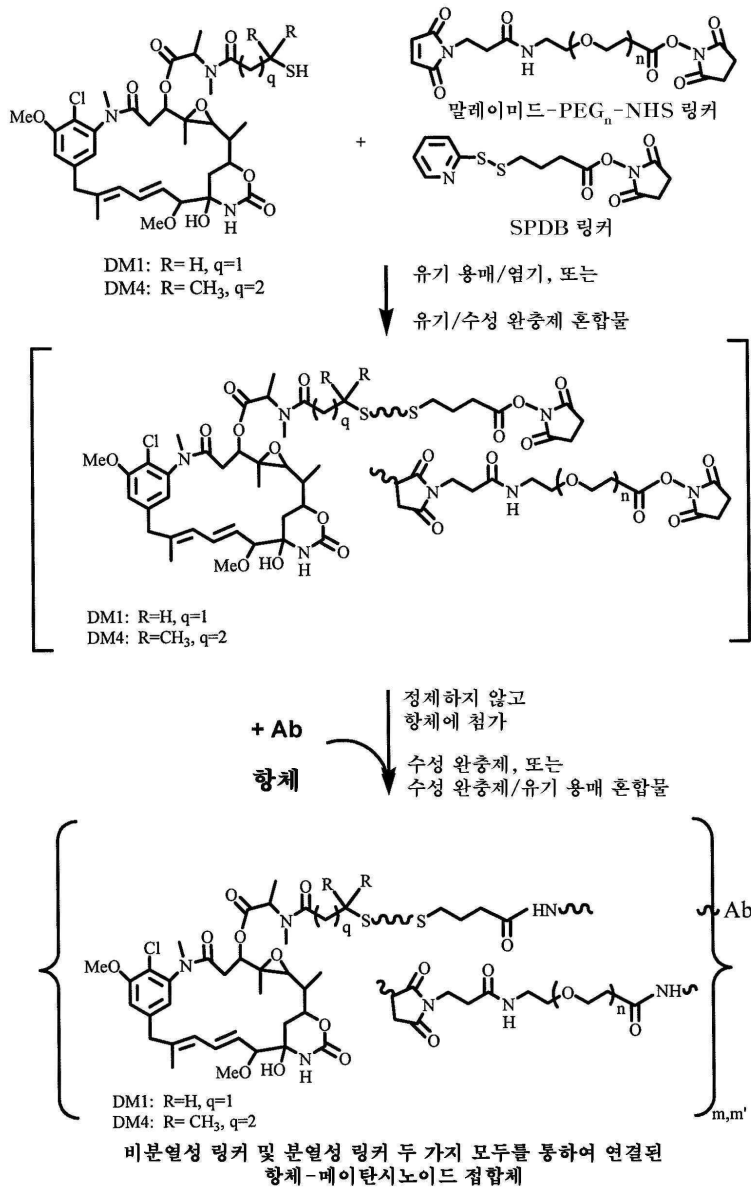
DM1 (또는 DM4) 및 SPDB 링커의 반응 혼합물을 이용하는 항체의 디설파이드-연결된 접합체의 제조



도면20

FIG. 20

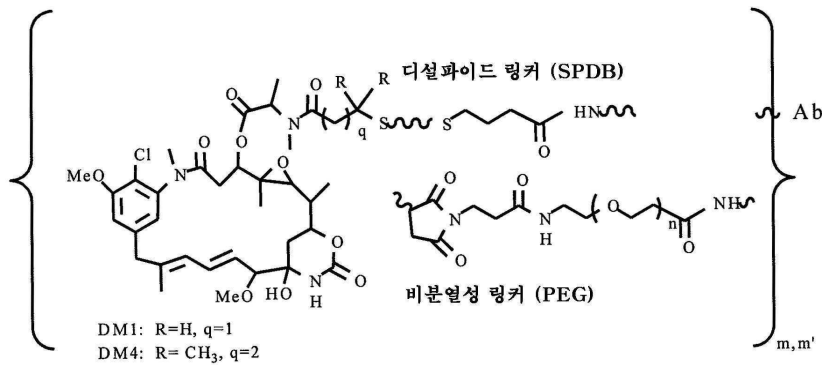
SPDB와 NHS-PEG_n-Mal 링커 두 가지 모두 및 DM1 (또는 DM4)의 미정제 반응 혼합물과의 항체 접합을 통한, 디설파이드- 및 비분열성 PEG_n-Mal 링커 두 가지 모두를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조



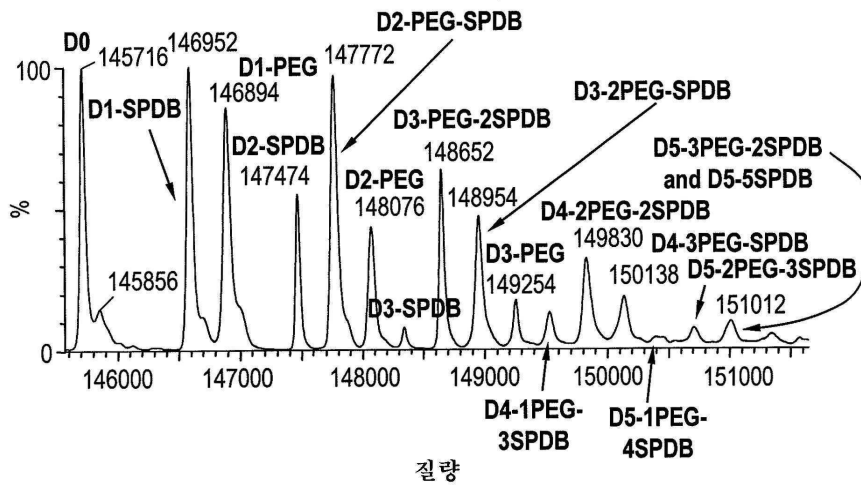
도면21

FIG. 21

(SPDB와 NHS-PEG-Mal 링커 두 가지 모두 및 DM1 (또는 DM4)의 미정제 반응 혼합물과 항체의 접합에 의하여 제조된) 디설파이드- 및 비분열성 PEG4-Mal 링커 두 가지 모두를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체의 MS. 접합체는 항체 분자당 평균 3.5 메이탄시노이드 분자의 부하를 가졌다.



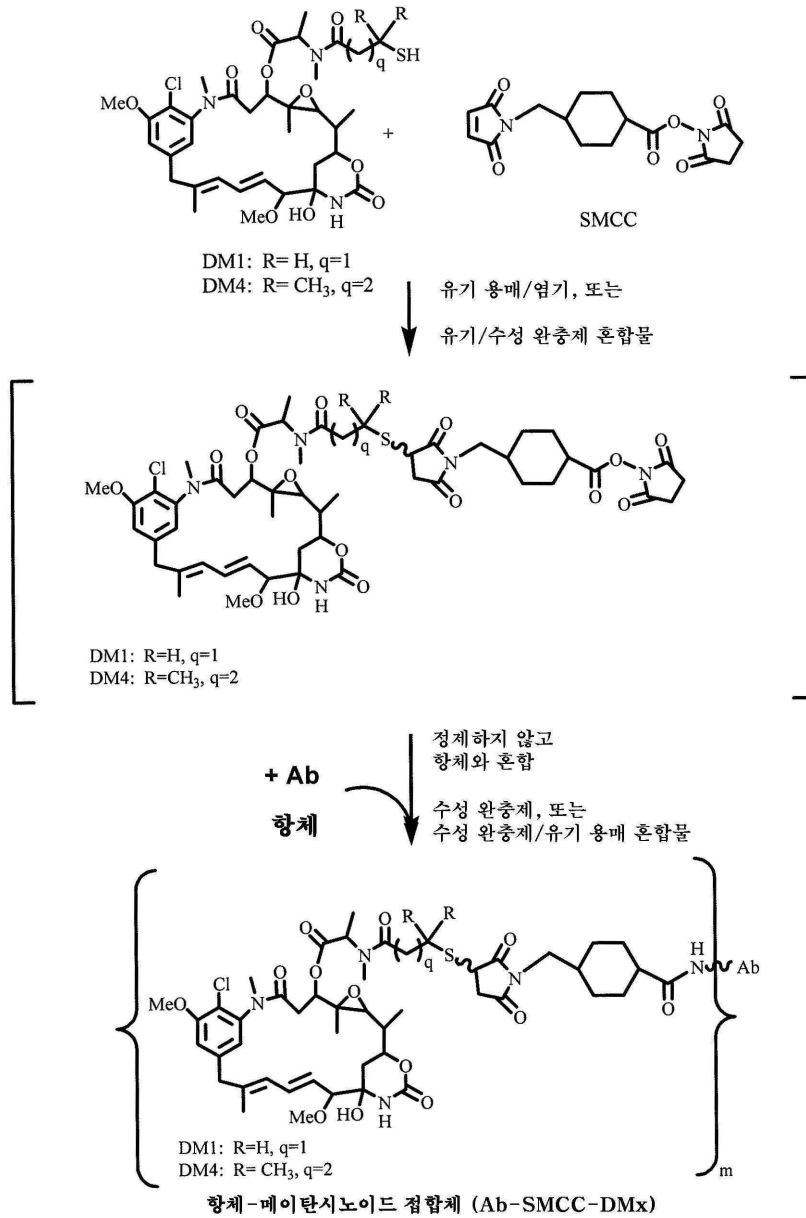
비분열성 및 분열성 링커 두 가지 모두를 통하여 연결된
항체-메이탄시노이드 접합체



도면22

FIG. 22

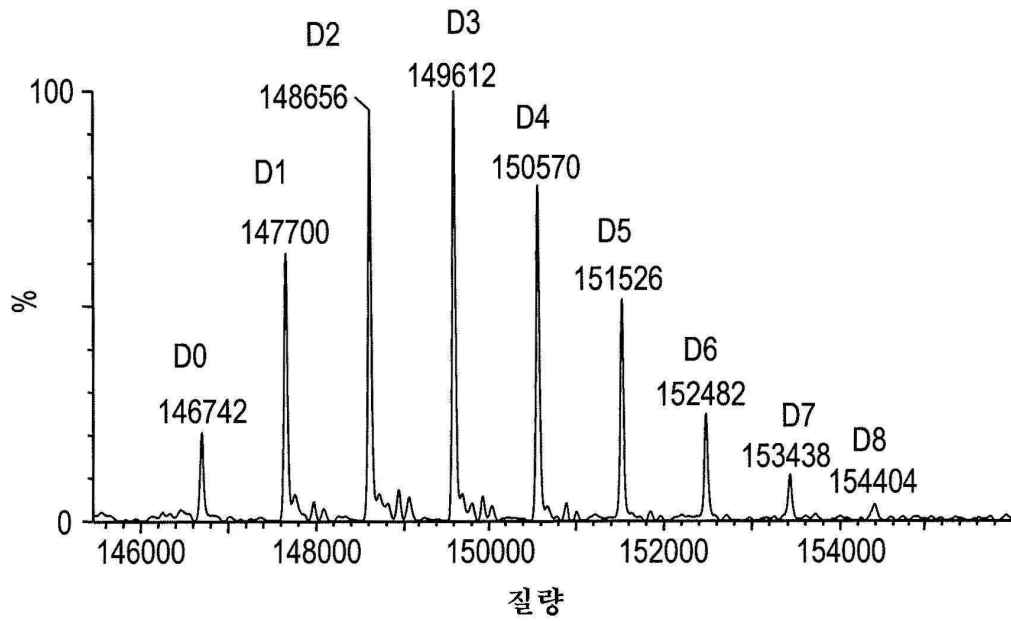
DM1 (또는 DM4) 및 SMCC 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합



도면23

FIG. 23

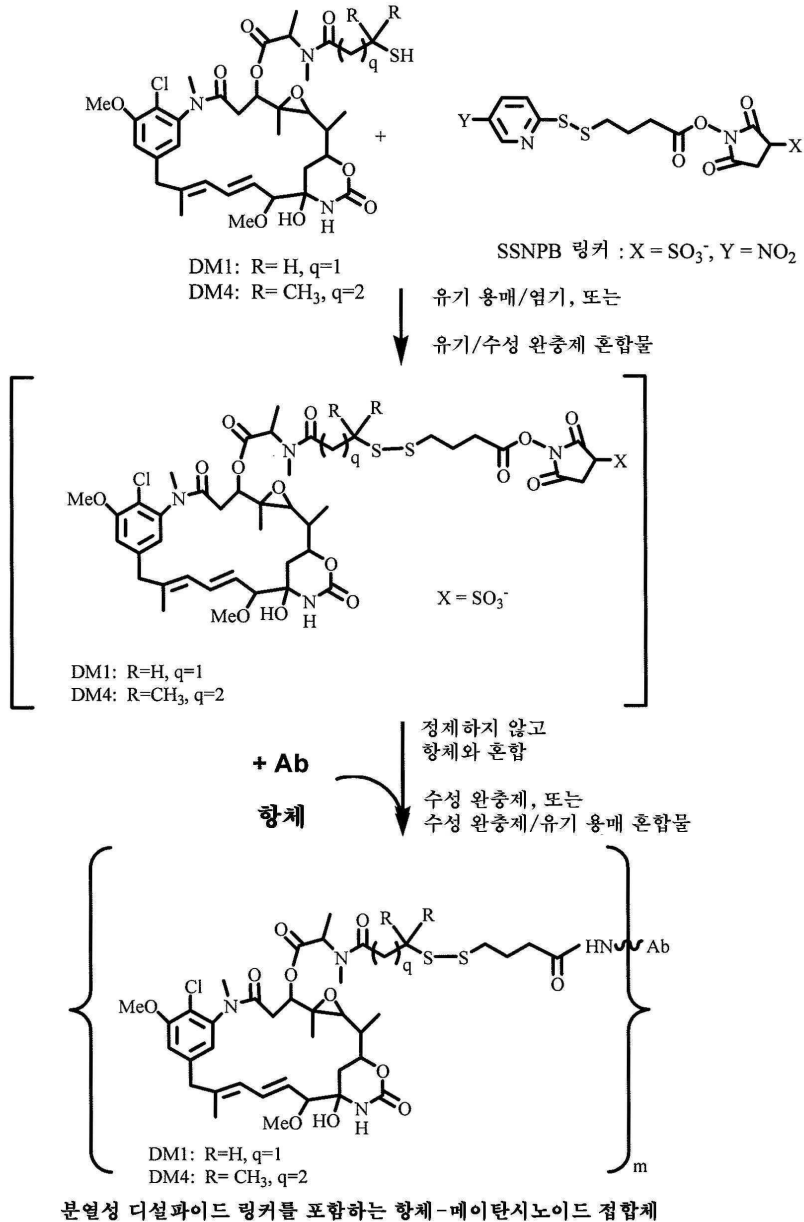
항체당 평균 3.1 DM1을 포함하는, 본 발명에 기재된 방법에 의하여
SMCC를 이용하여 제조된 항체-SMCC-DM1 접합체의 MS



도면24

FIG. 24

DM1 (또는 DM4) 및 SSNPB 링커의 반응 혼합물을 이용하는
항체의 디설파이드-연결된 접합체의 제조



도면25

FIG. 25

DM1 (또는 DM4) 및 설폰-NHS SMCC 링커의 반응 혼합물과 항체의 접합

