



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월03일
(11) 등록번호 10-2463267
(24) 등록일자 2022년11월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/113 (2006.01) A61K 47/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 1/1133 (2013.01)
A61K 47/65 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2017-7003843
- (22) 출원일자(국제) 2015년07월17일
심사청구일자 2020년07월17일
- (85) 번역문제출일자 2017년02월10일
- (65) 공개번호 10-2017-0028435
- (43) 공개일자 2017년03월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/040931
- (87) 국제공개번호 WO 2016/014360
국제공개일자 2016년01월28일
- (30) 우선권주장
62/028,679 2014년07월24일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US20110097322 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
프랭클린 제이미
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
린 신 신
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 27 항

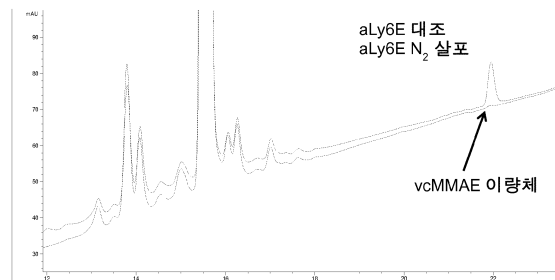
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 적어도 하나의 트리설파이드 결합을 함유하는 단백질에서 티올 모이어티에 제제의 접합 방법

(57) 요약

본 발명은 적어도 하나의 디설파이드 결합 및 적어도 하나의 트리설파이드 결합을 함유하는 단백질에서 티올 모이어티에 제제의 개선된 접합 방법을 제공한다. 예시적 구현예는 생산 공정에서 반응성 설파이드 모이어티의 존재하에 창출된 불순물이 실질적으로 없는 항체 약물 접합체의 생산을 포함한다.

대표도 - 도4b



(52) CPC특허분류

A61K 47/6803 (2017.08)

A61K 47/6849 (2017.08)

(72) 발명자

고렐 제프리

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1

틀리 티모시

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1

허친슨 매튜

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1

베치렐 채리티 터커

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 적어도 하나의 디설파이드 결합 및 적어도 하나의 트리설파이드 결합을 함유하는 단리된 단백질에서 티올 모이어티에 제제를 접합시키는, 방법:

- (a) 적어도 하나의 티올기를 포함하는 환원된 단백질 및 반응성 설파이드를 포함하는 조성물을 형성하기 위해 단리된 단백질에서 적어도 하나의 설파이드 결합을 환원시키는 단계;
- (b) 상기 조성물의 상기 반응성 설파이드 함량을 감소시키는 단계; 및
- (c) 단백질-제제 접합체를 형성하기 위해 상기 환원된 단백질의 상기 적어도 하나의 티올기에 제제를 접합시키는 단계.

청구항 2

하기 단계를 포함하는, 단리된 항체에서 트리설파이드 결합을 디설파이드 결합으로 전환시키는, 방법:

- (a) pH 5.0 내지 pH 8의 pH에서 TCEP와 용액에서 적어도 하나의 트리설파이드 결합을 함유하는 적어도 하나의 단리된 항체를 환원시키는 단계;
- (b) 상기 용액을 질소 기체와 접촉시키는 단계; 및,
- (c) 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성하기 위해 아우리스타틴, 또는 이의 유도체를 상기 환원된 항체에 접합시키는 단계.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 환원 단계가 환원제와 상기 단리된 단백질을 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 환원제가 적어도 하나의 디티오프레이톨 (DTT), 베타-머캅토에탄올 (β ME), 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP), 시스테인, L-시스테인, 환원된 글루타티온 (GSH) 및 L-GSH인, 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 환원 단계가 0.1 내지 8 mM의 농도로 화학 환원제와 제1항의 단리된 단백질 또는 제2항의 단리된 항체의 접촉을 포함하는, 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 환원 단계가 4.5 내지 6.5의 pH에서 수행되는, 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제 1 항의 감소 단계 또는 제 2 항의 접촉 단계가 5.0 내지 6.0의 pH로 상기 조성물의 상기 pH 조정을 포함하는, 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 감소 단계가 질소 공급원과 상기 조성물의 접촉을 포함하고, 상기 질소 공급원이 질소 기체를 포함하는, 방법.

청구항 8

제 2 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 접촉이 1 분 내지 240 분의 기간 동안 수행되는, 방법.

청구항 9

제 2 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 접촉이 10 입방 센티미터/분 내지 60 입방 센티미터/분의 속도로 질소 기체로 제 2 항의 용액 또는 제 7 항의 조성물 살포를 포함하는, 방법.

청구항 10

제 2 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 접촉이 상기 환원 단계에 대하여 최적의 혼합 속도보다 적어도 200% 더 큰 속도로 질소 기체의 존재하에서 제 2 항의 용액 또는 제 7 항의 조성물 혼합을 포함하는, 방법.

청구항 11

제 2 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 접촉이 5.0 내지 8.0의 pH에서 수행되는, 방법.

청구항 12

제 2 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 접촉이 4℃ 내지 40℃의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 13

제 2 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 접촉이 상기 환원 단계 수행에 대하여 일정 시간 미만인 시간 동안 상기 환원 단계 중에 제 2 항의 용액 또는 제 7 항의 조성물 속으로 질소 기체 도입을 포함하는, 방법.

청구항 14

제 2 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 접촉이 적어도 하나의 트윈(tween) 및 소포제의 존재하에서 수행되는 것인, 방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 단리된 단백질이 항체 또는 항체 단편인, 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 항체 단편이 항원-결합 항체 단편, Fab, Fab', F(ab)₂, Fv 단편, 디아바디, 단일-사슬 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc인, 방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편이 IgG 항체, 인간 모노클로날 항체, 인간 면역글로불린 불변 영역, 인간 IgG 불변 영역, 인간 IgG1 불변 영역, 인간 IgG2 불변 영역, 인간 IgG3 불변 영역, 인간 IgG4 불변 영역, 또는 경쇄 불변 영역인, 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 IgG 불변 영역의 아이소타입이 IgG1인, 방법.

청구항 19

제 15 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편에서 설파이드 결합이 항체 중쇄와 경쇄 사이, 또는 항체 중쇄 사이, 또는 양쪽 항체 중쇄와 경쇄 사이 및 항체 중쇄 사이인, 방법.

청구항 20

제 1 항에 있어서, 상기 제제가 화학치료제, 핵산, 사이토카인, 면역억제제, 방사선동위원소, 항생제, 및 치료적 항체로부터 선택된 적어도 하나의 치료제인, 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 화학치료제가 아우리스타틴, 빈카 알칼로이드, 포도필로톡신, 탁산, 박카틴 유도체, 크립토펜, 메이탄시노이드, 콤프레타스타틴, 및 둘라스타틴으로부터 선택된 적어도 하나의 항-튜블린 제제인, 방법.

청구항 22

제 20 항에 있어서, 상기 화학치료제가 아우리스타틴, DNA 좁은 홈 결합제, DNA 좁은 홈 알킬화제, 엔디인, 렉시트롭신, 듀오카르마이신, 탁산, 푸로마이신, 돌라스타틴, 메이탄시노이드, 및 빈카 알칼로이드 중 적어도 하나인, 방법.

청구항 23

제 2 항 또는 제 22 항에 있어서, 상기 아우리스타틴이 MMAE 또는 MMAF인, 방법.

청구항 24

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 1 항의 제제 또는 제 2 항의 아우리스타틴이 상기 제제 또는 상기 아우리스타틴에 상기 환원된 단백질 또는 항체의 상기 적어도 하나의 티올기를 연결하기 위해 적용된 링커 모이어티를 포함하는, 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 상기 링커 모이어티가 절단가능한 링커, 비-절단가능한 링커, 세포내 조건하에서 절단하기 쉬운 링커, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩타이드 링커, 또는 디펩타이드 링커인, 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 디펩타이드 링커가 발린-시트룰린 (val-cit), 페닐알라닌-라이신 (phe-lys) 링커, 또는 공유 결합을 형성하기 위해 유리 티올과 반응하는 말레이미드 관능기인, 방법.

청구항 27

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 1 항의 단백질-제제 접합체 또는 제 2 항의 ADC가 aCD22-val-cit-MMAE, aCD22-val-cit-MMAF, aLy6E-val-cit-MMAE, aLy6E-val-cit-MMAF, aCD79b-val-cit-MMAE, aCD79b-val-cit-MMAF, aNaPi2b-val-cit-MMAE, aNaPi2b-val-cit-MMAF, aMUC16-val-cit-MMAE, a MUC16-val-cit-MMAF, sSTEAP1, 및 aETBR 중 하나인, 방법.

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
- 청구항 82
삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원 데이터

[0002] 본원은 2014년 7월 24일 출원된 미국 가특허 출원 시리즈 번호 62/028,679에 우선권을 주장하고, 이는 본원에서 참고로 편입된다. 본 개시내용에서 인용된 각각의 출원 및 특허, 뿐만 아니라 각각의 출원 및 특허에서 인용된 각 문헌 또는 참조문헌 (각 발행된 특허의 소송 동안 포함; "출원 인용된 문헌"), 및 임의의 이들 출원 및 특허로부터 우선권을 주장하는 및/또는 임의의 이들 출원 및 특허에 상응하는 각각의 PCT 및 외국 출원 또는 특허, 및 각각의 출원 인용된 문헌에서 인용된 또는 참조된 각각의 문헌은 이로써 본원에서 참고로 명확히 편입되고 본 발명의 실시에서 이용될 수 있다. 더욱 일반적으로, 문헌 또는 참조문헌은 이 본문에서, 한쪽 청구범위 이전의 참조 목록에서, 또는 본문 자체에서 인용되고; 그리고, 각각의 이들 문헌 또는 참조문헌 ("본원에서 인용된 참조문헌"), 뿐만 아니라 본원에서 인용된 참조문헌 각각에서 인용된 각 문헌 또는 참조문헌 (임의의 제조자의

시방서, 설명서, 등 포함)은 이로써 본원에서 참고로 명확히 편입된다.

배경 기술

- [0003] 재조합 단백질은 넓은 범위의 질환의 치료에 이용된 치료적 화합물의 중요한 부류가 되어 왔다. 생명공학의 분야에서 최근 성공은 상기 단백질의 다량을 생산하기 위한 성능을 개선하여 왔다. 그러나, 생성물의 광범위한 특성규명은 단백질이 상당한 이종성이 되는 것을 증명한다. 예를 들어, 분자 이종성은 화학적으로-유도된 변형 예컨대 산화, 탈아미드화, 및 당화반응 게다가 번역후 변형 예컨대 단백질 분해 성숙, 단백질 접합, 당화, 인산화, 및 디설파이드 결합 형성에서 비롯될 수 있다. 치료적 생성물이 다수의 정교한 분석적 기술을 광범위하게 특징으로 해야 하고 그리고 생성물 품질 및 점조도를 확보하는 허용가능한 표준을 충족시켜야 하기 때문에 분자 이종성은 요망되지 않는다.
- [0004] 항체 (또는 면역글로불린)은 이들이 큰, 다중-쇄 분자인 사실로 인해 상기 구조적 이종성이 특히 되기 쉽다. 예를 들어, IgG 항체는 4 폴리펩타이드 사슬: 2 경쇄 폴리펩타이드 (L) 및 2 중쇄 폴리펩타이드 (H)로 구성된다. 4 쇠는 중쇄 및 경쇄에 존재하는 시스테인 잔기들 사이에서 형성하는 디설파이드 결합에 의해 전형적으로 연결된다. 이들 디설파이드 연결기는 원상태 H₂L₂ 사량체의 전반적인 구조를 지배한다. 전반적으로, IgG1 항체는, H 쇠를 연결하는 2 힌지 영역 디설파이드를 포함하여, 4 쇠간 디설파이드 결합, 및 각 H 및 L 중쇄 사이에서 1 디설파이드 결합을 함유한다.
- [0005] 항체-약물 접합체 (ADCs)는, 항체의 생물학적 특이성을 특이적 치료 화합물의 높은 효력과 조합하는, 강력한 약물 분자에 커플링된 모노클로날 항체 (mAbs)이다. 약물 화합물은 라이신- 또는 시스테인-지향된 링커 화학을 이용하여 항체에 커플링될 수 있다 (Wu, A. M., Nat. Biotechnol. 23:1137-46 (2005)). 시스테인-지향된 화학을 이용하여, 약물은 쇠간 디설파이드 결합의 환원으로부터 유도된 원상태 시스테인 또는 특별히 조작된 시스테인에 연결될 수 있다. 화학양론적으로, 1 환원된 디설파이드 결합은 약물 접합을 위하여 2 유리 티올을 노출시켜야 한다. 접합이 IgG1 분자의 쇠간 시스테인에 대한 경우, 수득한 접합체는 항체 분자 당 0, 2, 4, 6, 또는 8 약물을 갖는 종을 주로 함유한 혼합물로 구성된다. 항체 당 접합된 약물 분자의 평균 수 (약물 대 항체 비; "DAR")는, 평균 DAR이 용량 당 전달된 약물의 양을 반영함에 따라, ADC 생성물에서 중요한 품질 속성이고, 따라서, ADC의 양쪽 안전성 및 효능에 영향을 미칠 수 있다. 불완전한 디설파이드 결합 형성, 또는 산화 또는 베타-제거를 통한 결합 파손 그 다음 디설파이드 스크램블링은 항체 이종성의 모든 잠재적 공급원이다. 부가적으로, 트리설파이드 결합 형성은 인간 IgG2 항체의 쇠간, 힌지 영역 결합 내에서 보고되었다 (Pristatsky et al, Anal. Chem. 81:6148 (2009); Gu et al, Anal. Biochem. 400:89-98 (2010)). 트리설파이드 결합은 추가의 환원자가 분자내에서 "트리설파이드 브릿지" (-CH₂-S-S-S-CH₂-)를 형성하는 경우 발생하고 그리고 ADC 생산 동안 추가의 점조도 및 오염 문제를 야기할 수 있다.
- [0006] 트리설파이드 연결기는 슈퍼옥사이드 디스무타아제 (Okado-Matsumoto et al., Free Radical Bio. Med. 41:1837 (2006)), 인터류킨-6의 절단된 형태 (Breton et al., J. Chromatog. 709:135 (1995)), 및 박테리아성으로 발현된 인간 성장 호르몬 (hGH) (Canova-Davis et al., Anal. Chem. 68:4044 (1996))에서 앞서 검출되고 있다. 디설파이드 결합, 예를 들어 인슐린, 인터류킨 및 특정 응고 인자 (예컨대 인자 VII)을 함유하는 다른 폴리펩타이드는 또한 잠재적으로 트리설파이드 유도체를 형성할 수 있다.
- [0007] hGH의 경우에서, 트리설파이드 형성이 발효 공정 동안 방출된 H₂S에 의해 촉진되었음 (PCT 특허 출원 번호 WO 96/02570), 및 hGH의 트리설파이드 함량이 용액내 H₂S에 노출에 의해 증가되었음 (미국 특허 번호 7,232,894)이 추측되었다. hGH의 트리설파이드 유도체는 *에스캐리치아 콜라이*에서 발현 동안 형성된 재조합 hGH에서 또한 기재되어 있다 (Andersson et al., Int. J. Peptide Protein Res. 47: 311-321 (1996); A. Jespersen et al., Eur. J. Biochem. 219:365-373 (1994)).
- [0008] PCT 공개 번호 WO 96/02570은 설파이트 화합물, 예컨대 나트륨 설파이트, 칼륨 설파이트 또는 암모늄 설파이트, 또는 알칼리성-토금속 설파이트 예컨대 마그네슘 설파이트 또는 칼슘 설파이트로 유도체를 처리함으로써 hGH 트리설파이드 유도체를 역으로 hGH의 천연형으로 전환하는 또 다른 방법을 기재한다.
- [0009] PCT 공개 번호 WO 00/02900은, 발효 단계 동안 또는 이후 금속 염 (예를 들어 칼륨 또는 나트륨 염)의 부가를 특징으로 하는, 소량의 트리설파이드로 재조합 펩타이드 생산 방법을 기재한다.
- [0010] PCT 공개 번호 WO 04/31213은 유전적으로 변형된 숙주세포에서 "성장 호르몬 길항제 폴리펩타이드"의 재조합 생산으로 생산된 트리설파이드 동형체 불순물의 양 감소 방법으로서, 여기에서 불순물이 "머캅토 화합물" (예컨대

설페이트, 글루타티온, β-머캅토-에탄올, 디티오프레이톨, 시스테인)과 접촉되는 방법을 개시한다. 상기 출원 은 또한 형성된 트리설페이드의 양으로 환원을 달성하기 위해 킬레이트제 또는 금속 염의 이용을 개시한다.

- [0011] 불행하게도, 용액에서 또는 발효 공정 동안, 시스테인, 머캅토 화합물, 설페이트 화합물, 금속 염, 등등에 노출에 의한 트리설페이드 결합의 제거는 특히 대규모 가공에 대하여 몇 개의 결점을 갖는다. 예를 들어, 다량의 이들 화합물이 필요하다. 부가적으로, 많은 이들 화합물질이 공지된 독성을 가짐에 따라, 상기 방법은 또한 트리설페이드 결합이 제거된 이후 단백질로부터 화합물질을 제거하기 위해 추가 가공 단계(들)을 필요로 하고, 잠재적 불순물의 또 다른 공급원 및 공정 가변성을 도입한다. 또한, 용액에서 상기 화합물질에 노출에 의한 트리설페이드 결합의 제거는 요망되지 않는 디설페이드 연결기의 형성을 통해 응집을 촉진시킬 수 있다.
- [0012] 따라서, 재조합 단백질의 제조 (항체 및 ADCs의 생산 포함)에서 사용된 생산 및 정제 절차 동안 트리설페이드 결합의 존재에 의해 야기된 가변성 및 오염을 다루기 위해, 상기 가변성 및/또는 불순물의 축소 또는 제거를 위하여 효율적인 및 개선된 수단은 본원에서 개시된 방법에 의해 제공된다.

발명의 내용

- [0013] 구현예의 요약
- [0014] 쇠간 시스테인 연결기를 갖는 항체-약물 접합체 (ADCs)는 총 쇠간 디설페이드 결합의 분획을 환원시킴으로써 생성된다. 새로 이용가능한 유리 티올은 그 다음 (더 큰 링커-약물 중간체의 종종 이미 일부인) 약물 분자와 접합된다. 부분적 환원이 비변성 조건하에서 수행됨에 따라, 쇠내 디설페이드 결합에 참여하는 시스테인에 대한 연결기는 전형적으로 관측되지 않는다. 티올 반응성 모이어티 (예컨대 말레이미드)를 함유하는 링커-약물은 과량으로 부가되어 모든 이용가능한 유리 티올의 접합을 보장한다. 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP)은, 그의 호의적인 반응 동력학, 반응에 앞서 용액 안정성으로 인해, 및 항체 티올과 혼합된 디설페이드를 형성할 수 없기 때문에, 이들 공정에서 바람직한 환원제이다. TCEP의 1 분자는 1 디설페이드 결합을 환원시키는 것으로 기대되어, 약물 접합을 위하여 2 유리 티올을 노출시킨다. TCEP의 1 몰 당량 (1.0X TCEP:mAb)으로 환원 이후, 기대된 평균 DAR 값은 2.0이다. 유사하게, 4.0의 표적화된 평균 DAR 값을 달성하기 위해, 2 몰 당량의 예상된 TCEP 부가 (2.0X TCEP:mAb)가 필요할 것이다. 실제로, 환원 단계는 소정의 TCEP:항체 (TCEP:mAb) 물비를 이용하여 수행된다.
- [0015] 다중 시스테인-지향된 ADC 생성물의 개발 동안, 평균 DAR 값의 이론적 예측으로부터 편차는 관측되었고 보고되었다 (Cummock, et al. Bioconjugate Chem. 24:1154-60 (2013)). 이들 경우에서, 환원제 대 항체의 필요한 비는, 비록 주어진 많은 항체에 대하여 재생가능하여도, 항체 사이에서 뿐만 아니라 상이한 많은 동일한 항체 사이에서 다양하였다. 비록 일부 항체 묶이 이론적 예측에 매우 근접한 TCEP의 양을 필요하였어도, 대부분의 묶은 표적화된 평균 DAR 값을 달성하기 위해 증가된 TCEP:mAb 물비를 필요로 하였다. 트리설페이드 결합의 존재는 ADCs의 제조 동안 관측된 상기 가변성의 잠재적 공급원으로서 확인되었다. 트리설페이드는 이들 ADCs의 제조 동안 관측된 TCEP:mAb 비 가변성의 잠재적 공급원으로서 확인되었다.
- [0016] 부가적으로, 역상 HPLC 분석은 접합된 ADCs를 함유한 몇 개의 조성물에서 예기치 못한 불순물을 확인하였다. ADCs 및 불순물의 조사는 항체에 존재하는 트리설페이드 결합의 환원 결과로서 항체와 약물 분자 사이에서 접합 반응에 존재하는 반응성 설페이드 모이어티가, 이들 조성물에서 불순물이라고 밝혀진, 유리 약물 이량체의 형성에 참여하고 있었음을 지적하였다.
- [0017] 항체를 생산하기 위해 사용된 확립된 및 보증된 재조합 기술의 변경보다는, 본 발명자들은 환원 및/또는 접합 반응 동안 이들 조성물로부터 반응성 설페이드 종을 축소 또는 제거함으로써 트리설페이드 결합을 함유하는 재조합 단백질의 환원에서 발생하는 유리 약물 이량체 (및 다른 불순물) 형성의 환원 방법을 개발하였다.
- [0018] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은, 반응성 설페이드 및 적어도 하나의 티올기를 함유하는 환원된 단백질을 포함하는 조성물을 형성하기 위해 단리된 단백질에서 적어도 하나의 설페이드 결합을 환원시키는 단계, 및 수득한 조성물의 반응성 설페이드 함량을 감소시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 디설페이드 결합 및 적어도 하나의 트리설페이드 결합을 함유하는 단백질에서 티올 모이어티에 제제를 접합시키는 방법을 제공한다. 제제는 그 다음 환원된 단백질의 적어도 하나의 티올기에 접합되어 단백질-제제 접합체를 형성한다.
- [0019] 적어도 하나의 설페이드 결합 환원의 단계는 환원제와 단리된 단백질을 접촉시킴으로써 적어도 하나의 설페이드 결합의 적어도 부분적 환원을 포함할 수 있다.
- [0020] 단리된 단백질은 적어도 4 디설페이드 결합을 포함할 수 있다.

- [0021] 단리된 단백질은 또한 적어도 2 트리설파이드 결합을 포함할 수 있다.
- [0022] 환원 단계에 앞서, 단리된 단백질에서 설파이드 결합의 약 1% 내지 약 20%는 트리설파이드 결합일 수 있다. 환원 단계에 앞서, 단리된 단백질에서 설파이드 결합의 약 5% 내지 약 7%는 트리설파이드 결합일 수 있다.
- [0023] 환원 단계는 비-변성 조건에서 수행될 수 있다. 이들 반응에서, 환원제는 적어도 하나의 디티오프레이틀 (DTT), 베타-머캅토에탄올 (β ME), 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP), 시스테인, L-시스테인, 환원된 글루타티온 (GSH) 및 L-GSH일 수 있다. 환원제는 TCEP일 수 있고, TCEP는 TCEP 대 단리된 단백질의 소정의 몰비로 단리된 단백질과 혼합될 수 있다. TCEP 대 단리된 단백질의 소정의 몰비는 몰 과량의 TCEP일 수 있다.
- [0024] 단백질에서 적어도 하나의 설파이드 결합 환원의 단계는 약 0.1 내지 약 8 mM; 약 0.1 내지 약 5 mM; 약 0.1 내지 약 3 mM; 약 0.1 내지 약 1 mM; 약 8 mM; 약 5 mM; 약 3 mM; 약 1 mM; 및, 약 0.5 mM의 농도로 화학 환원제와 단리된 단백질의 접촉을 포함한다.
- [0025] 단백질에서 적어도 하나의 설파이드 결합 환원의 단계는 약 5.0 내지 약 8.0; 약 5.5 내지 약 7.5; 약 5.5 또는 약 6.5의 pH에서 수행될 수 있다.
- [0026] 환원 단계에 앞서, 단리된 단백질의 pH는 약 5.0 내지 약 8.0의 pH로 조정될 수 있다.
- [0027] 바람직하게는, 단백질에서 트리설파이드 결합의 약 100%가 환원된다.
- [0028] 환원 단계에 이어서, 티올 모이어티의 약 4 내지 약 8 몰은 환원된 모든 몰의 단리된 단백질에 대하여 제제와 접합에 이용가능할 수 있다.
- [0029] 조성물에서 반응성 설파이드 환원의 단계는 약 5.0 내지 약 6.0의 pH로 조성물의 pH 조정을 포함할 수 있고, 약 5.5의 pH로 조성물의 pH 축소를 포함할 수 있다.
- [0030] 조성물에서 반응성 설파이드 환원의 단계는 조성물로부터 액체 배지 제거 및 대체 액체 배지로 액체 배지 대체를 포함할 수 있다. 액체 배지는 버퍼를 포함할 수 있다.
- [0031] 조성물에서 반응성 설파이드 환원의 단계는 조성물에서 환원된 단백질을 고흡 지지체와 회합시킨 다음 반응성 설파이드가 부족한 대체 용액으로 조성물의 적어도 90%를 대체하는 것을 포함할 수 있다. 고흡 지지체는 적어도 하나의 필터 막, 선택적 투과막, 및 크로마토그래피 수지를 포함할 수 있다.
- [0032] 조성물에서 반응성 설파이드 환원의 단계는 조성물의 반응성 설파이드 함량을 축소하기에 충분한 속도로 환원 단계에서 조성물 혼합을 포함할 수 있다. 혼합은 단리된 단백질에서 설파이드 결합(들)을 환원시키기 위해 혼합의 최적 속도를 초과하는 증가된 속도로 조성물 교반을 포함할 수 있다. 증가된 속도로 혼합은 환원 단계에 대하여 전체 반응 시간 미만인 기간 동안 환원 단계에서 혼합 속도 증가를 포함할 수 있다.
- [0033] 조성물에서 반응성 설파이드 환원의 단계는 질소 공급원과 용액의 접촉을 포함할 수 있다. 질소 공급원은, 조성물을 통해 거품화될 수 있는, 질소 기체를 포함할 수 있다. 접촉은 또한 적어도 하나의 질소 기체, 공기, 및 아르곤 기체로 조성물 살포를 포함할 수 있다. 접촉은 약 1 분 내지 약 240 분의 기간 동안 수행될 수 있다. 접촉은 또한 약 10 입방 센티미터/분 내지 약 60 입방 센티미터/분의 속도로 질소 기체로 조성물 살포를 포함할 수 있다. 접촉은 또한 환원 단계에 대하여 최적의 혼합 속도보다 적어도 200% 더 큰 속도로 질소 기체의 존재하에서 조성물 혼합을 포함할 수 있다.
- [0034] 접촉 단계는 약 5.0 내지 약 8.0의 pH에서 수행될 수 있다. 접촉은 약 4°C 내지 약 40°C의 온도에서 수행될 수 있다. 접촉은 또한 약 15°C 내지 약 40°C의 온도에서 수행될 수 있다. 접촉은 또한 약 20°C의 온도에서 수행될 수 있다. 접촉은 또한 약 30°C의 온도에서 수행될 수 있다. 조성물의 표면적 대 용적의 비는 약 2일 수 있다. 접촉은 조성물을 함유하는 반응 용기 측에 대하여 질소 기체 파이핑을 포함할 수 있다. 접촉은 조성물에서 살포 석판의 침수를 포함할 수 있고, 여기에서 살포 석판은 약 1 cm 및 약 1 미터 직경을 갖는다.
- [0035] 접촉은 환원 단계 수행을 위한 시간 미만인 시간 동안 상기 환원 단계 중에 조성물 속으로 질소 기체 도입을 포함할 수 있다. 접촉 단계는 폐쇄된 반응 용기에서 수행될 수 있다. 접촉은 개방된 반응 용기에서 수행될 수 있고, 이로써, 반응성 설파이드(들)은 조성물로부터 통기된다.
- [0036] 접촉은 적어도 하나의 트윈 (tween) 및 소포제의 존재하에 수행된다. 트윈은 적어도 하나의 Tween20 및 트윈 (Tween)-80일 수 있다. 소포제는 적어도 하나의 안티포움(Antifoam)-A, 안티포움(Antifoam)-C, 및 폴록사머 예컨대 폴리에틸렌 옥사이드일 수 있다.

- [0037] 단리된 단백질은 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 항체 단편은, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab)₂, Fv 단편, 디아바디, 단일-사슬 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc를 포함하는, 항원-결합 항체 단편일 수 있다.
- [0038] 항체 또는 항체 단편은 IgG 항체일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 또한 인간 모노클로날 항체일 수 있다.
- [0039] 항체 또는 항체 단편은 인간 면역글로불린 불변 영역을 포함할 수 있다. 불변 영역은 인간 IgG 불변 영역일 수 있다. 특정 구현예에서, IgG 불변 영역의 아이소타입은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4이다.
- [0040] 항체 또는 항체 단편에서 설파이드 결합은 항체 중쇄와 경쇄 사이, 또는 항체 중쇄 사이, 또는 양쪽 항체 중쇄와 경쇄 사이 및 항체 중쇄 사이이다. 항체 또는 항체 단편은 경쇄 불변 도메인을 포함할 수 있다. 경쇄 불변 도메인은 카파 불변 도메인일 수 있다. 항체는 또한 중쇄를 연결하는 힌지 영역에서 2 설파이드 결합, 및 각 경쇄와 중쇄 사이에서 1 설파이드 결합을 포함하는 4 쇠간 설파이드 결합을 갖는 IgG1 모노클로날 항체일 수 있다.
- [0041] 단리된 단백질은 항체일 수 있고, 환원 단계는 쇠내 결합 없는 단지 쇠간 디설파이드 결합 환원을 초래할 수 있다.
- [0042] 제제는 화학치료제, 핵산, 사이토카인, 면역억제제, 방사선동위원소, 항생제, 및 치료적 항체로부터 선택된 적어도 하나의 치료제일 수 있다. 제제는 또한 아우리스타틴, 빈카 알칼로이드, 포도필로톡신, 탁산, 박카틴 유도체, 크립토포신, 메이탄시노이드, 콤프레타스타틴, 및 돌라스타틴으로부터 선택된 적어도 하나의 항-튜블린 제제일 수 있다. 돌라스타틴은 아우리스타틴일 수 있다. 아우리스타틴은 또한 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)일 수 있다.
- [0043] 제제는 적어도 하나의 DNA 좁은 홈 결합제, DNA 좁은 홈 알킬화제, 엔디인, 렉시트롭신, 듀오카르마이신, 탁산, 퓨로마이신, 돌라스타틴, 메이탄시노이드, 및 빈카 알칼로이드일 수 있다.
- [0044] 제제는 환원된 단백질의 적어도 하나의 티올기를 제제에 연결하기 위해 적용된 링커 모이어티일 수 있다. 링커 모이어티는 절단가능한 링커 또는 비-절단가능한 링커일 수 있다. 링커 모이어티는 세포내 조건하에서 절단하기 쉬운 링커일 수 있다. 링커 모이어티는 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩타이드 링커일 수 있다. 링커 모이어티는 디펩타이드 링커일 수 있다. 디펩타이드 링커는 발린-시트룰린 (val-cit) 또는 페닐알라닌-라이신 (phe-lys) 링커일 수 있다. 디펩타이드 링커는 공유 결합을 형성하기 위해 유리 티올과 반응하는 말레이미드 관능기일 수 있다.
- [0045] 단백질-제제 접합체는 aCD22-val-cit-MMAE, aCD22-val-cit-MMAF, aLy6E-val-cit-MMAE, aLy6E-val-cit-MMAF, aCD79b-val-cit-MMAE, aCD79b-val-cit-MMAF, aNaPi2b-val-cit-MMAE, aNaPi2b-val-cit-MMAF, aMUC16-val-cit-MMAE, aMUC16-val-cit-MMAF, aSTEAP1, 및 aETBR 중 하나일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 측면은, 약 5.5 내지 약 7.5의 pH에서 TCEP와 용액에서 적어도 하나의 트리설파이드 결합을 함유하는 적어도 하나의 단리된 항체의 접촉, 및 질소 기체와 용액의 접촉을 포함하는, 단리된 항체에서 트리설파이드 결합을 디설파이드 결합으로 전환시키는 방법을 제공한다. 단리된 항체는 그 다음 아우리스타틴, 또는 이의 유도체에 접합되어, 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성한다.
- [0047] 개시된 방법, 및 조성물의 추가의 구현예는, 적어도 부분적으로, 후술하는 설명에서 제시되거나, 설명으로부터 이해될 수 있거나, 또는 개시된 방법 및 조성물의 실시에 의해 배울 수 있다. 전술한 간단한 설명 및 하기 상세한 설명은 예시적 및 설명적이고 청구된 바와 같이 본 발명을 제한하지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 부분적 환원 반응 및 후속의 접합 반응 이후 RP-HPLC에 의한 유리-약물 이량체의 측정이 트리설파이드의 상이한 백분율을 함유하는 mAb 중간체를 이용하여 수행되었음을 보여준다. 도 1a는, 개시 mAb 중간체 (대조)에서 트리설파이드를 함유하지 않는, aCD79b-vcMMAE에 대하여 공정내 접합 풀의 유리 약물 분석을 보여주고, 도 1b는, 개시 mAb 중간체에서 측정된 트리설파이드의 약 5-6%를 함유하는, aCD22-vcMMAE에 대하여 동일한 분석을 보여준다.

도 2는, 약물 접합에 앞서, RP-HPLC 그 다음 트리설파이드의 상이한 백분율을 함유하는 부분적으로 환원된 mAb 중간체의 버퍼 교환에 의한 유리-약물 이량체의 측정을 보여준다. 도 1a는, 개시 mAb 중간체 (대조)에서 트리설파이드를 함유하지 않는, aCD79b-vcMMAE에 대하여 공정내 접합 풀의 유리 약물 분석을 보여주고, 도 1b는, 개시

mAb 중간체에서 측정된 트리설파이드의 약 5-6%를 함유하는, aCD22-vcMMAE에 대하여 동일한 분석을 보여준다.

도 3은 트리설파이드의 상이한 백분율을 함유하는 mAb 중간체의 부분적 환원 동안 가속화된 혼합의 영향을 보여준다. 최상부 라인, 환원 (표적 혼합 대조) 동안 75 RPM의 혼합 속도를 이용하여, aMUC16-vcMMAE에 대하여 공정내 접합 풀의 유리 약물 분석을 보여준다. 제3 라인은 혼합 속도 400 RPM이 환원 반응 (빠른 혼합) 전반에 걸쳐 사용된 경우 유리-약물 이량체의 동일한 분석을 보여준다. 중간 라인은 환원 반응의 85 분 동안 75 RPM 사용된 혼합 속도 프로토콜 및 환원 반응의 마지막 5 분 (5 분, 빠른 혼합, 총 환원 시간: 90 분) 동안 400 RPM의 혼합 속도에 대하여 유리 약물 분석을 보여준다. 배경 대조는 독립된, 최하부 라인으로 보여지고, 이는 제형 버퍼 블랭크의 유리 약물 분석이다.

도 4는 트리설파이드의 상이한 백분율을 함유하는 mAb 중간체의 부분적 환원 동안 N2 기체 살포의 영향을 보여준다. 부분적 환원 반응 동안, 질소 기체는, 다운스트림 접합 반응 직전에, 환원 풀을 통해 거품화되었다. 도 4a는, 부분적 환원 반응의 마지막 5 분 동안 N2 살포 (최하부 라인) 및 살포 없이 (최상부 라인), aCD22-vcMMAE에 대하여 공정내 접합 풀에서 유리 약물을 보여준다. 도 4b는 TCEP 부분적 환원 반응의 마지막 5 분 동안 N2 살포 (최하부 라인) 및 살포 없이 (최상부 라인), aLy6E-vcMMAE에 대하여 접합 풀의 유리 약물 분석을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 이제 본 발명의 대표적인 구현예를 상세히 참조할 것이다. 본 발명이 열거된 구현예와 함께 기재될 동안에, 본 발명이 상기 구현예에 제한될 의도는 아님이 이해될 것이다. 반대로, 본 발명은 청구항에 의해 정의된 바와 같이 본 발명의 범위 내에서 포함될 수 있는 모든 대안, 변형, 및 등가물을 포함할 의도이다.
- [0050] 당해 분야의 숙련가는, 본 발명의 실시의 범위에서 및 내에서 사용될 수 있는, 본원에서 기재된 것과 유사한 또는 동등한 많은 방법 및 물질을 인식할 것이다. 본 발명은 비제한적으로 기재된 방법 및 물질이다.
- [0051] 정의
- [0052] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 기술 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본원에서 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법, 디바이스, 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있어도, 바람직한 방법, 디바이스, 및 물질은 이제 기재된다.
- [0053] 첨부된 청구항을 포함하여, 본 출원에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는, 내용이 명확히 다르게 지시하지 않는 한, 복수의 참조를 포함하고, "적어도 하나의" 및 "하나 이상의"와 상호교환적으로 사용된다. 따라서, "폴리뉴클레오타이드"에 대한 지칭은 복수의 폴리뉴클레오타이드 또는 유전자, 등등을 포함한다.
- [0054] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 수치의 무의미한 변형 또는 변화를 나타내고, 이로써 수치가 관련하는 항목의 기본적 기능이 변함없다.
- [0055] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "포함하다", "포함하는", "포괄하다", "포괄하는", "함유하다", "함유하는" 및 이들의 임의의 변화는 비-배타적 포함을 커버할 의도이고, 이로써 요소 또는 요소의 목록을 포함하는, 포괄하는, 또는 함유하는 제법, 방법, 제법에 의한 생성물, 또는 물질의 조성물이 단지 상기 요소를 포함하지 않지만 상기 제법, 방법, 제법에 의한 생성물, 또는 물질의 조성물에 명확히 열거되지 않은 또는 고유하지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다.
- [0056] 본원에서 임의의 수치 범위 (예를 들어, 투약량 범위)에 대한 참조는 그 범위에 의해 포함되는 각 수치 (단편적인 개수 및 정수 포함)를 명확히 포함한다. 예를 들어, 본원에서 "x 미만" (여기에서 x는 특정 개수이다)의 범위에 대한 참조는 정수 x-1, x-2, x-3, x-4, x-5, x-6, 등, 및 단편적인 개수 x-0.1, x-0.2, x-0.3, x-0.4, x-0.5, x-0.6, 등을 포함한다. 추가의 또 다른 실시예에서, 본원에서 "x 내지 y" (여기에서 x는 특정 개수이고, 및 y는 특정 개수이다)의 범위에 대한 참조는 x, x+1, x+2... 내지 y-2, y-1, y의 각 정수, 뿐만 아니라 각 단편적인 개수, 예컨대 x+0.1, x+0.2, x+0.3... 내지 y-0.2, y-0.1을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 용어 "적어도 95%"는, 예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100%를 포함하여, 95% 내지 100%의 각 수치 (단편적인 개수 및 정수 포함)를 포함한다.
- [0057] "치료적" 제제는 개체에서 원하는 치료적 반응을 생산하기 위해 유효한 화합물 또는 조성물을 의미한다.
- [0058] 본 발명의 방법에서 사용에 적합한 단백질은 천연 또는 합성 (즉, 재조합) 기원의 단백질을 포함하고, 본 발명

에 따른 방법은 임의의 공급원, 예를 들어 식물 또는 동물로부터 추출된 단백질에 적용될 수 있다. 단백질은, 상기에서 정의된 바와 같이, 치료적 단백질일 수 있고, 보통 하나 이상의 디설파이드 결합, 및 하나 이상의 트리설파이드 결합을 함유한다. 예시적인 단백질은 슈퍼옥사이드 디스무타아제, 인터류킨, 성장 호르몬 및 항체 또는 항체 단편을 포함한다.

[0059] 반응성 설파이드는 황화수소 (H_2S) 및/또는 이의 탈양성자화된 형태 (즉 HS^- 및/또는 S_2^{2-})를 포함할 수 있다.

[0060] "트리설파이드 결합"은 디설파이드 결합 속으로 추가의 황 원자의 삽입에 의해 생성되고, 그렇게 함으로써 3 연속적인 황 원자의 공유 결합을 초래한다. 트리설파이드 결합은 단백질내 시스테인 잔기 사이에서 형성할 수 있고 그리고 분자내로 (즉, 동일한 단백질내 2 시스테인 사이에서) 또는 분자간으로 (즉 독립한 단백질내 2 시스테인 사이에서) 형성할 수 있다. 항체, 예컨대 IgG1 항체의 경우에, 2 분자간 디설파이드 결합은 중쇄를 함께 연결하고 분자간 디설파이드 결합은 또한 각각의 중쇄 및 경쇄를 연결한다. 유사하게, IgG2 분자는 중쇄를 연결하는 3 분자간 디설파이드 결합을 함유하고, IgG3 분자는 중쇄를 연결하는 6-16 분자간 디설파이드 결합을 함유한다. 트리설파이드 변형은 이들 디설파이드 연결기의 한쪽에서 발생할 수 있지만, 그러나 중-중 (HH) 연결에서 보다 중-경 (HL) 연결에서 더 자주 발생한다.

[0061] 단백질에서 트리설파이드 결합의 화학 환원이, 약물 및 단백질 이량체 또는 다른 원치않는 및 잠재적으로 위험한 유도체의 형성을 유도할 수 있는, 반응성 설파이드 중을 방출한다고 여겨진다. 단백질에서 모든 현존하는 트리설파이드 결합을 제거하는 것이 또는 트리설파이드 결합의 형성을 예방하는 것이 종종 실행가능하지 않는 반면, 본 발명자들은 접합 반응에서 단백질 환원 동안 약물 및/또는 단백질 불순물 (즉 원치않는 화학 반응 생성물)의 형성을 축소 또는 제거하는 것이 가능함을 발견하였다. 이들 원치않는 화학 반응 생성물의 축소 또는 제거의 방법은 화학 반응의 액체 배지로부터 반응성 설파이드 중의 제거를 포함한다.

[0062] 단리된 단백질의 환원

[0063] 본 발명의 방법에서 유용한, 디설파이드 및 트리설파이드 결합을 함유하는 단백질은, 비제한적으로, (천연 발생 단백질의 경우에) 천연 공급원으로부터 단리, 폴리펩타이드를 인코딩하는 조기 제조된 DNA의 부위 지향적 (또는 올리고뉴클레오타이드-매개된) 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발을 포함할 수 있는 재조합 단백질 생산 방법론을 포함하는 다양한 방법에 의해 수득될 수 있다. 돌연변이유발 프로토콜, 키트, 및 시약, 예를 들어 QuikChange™ 다중 부위-직접 돌연변이유발 키트 (Stratagene, La Jolla, Calif.)는 상업적으로 이용가능하다.

[0064] 단리된 단백질은 공지된 올리고펩타이드 합성 방법론을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있거나 또는 재조합 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 적절한 아미노산 서열, 또는 이의 부분은 고체상 기술을 이용하여 직접적인 펩타이드 합성에 의해 생산될 수 있다 (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif.; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). 시험관내 단백질 합성은 매뉴얼 기술을 이용하여 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화 고체상 합성은, 예를 들면, t-BOC 또는 Fmoc 보호된 아미노 산을 사용하여 및 제조자의 설명서를 이용한 Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, Calif.)를 이용하여 달성될 수 있다. 단리된 단백질의 다양한 부분은 본 발명의 방법에서 사용을 위하여 원하는 단리된 단백질을 생산하기 위해 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 별도로 화학적으로 합성 및 조합될 수 있다.

[0065] 부가적으로, 항체 단편을 포함하는, 단백질 단편은 본 발명의 방법에서 단리된 단백질로서 사용될 수 있다. 전통적으로, 항체 단편은 온전한 항체의 단백질 분해 소화를 통해 유도되었거나 (Morimoto et al (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; 및 Brennan et al (1985) Science, 229:81), 또는 재조합 숙주세포에 의해 직접적으로 생산되었다. Fab, Fab', F(ab)₂, Fv 단편, 디아바디, 단일-사슬 항체, scFv 단편 또는 scFv-Fc 항체 단편은 모두 E. 콜리에서 발현될 수 있고, 이로부터 분비될 수 있고, 따라서 다량의 이들 단편의 손쉬운 생산을 허용한다. 항체 단편은 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 E. 콜리로부터 직접적으로 회수될 수 있고 F(ab')₂ 단편을 형성하기 위해 화학적으로 커플링될 수 있거나 (Carter et al (1992) Bio/Technology 10:163-167), 또는 재조합 숙주 세포 배양으로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체는 단일 사슬 Fv 단편 (scFv)일 수 있다. 항체 단편은 또한 "선형 항체"일 수 있다 (미국 특허 번호 5,641,870). 상기 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 IgG 항체일 수 있다. 항체는 인간 모노클로날 항체일 수 있다.

[0066] 단리된 항체는 또한, 지정된, 설계된, 선택적 부위에서 약물 분자를 갖는, 항체 접합체 화합물, 예컨대 항체-약

물 접합체 (ADC) 화합물을 가능하게 하는, 시스템인 조작된 항체일 수 있다. 항체 표면 상에서 반응성 시스템인 잔기는 티올 반응기 예컨대 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해 약물 모이어티를 특이적으로 접합시킨다. 말레이미드기에 대한 Cys 잔기의 티올 관능성의 친핵성 반응성은 단백질에서 임의의 다른 아미노 산 관능성, 예컨대 라이신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비교로 약 1000 배 높다. 아이오도아세틸 및 말레이미드 시약에서 티올 특이적 관능성은 아민기와 반응할 수 있지만, 그러나 더 높은 pH (>9.0) 및 더 긴 반응 시간은 전형적으로 필요하다 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

- [0067] 디- 및 트리설파이드 결합을 함유하는 항체가 사용된 구현예에서, 항체는 약물이 접합될 수 있는 충분히 반응성 티올기를 형성하기 위해 환원될 수 있는 단 하나의 또는 몇 개의 설파이드 결합을 가질 수 있다. 단백질은 총 4 개의 쇠간 디설파이드: 중쇄를 연결하는 힌지 영역에서 2개, 및 Fab 영역 근처의 각 경쇄와 중쇄 사이에서 1개를 갖는 IgG1 모노클로날 항체일 수 있다. 각 환원된 쇠간 디설파이드 결합은, 약물과 접합에 각 이용가능한, 2 개의 유리 티올을 초래한다. 비-변성 조건에서 상기 항체 중간체의 환원은 전형적으로 단지 쇠간 디설파이드 결합을 환원시킬 것이고 사슬내 결합은 아니다. 따라서, 쇠간 디설파이드 결합의 완전한 환원은 IgG1 항체 중간체의 몰 당 유리 티올의 총 8 몰을 초래한다.
- [0068] 항체는 인간 면역글로불린 불변 영역을 가질 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 인간 IgG 불변 영역을 포함할 수 있고, IgG 불변 영역의 아이소타입은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4일 수 있다. 특정 구현예에서, IgG 불변 영역의 아이소타입은 IgG1이다.
- [0069] 항체 또는 항체 단편에 존재하는 설파이드 결합은 항체 중쇄와 경쇄 사이, 또는 항체 중쇄 사이, 또는 양쪽 항체 중쇄와 경쇄 사이 및 항체 중쇄 사이이다. 항체 또는 항체 단편은 경쇄 불변 도메인을 포함할 수 있다. 경쇄 불변 도메인은 카파 불변 도메인일 수 있다. 항체는 중쇄를 연결하는 힌지 영역에서 2 설파이드 결합, 및 각 경쇄와 중쇄 사이에서 1 설파이드 결합을 포함하는 4 쇠간 설파이드 결합을 갖는 IgG1 모노클로날 항체일 수 있다.
- [0070] 전형적으로, 단백질에서 설파이드 결합의 단지 서브셋은 트리설파이드 결합으로서 존재한다. 단리된 단백질에서 설파이드 결합의 약 1% 내지 약 20%는 트리설파이드 결합일 수 있고, 대안적으로, 단리된 단백질에서 설파이드 결합의 약 1% 내지 약 18%, 약 2% 내지 약 16%, 약 3% 내지 약 12%, 약 4% 내지 약 10%, 또는 약 5% 내지 약 7%는 트리설파이드 결합이다. 단리된 단백질에서 트리설파이드 결합의 적어도 약 80%는 환원 단계에서 환원될 수 있고, 대안적으로 단리된 단백질에서 트리설파이드 결합의 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 환원 단계에서 환원된다.
- [0071] 항체를 포함하는, 단리된 단백질은 부분적 또는 전체적 환원 조건하에서 환원되어, 반응성 시스템인 티올기를 생성한다. 환원제는 적어도 하나의 디티오트레이톨 (DTT), 베타-머캅토에탄올 (β ME), 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP), 시스템인, L-시스템인, 환원된 글루타티온 (GSH) 및 L-GSH를 포함할 수 있다. 항체가 이들 방법에서 사용된 경우, 환원제는 바람직하게는 디티오트레이톨 (DTT) 및 트리카보닐에틸포스핀 (TCEP)의 하나 또는 둘 모두이고 환원 반응은 비-변성 조건하에서 수행된다. TCEP는 TCEP 대 단리된 단백질의 소정의 몰비로 환원 반응에서 전형적으로 사용된다. 전형적으로, TCEP는 단리된 단백질에 몰 과량으로 반응에 부가된다. TCEP는 약 0.1 내지 약 8 mM; 약 0.1 내지 약 5 mM; 약 0.1 내지 약 3 mM; 약 0.1 내지 약 1 mM; 약 8 mM; 약 5 mM; 약 3 mM; 약 1 mM; 또는 약 0.5 mM의 농도로 환원 반응에 부가될 수 있다. 단리된 항체의 이용에서, 상기 환원 단계에 이어서, 전형적으로 티올 모이어티의 약 4 내지 약 8 몰이, 환원된 모든 몰의 단리된 단백질에 대하여, 제제와 접합에 이용가능하다.
- [0072] 환원 반응은, 약 pH 5 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 5.5 내지 약 pH 7.5, 또는 약 pH 6 내지 약 pH 7의 pH를 포함할 수 있는, pH 7 미만의 pH에서, 또는 약 pH 5.5에서, 또는 약 pH 6.5에서 실시될 수 있다.
- [0073] 환원 반응은 적어도 약 5 분, 약 10 분, 약 20 분, 약 30 분, 약 40 분, 약 50 분, 약 60 분, 약 90 분, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4 시간, 또는 약 5 시간의 시간 동안 수행될 수 있다. 환원 반응의 시간은 약 24 시간 미만, 약 20 시간 미만, 약 12 시간 미만, 또는 약 6 시간 미만일 수 있다. 환원 반응은 또한 약 1 시간 동안 수행될 수 있다.
- [0074] 환원 반응은 제제가 연결될 수 있는 적어도 하나의 티올기를 갖는 환원된 단백질을 함유하는 조성물의 생산을 초래한다. 부가적으로, 트리설파이드 결합이 환원 단계에 앞서 단리된 단백질에서 존재하는 경우, 수득한 조성물은 또한 반응성 설파이드(들)을 함유할 것이다.

- [0075] 환원 반응에 의해 생산된 조성물에서 반응성 설파이드 함량은 약 5.0 내지 약 6.0의 pH, 또는 약 5.2 내지 약 5.8의 pH로 조성물의 pH를 조정함으로써, 또는 약 pH 5.5의 pH로 조성물의 pH를 조정함으로써 감소될 수 있다. 약산성 pH에서 환원 반응의 수행은 환원 반응의 전반적인 효능을 축소시킬 수 있지만, 그러나 이들 약(weekly) 산성 반응 조건은 또한 조성물의 반응성 설파이드 함량을 축소시킨다. 대안적으로, 환원 반응이 완료된 이후 조성물의 pH는 약 7.0의 중성 pH부터 약 5.0 내지 약 6.0의 약(weekly) 산성 pH까지 조정될 수 있다.
- [0076] 환원 반응에서 pH의 선택은 또한 다른 인자, 예컨대 이의 다른 요망되지 않는 유도체 (예를 들어 이량체 또는 이의 더 높은 올리고머, 이의 탈아미드화된 형태, 이의 설폭시화된 형태, 등)의 형성, 침전의 회피, 등등에 대하여 단리된 단백질의 안정성에 의해 영향을 받을 수 있는 반면, 조성물에서 반응성 설파이드 함량의 생산 최소화를 찾고 있다.
- [0077] 환원 반응에 의해 생산된 조성물에서 반응성 설파이드 함량은 또한 실질적으로 환원된 또는 무 반응성 설파이드 함량을 갖는 신선한 또는 신규 액체로 조성물에서 액체의 특정 부분을 대체함으로써 감소될 수 있고, 그렇게 함으로써 전반적인 조성물에서 반응성 설파이드 함량을 저하시킨다. 이는 조성물에서 환원된 단백질을 고�형 지지체와 회합 및 그 다음 환원된 단백질을 하나 이상의 세정 단계로 세정에 의해 달성될 수 있다. 고�형 지지체와 회합된 조성물에서 환원된 단백질은 하나 이상의 버퍼, 안정제, pH 조정제, 단백질 변성제, 등등을 포함할 수 있는 수성 배지로 세정될 수 있다. 예를 들어, PBS 세정은 환원된 단백질이 고�형 지지체와 회합된 이후 적용될 수 있고, 그렇게 함으로써 환원 반응 이후 조성물에서 존재하는 일부 또는 모든 반응성 설파이드 종을 세정제거한다. 세정은 또한, 예를 들어, 맑은 다른 불순물에 사용될 수 있다. 고 염 버퍼 용액으로 세정은 또한, 예를 들어, 환원된 단백질을 포함하는 조성물이 고�형 지지체와 회합된 이후 불순물의 청소능을 촉진시키기 위해 사용될 수 있다. 상이한 액체를 각각 포함하는 몇 개의 세정을 이용하는 것이 또한 가능하다. 예를 들어, 고 염 세정은 환원된 단백질에 약물 접합의 단계에 앞서 조성물의 pH를 조정하기 위해 또는 조성물에서 존재하는 버퍼를 대체하기 위해 설계된 세정과 조합될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 환원 반응이 완료된 것으로 간주된 경우 단백질로부터 환원제를 제거하기 위해 환원된 단백질이 고�형 지지체와 회합된 이후 세정은 적용될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 또 다른 세정, 예를 들어 저 염 농도 세정은 고�형 지지체로부터 환원된 단백질의 효율적인 분해, 예를 들어 용출을 촉진시키기 위해 적용될 수 있다. 환원된 단백질을 함유하는 조성물의 적어도 90%는 반응성 설파이드가 부족한 대체 용액으로 대체될 수 있다.
- [0078] 고�형 지지체는 적어도 하나의 필터 막, 선택적 투과막, 및 크로마토그래피 수지를 포함할 수 있다. 예시적인 여과 막은 직교류 여과 (또한 접선 유동 여과; TFF로서 공지됨) 막 또는 막다른 여과 막을 포함할 수 있다. 예시적인 선택적 투과막은 투석, 탈염 및 버퍼 교환 막을 포함한다.
- [0079] 환원 반응에 의해 생산된 조성물에서 반응성 설파이드 함량은 환원 반응의 성분의 혼합 속도 증가에 의해 감소된다. 이 증가된 혼합 속도는 반응성 설파이드 종이 통기된 기체 및 개방된 반응기 포트로서 반응을 빠져 나가는 것을 가능하게 할 수 있다.
- [0080] 이들 환원 반응에 대하여, 최적의 혼합 속도는 전형적으로 확립되고, 여기에서 단리된 단백질에서 존재하는 트리설파이드 및 디설파이드 결합의 완전한 또는 부분적 환원은 약물 분자에 대한 후속의 접합에 대하여 이용가능한 티올 모이어티의 평균 표적 수준까지 경제적으로 및 효율적으로 환원된다. 혼합 속도는 환원 반응 동안 형성된 조성물로부터 반응성 설파이드 종의 제거를 강화하기 위해 환원 반응의 시간 모두 또는 적어도 일부 동안 증가될 수 있다. 예를 들어, 혼합 속도는 환원 반응에 대하여 확립된 최적의 혼합 속도의 적어도 10%, 20%, 40%, 80%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 또는 550% 초과만큼 증가될 수 있다. 또 다른 예로서, 혼합 속도는 환원 반응에 대하여 확립된 최적의 혼합 속도의 2 배, 3 배, 4 배, 또는 5 배 초과만큼 증가될 수 있다. 혼합 속도는 또한 환원 반응이 수행된 시간의 전체 총계 미만 동안 환원 반응에 대하여 확립된 최적의 혼합 속도 초과로 증가될 수 있다. 혼합 속도는 환원 반응이 수행된 동안의 시간의 후자 부분 동안만 증가될 수 있다. 예를 들어, 혼합 속도는 환원 반응이 수행된 동안의 시간의 후반부 동안만 증가될 수 있다. 대안적으로, 혼합 속도는 환원 반응이 수행된 동안의 시간의 후반 40%, 30%, 20%, 10%, 또는 5% 동안만 증가될 수 있다. 특정 예에서, 환원 반응은 90 분 동안 수행되고 혼합 속도는 환원 반응의 후반 5 분 동안 약 200% 내지 약 500% 증가된다. 혼합 속도는 또한 환원 반응이 수행된 동안의 시간의 초기 동안만 증가될 수 있다. 예를 들어, 혼합 속도는 환원 반응이 수행된 동안의 시간의 전반부 동안만 증가될 수 있다. 예를 들어, 혼합 속도는 환원 반응이 수행된 동안의 시간의 전반 40%, 30%, 20%, 10%, 또는 5% 동안만 증가될 수 있다. 특정 예에서, 환원 반응은 90 분 동안 수행되고 혼합 속도는 환원 반응의 전반 5 분 동안 약 200% 내지 약 500% 증가된다.
- [0081] 환원 반응에 의해 생산된 조성물에서 반응성 설파이드 함량은 환원 반응 동안 형성된 조성물을 질소 공급원과

접촉시킴으로써 감소될 수 있다.

- [0082] 질소 공급원은 질소 기체, 뿐만 아니라 공기 및/또는 아르곤 기체를 포함할 수 있다. 질소 공급원은 또한 "비활성 기체" (예컨대 헬륨 (He), 네온 (Ne), 아르곤 (Ar), 크립톤 (Kr) 및 크세논 (Xe)), 현저히 헬륨 및 아르곤을 포함할 수 있다.
- [0083] 환원 반응에서 형성된 조성물을 질소 공급원과 접촉시키는 방법은, 예를 들어, 혼합의 다른 수단 또는 교반 있거나 없이, 액체 조성물을 통해 질소 함유 기체 통과에 의해 (예를 들어 매질 속으로 기포의 스트림 전달에 의해), 또는 상들 사이에서 기체 확산이 발생할 수 있는 큰 액체 상/기체 상 인터페이스를 창출하는 다른 수단에 의해 실시될 수 있다.
- [0084] 조성물에서 반응성 설파이드 종을 축소시키기 위해 조정될 수 있는 파라미터는 질소 함유 기체와 액체 조성물 사이에서 접촉의 지속시간, 액체 조성물 속으로 질소 함유 기체의 도입/통과의 속도, 조성물의 질소 함유 기체와의 혼합 속도, 액체 배지의 pH, 액체 조성물 및/또는 질소 함유 기체의 온도, 기체 상과 액체 상 사이 접촉의 표면적, 및 이용된 질소 함유 기체의 용적을 포함한다. 부가적으로, 질소 함유 기체는 살포 석판을 통해 액체 조성물과 접촉으로 도입될 수 있고, 이 경우에 살포 석판의 위치 및 크기는 또한 조성물로부터 반응성 질소 종의 축소 또는 제거에 영향력 있을 수 있는 파라미터이다.
- [0085] 질소 함유 기체와 액체 조성물 사이 접촉의 지속시간은 바람직하게는 조성물에서 반응성 설파이드 종의 존재 축소하기 또는 제거하기에 충분한 시간이다. 이는, 예를 들어, 약 1 분 내지 약 240 분일 수 있다. 질소 함유 기체는 환원 반응의 전체 지속시간 동안 환원 반응의 조성물과 접촉될 수 있다. 질소 함유 기체는 환원 반응이 수행된 동안의 시간의 단지 부분 동안 환원 반응의 조성물과 또한 접촉될 수 있다. 환원 반응이 완료되거나, 또는 다른 수단, 예컨대 조성물에서 환원제를 제거하기 위한 버퍼 교환에 의해 또는 환원 반응을 멈추기 위해 조성물 속으로 도입된 제제로 켄칭에 의해 멈춘 이후 질소 함유 기체는 환원 반응의 조성물과 또한 접촉될 수 있다. 질소 함유 기체는 환원 반응이 수행된 동안 시간의 단지 전반부 동안 환원 반응의 조성물과 또한 접촉될 수 있다. 예를 들어, 질소 함유 기체는 환원 반응이 수행된 동안 시간의 전반 40%, 30%, 20%, 10%, 또는 5% 동안 환원 반응의 조성물과 또한 접촉될 수 있다. 질소 함유 기체는 약 30 분, 약 60 분, 또는 약 90 분의 기간 동안 환원 반응의 조성물과 접촉될 수 있다.
- [0086] 액체 조성물 속으로 질소 함유 기체의 도입 또는 통과 속도는 조성물에서 반응성 설파이드 종의 존재를 실질적으로 축소하기에 또는 제거하기에 충분한 환원 반응의 조성물 속으로 질소 함유 기체 도입의 제어된 속도를 포함할 수 있다. 질소 함유 기체는 약 10 입방 센티미터/분 내지 약 60 입방 센티미터/분의 속도로 조성물 속으로 도입될 수 있다. 질소 함유 기체는 약 5 리터/시간 내지 약 30 리터/시간, 약 10 l/hr 내지 약 25 l/hr, 또는 약 15 l/hr 내지 약 20 l/hr의 속도로 조성물 속으로 도입될 수 있다. 질소 함유 기체는 약 0.25 내지 약 1 (기체의 용적/액체의 용적/분)의 속도로 조성물 속으로 도입될 수 있다.
- [0087] 질소 함유 기체와 조성물의 혼합 속도는 질소 함유 기체와 환원 반응의 실질적으로 모든 조성물을 접촉하기에 충분한 혼합 속도일 수 있고, 그렇게 함으로써 조성물에서 존재하는 반응성 설파이드 종을 실질적으로 축소 또는 제거한다. 질소 함유 기체와 조성물 접촉의 단계 동안 환원 반응의 혼합 속도는 환원 반응에 대하여 최적의 혼합 속도보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 300%, 또는 400% 더 클 수 있다. 질소 함유 기체와 조성물 접촉의 단계 동안 환원 반응의 혼합 속도는 환원 반응에 대하여 최적의 혼합 속도보다 약 200% 더 클 수 있다.
- [0088] 질소 함유 기체가 조성물과 접촉된 기간 동안 환원 반응의 pH는 단리된 단백질에서 존재하는 일부 부분 또는 모든 설파이드 결합 환원의 원하는 종료점까지 환원 반응을 구동하기 위한 최적의 pH 범위일 수 있다. 이 pH 범위는 환원 반응의 양호한 수율을 유지하기 위해 조정될 수 있으면서 실질적으로, 질소 함유 기체와 조성물의 접촉과 함께, 조성물에서 존재하는 활성 자기-종을 축소 또는 제거한다. 질소 함유 기체가 환원 반응의 조성물과 접촉되는 동안 환원 반응의 pH는 약 pH 4.0 내지 약 pH 9.0의 pH 범위에서 유지될 수 있다. 질소 함유 기체가 조성물과 접촉되는 동안 환원 반응의 pH는 약 pH 5.0 내지 약 pH 8.0의 pH 범위에서 또한 유지될 수 있다. 질소 함유 기체가 조성물과 접촉되는 동안 환원 반응의 pH는 약 pH 5.0 내지 약 pH 6.0의 약(weekly) 산성 pH 범위에서 유지될 수 있다.
- [0089] 환원 반응의 액체 조성물 및 질소 함유 기체의 온도는 환원 반응에 최적인 온도 범위에서 유지될 수 있다. 이 온도 범위는 환원 반응에 대하여 양호한 수율을 유지하기 위해 변경될 수 있으면서 실질적으로, 조성물에 질소 함유 기체의 도입과 함께, 환원 반응의 조성물에서 반응성 설파이드 종을 축소 또는 제거한다. 환원 반응의 액

체 조성물의 온도는 질소 함유 기체가 조성물과 접촉되는 시간 동안 약 4°C 내지 약 40°C의 온도에서 유지될 수 있다. 환원 반응의 액체 조성물의 온도는 약 15°C 내지 약 40°C의 온도에서 또한 유지될 수 있다. 환원 반응의 액체 조성물의 온도는 약 20°C 또는 약 30°C의 온도에서 또한 유지될 수 있다.

[0090] 질소 함유 기체가 반응 조성물과 접촉된 시간 동안 환원 반응의 반응 조건은, 실질적으로 반응 조성물에서 존재하는 반응성 설피이드 종을 축소 또는 제거하는 범위에서, 질소 함유 기체 상과 액체 반응 상 사이에서 접촉의 표면적을 유지하기 위해 조정될 수 있다. 질소 함유 기체의 표면적 대 조성물의 용적의 비는 약 0.1 내지 약 3이다. 질소 함유 기체의 표면적 대 조성물의 용적의 비는 약 2일 수 있다. 환원 반응의 액체 조성물 속으로 도입된 질소 함유 기체의 용적은 환원 반응의 조성물에서 반응성 설피이드 종을 실질적으로 축소 또는 제거하기 위해 액체 반응 성분의 표면적 대 용적의 비 및 최적의 속도를 유지하도록 제어된다.

[0091] 부가적으로, 질소 함유 기체는 정의된 크기의 기포를 발생시키는 디바이스를 통해 환원 반응의 액체 조성물과 접촉으로 제어가능하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 질소 함유 기체는 공기 또는 "살포" 석판 또는 천공된 필터 디스크를 통해 도입될 수 있다. 불활성 금속 살포 석판은 반복적으로 사용될 수 있고 산/염기 세정에 의해 청소될 수 있고 오토클레이빙에 의해 멸균될 수 있다. 형성된 거품이 반응 유체 속에 직접적으로 솟아오르게 하는 방식으로 환원 반응의 유체 조성물에서 살포 석판은 수직으로 배향될 수 있다. 살포 석판은 약 2 마이크로미터 구멍을 갖는 스테인레스강 살포 석판일 수 있다. 살포 석판은 최대 5 L/분의 유속에서 <1 mm 직경의 기포를 발생하는 기공을 가질 수 있다. 유속은 살포 석판의 질량 유량계 배치된 업스트림에 의해 제어될 수 있다.

[0092] 특정 유속에서 및 특정 혼합 조건하에서 질소 함유 기체의 도입은, 환원 반응의 효율 및/또는 정도를 축소시킬 수 있는, 환원 반응의 조성물에서 거품을 창출할 수 있다. 따라서, 질소 함유 기체가 환원 반응 속에 도입된 경우, 반응은 트윈 및/또는 소포제의 존재하에서 수행될 수 있다. 환원 반응은 적어도 하나의 트윈(Tween)-20 및 트윈(Tween)-80인 트윈의 존재하에서 수행될 수 있다. 환원 반응은 적어도 하나의 안티포움(Antifoam)-A, 안티포움(Antifoam)-C, 및 폴록사머 예컨대 폴리에틸렌 옥사이드인 소포제의 존재하에서 또한 수행될 수 있다.

[0093] 환원된 단백질의 접합

[0094] 단백질에 접합되는 치료제는 링커를 통해 환원된 단백질의 아미노산 측쇄, 또는 활성화된 아미노산 측쇄, 또는 단백질에서 조작된 시스테인, 등등과 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 부분적으로 환원된 항체는 바이오틴과 접합될 수 있고 그리고 제제는 아비딘 또는 스트렙타비딘, 또는 그 반대로 접합될 수 있다. 바이오틴은 스트렙타비딘에 선택적으로 결합하고 따라서, 제제는 이 간접적인 방식으로 항체와 접합될 수 있다.

[0095] 약물 링커 모이어티 및 접합 방법은 아래 개시되어 있다: PCT 공개 번호 WO 2004/010957, US 특허 번호 7,659,241, 7,829,531, 및 7,851,437 (본원에서 참고로 편입된다).

[0096] 본 발명의 방법에 의해 생산된 부분적으로 환원된 항체는, 예를 들어, 폴리머를 포함하여, 그의 순환 반감기를 증가시킬 수 있는 제제에 공유 접합에 의해 또한 화학적으로 변경될 수 있다. 켈타이드에 첨부하기 위한 예시적인 폴리머, 및 방법은, 본원에서 참고로 편입된, 미국 특허 번호 4,766,106, 4,179,337, 4,495,285 및 4,609,546에서 실증된다. 폴리머는 폴리옥시에틸화된 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) (예를 들어, 약 1,000 내지 약 40,000, 예컨대 약 2,000 내지 약 20,000의 분자량을 갖는 PEG)를 포함할 수 있다.

[0097] 제제는 화학치료제, 핵산, 사이토카인, 면역억제제, 방사선동위원소, 항생제, 및 치료적 항체로부터 선택된 치료제일 수 있다. 치료제는 화학치료제일 수 있다. 화학치료제는 아우리스타틴, 빈카 알칼로이드, 포도필로톡신, 탁산, 박카틴 유도체, 크립토포신, 메이탄시노이드, 콤프레타스타틴, 및 둘라스타틴으로부터 선택된 적어도 하나의 항-튜불린 제제일 수 있다. 화학치료제는 적어도 하나의 아우리스타틴, DNA 좁은 홈 결합제, DNA 좁은 홈 알킬화제, 엔디인, 렉시트롭신, 듀오카르마이신, 탁산, 푸로마이신, 둘라스타틴, 메이탄시노이드, 및 빈카 알칼로이드일 수 있다. 화학치료제는 둘라스타틴, 및 특히 아우리스타틴, 및 특정한 경우에, 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)일 수 있다.

[0098] 환원된 단백질의 적어도 하나의 티올기에 접합된 제제는 항체 약물 접합체 (ADC)를 형성할 수 있고, 따라서 링커를 통해 서로 접합될 수 있는, 양쪽 항체 및 약물을 포함한다.

[0099] 본 발명의 방법에 따라 ADCs의 형성에서 환원된 항체에 약물의 접합에서 사용에 적합한 링커는 세포내 조건하에서 절단가능한 링커를 포함하고, 이로써, 링커의 절단은 세포내 환경에서 항체로부터 약물 유니트를 방출시킨다. 대안적으로, 링커는 절단가능할 수 없고 그리고 약물은, 예를 들어, 항체 분해에 의해 방출된다. 대안적으로, 링커는 세포내 환경에서 (예를 들어 리소솜 또는 엔도솜 내에서) 존재하는 절단제에 의해 절단가능하다. 따라서, 링커는, 비제한적으로, 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하여, 세포내 켈타다아제 또는 프

로테아제 효소에 의해 절단된 펩티딜 링커일 수 있다. 펩티딜 링커는 적어도 2 아미노산 길이 또는 적어도 3 아미노산 길이일 수 있다. 절단제는 카텝신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있고, 이들 모두는 표적 세포 내부에서 활성 약물의 방출을 초래하는 디펩타이드 약물 유도체를 가수분해한다고 공지된다 (참고 예를 들어 Dubowchik 및 Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit (발린-시트룰린) 링커 또는 Phe-Lys (페닐알라닌-라이신) 링커일 수 있다 (참고 예를 들어 미국 특허 번호 6,214,345, Val-Cit 링커와 독소루비신의 합성 및 Phe-Lys 링커의 상이한 실시예 기재). 링커는 공유 결합을 형성하기 위해 유리 티올과 반응하는 말레이미드 관능기일 수 있다.

[0100] 환원된 단백질의 적어도 하나의 티올기에 제제 접합의 단계는 적어도 하나의 하기를 형성하기 위해 항체에 항암 치료제를 접합하도록 사용될 수 있다: aCD22-val-cit-MMAE, aCD22-val-cit-MMAF, aLy6E-val-cit-MMAE, aLy6E-val-cit-MMAF, aCD79b-val-cit-MMAE, aCD79b-val-cit-MMAF, aNaPi2b-val-cit-MMAE, aNaPi2b-val-cit-MMAF, aMUC16-val-cit-MMAE, a MUC16-val-cit-MMAF, sSTEAP1, 및 aETBR.

[0101] 본 발명의 방법의 한 예시적인 구현에는 용액에서 적어도 하나의 트리설파이드 결합 및 적어도 하나의 디설파이드 결합을 함유하는 적어도 하나의 단리된 항체를 TCEP와 약 pH 5.5 내지 약 pH 7.5의 pH에서 접촉시킴, 및 용액을 질소 기체와 접촉시킴, 및, 아우리스타틴, 또는 이의 유도체를 환원된 항체에 접합시켜 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성함으로써 단리된 항체에서 트리설파이드 결합을 디설파이드 결합으로 전환시키는 방법을 제공한다.

[0102] 실시예

[0103] 하기 실시예는 단지 설명하기 위한 것으로 제공되고 본 발명의 범위를 제한할 의도는 아니다.

[0104] 실시예 1

[0105] 본 실시예는 Val-Cit (발린-시트룰린) 링커를 통해 항-암 돌라스타틴 (MMAE)에, 다양한 트리설파이드 함량을 함유하는 항체 (항-CD79b 또는 항-CD22)의 접합 및 환원 동안 약물 이량체의 형성을 기재한다. 이들 데이터는 약물 이량체 형성이 모델 시스템에서 mAb 벌크 중간체의 트리설파이드 함량에 관련됨을 증명한다.

[0106] 트리설파이드 결합의 상이한 백분율을 함유하는 mAb 중간체 (항-CD79b 또는 항-CD22)는 TCEP를 이용하여 부분적으로 환원되었고 그리고 후속의 접합 반응이 약물-링커 vcMMAE로 수행되었다.

[0107] 비접합된 mAbs (>5 g/L)은 pH 5.5 - 7.5의 pH로 조정되었다. 단백질 농도의 결정 이후, 실온에서 90 분의 표적 환원 시간 동안 (물에서 10 mM 원액의 TCEP로부터) 소정의 TCEP:mAb 비를 이용하여 pH-조정된 샘플은 환원되었다. 과량의 원하는 말레이미드-함유 링커-약물을 이용하여 부분적으로-환원된 mAb는 즉시 접합되었다. 미반응된 링커-약물은 (물에서 10 mM 원액의 NAC로부터) 과량의 N-아세틸 시스테인 (NAC):링커 약물 비로 키펠되고 그리고 pH는 제형 pH 조건을 맞추기 위해 조정되었다. 필요하다면, 접합된 샘플은 후속의 샘플 분석을 잠재적으로 방해할 수 있는 잔류 용매 및 유리 약물 종을 제거하기 위해 제형 버퍼로 버퍼 교환되었다. 환원된 및 접합된 조성물에서 유리 약물 함량은 RP-HPLC에 의해 분석되었다.

[0108] 도 1a에서 보이는 바와 같이, 개시 mAb에서 트리설파이드를 함유하지 않은 벌크 mAb 공급원료로부터 형성된 aCD79b-vcMMAE 접합체에 대하여 공정내 접합 풀의 RP-HPLC 분석으로부터 약물 이량체는 검출되지 않는다. 도 1b에서 보이는 바와 같이, 개시 mAb 중간체에서 측정된 트리설파이드의 약 5-6% 함유하는, aCD22-vcMMAE에 대하여 공정내 접합 풀의 분석 동안 약물 이량체 (vcMMAE 이량체)는 검출된다.

[0109] 실시예 2

[0110] 본 실시예는 후속의 접합 반응에서 약물 이량체 형성을 축소 또는 제거하기 위한 수단으로서 부분적으로-환원된 단백질의 환원 이후 버퍼 교환의 분석을 기재한다. 이들 데이터는 vcMMAE 접합에 앞서 부분적으로 환원된 mAb 중간체의 버퍼 교환이 본 모델 시스템에서 약물 이량체 형성을 축소시킴을 증명한다.

[0111] 실시예 1에 기재된 바와 같이, TCEP를 이용한 부분적 환원 이후, 원심 버퍼 교환 디바이스 (CENTIRCON™)를 이용하여 환원된 단백질 풀은 버퍼 교환되었다. 센트리콘 (Centricons)를 이용한 버퍼 교환 동안, 양쪽 물 (버퍼) 및 저분자량 용질은 명목 분자량 컷오프 막-필터를 강제 통과되고 다른 측 (여과액) 상에서 수집된다. 환원된 단백질은 막 (보전물)의 샘플 측 상에서 잔류하고, 여기에서 물이 막을 거쳐 반대 측으로 강제됨에 따라 더 작은 용적으로 농축된다. 명목 10 - 30 kDa 분자량 컷오프를 갖는 센트리콘 원심 여과 디바이스는 제조 설명서에 따라 사용되었다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, TCEP (~1 - 3 mL)로 부분적으로 환원된 단백질은 단일 센트리콘 디바이스에 추가되었고 10 mM Tris pH 7.5로 희석되어 디바이스에서 10 mL의 최종 용적이 되었다. 센트리콘 디바이스는 20 분 동안 4500 g에서 원심분리되었다. 버퍼 교환된 단백질의 회수에 앞서, 센트리콘 디바이스의

보전물 샘플은 10 mL의 10 mM Tris pH 7.5의 2 추가 통과로 추가로 버퍼 교환되었다. 버퍼-교환된 부분적으로-환원된 단백질은 센트리콘 디바이스로부터 회수되었고 후속의 다운스트림 접합에서 사용되었다.

- [0112] 버퍼 교환 이후, 부분적으로-환원된 mAb 중간체는 vcMMAE와 접합되었고, 그리고 유리-약물 이량체 함량은 실시예 1에 기재된 바와 같이 RP-HPLC에 의해 측정되었다. 도 2a에서 보이는 바와 같이, aCD79b-vcMMAE 항체-약물 접합체 (ADC)에 대하여 공정내 접합 풀의 RP-HPLC 분석은 유리 약물 이량체 (vcMMAE 이량체)의 형성을 초래한다. 그러나, 도 2b에서 보이는 바와 같이, 부분적으로-환원된 mAb 단백질 중간체의 버퍼 교환 이후 동일한 aCD22-vcMMAE ADC에 대하여 공정내 접합 풀의 RP-HPLC 분석 동안 유리 약물 이량체는 검출되지 않는다.
- [0113] 실시예 3
- [0114] 본 실시예는 후속의 접합 반응에서 약물 이량체 형성을 축소 또는 제거하기 위한 수단으로서 단백질의 부분적 환원 동안 증가된 반응 혼합 속도의 분석을 기재한다. 이들 데이터는 vcMMAE 접합에 앞서 mAb 중간체의 환원 반응의 시간의 적어도 일부 동안 혼합 속도 증가는 본 모델 시스템에서 약물 이량체 형성을 축소시킬 수 있음을 증명한다.
- [0115] 실시예 1에 기재된 바와 같이, TCEP를 이용한 mAb 중간체 (항-MUC16)의 부분적 환원 동안, 오버헤드 교반 장치의 혼합 속도는 표적 혼합 속도로부터 증가되었고, 이는 aMUC16 단백질의 부분적 환원에 최적임이 앞서 결정되었다. 혼합 속도는 100mL 반응기에서 자석 교반 막대에 의해 또는 100mL EASYMAX™ 반응기에서 모터식 유리 진탕기에 의해 제어되었다. 자석 교반 막대의 혼합 속도는, 환원 동안 혼합 속도를 변화하기 위해 rpm의 수동 조정으로, 자기 교반 플레이트 상에서 셋팅에 의해 지시되었다. EASYMAX의 유리 진탕기는 기기 소프트웨어에 의해 제어되었고, 혼합 속도는 기기 터치패드를 통해 또는 동반 소프트웨어 상에서 실험 방법에서 소정의 셋팅을 통해 수작업으로 변화되었다.
- [0116] 표적 혼합 파라미터를 이용하여, 접합 반응은 실시예 1에 기재된 바와 같이 진행하였고, RP-HPLC 분석은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행되었다. 도 3을 참조로, RP-HPLC 분석은 배경 대조 (독립된, 하부 라인)으로서 제형 버퍼 블랭크 상에서 수행되었다.
- [0117] 90 분 TCEP 환원 반응 (표적 혼합 대조) 전반에 걸쳐 75 RPM의 혼합 속도에 대하여, aMUC16-vcMMAE용 공정내 접합 풀의 RP-HPLC 분석은 유리 약물 이량체 형성을 보여준다.
- [0118] 90 분 TCEP 환원 반응 전반에 걸쳐 400 RPM (빠른 혼합)의 혼합 속도에 대하여, aMUC16-vcMMAE용 공정내 접합 풀의 RP-HPLC 분석은 유리 약물 이량체가 검출되지 않음을 보여준다.
- [0119] 75 RPM 환원에서 TCEP 환원 반응 혼합의 85 분, 그 다음 환원 반응의 마지막 5 분 동안 400 RPM까지 혼합 속도 증가 (5 분, 빠른 혼합, 총 환원 시간: 90 분)를 포함한 조합된 혼합 속도에 대하여, aMUC16-vcMMAE용 공정내 접합 풀의 RP-HPLC 분석은 유리 약물 이량체의 형성에서 실질적인 환원을 보여준다.
- [0120] 실시예 4
- [0121] 본 실시예는 후속의 접합 반응에서 약물 이량체 형성을 축소 또는 제거하기 위한 수단으로서 질소 기체로 단백질의 부분적 환원 반응 살포의 분석을 기재한다. 이들 데이터는 vcMMAE 접합에 앞서 mAb 중간체의 환원 반응의 시간의 적어도 일부 동안 반응 살포가 본 모델 시스템에서 약물 이량체 형성을 축소 또는 제거할 수 있음을 증명한다.
- [0122] TCEP를 이용한 2 모델 항체 (항-CD22 및 항-Ly6E)의 부분적 환원은 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행되었고, (실시예 1에 기재된 바와 같이, vcMMAE 약물을 이용한) 다운스트림 접합 반응 직전에, 환원 풀을 통해 거품화된 질소 기체를 추가로 포함하였다. 질소 기체는 배관을 통해 질소 탭에 부착된 폴리프로필렌 혈청 피펫을 통해 반응 혼합물 속으로 거품화되었다. 반응 혼합물 살포에 앞서, 유속은 기체 유량계를 이용하여 측정된다. 공지된 유속으로, 환원 동안 지정된 개시 시간까지 고정된 라인과 반응 속도로 질소 기체 라인이 부가된다. 반응은 소정의 종료 시간까지 살포되고, 라인은 재-고정되고, 피펫은 반응기로부터 제거된다. ADC의 수득한 조성물에서 RP-HPLC 분석은 실시예 1에 기재된 바와 같이 RP-HPLC를 이용하여 수행되었다.
- [0123] 도 4a에서 보이는 바와 같이, TCEP 부분적 환원 반응 (총 환원 시간 90 분)의 마지막 5 분 동안 N2 기체 살포 (최하부 라인) 및 살포 없이 (최상부 라인), aCD22-vcMMAE ADC용 공정내 접합 풀의 RP-HPLC 분석은 질소 살포가 유리 vcMMAE 약물 이량체 형성을 제거하였음을 증명한다. 유사하게, 도 4b에서 보이는 바와 같이, TCEP 부분적 환원 반응 (총 환원 시간 90 분)의 마지막 5 분 동안 N2 기체 살포 (최하부 라인) 및 살포 없이 (최상부 라인),

aLy6E-vcMMAE ADC용 공정내 접합 폴의 RP-HPLC 분석은 또한 질소 살포가 유리 vcMMAE 약물 이량체 형성을 제거하였음을 증명한다.

- [0124] 실시예 5
- [0125] 본 실시예는 후속의 접합 반응에서 약물 이량체 형성을 축소 또는 제거하기 위한 수단으로서 공기와 단백질의 부분적 환원 반응 살포의 분석을 기재한다.
- [0126] 약 8-12% 트리실라이드를 갖는 및 vcMMAE로 접합된 벌크 중간체 항체 (항 MUC16)의 2개 21mL 환원 환원은 환원제 TCEP 또는 DTT로 수행되었다. 환원 이후 각 반응 (TCEP 및 DTT)은 3개 폴로 분할되었다: 1) 질소 기체로 5분 살포를 받은 폴, 2) 공기로 5분 살포를 받은 폴, 및 3) 임의의 기체의 살포를 받지 않은 대조 반응. 특히적으로, 항체 환원의 85분 이후, TCEP-환원된 및 DTT-환원된 항체 폴은 각각 2개 10mL 샘플 (샘플 1 - 2) 및 1개 1mL 샘플 (샘플 3)으로 분할되었다. 샘플 1은 다운스트림 접합용 약물의 부가에 앞서 5분 동안 질소로 살포되었다. 샘플 2는 다운스트림 접합용 약물의 부가에 앞서 5분 동안 공기로 살포되었다. 샘플 3 (대조)는 살포되지 않았고, 다운스트림 접합용 약물의 부가에 앞서 5분 동안 유지되었다. 이들 환원 반응 이후, 환원된 단백질은 vcMMAE와 접합되었고 RP-HPLC에 의해 vcMMAE 유리 약물 이량체의 존재에 대하여 분석되었다.
- [0127] 샘플 1 - 3에 대하여 각 접합 폴은 RP-HPLC 검정을 이용한 유리 약물 이량체의 존재, 환원 또는 제거에 대하여 분석되었다. 도 5a에서 보이는 바와 같이, TCEP로 환원된 반응에 대하여, vcMMAE 유리 약물 이량체 불순물은 임의의 기체의 살포를 받지 않은 및 질소 기체로 살포된 반응 및 공기로 살포된 반응 양쪽에서 부재인 대조 반응에서 존재한다.
- [0128] 유사하게, DTT로 환원된 반응에 대하여, 도 5b에서 보이는 바와 같이, vcMMAE 유리 약물 이량체 불순물은 임의의 기체의 살포를 받지 않은 및 질소 기체로 살포된 반응 및 공기로 살포된 반응 양쪽에서 부재인 대조 반응에서 존재한다. 이들 반응에 대하여 곡선하 면적 데이터는 표 1에서 표로 작성된다. 다운스트림 접합에 앞서 5분 동안 질소 또는 공기로 살포는 대조 무-살포 샘플에 비해 유리 약물 이량체 중의 형성을 제거하였다.
- [0129] 표 1. 기체 또는 공기 살포 이후 유리 약물 이량체 형성.

표 1

[0130]

| 샘플 | | vcMMAE D이량체 | |
|------|----|---------------|--------------|
| 환원제 | 살포 | Ret. Time (분) | Area (mAU*분) |
| TCEP | 질소 | N/A | 0 |
| | 공기 | N/A | 0 |
| | 대조 | 20.893 | 0.8947 |
| DTT | 질소 | N/A | 0 |
| | 공기 | N/A | 0 |
| | 대조 | 20.788 | 5.5087 |

- [0131] 본 데이터는 트리실라이드-함유 항체에서 유리 약물 이량체를 생산하기 위한 티올 환원제 DTT 및 TCEP의 용도를 증명한다. 부가적으로, 본 데이터는 공기로 환원 반응 살포가, 불활성 기체 예컨대 질소를 이용하여 수득된 결과와 유사한, 접합 동안 유리 약물 이량체 형성을 예방함을 증명한다.
- [0132] 실시예 6
- [0133] 본 실시예는 후속의 접합 반응에서 유리 약물 이량체 형성의 환원 또는 예방 상에서 단백질의 환원 반응 동안 살포의 타이밍의 분석을 기재한다.
- [0134] 환원 반응 동안 질소 기체 살포의 타이밍의 효과를 조사하기 위해, 살포 시간은 다양하였고 그리고 유리 약물 이량체 피크 면적은 RP-HPLC 검정으로 모니터링되었다. 단일 90mL 환원은 벌크 중간체 항체 (항-Ly6E 항체)로 수행되었다. 환원 반응을 개시하기 위한 TCEP의 부가 이후, 폴은 전체 90분 환원 반응 동안 질소로 살포되었다. 환원 반응 생성물의 샘플은 살포의 개시에 앞서 뿐만 아니라 살포 동안 취해졌고, 그리고 각 샘플은 그 다음 살포 이후 접합되었다. 각 접합된 샘플은 형성된 유리 약물 (vcMMAE) 이량체의 양을 모니터링하기 위해 RP-HPLC 검정에 의해 분석되었다. 도 6에서 보이는 바와 같이, 그리고 표 2에서 표로 작성된 바와 같이, 유리 약물 이량체 피크 면적은 살포 시간 증가와 함께 감소한다.

[0135] 표 2. 다양한 살포 시간 이후 유리 약물 이량체 형성

표 2

[0136]

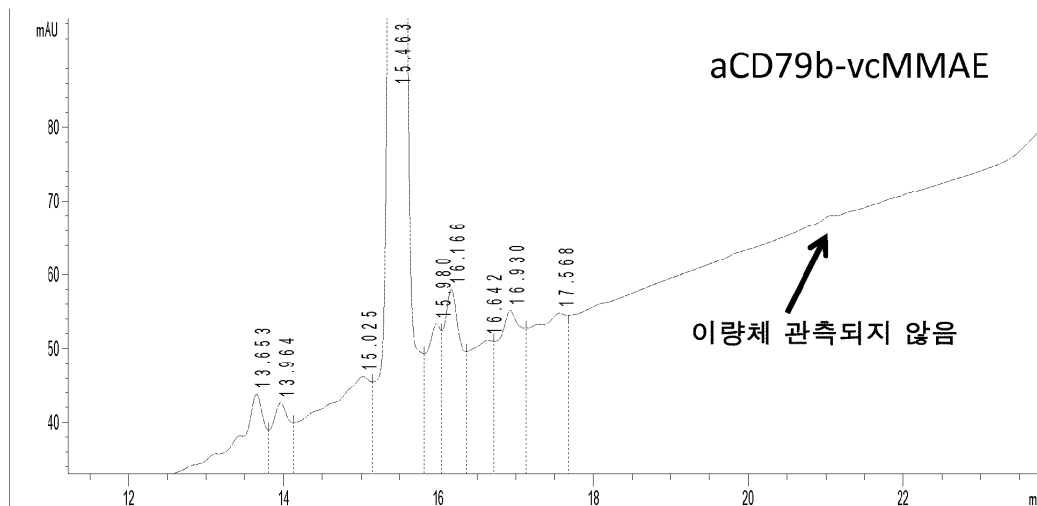
| 살포 시간 (분) | vcMMAE 이량체 피크 면적 (mAU*분) |
|-----------|--------------------------|
| 0 | 6.2005 |
| 5 | 1.9524 |
| 10 | 0.8626 |
| 15 | 0.3504 |
| 20 | 0.1493 |
| 25 | 0.0769 |
| 30 | 0.0621 |
| 40 | 0 |
| 50 | 0 |
| 60 | 0 |
| 70 | 0 |
| 80 | 0 |
| 90 | 0 |

[0137] 본 데이터는 유리 약물 이량체가 살포의 30 분 이후 제거됨을 증명한다. 상기 데이터는 또한 환원의 개시에서 살포가 유리 약물 이량체 형성을 효과적으로 축소시키고, 따라서 살포가 환원 반응의 개시에서 또는 말단에 대하여 유사한 결과로 발생할 수 있음을 증명한다.

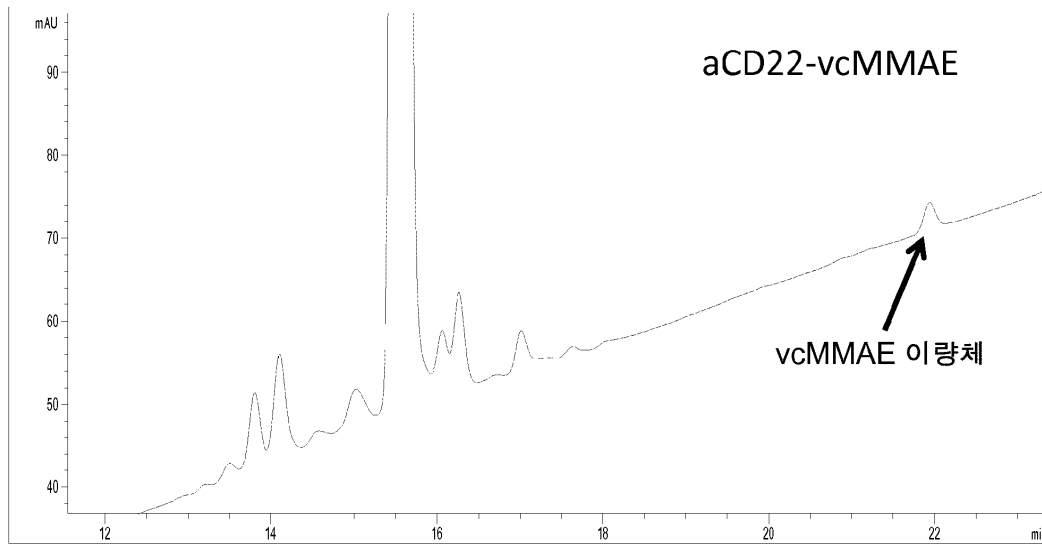
[0138] 본 발명의 전술한 실시예는 실례 및 설명의 목적으로 나타내고 있다. 더욱이, 이들 실시예는 본원에서 개시된 형태로 본 발명을 제한할 의도는 아니다. 결과적으로, 본 발명의 설명의 교시에 비례한 변화 및 변형, 및 관련된 분야의 기술 또는 지식은 본 발명의 범위 내이다. 본원에서 제공된 실시예에 기재된 특정 구현예는 본 발명 실시로 공지된 최선의 방식을 추가로 설명하기 위해 및 상기, 또는 다른, 구현예에서 그리고 본 발명의 특정한 적용 또는 사용에 의해 필요한 다양한 변형으로 본 발명을 당업자가 이용할 수 있기 위해 의도된다. 첨부된 청구항이 선행기술에 의해 허용된 정도까지 대안적인 구현예를 포함하도록 해석되어야 하는 것이 의도된다.

도면

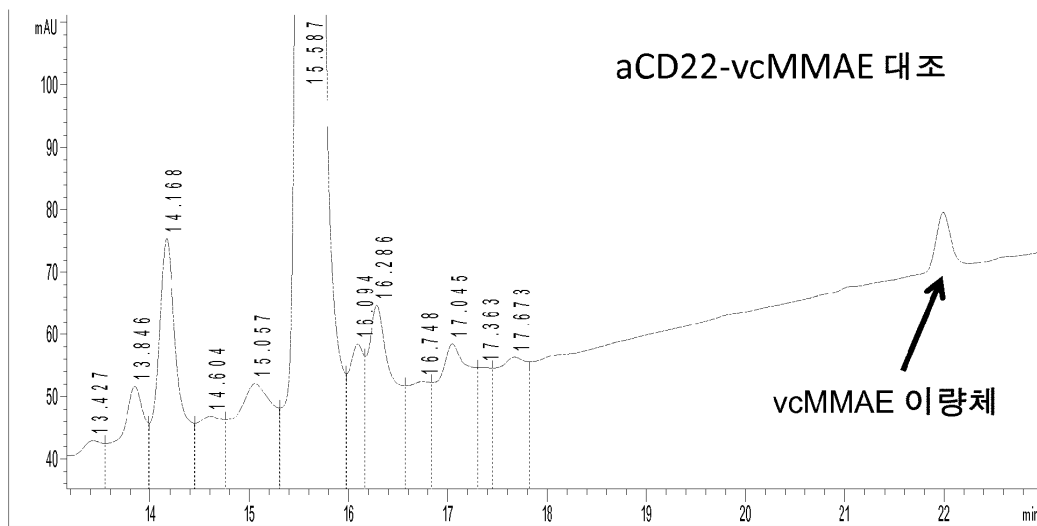
도면1a



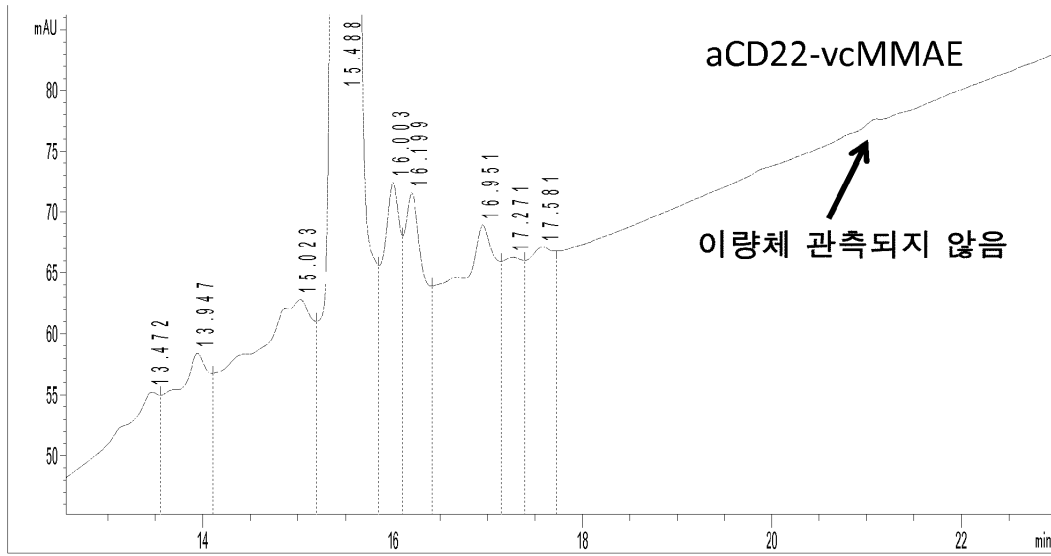
도면1b



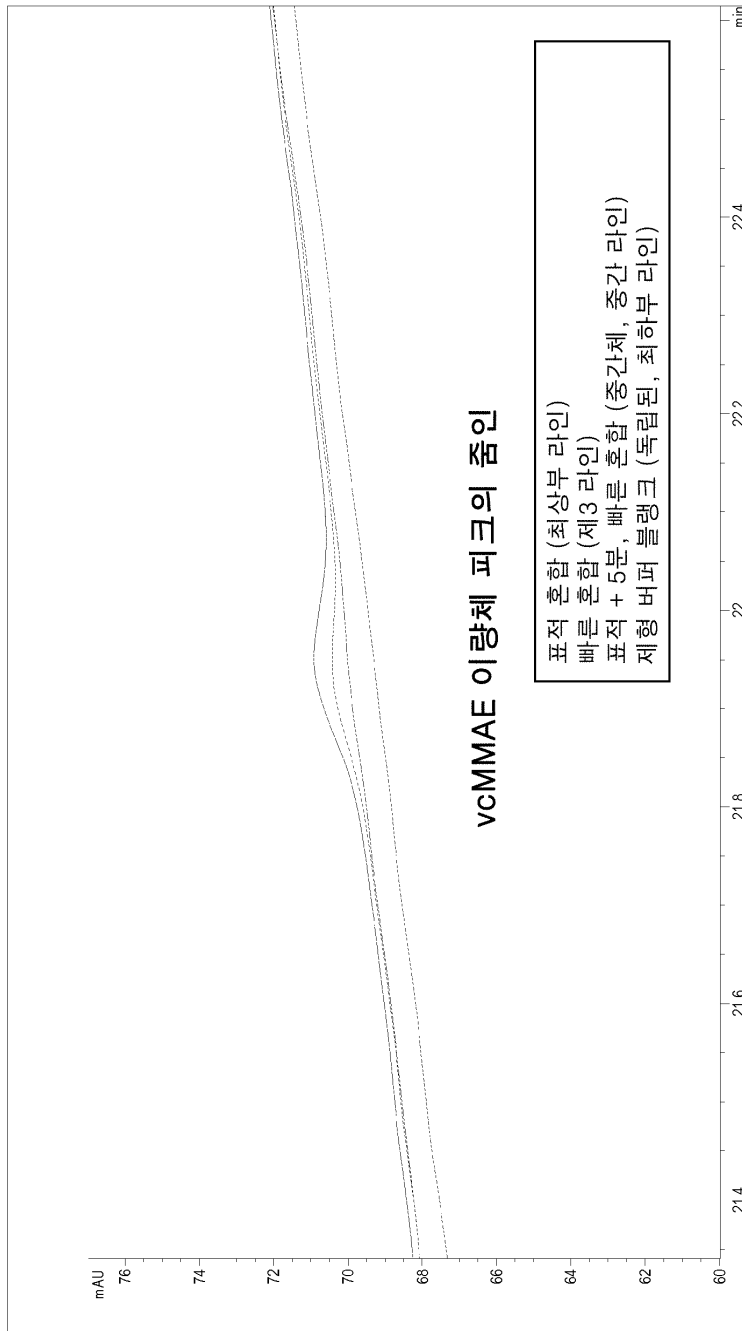
도면2a



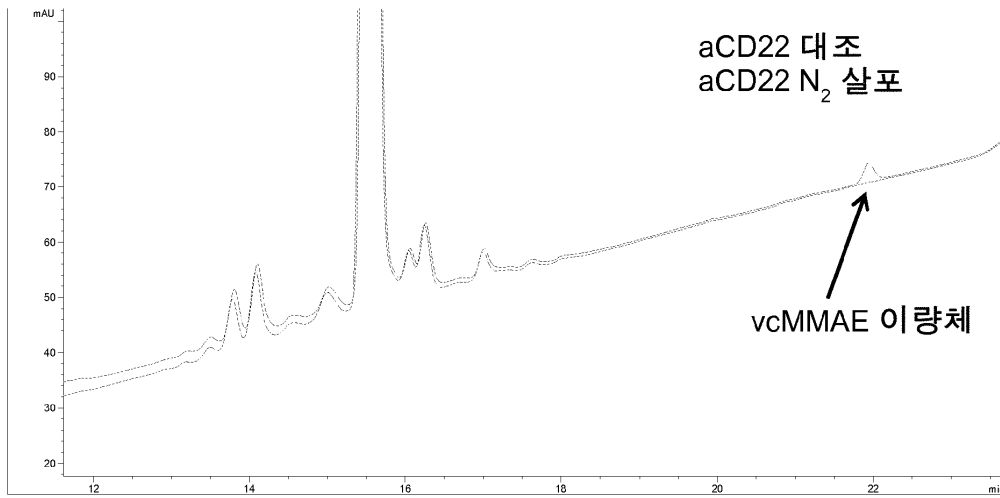
도면2b



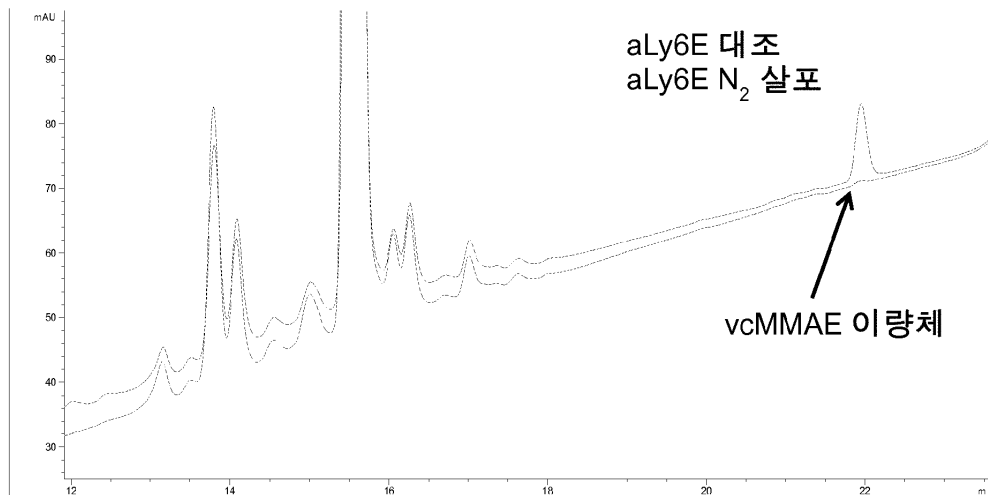
도면3



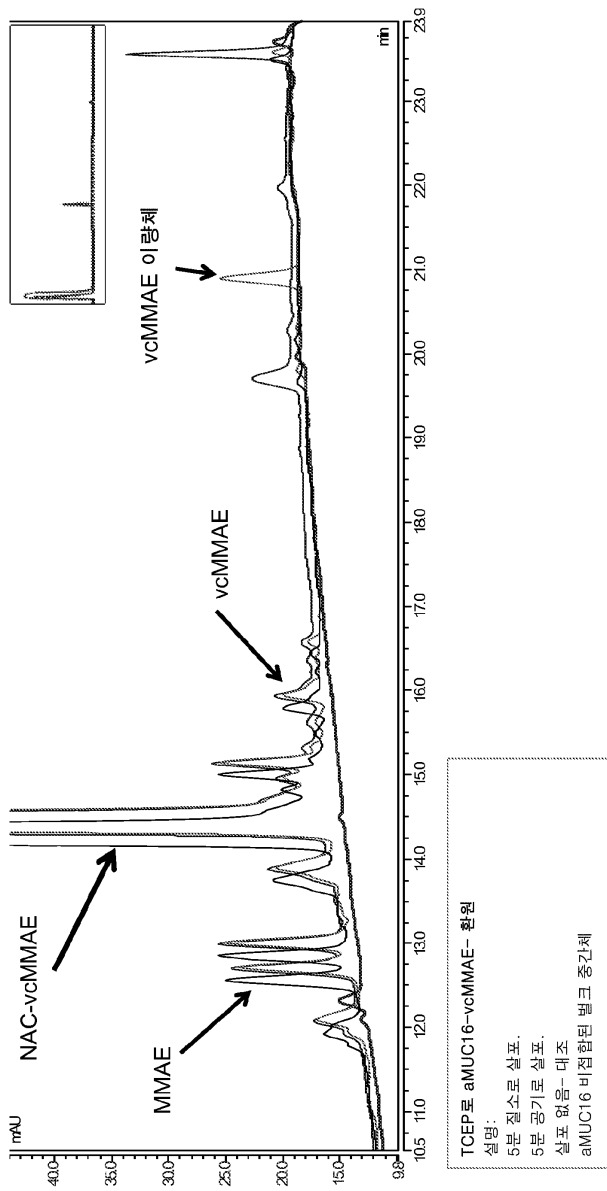
도면4a



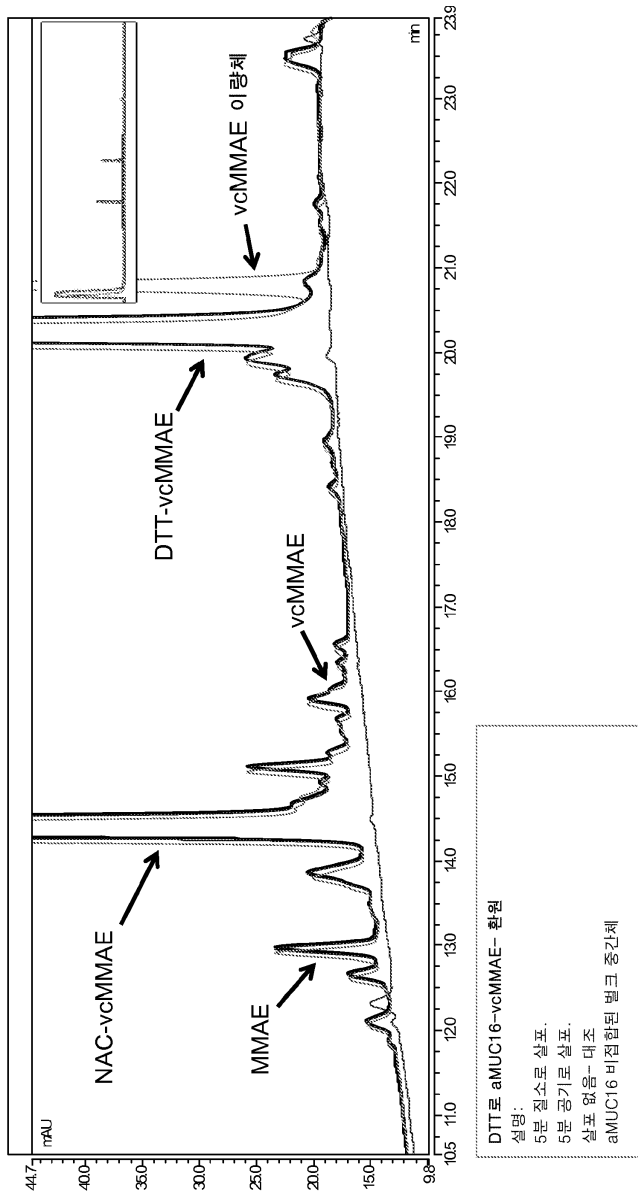
도면4b



도면5a



도면5b



도면6

