



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월10일  
(11) 등록번호 10-1795984  
(24) 등록일자 2017년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/48 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 47/6849 (2017.08)  
A61K 47/6803 (2017.08)  
(21) 출원번호 10-2016-7031683  
(22) 출원일자(국제) 2015년04월27일  
심사청구일자 2017년01월06일  
(85) 번역문제출일자 2016년11월14일  
(65) 공개번호 10-2016-0146817  
(43) 공개일자 2016년12월21일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/059045  
(87) 국제공개번호 WO 2015/162291  
국제공개일자 2015년10월29일  
(30) 우선권주장  
14305620.8 2014년04월25일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO2012142164 A1  
KR1020080032117 A

(73) 특허권자  
피에르 파브르 메디카먼트  
프랑스, 에프-92100 볼로뉴-빌랑꾸르, 뽀라스 아  
벨-강스, 45  
(72) 발명자  
리라뜨, 이앙  
프랑스, 에프-81100 까스뜨레, 꺄맹, 드 몽뜨플레  
지르 67  
쁘레, 미셀  
프랑스, 에프-81100 까스뜨레, 꺄맹 드 라 피끄  
45  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
한인열

전체 청구항 수 : 총 21 항

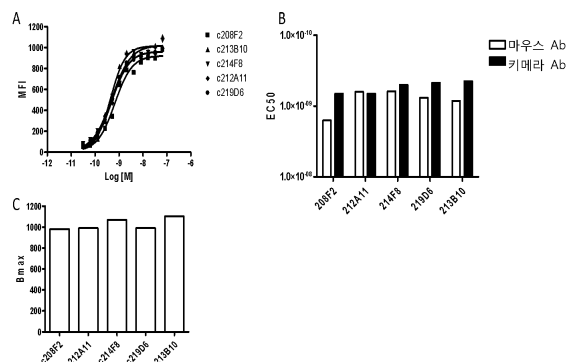
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 IGF-1R 항체-약물-결합체 및 암의 치료를 위한 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 IGF-1R과 결합할 수 있는 항체-약물-결합체에 관한 것이다. 한 가지 관점으로부터, 본 발명은 IGF-1R과 결합할 수 있는 항체를 포함하는 항체-약물-결합체로서, 상기 항체는 돌라스타틴 10 (dolastatin 10)의 유도체들 및 아우리스타틴들 (auristatin)로부터 선택된 적어도 하나의 약물과 결합되는, 항체-약물-결합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 상기 항체-약물-결합체의 치료 방법 및 용도를 포함한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**고뜨쉬, 릴리앙**

프랑스, 에프-74130 에이쥬, 루뜨 드 끌뤼셰 15

**브루썸, 마뮈**

프랑스, 에프-01420 세이쉴르, 앙되블 레 페라쉴,  
뤼 뒤 리외뜨낭 13베

**보-라르보르, 샤르로뜨**

프랑스, 에프-74520 중지에르 에파니위, 아모 드  
비그니, 뤼 뒤 쌍프 아 라 므와느 156

**아외, 장-프랑스와**

프랑스, 에프-74160 보몽, 루뜨 뒤 샬레브, 도맹  
뒤 샬레브 30

**쌍삐오, 띠엘리**

프랑스, 에프-74160 센 쥐리에 에 쥐느브와, 앙되  
블 르 까이 드아르망, 아방뉘 드 라 갈 4

**로베르, 알레**

프랑스, 에프-74100 앙느마쓰, 뤼 드 로마그니 12

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다음 화학식 (I)의 항체-약물-결합체 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염:

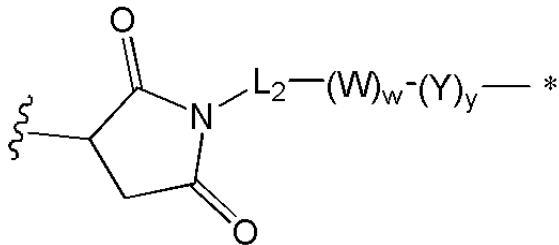


(I)

여기에서

**Ab**는 서열번호 1, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 4, 5 및 6의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체로부터 선택되는 인간 IGF-1R과 결합할 수 있는 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이고;

**L**은 다음 화학식 (III)의 링커이고:

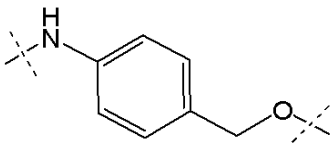


(III)

여기에서

**L<sub>2</sub>**는 (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>)고리알킬-카르보닐, 또는 (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)알킬, (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)알킬-카르보닐이고,

**W**는 아미노산 단위이고, **w**는 0 및 5 사이 범위에 포함된 정수이고,

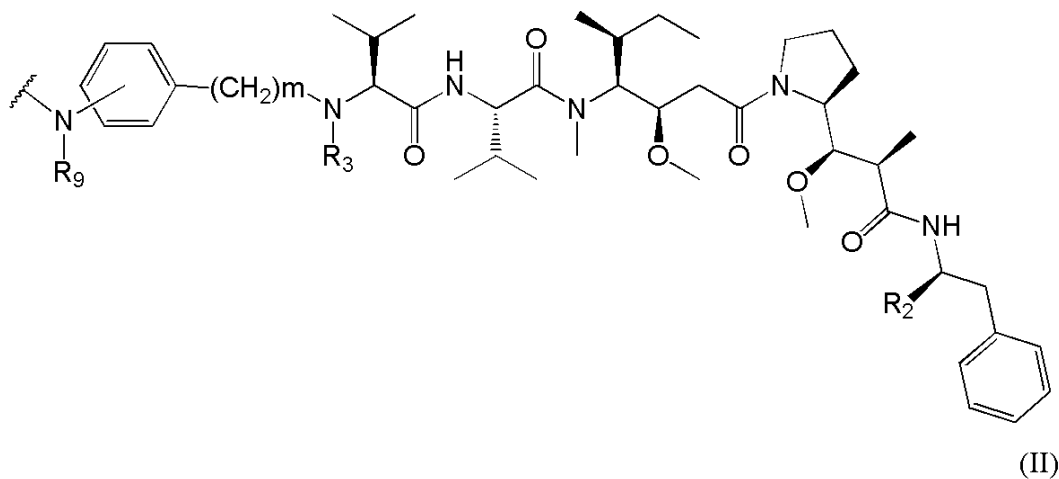


**Y**는 PAB가 인 PAB-카르보닐이고, **y**는 0 또는 1이고,

별표는 **D**와의 부착점을 가리키고,

물결선은 **Ab**와의 부착점을 가리키고;

D는 다음 화학식 (II)의 약물 분체이고:



여기에서

$R_2$ 는  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOCH}_3$  또는 티아조릴이고,

$R_3$ 는 H 또는  $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 알킬이고,

$R_9$ 는 H 또는  $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 알킬이고,

$m$ 은 1 및 8 사이 범위에 포함된 정수이고,

물결선은 L과의 부착점을 가리키고,

$n$ 은 1 내지 12이다.

## 청구항 2

제 1항에 있어서,

Ab는

- a) 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- b) 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 10, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- c) 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- d) 서열번호 8, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;

로부터 선택되는, 항체-약물-결합체.

## 청구항 3

제 1항에 있어서,

Ab는

- a) 서열번호 13의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- b) 서열번호 14의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 10, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;

체;

c) 서열번호 15의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;

d) 서열번호 16의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및

e) 서열번호 17의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;

로부터 선택되는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,

Ab는

a) 서열번호 18의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;

b) 서열번호 19의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;

c) 서열번호 20의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;

d) 서열번호 21의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 8, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및

e) 서열번호 22의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;

로부터 선택되는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,

Ab는 프랑스 파스퇴르 연구소, CNCM에 각각 2013년 5월 30일, 2013년 6월 26일, 2013년 6월 26일, 2013년 4월 24일 및 2013년 6월 26일에 기탁된 하이브리도마 I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 또는 I-4774에 의해 생산된 항체로부터 선택되는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서,

Ab는

a) 잔기들 20번, 34번, 35번, 38번, 48번, 50번, 59번, 61번, 62번, 70번, 72번, 74번, 76번, 77번, 79번, 82번 및 95번으로부터 선택된 적어도 1개의 역-돌연변이를 포함하는, 서열번호 33의 서열의 중쇄 가변 도메인 (VH); 및

b) 잔기들 22번, 53번, 55번, 65번, 71번, 72번, 77번 및 87번으로부터 선택된 적어도 1개의 역-돌연변이를 포함하는, 서열번호 35의 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL):

을 포함하는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,

Ab는

- a) 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80으로부터 선택된 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- b) 서열번호들 57 및 60으로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호들 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- c) 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80으로부터 선택된 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 57 또는 60으로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체:
- 로부터 선택되는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

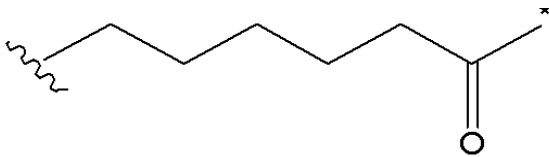
Ab는

- a) 서열번호들 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 및 81로부터 선택된 서열의 중쇄; 및
- b) 서열번호들 59 및 61로부터 선택된 서열의 경쇄:
- 를 포함하는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서,

L<sub>2</sub>가 다음 화학식을 가진 항체-약물-결합체:



여기에서

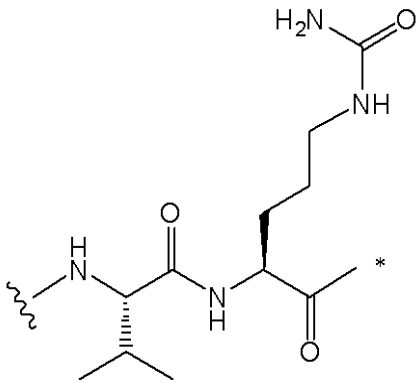
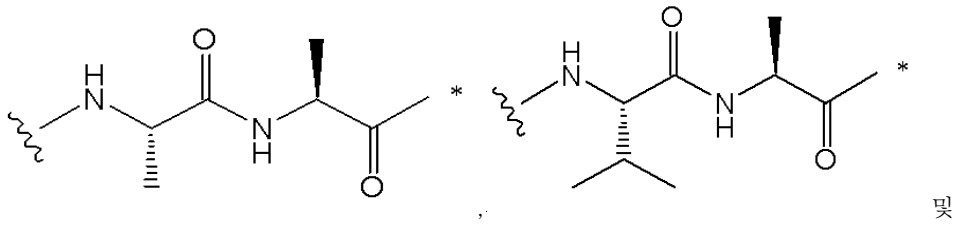
별표는 (W)<sub>n</sub>와의 부착점을 가리키고;

물결선은 말레이미드 분체의 질소 원자와의 부착점을 가리킨다.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서,

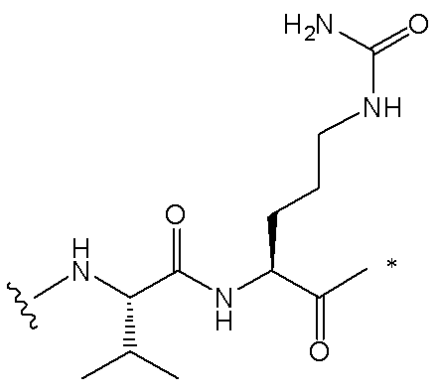
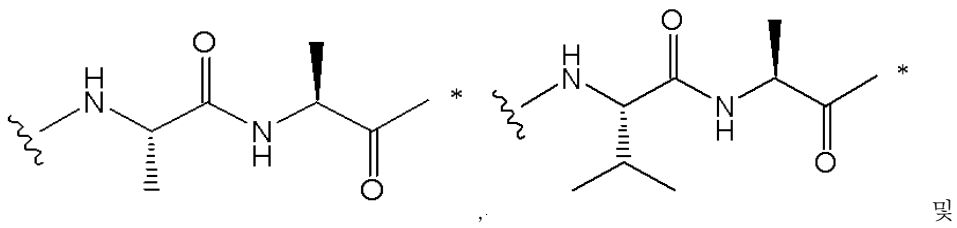
(W)<sub>n</sub>는 단일 결합,



로부터 선택되는, 항체-약물-결합체:  
여기에서  
별표는 (Y)<sub>y</sub>와의 부착점을 가리키고;  
물결선은 L<sub>2</sub>와의 부착점을 가리킨다.

#### 청구항 11

제 1항에 있어서,  
w = 0; 또는 w = 2이고; (W)<sub>w</sub>는



로부터 선택되는, 항체-약물-결합체:  
여기에서

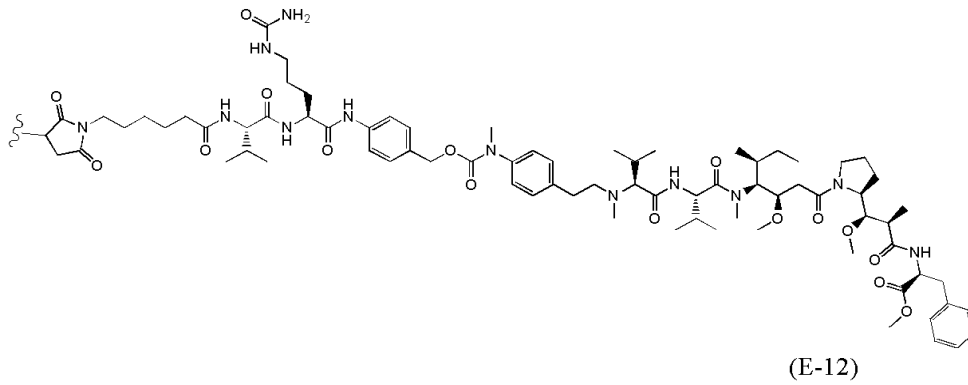
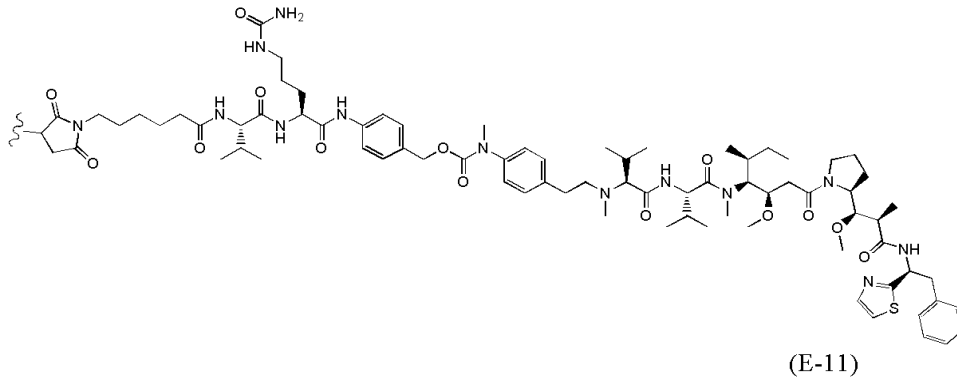
별표는 (Y)<sub>y</sub>와의 부착점을 가리키고;

물결선은 L<sub>2</sub>와의 부착점을 가리킨다.

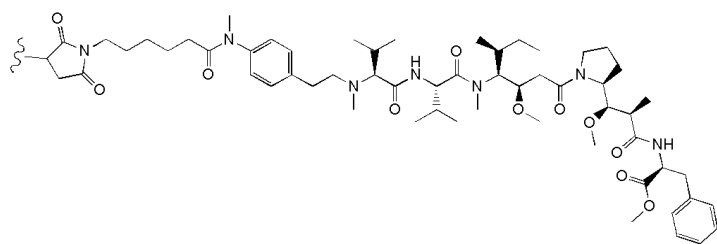
## 청구항 12

제 1항에 있어서,

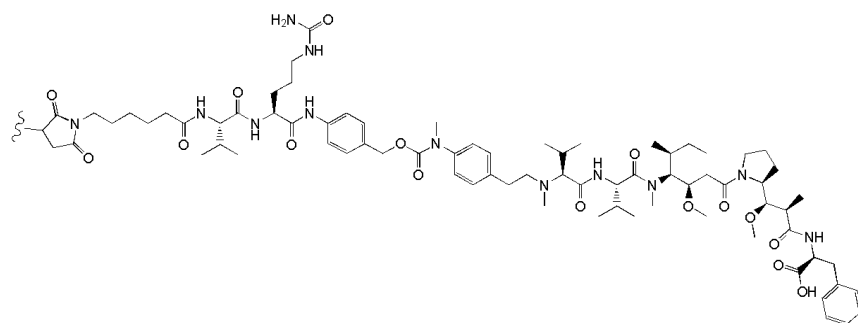
(L - D)는 다음으로부터 선택되는, 항체-약물-결합체:



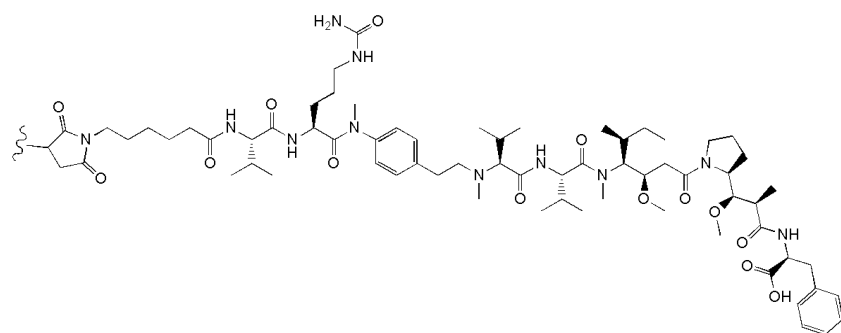




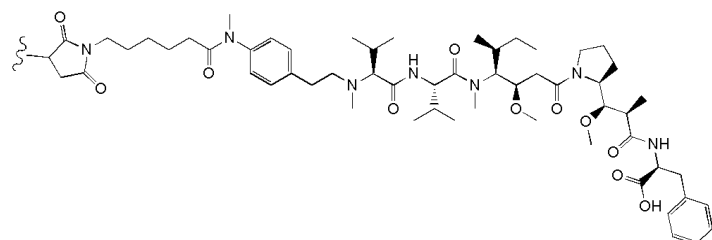
(G-12)



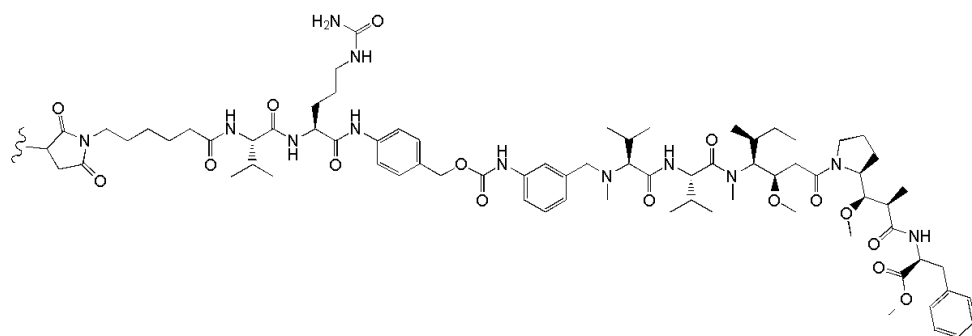
(E-13)



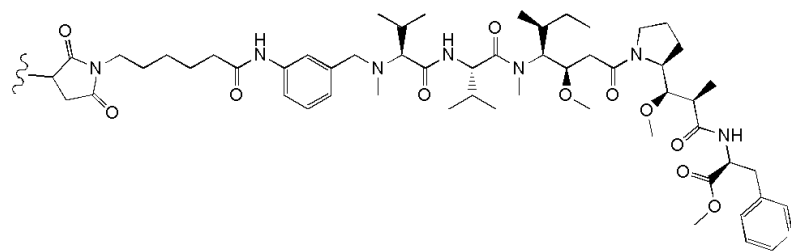
(F-13)



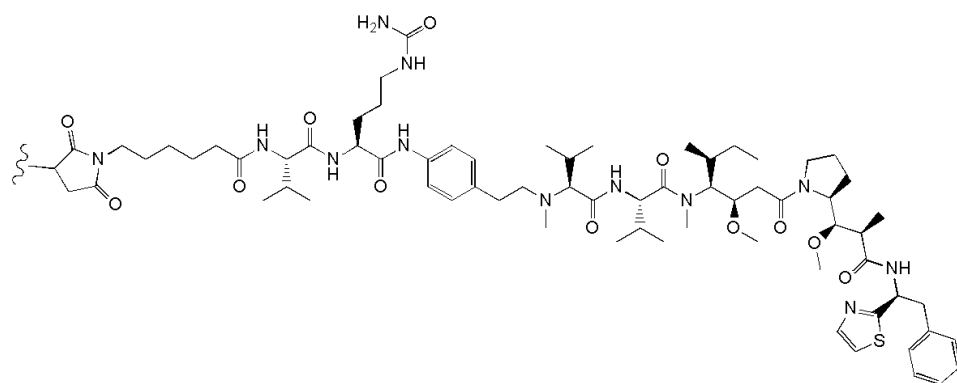
(G-13)



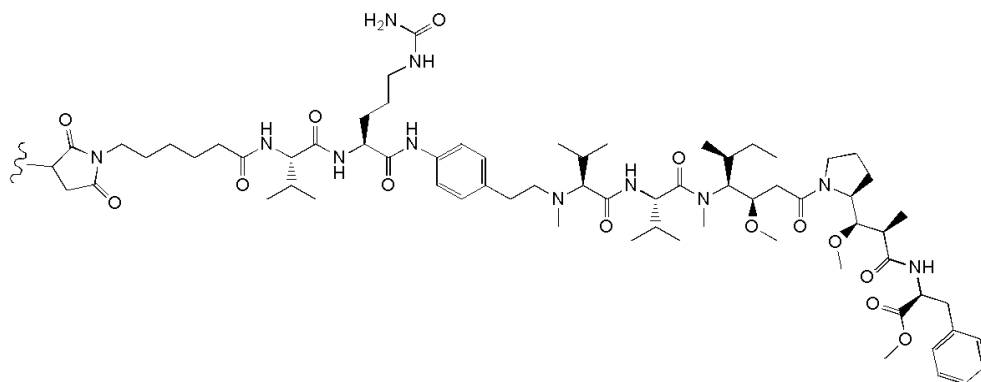
(E-15)



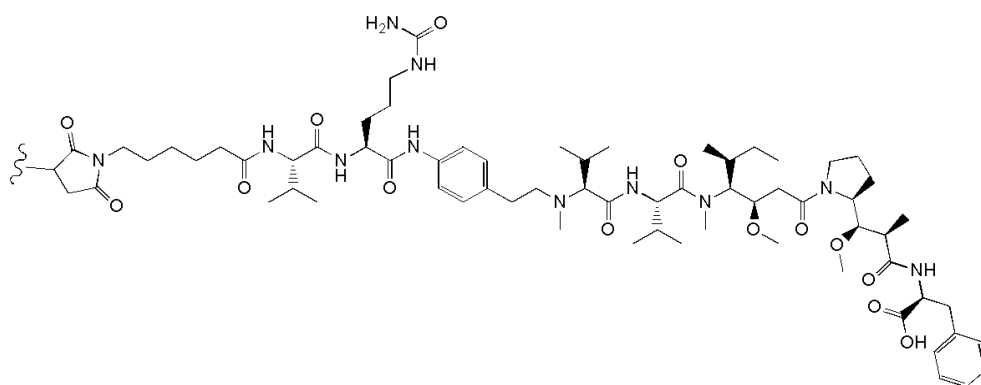
(G-15)



(F-61)



(F-62)



(F-63)

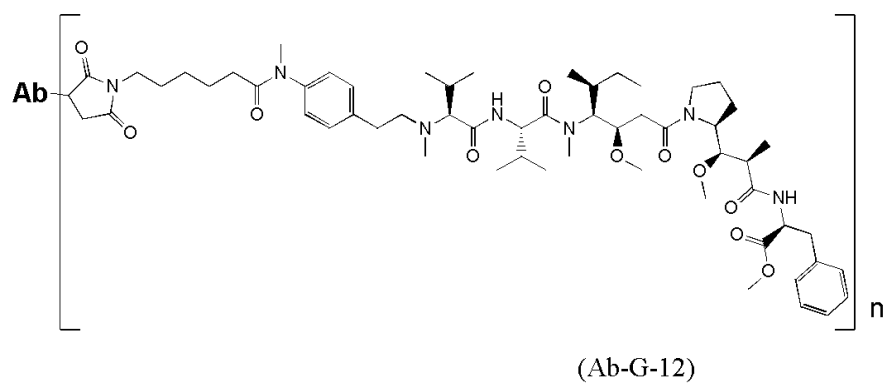
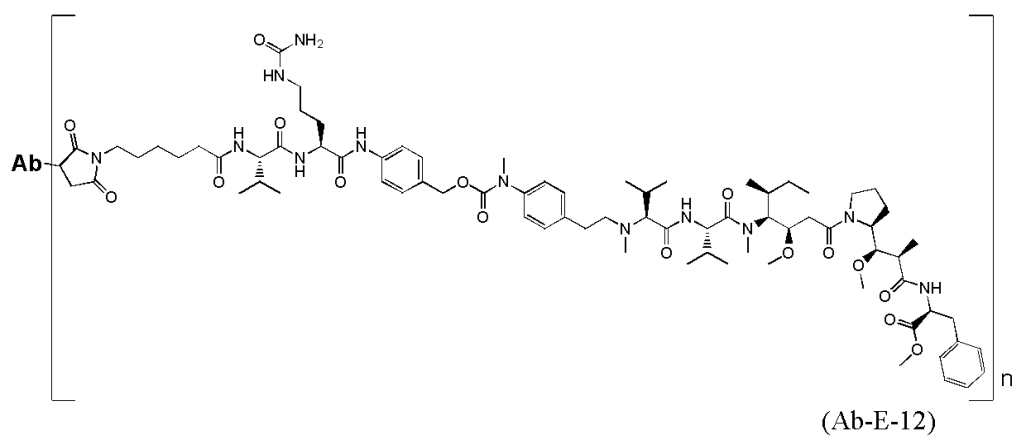
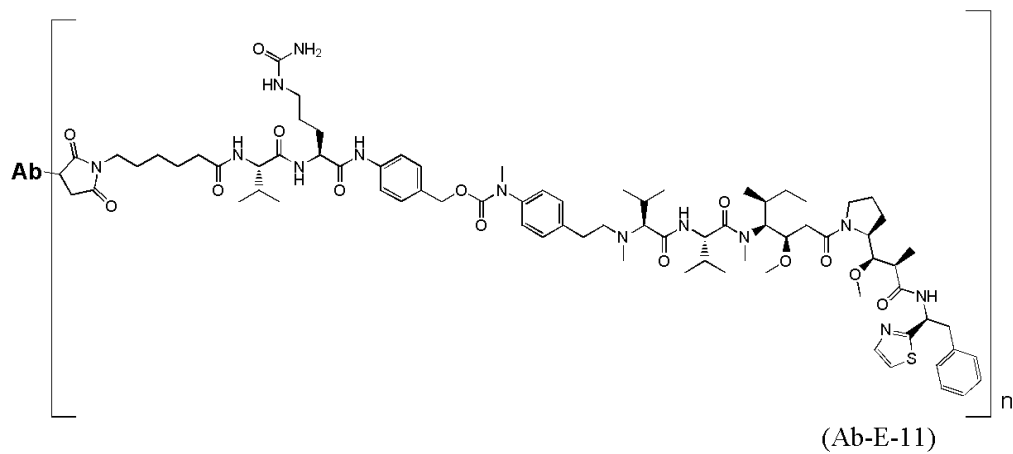
여기에서

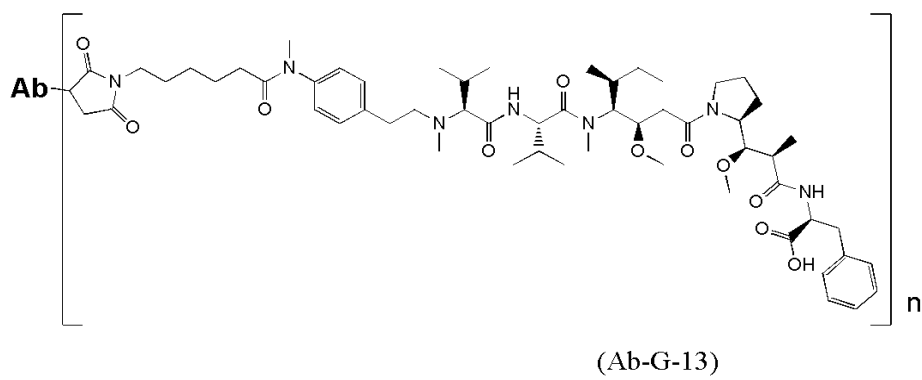
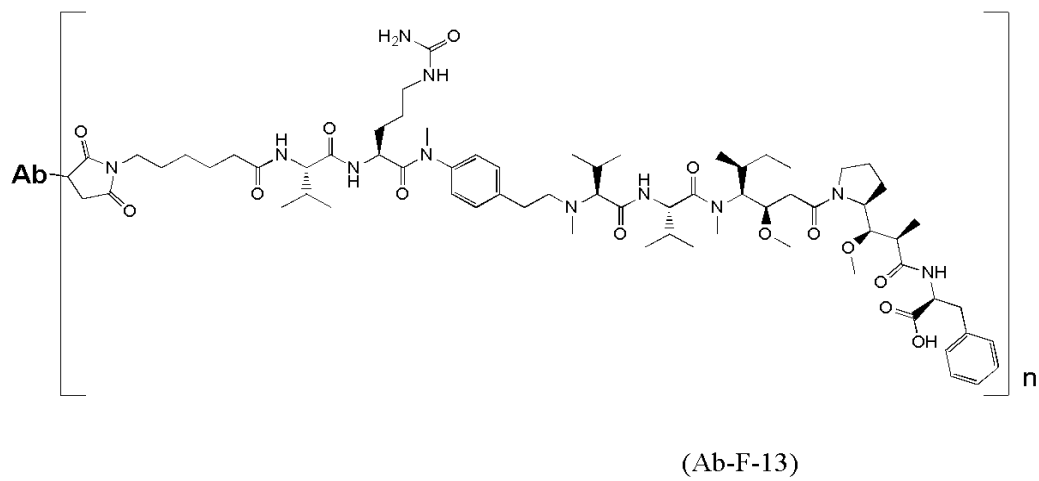
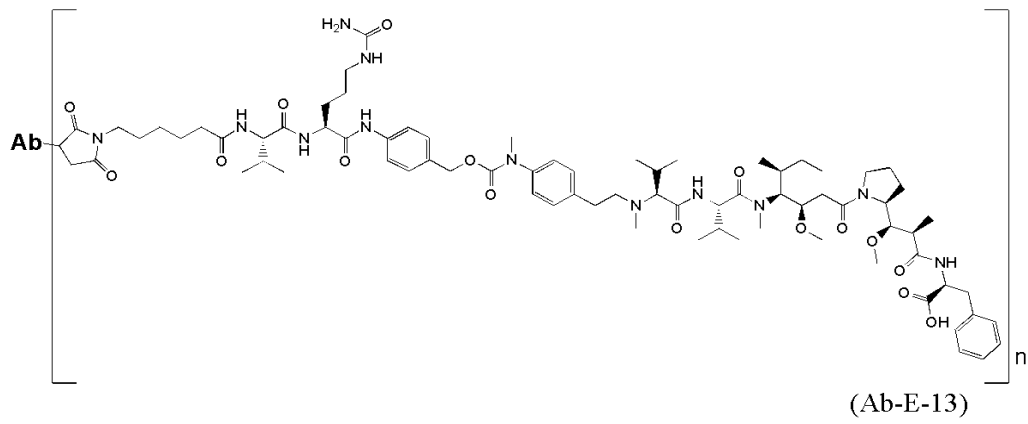
물결선은 **Ab**와의 부착점을 가리킨다.

### 청구항 13

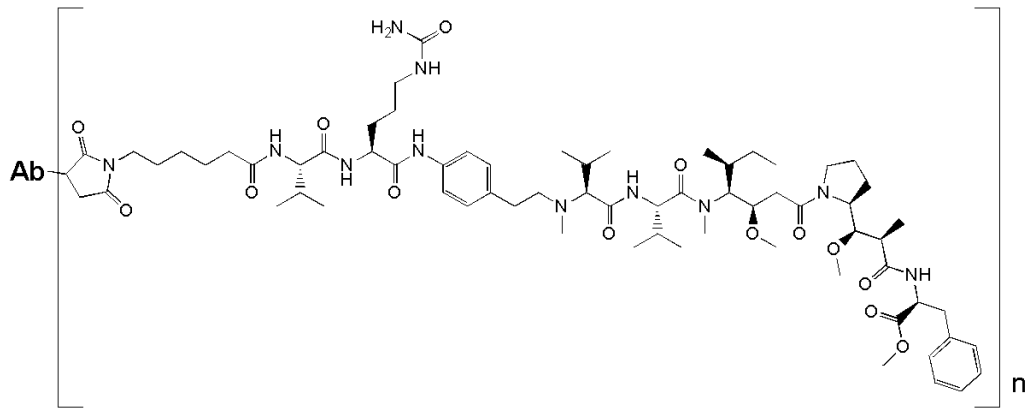
제 1항에 있어서,

다음으로부터 선택되는 화학식을 가진 항체-약물-결합체 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로서, **Ab**가 프랑스 파스티르 연구소, CNCM에 각각 2013년 5월 30일, 2013년 6월 26일, 2013년 6월 26일, 2013년 4월 24일 및 2013년 6월 26일에 기탁된 하이브리도마 I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 또는 I-4774에 의해 생산된 항체로부터 선택되는, 항체-약물-결합체:

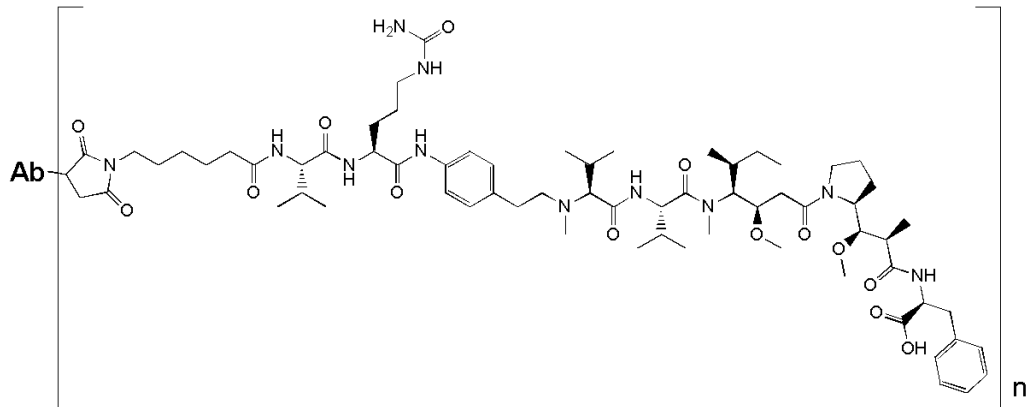








(Ab-F-62)



(Ab-F-63)

#### 청구항 14

제 13항에 있어서,

Ab는

- a) 서열번호 56의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- b) 서열번호 56의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 60의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- c) 서열번호 62의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- d) 서열번호 64의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- e) 서열번호 64의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 60의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- f) 서열번호 66의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- g) 서열번호 68의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- h) 서열번호 68의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 60의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- i) 서열번호 70의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- j) 서열번호 72의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- k) 서열번호 74의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- l) 서열번호 76의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- m) 서열번호 78의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;

- n) 서열번호 78의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 60의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체; 및
- o) 서열번호 80의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 57의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;로 이루어진 군에서 선택되는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 15

제 14항에 있어서,

**Ab**는

- a) 서열번호 58의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- b) 서열번호 58의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 61의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- c) 서열번호 63의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- d) 서열번호 65의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- e) 서열번호 65의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 61의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- f) 서열번호 67의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- g) 서열번호 69의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- h) 서열번호 69의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 61의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- i) 서열번호 71의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- j) 서열번호 73의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- k) 서열번호 75의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- l) 서열번호 77의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- m) 서열번호 79의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;
- n) 서열번호 79의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 61의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체; 및
- o) 서열번호 81의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 59의 서열의 경쇄 가변 도메인을 가지는 항체;로 이루어진 군에서 선택되는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 16

제 1항에 있어서,

**n**은 2인, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 17

제 1항에 있어서,

**n**은 4인, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 18

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서,

약제로서 사용되는, 항체-약물-결합체.

#### 청구항 19

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 항체-약물-결합체를 포함하는 IGF-1R-발현 암의 치료에 사용되는 조성물.

#### 청구항 20



제 19항에 있어서,

전분, 셀룰로스, 슈크로스, 락토스, 실리카, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 물, 프로필렌 글리콜, 식물성 오일 및 에틸 올레이트에서 선택되는 약제학적으로 허용가능한 운반체를 더 포함하는, 조성물.

## 청구항 21

제 19항에 있어서,

상기 IGF-1R-발현 암은 유방암, 결장암, 식도암, 간세포암, 위암, 신경아교종, 폐암, 흑색세포종, 골육종, 난소암, 전립선암, 횡문근육종, 신장암, 갑상샘암, 자궁내막암, 중피종, 구강 편평세포 암종 및 임의의 약물 저항성 암으로부터 선택되는 암인, 조성물.

## 청구항 22

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 IGF-1R과 결합할 수 있는 항체-약물-결합체에 관한 것이다. 한 가지 관점으로부터, 본 발명은 IGF-1R과 결합할 수 있는 항체를 포함하는 항체-약물-결합체로서, 상기 항체는 돌라스타틴 10 (dolastatin 10)의 유도체들 및 아우리스타틴들 (auristatin)로부터 선택되는 적어도 하나의 약물과 결합되는, 항체-약물-결합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암의 치료를 위한 상기 항체-약물-결합체의 치료 방법 및 용도를 포함한다.

### 배경 기술

[0002] IGF-1R (때로 IGF1R 또는 IGF-IR)이라고 불리는 인슐린-유사 성장인자 I 수용체는 인슐린 수용체 IR과 70% 상동성을 가지는, 타이로신 키나제 활성을 가진 수용체이다. IGF-1R은 분자량 대략 350,000의 당단백질이다. 이것은 디설파이드 결합들에 의해 연결된 각각의 절반이 세포의  $\alpha$ -소단위체 및 막통과  $\beta$ -소단위체로 구성된 헤테로-사량체 수용체이다. IGF-1R은 매우 높은 친화도 ( $K_d$  #1 nM)로 IGF1 및 IGF2와 결합하지만, 100 내지 1,000배 더 낮은 친화도로 인슐린과 동일하게 결합할 수 있다. 역으로, IR은 IGF들이 100배 더 낮은 친화도로만 인슐린 수용체와 결합하더라도, 매우 높은 친화도로 인슐린과 결합한다. IGF-1R 및 IR의 타이로신 키나제 도메인들은 상동성이 약한 영역들이 각각  $\alpha$ -소단위체 및  $\beta$ -소단위체의 C-말단 부분 위에 위치하는 시스테인-강화 부위와 관련되긴 하더라도 매우 높은 서열 상동성을 가진다.  $\alpha$ -소단위체에서 관찰되는 서열 차이들은 리간드들의 결합 영역에 위치하고, 따라서 IGF들 및 인슐린 각각에 대한 IGF-1R 및 IR의 상대적 친화도들의 기원이 된다.  $\beta$ -소단위체의 C-말단 부분에서 차이들은 두 가지 수용체들의 신호전달 경로들에서 다양성 (divergence)의 결과를 가져온다; IGF-1R은 분열생성, 분화 및 항-세포사멸 효과들을 매개하는 반면, IR의 활성화는 대사적 경로들의 수준의 효과들에 관여한다.

[0003] 세포질 타이로신 키나제 단백질들은 수용체의 세포의 도메인과 리간드의 결합에 의해 활성화된다. 키나제의 활성화는 교대로 IRS-1, IRS-2, Shc 및 Grb 10를 포함하는, 서로 다른 세포내 기질들의 자극에 관여한다. IGF-1R의 두 가지 주요한 기질들은 IRS 및 Shc이고, 이들은 수많은 하부 효과기들의 활성화에 의해 IGF들의 이러한 수용체와 부착과 연관된 성장 및 분화 효과들의 대부분을 매개한다. 기질들의 유용성은 결론적으로 IGF-1R의 활성화와 연관된 최종 생물학적 효과를 설명할 수 있다. IRS-1이 우세할 때, 세포들은 증식하고 형질전환되는 경향이 있다. Shc가 우세할 때는, 세포들이 분화되는 경향이 있다. 세포사멸에 대한 보호작용의 효과들에 기본적으로 관여하는 경로는 포스포티딘-이노시톨 3-키나제들 (PI 3-키나제들) 경로인 것으로 여겨진다.

[0004] 발암기전에서 IGF 시스템의 역할은 지난 10년간 활발한 연구의 주제가 되어왔다. 이러한 관심은 그의 분열생성 및 항세포사멸 특성들에 추가하여, IGF-1R이 형질전환된 표현형의 확립 및 유지를 위해 요구되는 것으로 여겨지는 사실의 발견으로 이어졌다. 사실상, IGF-1R의 과다발현 또는 전신적 활성화가 다양한 많은 세포들에서 우태아 혈청이 결여된 배지의 사용과는 독립적인 세포들의 성장 그리고 누드 마우스에서 종양들의 형성을 유발하는 점은 잘 확립되어 왔다. 이것은 과다발현된 유전자들의 매우 다양한 산물들이 많은 성장인자들의 수용체들을 포함하여, 세포들을 형질전환할 수 있기 때문에 그 자체로 독특한 특성이 아니다. 그러나, 형질전환에서 IGF-1R가 담당하는 주요한 역할을 명백하게 보여주었던 결정적인 발견으로, IGF-1R을 코딩하는 유전자가 불활성된 IGF-

1R<sup>-</sup> 세포들이 보통 세포들을 형질전환할 수 있는 소의 파필로마 바이러스의 E5, EGFR 또는 PDGFR의 과다발현, SV 40의 T 항원, 활성화된 ras 또는 이들 마지막 인자들 둘의 조합과 같은 서로 다른 제제들에 의한 형질전환과는 완벽하게 구별되는 점이 되었다.

[0005] IGF-1R은 매우 다양한 종양들 및 종양 계열들에서 발견되고 IGF들은 그들의 IGF-1R과의 부착을 통해 종양 성장을 증폭시킨다. 발암기전에서 IGF-1R의 역할을 찬성하는 다른 주장들은 수용체들에게로 유도되는 마우스 단일클론 항체들을 사용하거나, IGF-1R의 음성 우성체들을 사용하는 연구들로부터 나온다. 실제로, IGF-1R에게로 유도되는 마우스 단일클론 항체들은 배양에서 수많은 세포주들의 증식 및 *생체내*에서 종양 세포들의 성장을 억제하고 있다. 마찬가지로 이것은 IGF-1R의 음성 우성체들이 종양 증식을 억제할 수 있는 점을 보여주었다.

[0006] 매우 많은 프로젝트들이 암들의 치료를 위해 미가공 IGF-1R 항체들 개발하도록 착수되어 왔다. 그럼에도 불구하고, 지금까지 이들 프로젝트들은 전혀 성공적이지 못하였고 항-IGF-1R 항체들은 전혀 시판되지 않는다.

[0007] 더구나, EGFR 및 IGF-1R 둘 다를 표적하기 위하여 항-EGFR 항체들과 조합된 항-IGF-1R 항체들이 관여하는 일련의 임상시험들은 이들 항체들이 전혀 KRAS 돌연변이 환자들을 치료할 수 없었기 때문에 실패로 끝났다.

[0008] 결론적으로, IGF-1R은 현재 주요한 표적으로서 고려되지 않고, 잠재적인 치료제 항체들의 연구에서 IGF-1R은 더 이상 특정한 관심거리로서 고려되지 않는다.

[0009] 그럼에도 불구하고, IGF-1R 항체들을 생성하려는 노력들이 미가공 (naked) 항체들, 예로 그들의 본질적인 특성들에 의해 유용한 항체들에 중점을 두었던 점은 역시 주목되어야 한다. 이러한 의미에서, IGF-1R은 혈관들을 포함하는 정상 세포들에 의해 역시 널리 발현되는 표적으로서 기술되어 있기 때문에, IGF-1R이 항체-약물-결합체 ("ADC"라고도 약칭됨)와 같은 ADC의 생성에는 적합하지 않은 표적으로서 고려된다. 이러한 의미에서, 가장 최신의 IGF-1R 항체, 예로 AVE1642가 약물이 장착되지 않은 미가공 항체로서 개발된 점이 주목될 수 있다. 이것은 현재 개발 중인 다른 IGF-1R 항체들 및 임상시험들에서 실패한 다른 모든 것들의 경우에서도 동일하다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

(특허문헌 0001) WO 2012/142164 A1 (2012-10-18)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 이러한 맥락에서, 본 발명은 ADC 또는 결합체 및 암의 보다 상세하게는 IGF-1R-발현 암들의 치료를 위한 그의 용도에 관한 것이다.

[0011] ADC들은 항체의 결합 특이도를, 예를 들면 세포독성 제제들과 같은 약물들의 효능과 조합한다. 단일클론 항체들의 개발과 연관된 기술학, 더욱 효과적인 약물들의 사용 및 이들 성분들을 공유적으로 결합시키는 화학적 링커들의 설계가 최근 수 년간 신속하게 진행되어 왔다.

[0012] ADC들의 사용은 미결합된 약물들로서 투여되는 경우라면 정상 세포들에게 허용가능하지 않은 수준들의 독성을 미칠 수 있는 약물들의 국소적 전달을 허용한다.

[0013] 다른 말로 하면, 최소의 독성으로 최대의 효능이 이에 의해 추구된다. ADC를 설계하고 정련하려는 노력들은 항체의 선택도뿐만 아니라 약물 작용의 기작, 약물-결합, 약물/항체 비율 (부하 또는 DAR), 및 약물-방출 특성들에 중점을 두어왔다. 약물 분체들은 튜블린 결합, DNA 결합, 프로테오좀, 리보솜 기능의 손상, 단백질 합성 및/또는 토포이소머라제 저해를 포함하는 기작들에 의해 세포독성 및 세포증식억제 효과들을 낼 수 있다. 일정 세포독성 약물들은 커다란 항체와 결합될 때, 비활성화 또는 덜 활성화되는 경향이 있다.

[0014] 각각의 항체가 별도로 특성화되고, 적당한 링커가 설계되며, 종양 세포들에게로 전달 시 그의 효능을 유지하는 적합한 세포독성 제제가 동정되어야 한다. 연구자는 암 표적 상의 항원 밀도 및 정상 조직들이 표적 항원을 발현하는지 여부를 고려해야 한다. 다른 사항들로는 전체 ADC가 표적과 결합 시 내재화되는지 여부; 가능한 정상 조직 노출 및/또는 치료될 암의 유형 및 단계를 고려할 때 세포증식억제 또는 세포독성 약물이 바람직한지

여부; 및 항체를 약물 페이로딩과 연결하는 링커가 절단가능 또는 절단불가능한 결합인지 여부를 포함한다. 또한, 항체와 약물 분체의 결합 비율은 항체의 결합 활성 및/또는 약물의 효능과 타협하지 않고도, 그리고 화합물의 향후 개발 공정을 고려하여 응집 또는 해로운 특성들의 결과를 가져오는 ADC의 물리화학적 특성들을 변형시키지 않고도 충분해야 한다.

[0015] ADC는 복잡한 생물학적 분자이고 효과적인 ADC를 개발하려는 도전들은 여전히 중요한 주제이다.

[0016] 본 발명은 이러한 논의를 목적으로 하고, 다음 화학식 (I)의 ADC 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:



(I)

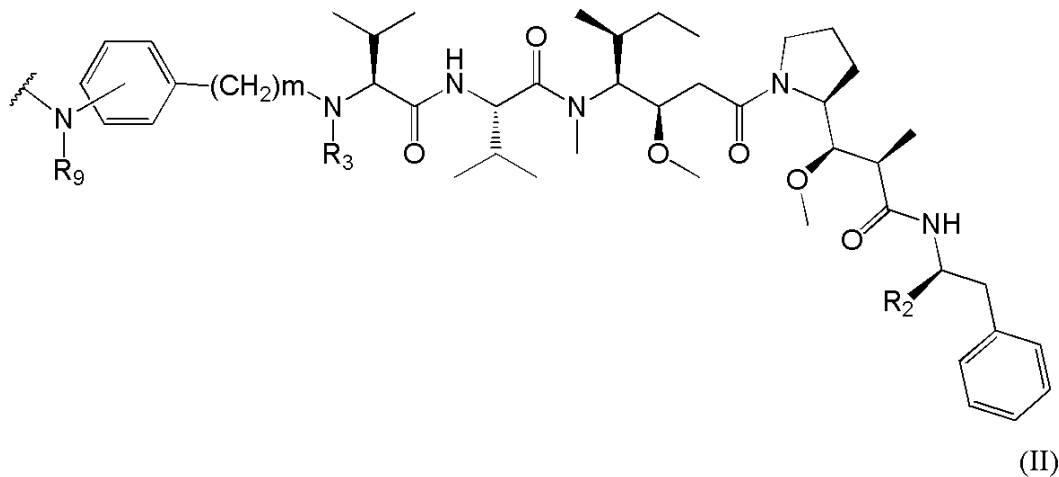
[0017]

[0018] 여기에서

[0019] Ab는 i) 서열번호 1, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 4, 5 및 6의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; ii) i)의 항체와 IGF-1R과의 결합을 경쟁하는 항체; 및 iii) i)의 항체와 동일한 IGF-1R의 에피토프와 결합하는 항체;로부터 선택되는 인간 IGF-1R과 결합할 수 있는 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이고;

[0020] L은 링커이고;

[0021] D는 다음 화학식 (II)의 약물 분체이고:



[0022]

[0023] 여기에서

[0024] R<sub>2</sub>는 COOH, COOCH<sub>3</sub> 또는 티아조릴이고;

[0025] R<sub>3</sub>는 H 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬이고;

[0026] R<sub>9</sub>는 H 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬이고;

[0027] m은 1 및 8 사이 범위에 포함된 정수이고;

[0028] 물결선은 L과의 부착점을 가리키고;

[0029] n은 1 내지 12이다.

[0030] 본 발명의 한 가지 구현예는 ADC로서, Ab가

[0031] a) 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;

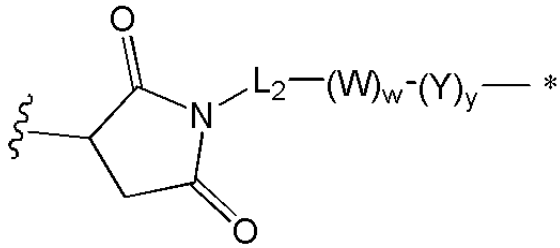
[0032] b) 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 10, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함

하는 항체;

- [0033] c) 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0034] d) 서열번호 8, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0035] 로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명의 한 가지 구현에는 ADC로서, **Ab**가
- [0037] a) 서열번호 13의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0038] b) 서열번호 14의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 10, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0039] c) 서열번호 15의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0040] d) 서열번호 16의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0041] e) 서열번호 17의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0042] 로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명의 한 가지 구현에는 ADC로서, **Ab**가
- [0044] a) 서열번호 18의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0045] b) 서열번호 19의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0046] c) 서열번호 20의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0047] d) 서열번호 21의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 8, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0048] e) 서열번호 22의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0049] 로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다.
- [0050] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 ADC로서, **Ab**가
- [0051] i) 항체들 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 및 213B10;
- [0052] ii) i)의 항체들과 IGF-1R과의 결합을 경쟁하는 항체들; 및
- [0053] iii) i)의 항체들과 동일한 IGF-1R의 에피토프와 결합하는 항체들;
- [0054] 로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다.
- [0055] 본 발명의 한 가지 구현에는 **Ab**가 인간화 항체인, ADC에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명의 한 가지 구현에는 ADC로서 **Ab**가
- [0057] a) 각각 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3, 그리고 인간 생식계열 IGHV1-46\*01 (서열번호 46)로부터 유래한 FR1, FR2 및 FR3, 및 인간 생식계열 IGHJ4\*01 (서열번호 48)로부터 유래한 FR4를 가지는 중쇄; 및

- [0058] b) 각각 서열번호 9, 5 및 11의 서열들의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3, 그리고 인간 생식계열 IGKV1-39\*01 (서열번호 47)로부터 유래한 FR1, FR2 및 FR3, 및 인간 생식계열 IGKJ4\*01 (서열번호 49)로부터 유래한 FR4를 가지는 경쇄:
- [0059] 를 포함하는 항체로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명의 한 가지 구현예에서, **Ab**는
- [0061] a) 서열번호 33의 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0062] b) 서열번호 34의 서열 또는 서열번호 34와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체:
- [0063] 로부터 선택된다.
- [0064] 본 발명의 한 가지 구현예에서, **Ab**는
- [0065] a) 서열번호 35의 서열 또는 서열번호 35와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호들 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0066] b) 서열번호 36의 서열 또는 서열번호 36과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호들 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체:
- [0067] 로부터 선택된다.
- [0068] 본 발명의 한 가지 구현예에서, **Ab**는
- [0069] a) 서열번호 37의 서열 또는 서열번호 37과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 39의 서열 또는 서열번호 39와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체; 및
- [0070] b) 서열번호 38의 서열 또는 서열번호 38과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 40의 서열 또는 서열번호 40과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체:
- [0071] 로부터 선택된다.
- [0072] 본 발명의 한 가지 구현예에서, **Ab**는
- [0073] a) 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80 또는 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 또는 80과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0074] b) 서열번호들 57 및 60 또는 서열번호들 57 또는 60과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호들 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0075] c) 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80 또는 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 또는 80과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 57 및 60 또는 서열번호들 57 또는 60과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체:
- [0076] 로부터 선택된다.
- [0077] 본 발명의 한 가지 구현예에서, **Ab**는
- [0078] a) 서열번호들 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 및 81 또는 서열번호들 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 및 81과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 중쇄; 및
- [0079] b) 서열번호들 59 및 61 및 서열번호들 59 또는 61과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 경쇄:
- [0080] 로부터 선택된다.

[0081] 한 가지 구현예에서, 본 발명은 ADC로서,  $L_1$ 이 다음 화학식 (III)의 링커인 항체-약물-결합체에 관한 것이다:



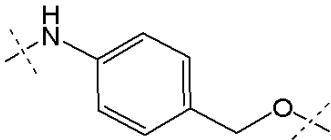
(III)

[0082]

[0083] 여기에서

[0084]  $L_2$ 는  $(C_4-C_{10})$ 고리알킬-카르보닐,  $(C_2-C_6)$ 알킬,  $(C_2-C_6)$ 알킬-카르보닐-이고;

[0085] W는 아미노산 단위이고; w는 0 및 5 사이 범위에 포함된 정수이고;

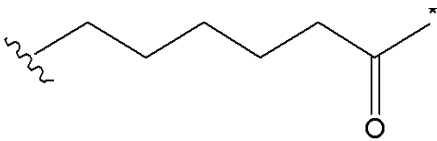


[0086] Y는 PAB가 인 PAB-카르보닐이고; y는 0 또는 1이고;

[0087] 별표는 D와의 부착점을 가리키고;

[0088] 물결선은 Ab와의 부착점을 가리킨다.

[0089] 본 발명의 한 가지 구현예는 ADC로서,  $L_2$ 가 다음 화학식을 가진 ADC에 관한 것이다:

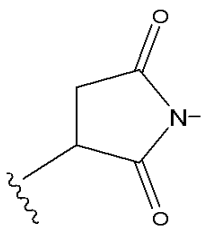


[0090]

[0091] 여기에서

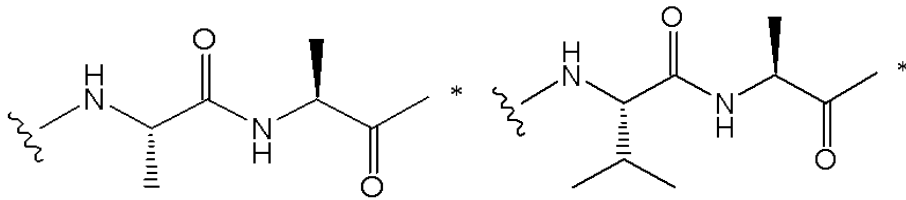
[0092] 별표는  $(W)_w$ 와의 부착점을 가리키고;

[0093] 물결선은 다음 화학식



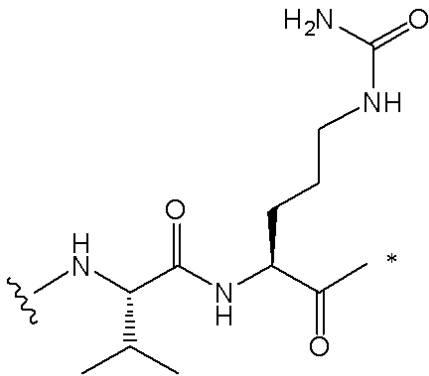
[0094] 의 말레이미드 분체의 질소 원자와의 부착점을 가리킨다.

[0095] 본 발명의 구현예에서,  $W = 0$ , 또는  $w = 2$ 이고, 다음으로  $(W)_w$ 는



[0096]

및



[0097]

[0098]

로부터 선택된다:

[0099]

여기에서

[0100]

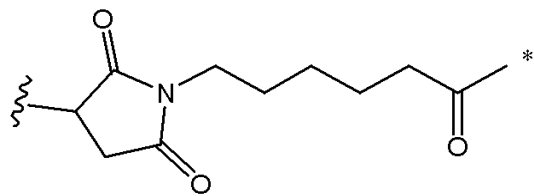
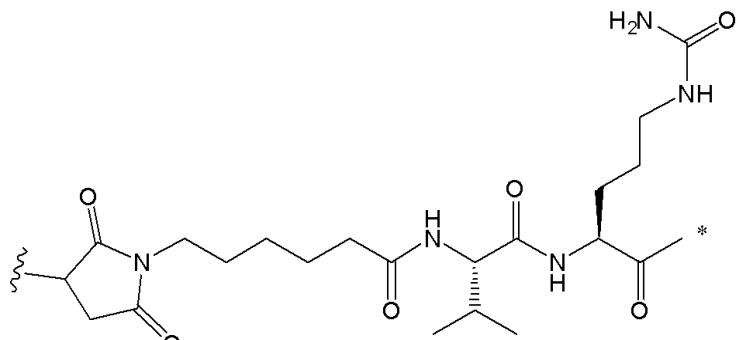
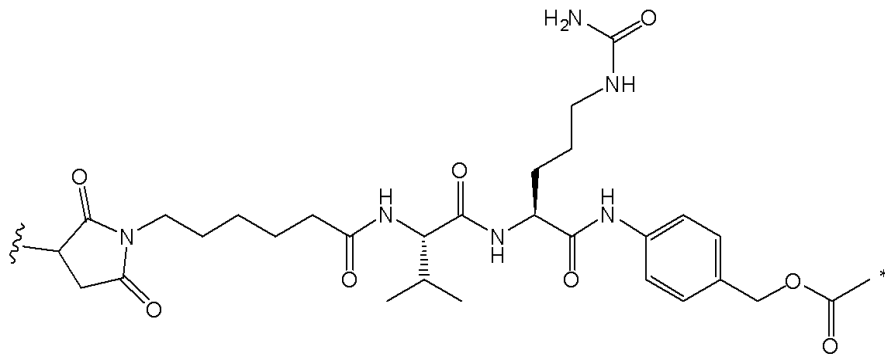
별표는 (Y)<sub>y</sub>와의 부착점을 가리키고;

[0101]

물결선은 L<sub>2</sub>와의 부착점을 가리킨다.

[0102]

본 발명의 한 가지 구현예는 ADC로서, L은



[0103]

및

[0104]

[0105]

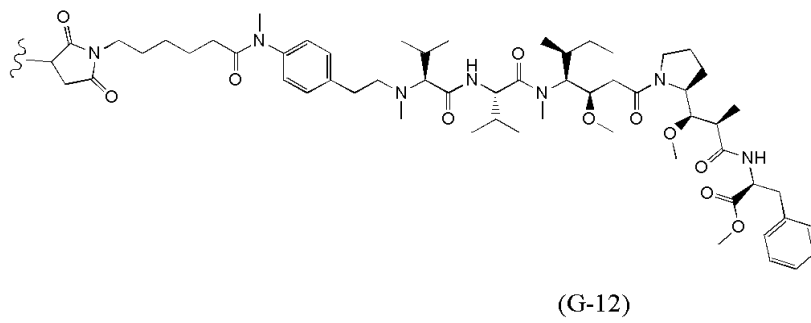
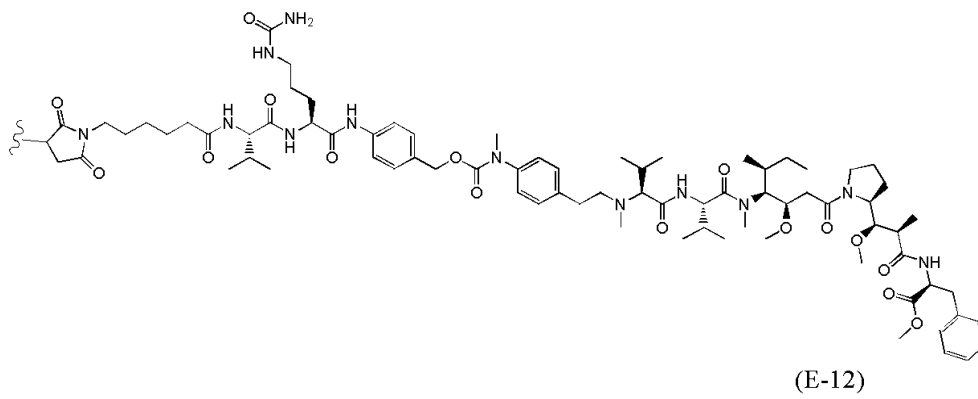
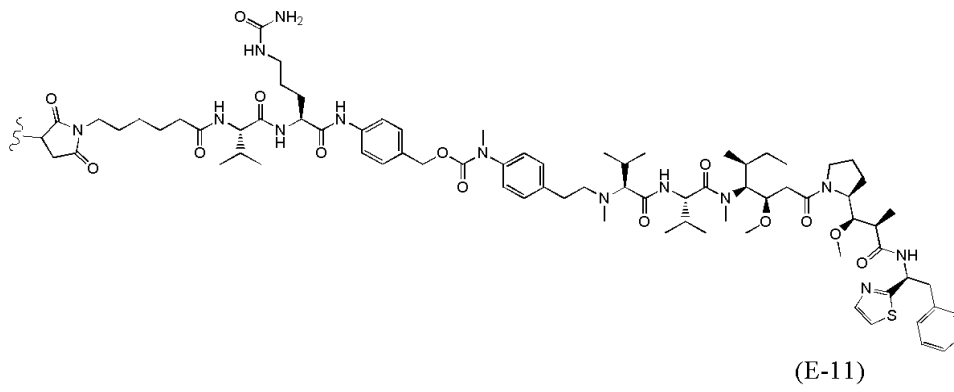
로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다:

[0106]

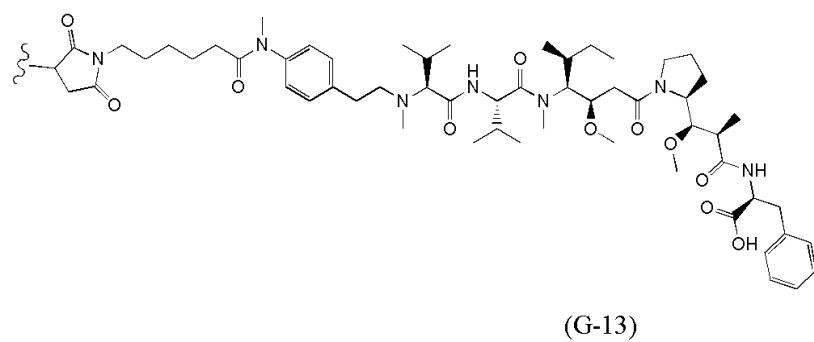
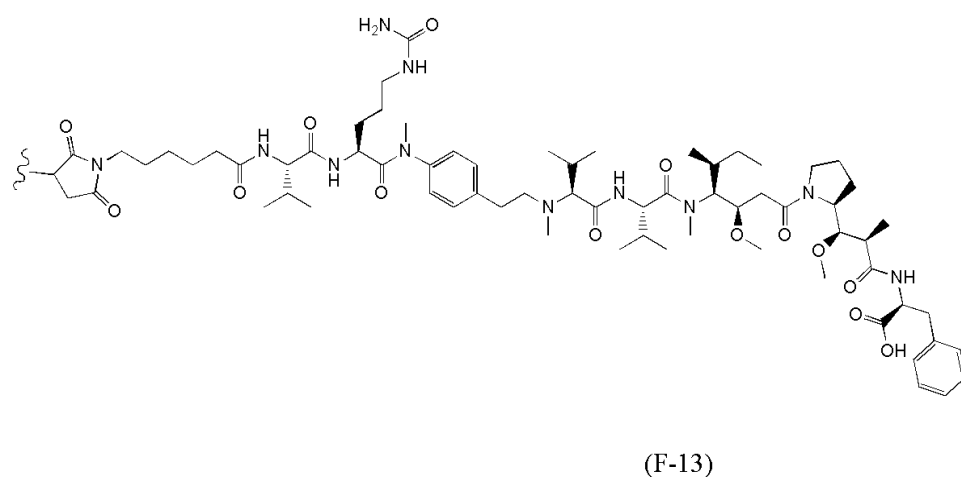
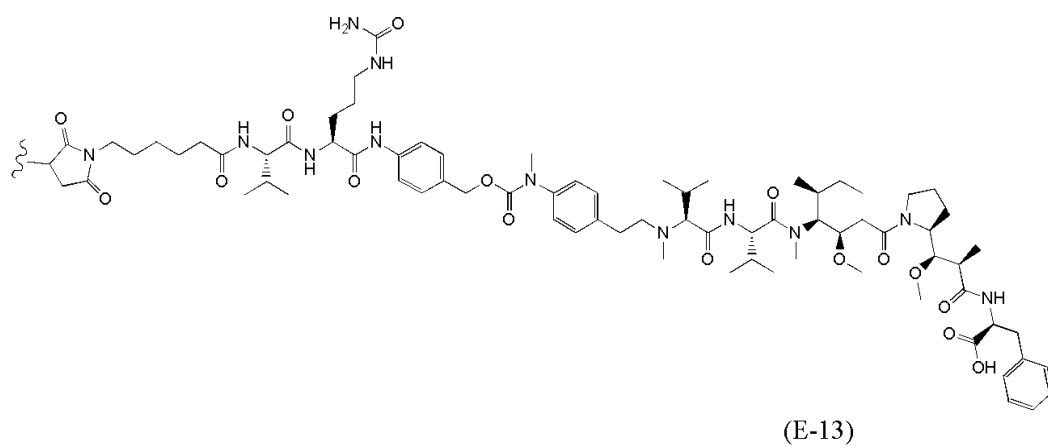
여기에서 별표는 **D**와 부착점을 가리키고, 물결선은 **Ab**와 부착점을 가리킨다.



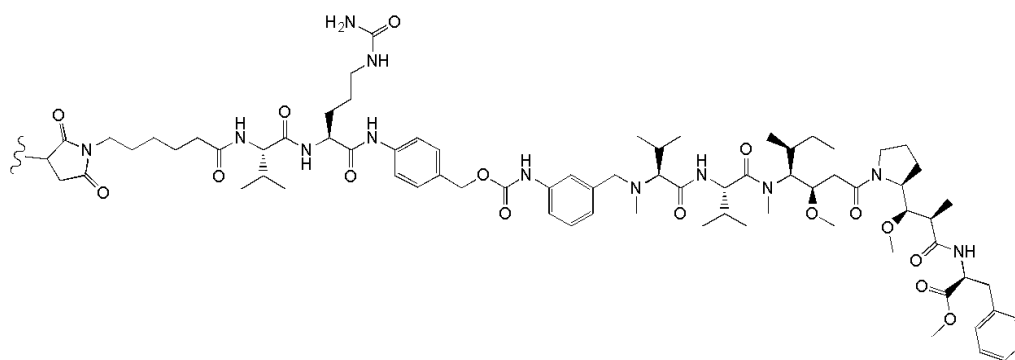
[0107] 본 발명의 한 가지 구현예는 ADC로서, (L - D)가



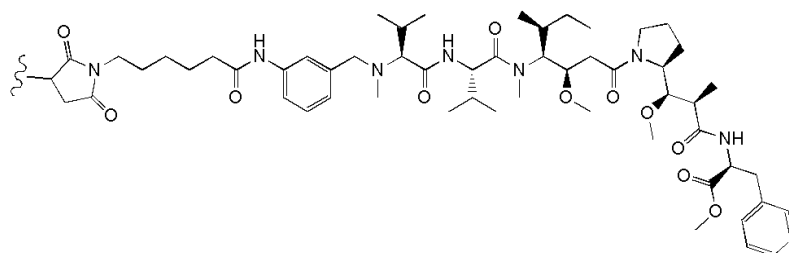
[0108]



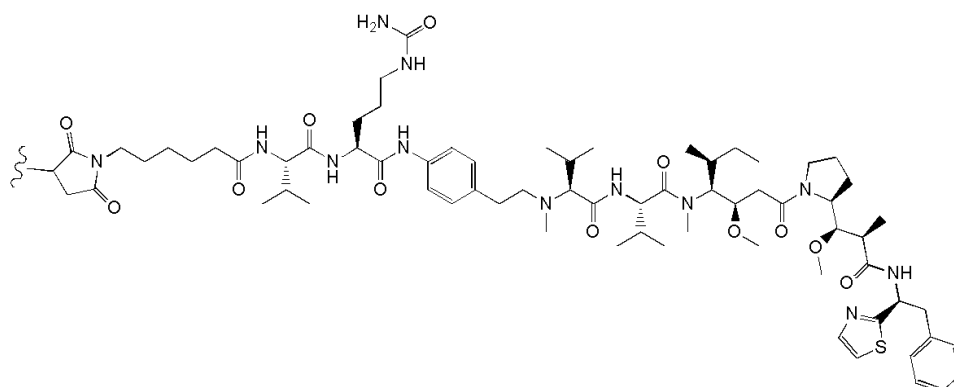
[0109]



(E-15)

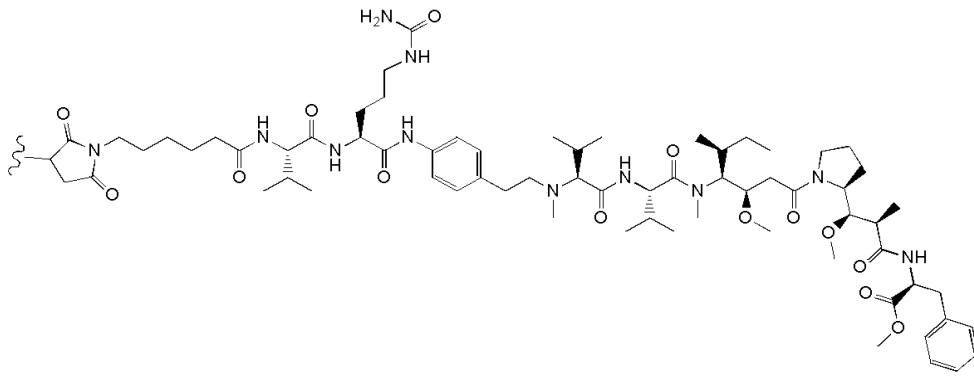


(G-15)



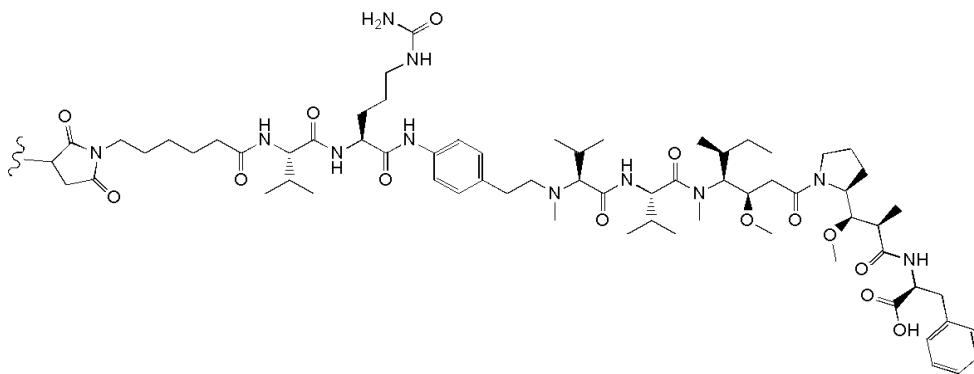
(F-61)

[0110]



및

(F-62)



(F-63)

[0111]

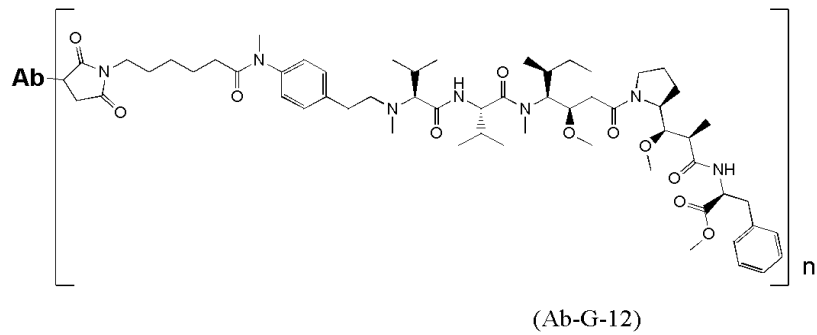
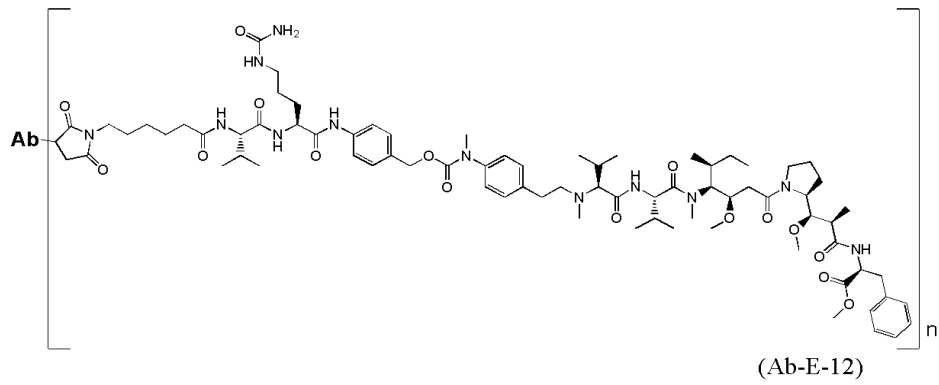
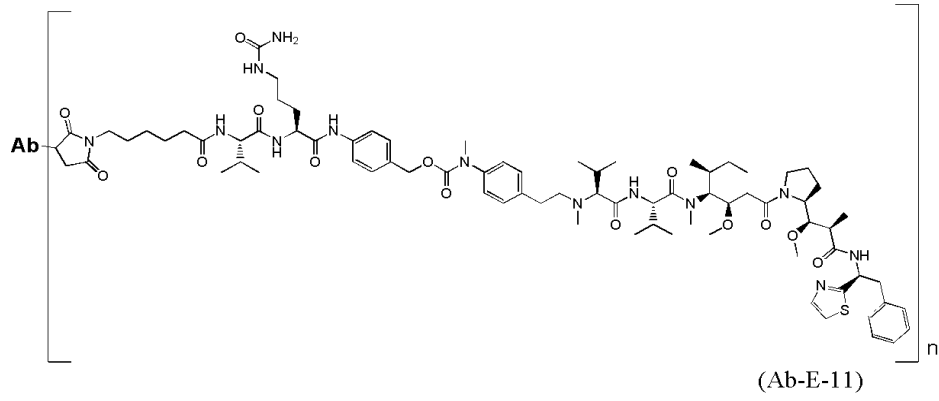
[0112]

로부터 선택되는 ADC에 관한 것이다:

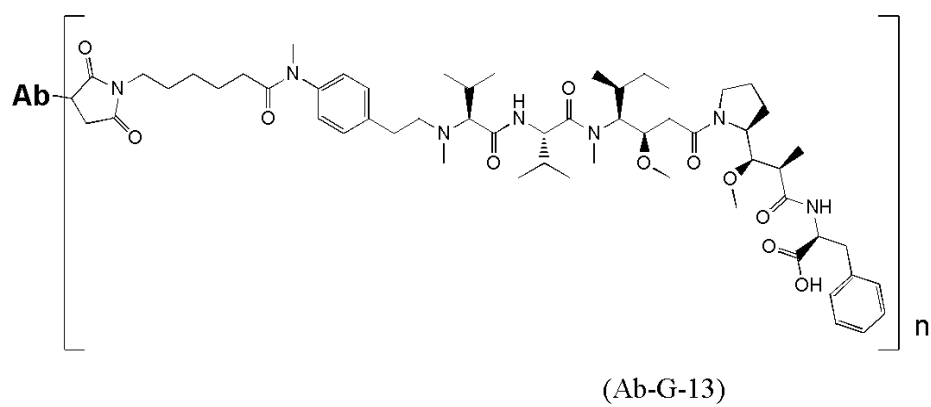
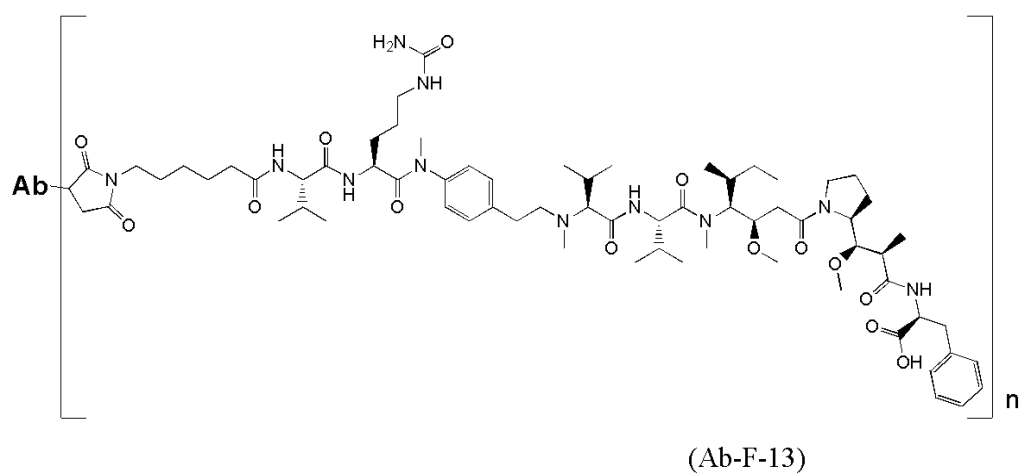
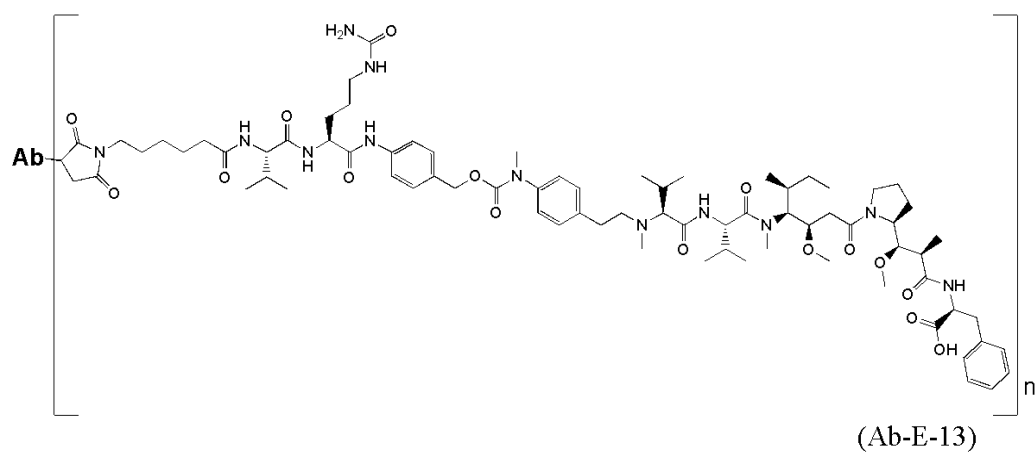
[0113]

여기에서 물결선은 **Ab**와 부착점을 가리킨다.

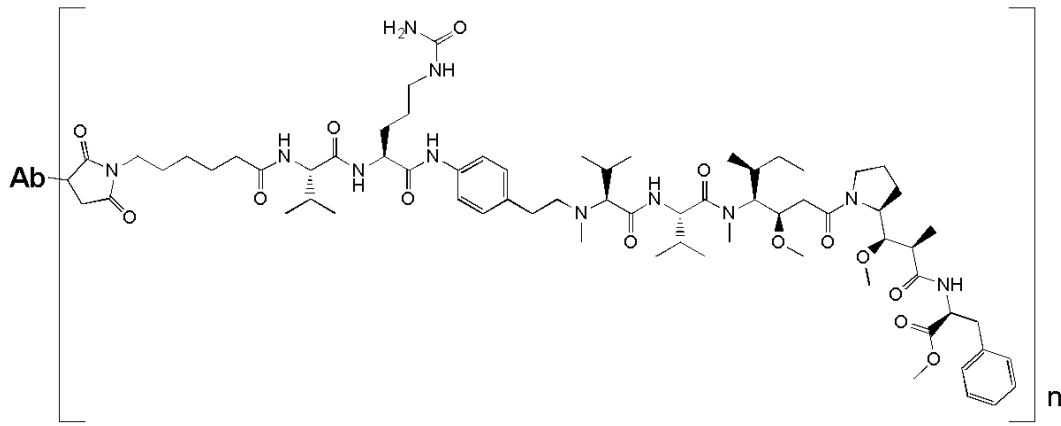
[0114] 본 발명의 한 가지 구현예는



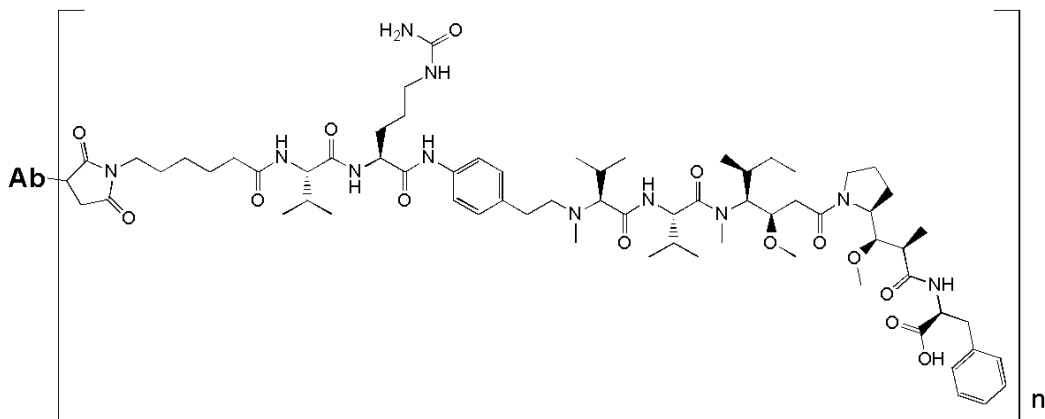
[0115]







(Ab-F-62)



(Ab-F-63)

[0118]

[0119]

[0120]

[0121]

[0122]

[0123]

[0124]

[0125]

[0126]

[0127]

[0128]

[0129]

[0130]

[0131]

로부터 선택되는 화학식 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 가지는 ADC로서, Ab가

i) 항체들 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 및 213B10;

ii) i)의 항체들과 IGF-1R과의 결합을 경쟁하는 항체들; 및

iii) i)의 항체들과 동일한 IGF-1R의 에피토프와 결합하는 항체들:

로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다.

본 발명의 한 가지 구현예는 n이 2인, ADC에 관한 것이다.

본 발명의 한 가지 구현예는 n이 4인, ADC에 관한 것이다.

본 발명의 한 가지 구현예는 약제로서 사용되는, ADC에 관한 것이다.

본 발명의 한 가지 구현예는 상기에 기술된 바와 같은 ADC를 포함하는, 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 한 가지 구현예는 약제학적으로 허용가능한 운반체를 더 포함하는, 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 한 가지 구현예는 IGF-1R-발현 암 또는 IGF-1R 관련된 암들의 치료에 사용되는, 조성물에 관한 것이다.

IGF-1R-발현 암 또는 IGF-1R 관련된 암들은 그들의 표면에 IGF-1R의 전부 또는 일부를 발현하거나 과다-발현하는 종양성 세포들을 포함한다.

본 발명의 한 가지 구현예는 상기 IGF-1R-발현 암이 유방암, 결장암, 식도암, 간세포암, 위암, 신경아교종, 폐암, 흑색세포종, 골육종, 난소암, 전립선암, 횡문근육종, 신장암, 갑상샘암, 자궁내막암, 중피종, 구강 편평세포 암종 및 임의의 약물 저항성 암으로부터 선택되는 암인, 조성물에 관한 것이다.



- [0132] 본 발명의 한 가지 구현예는 필요로 하는 개체에서 IGF-1R-발현 암의 치료 방법으로서, 본 발명에 따른 적어도 하나의 항체-약물-결합체 또는 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법에 관한 것이다.
- [0133] 본 발명의 한 가지 구현예는 i) 상기에 기술된 항체-약물-결합체 및/또는 조성물 및 ii) 상기 항체-약물-결합체 및/또는 조성물이 배치되는 주사기, 바이알 또는 앰플을 적어도 포함하는 키트에 관한 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0134] 용어들 "항체", "항체들", "ab", "Ab", "MAb" 또는 "면역글로불린"은 가장 넓은 의미에서 상호교환적으로 사용되고 단일클론 항체들, 분리된, 조각된 또는 재조합 항체들 (예로, 전장의 또는 미가공의 단일클론 항체들), 다중클론 항체들, 다가의 항체들 또는 다중특이적 항체들 (예로, 이중특이적 항체들), 그들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 그들의 항체 단편도 역시 포함한다.
- [0135] 한 가지 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는 재조합 항체로 구성된다. 용어 "재조합 항체"는 살아있는 세포들 내에서 재조합 DNA의 발현으로부터 유도되는 항체를 말한다. 본 발명의 ADC의 항체는 당업자에게 잘 숙지되어 있고, 생물학적 유기체들에는 발견될 수 없는 DNA 서열들을 제작하는 유전적 재조합의 연구실 방법들을 사용하여 획득된다.
- [0136] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는 화학적으로 합성된 항체로 구성된다.
- [0137] 보다 상세하게, 이러한 분자는 디설파이드 결합들에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄들 (H) 및 2개의 경쇄들 (L)을 포함하는 당단백질로 구성된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 부위 (또는 도메인) (본 명세서에서 HCVR 또는 VH라고 약칭됨) 및 중쇄 불변 부위를 포함한다. 중쇄 불변 부위는 3가지 도메인들, CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 부위 (본 명세서에서 LCVR 또는 LH라고 약칭됨) 및 경쇄 불변 부위를 포함한다. 경쇄 불변 부위는 하나의 도메인, CL을 포함한다. VH 및 VL 부위들은 또한 구조를 부위들 (FR)이라고 명명되는 더욱 보존된 부위들과 함께 산재되어 있는 상보성 결정 부위들 (CDR)이라고 명명되는 과다가변성의 부위들로 소분류될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단으로부터 카복시-말단까지 다음의 순서로 배열된 3가지 CDR들 및 4가지 FR들로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄들 및 경쇄들의 가변 부위들은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체들의 불변 부위들은 면역계의 다양한 세포들 (예로, 효과기 세포들) 및 고전적인 보체계의 첫 번째 구성성분 (C1q)을 포함하는 숙주 조직들 또는 인자들과 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.
- [0138] 본 발명에 따른 ADC의 항체의 "항원 결합 단편" 또는 "IGF-1R 결합 단편"에 의하여, 이것은 항체의 표적 (일반적으로 항원이라고도 역시 말함)과 결합하는 능력을 보유하는 임의의 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질을 가리키도록 의도된다.
- [0139] 한 가지 구현예에서, 이러한 "항원 결합 단편들"은 Fv, scFv (단일 사슬의 sc), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc 단편들 또는 다이아체들, 또는 반감기가 폴리(에틸렌)글리콜 ("PEG화")(Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG 또는 Fab'-PEG라고 불리는 PEG화된 단편들) (폴리(에틸렌)글리콜의 "PEG")과 같은 폴리(알킬렌)글리콜의 첨가와 같은 화학적 변형, 또는 리포좀 내로 도입에 의해 증가되었던 임의의 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 상기 단편들은 본 발명에 따른 항체의 특징적인 CDR들의 적어도 하나를 가진다. 바람직하게, 상기 "항원 결합 단편들"은 그들이 유래된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 사슬의 부분적 서열로 구성되거나 이를 포함할 것이고, 상기 부분적 서열은 표적에 대하여 이것이 유래된 항체와 동일한 결합 특이도 및 충분한 친화도, 바람직하게는 이것이 유래된 항체의 친화도의 적어도 동등 내지 1/100, 더욱 바람직한 방식으로 적어도 1/10까지의 친화도를 보유하기에 충분하다. 더욱 바람직하게, 상기 "항원 결합 단편들"은 그들이 유래된 중쇄 가변 사슬의 적어도 3가지 CDR들 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 및 경쇄 가변 사슬의 3가지 CDR들 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 구성되거나 이들을 포함할 것이다.
- [0140] "결합하는" 또는 "결합하다" 등에 의하여, 항체, 또는 그의 임의의 항원-결합 단편은 생리적 조건들 하에서 비교적 안정한 항원과 복합체를 형성하는 것으로 의도된다. 특이적 결합은 적어도 약  $1 \times 10^{-6}$  M의 평형 해리 상수를 특징으로 할 수 있다. 두 분자들이 결합하는지 여부를 결정하는 방법들은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면 평형 투석법, 표면 플라즈몬 공명법, 방사선 표지된 검정법들 등을 포함한다. 애매함의 회피를 위해, 이것은 상기 항체가 또 다른 항원과 낮은 수준으로 결합 또는 개입할 수 없는 점을 의미하지는 않는다. 그럼에도 불구하고, 한 가지 구현예로서, 상기 항체는 상기 항원과만 결합한다.

- [0141] 본 명세서에서 사용되는 바, 용어 표현 "IGF-1R 항체"는 "항-IGF-1R 항체"와 유사한 것으로서 해석되어야 하고, IGF-1R와 결합할 수 있는 항체를 의미한다.
- [0142] 본 출원의 한 가지 구현예에서, 항체의 에피토프는 바람직하게 인간 IGF-1R의 세포외 도메인 (IGF-1R ECD라고도 역시 말함) 내에 정착된다.
- [0143] 상세한 구현예에서, 항체, 또는 그의 임의의 항원 결합 단편은  $10 \times 10^{-10}$  내지  $1 \times 10^{-10}$  M 사이 범위, 더욱 바람직하게는  $8 \times 10^{-10}$  내지  $2 \times 10^{-10}$  M 사이 범위에 포함되는  $EC_{50}$ 으로 IGF-1R과 결합할 수 있다.
- [0144] 용어 최대의 절반 유효 농도 ( $EC_{50}$ )는 일정 특정된 노출 시간 이후에 기저값 및 최대값 사이의 절반의 반응을 유도하는 약물, 항체 또는 독물의 농도에 해당한다. 이것은 약물의 효능의 척도로서 보편적으로 사용된다. 따라서 등급화된 용량 반응 곡선의  $EC_{50}$ 은 그의 최대 효과의 50%가 관찰되는 화합물의 농도를 나타낸다. 양적 용량 반응 곡선의  $EC_{50}$ 은 특정된 노출 지속 이후에 집단의 50%가 반응을 나타내는 화합물의 농도를 나타낸다. 농도 측정들은 전형적으로 S자형 곡선을 따르고, 농도의 비교적 적은 변화를 거쳐서 신속하게 증가한다. 이것은 최고-적정선의 유도에 의해 수학적으로 결정될 수 있다.
- [0145] 바람직한 구현예로서, 본 발명에서 결정된  $EC_{50}$ 은 인간 종양 세포들 상에 노출된 IGF-1R ECD 상의 항체 결합의 효능을 특성화한다.  $EC_{50}$  매개변수는 FACS 분석을 사용하여 결정된다.  $EC_{50}$  매개변수는 인간 종양 세포들에서 발현된 인간 IGF-1R 상의 최대 결합의 50%가 획득되는 항체 농도를 반영한다. 각각의  $EC_{50}$  수치는 4개-매개변수 회귀 곡선 적응 프로그램 (프리즘 소프트웨어)을 사용하여 용량 반응 곡선의 중간점으로서 계산되었다. 이러한 매개변수는 생리학/병리학 병태들을 나타내도록 선택되어 왔다.
- [0146] 용어 "에피토프"는 항체에 의해 결합되는 항원의 부위이다. 에피토프들은 구조적 또는 기능적으로서 정의될 수 있다. 기능적 에피토프들은 일반적으로 구조적 에피토프들의 부분 집합이고, 상호작용의 친화도에 직접적으로 기여하는 잔기들을 포함한다. 에피토프들은 입체형태도 역시 가지고, 즉 비-선형의 아미노산들로 구성될 수 있다. 소정의 구현예들에서, 에피토프들은 아미노산들, 당 측쇄들, 포스포릴 기들, 또는 설퍼닐 기들과 같은 분자들의 화학적으로 활성을 가진 표면 그룹화가 되는 결정기들을 포함할 수 있고, 소정의 구현예들에서, 특이적인 삼차원 구조적 특징들, 및/또는 특이적인 전하 특징들을 가질 수 있다.
- [0147] IGF-1R과 결합을 위한 경쟁은, 이에 제한되는 것은 아니지만 방사능 활성화, 비아코아 (Biacore), 엘라이자 (ELISA), 유동세포측정법 등과 같은 당업자에게 숙지된 임의의 방법들 또는 기법들에 의해 결정될 수 있다. "IGF-1R과 결합을 위해 경쟁하는"으로서, 이것은 적어도 20%, 바람직하게 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 70%의 경쟁을 의미한다.
- [0148] 동일한 에피토프와 결합의 결정은, 이에 제한되는 것은 아니지만 방사능 활성화, 비아코아, 엘라이자, 유동세포측정법 등과 같은 당업자에게 숙지된 임의의 방법들 또는 기법들에 의해 결정될 수 있다. "IGF-1R의 동일한 에피토프와 결합하는"으로서, 이것은 적어도 20%, 바람직하게 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 70%의 경쟁을 의미한다.
- [0149] 상기에 언급된 바와 같이, 그리고 일반 지식과는 정반대로, 본 발명은 IGF-1R 결합 이후에 내재화될 높은 능력을 제시하는 특이적인 IGF-1R 항체들에 중점을 두고 있다. 본 명세서에서 사용되는 바, "내재화되다" 또는 "내재화된" (두 가지 용어 표현은 유사함) 항체는 포유동물 세포에서 IGF-1R과 결합 시 세포에 의해 흡수되는 (이것은 "진입하는" 것을 의미함) 항체이다. 이러한 항체는 ADC의 부분로서 흥미롭고, 따라서 표적화된 암 세포들 내로 연결된 세포독성제를 어드레싱하거나 인도한다. 일단 내재화되면, 세포독성제는 암 세포의 사망을 촉발시킨다.
- [0150] 놀랍게도, 본 발명에 따른 항체들은 모두 CDR-H2, CDR-H3 및 CDR-L2에 대한 동일한 서열들을 제시하고, 나머지 3가지의 CDR들은 다르다. 이러한 관찰은 항체의 결합 특이도에 관하여 CDR-H3가 에피토프의 인식에서 가장 중요하고 가장 관련있는 것으로 기술된 일반 지식과 부합하는 것 같다.
- [0151] ADC 요법으로의 성공을 위한 중요한 핵심은 표적 항원 특이도 및 암 세포들 내로 항원-항체 단백질 복합체들의 내재화인 것으로 생각된다. 명백하게, 비-내재화 항원들은 세포독성 제제들을 전달하는 데 내재화 항원들보다 덜 효과적이다. 내재화 공정들은 항원들 간에 다양하고 항체들에 의해 영향을 받을 수 있는 다수의 매개변수들에 의존한다.

- [0152] ADC에서, 세포독성제는 세포독성 활성을 부여하고, 사용된 항체는 암 세포들에 대한 특이성뿐만 아니라 세포들 내로 진입하는 벡터가 되어 세포독성제를 정확하게 어드레싱하는 책임을 진다. 따라서 항체가 표적화된 암 세포들 내로 내재화되는 높은 능력을 나타내어 ADC를 개선시킬 수 있다. 항체가 내재화를 매개하는 효율은 표적화된 에피토프에 의존하여 유의하게 달라진다. 강력한 내재화 IGF-1R 항체들의 선별은 IGF-1R 저하조절 (down-regulation) 뿐만 아니라 이어지는 세포들 내로 IGF-1R 항체 내재화를 연구하는 다양한 실험적 데이터를 요구한다.
- [0153] 한 가지 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체의 내재화는 (본 출원에서 하기 예시되는 바와 같은) 면역형광법, 또는 FACS (유동세포측정법) 또는 내재화 기작에 특이적인 당해 기술분야의 당업자에게 숙지된 임의의 방법 또는 공정에 의해 측정될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는 IGF-1R과 결합 이후에 적어도 30%, 바람직하게 50%, 더욱 바람직하게 80%의 내재화를 유도할 수 있다.
- [0154] 복합체 IGF-1R/항체는 상기 IGF-1R의 ECD와 항체의 결합 이후에 내재화되고, 세포들의 표면에서 IGF-1R 정량의 감소가 유도된다. 이러한 감소는, 비제한적인 예들로서 웨스턴-블롯법, FACS, 면역형광법 등과 같은 당업자에게 숙지되어 있는 임의의 방법에 의해 정량화될 수 있다.
- [0155] 한 가지 구현예에서, 이러한 내재화를 반영하는 감소는 바람직하게 FACS에 의해 측정되고, 항체와 4시간 배양 이후에 4℃에서 측정된 평균 형광 강도 (MFI) 및 37℃에서 측정된 MFI 간의 차이 또는 델타값으로서 표현될 수 있다.
- [0156] 본 발명의 비제한적인 예로서, 이러한 델타값은 미처리된 세포들 및 항체로 처리된 세포들로 획득된 MFI들을 기초로 하여, i) 본 명세서에서 기술된 항체와 4시간 배양 기간 이후에 유방암 세포들 MCF17 및 ii) 알렉사 488로 표지된 이차 항체를 사용하여 결정된다. 이러한 매개변수는 다음의 공식으로 계산된 바와 같이 정의된다:
- $$\Delta(\text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}} - \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}})$$
- [0157] 이러한 MFI들 간의 차이는 MFI들이 세포-표면 상에서 발현된 IGF-1R과 비례하기 때문에 IGF-1R 저하조절을 반영하고 있다.
- [0158] 유리한 관점에서, 항체들은 MCF-7에서 적어도 280, 바람직하게는 적어도 400의  $\Delta(\text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}} - \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}})$ 를 촉발시키는 항체로 구성된다.
- [0159] 보다 자세하게, 상기 언급된 델타값은 다음의 공정에 따라 측정될 수 있고, 이는 설명적이고 비제한적인 예로서 고려되어야 한다:
- [0160] a) 관심 있는 종양 세포들을 본 발명의 항체와 함께 차가운 (4℃) 또는 따뜻한 (37℃) 둘 중 하나의 완전 배양 배지에서 처리하고 배양하는 단계;
- [0161] b) 단계 a)의 처리된 세포들 및 미처리된 세포들을 동시에 이차 항체로 처리하는 단계;
- [0162] c) 처리된 및 미처리된 세포들에 대한 MFI (표면에 제시된 IGF-1R의 정량을 나타냄)를 본 발명의 항체와 결합할 수 있는 이차 표지된 항체로 측정하는 단계; 및
- [0163] d) 미처리된 세포들로 획득된 MFI로부터 처리된 세포들로 획득된 MFI의 차감으로서 델타값을 계산하는 단계.
- [0164] 이러한 델타값 MFI로부터, 내재화 백분율이 다음과 같이 결정될 수 있다:
- $$100 \times (\text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}} - \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}}) / \text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}}$$
- [0165] 본 발명에 따른 ADC의 항체들은 MCF-7에서 50% 및 99% 사이, 70% 및 90% 사이 범위, 바람직하게는 75% 및 87% 사이 범위에 포함되는 내재화 백분율을 제시한다.
- [0166] 본 명세서에서 기술된 항체들의 상세한 장점은 그들의 내재화 속도에 의존한다.
- [0167] 일반적으로 ADC의 경우, 사용된 항체들이 바람직하게 항체의 투여로부터 24시간 이내, 더욱 바람직하게는 12시간 이내, 훨씬 더 바람직하게는 6시간 이내의 신속한 내재화 속도를 나타내는 것이 바람직하다고 알려져 있다.
- [0168] 본 발명에서, 내재화 속도는 세포 표면 결합 항체 감소 또는 세포 표면 항체 붕괴라고도 역시 약칭되며, t<sub>1/2</sub> (반감기)로서 표현되고  $\Delta\text{MFI}$ 의 50% 감소를 획득하는 데 필요한 시간에 해당한다 (이러한 관점은 다음의 실시예

들을 고려하여 명백하게 이해될 것이다).

- [0169] 상세한 장점은 본 발명의 ADC의 항체들이 5분 및 25분 사이 범위, 바람직하게는 10분 및 20분 사이 범위에 포함되는  $t_{1/2}$ 를 가지는 것이다.
- [0170] 본 발명의 상세한 구현에는 ADC로서, 항체 Ab가 서열번호 2의 서열의 CDR-H2 및 서열번호 3의 서열의 CDR-H3를 가진 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 5의 서열의 CDR-L2를 가진 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는, ADC에 관한 것이다.
- [0171] 본 발명의 상세한 구현에는 ADC로서, 항체 Ab가 서열번호 1, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 4, 5 및 6의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는, ADC에 관한 것이다.
- [0172] ADC의 한 가지 구현에는 서열번호 1, 2 및 3의 서열들, 또는 서열번호 1, 2 또는 3과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는 3가지 중쇄 CDR들, 및 서열번호 4, 5 및 6의 서열들, 또는 서열번호 4, 5 또는 6과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0173] 또 다른 구현예에서, 항체, 또는 그의 임의의 항원 결합 단편은 서열번호 1, 2 및 3의 서열들을 포함하는 3가지 중쇄 CDR들 및 서열번호 4, 5 및 6의 서열들을 포함하는 3가지 경쇄 CDR들을 포함한다.
- [0174] 독특한 IMGT 번호매김 (IMGT unique numbering)은 어떤 항원 수용체, 사슬 유형 또는 종이라도 가변 도메인들을 비교하도록 정의되어 왔다 [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M. P., Pommie C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. 독특한 IMGT 번호매김에서, 보존되는 아미노산들은 항상 동일한 위치들, 예를 들면 23번 시스테인 (1번째-CYS), 41번 트립토판 (보존된-TRP), 89번 소수성 아미노산, 104번 시스테인 (2번째-CYS), 118번 페닐알라닌 또는 트립토판 (J-PHE 또는 J-TRP)을 보유한다. 독특한 IMGT 번호매김은 구조를 부위들 (FR1-IMGT: 1 내지 26번 위치, FR2-IMGT: 39 내지 55번 위치, FR3-IMGT: 66 내지 104번 위치 및 FR4-IMGT: 118 내지 128번 위치) 및 상보성 결정 부위들 (CDR1-IMGT: 27 내지 38번 위치, CDR2-IMGT: 56 내지 65번 위치 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117번 위치)의 표준화된 구획을 제공한다. "공간들 (gap)"은 채워지지 않은 위치를 나타내기 때문에, CDR-IMGT 길이들 (괄호들 사이에 나타나고 점들로 분리됨, 예로 [8.8.13])는 결정적인 정보가 된다. 독특한 IMGT 번호매김은 IMGT 진주목걸이라고 명명되는 [Ruiz, M. and Lefranc, M. P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc, M. P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] 2차원 그래픽 전시들 및 IMGT/3D 구조-DB의 3차원 구조들 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M. P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]에 사용된다.
- [0175] 본 명세서에서 반대의 특징이 없는 경우라면, 상보성-결정 부위들 또는 CDR들은 IMGT 번호매김 체계에 따라 정의된 바와 같이 면역글로불린의 중쇄들 및 경쇄들의 과다가변 부위들을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0176] 그럼에도 불구하고, CDR들은 카밧 번호매김 체계에 따라 역시 정의될 수 있다 (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 제 5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 및 나중의 개정판들). 3가지 중쇄 CDR들 및 3가지 경쇄 CDR들이 존재한다. 본 명세서에서, 용어들 "CDR" 및 "CDR들"은 경우에 따라서 그들이 인식하는 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합 친화도를 부여하는 대부분의 아미노산 잔기들을 포함하는 부위들의 하나 이상 또는 심지어 전부를 가리키는 데 사용된다. 본 출원의 해석을 단순화하기 위하여, 카밧에 따른 CDR들은 정의되지 않는다. 그럼에도 불구하고, 당업자에게는 IMGT에 따른 CDR들의 정의를 사용하여 카밧에 따른 CDR들을 정의하는 것이 자명할 것이다.
- [0177] 본 발명의 의미에서, 두 개의 핵산들 또는 아미노산들의 서열들 간의 "일치도 (identity)" 또는 "일치도 백분율 (percentage identity)"은 최적의 정렬에 따라 획득되어 비교되는 두 개의 서열들 간에 일치하는 뉴클레오타이드들 또는 아미노산 잔기들의 백분율을 의미하고, 이러한 백분율은 순수하게 통계적이고 이 두 서열들 간의 차이들은 그들의 길이를 따라 무작위적으로 분포한다. 두 개의 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 서열 비교는 통상적으로 그들을 최적으로 정렬시킨 이후 서열들을 비교하여 수행되고, 상기 비교는 분절마다 또는 "정렬창 (alignment window)"을 사용하여 수행될 수 있다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬은 수동적인 비교와 더불어 스미스 및 워터만의 로칼 상동성 알고리즘 [Smith and Waterman (1981) Ad. App. Math. 2:482]에 의해, 네들만 및 운쉬의 로칼 상동성 알고리즘 [Neddleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]에 의해, 피어슨 및 립만의 유사도 탐색 방법 [Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]에 의해, 또는 이들



알고리즘을 사용하는 컴퓨터 소프트웨어에 의해 (위스콘신 유전학 소프트웨어 패키지, 유전학 컴퓨터 그룹, 575 Science Dr., Madison, WI에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 또는 비교 소프트웨어 BLAST N 또는 BLAST P에 의해) 수행될 수 있다.

- [0178] 일치도 백분율은 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 두 개 서열들 간에, 바람직하게는 두 개의 완전한 서열들 간에 일치하는 위치들의 수를 결정하고, 동일한 위치들의 수를 정렬창에서의 전체 위치들의 수로 나누고, 결과를 두 개 서열들 간의 일치도 백분율을 획득하도록 100으로 곱하여 계산된다.
- [0179] 예를 들면, 웹 사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 상에서 입수가능한 BLAST 프로그램 "BLAST 2 서열들" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 서열- 단백질 및 뉴클레오타이드 서열들을 비교하기 위한 새로운 도구", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174: 247-250)은 디폴트 매개변수 (명확하게, 매개변수 "오픈 갭 페널티 (open gap penalty)"의 경우: 5, 및 "연장 갭 페널티 (extension gap penalty)": 2; 선택된 매트릭스는 예를 들면 프로그램에 의해 제시되는 "BLOSUM 62" 매트릭스일 수 있음)와 함께 사용될 수 있고, 비교될 두 개 서열들 간의 일치도 백분율은 프로그램에 의해 직접 계산될 수도 있다.
- [0180] 기준 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 가지는 아미노산 서열을 위해, 바람직한 예들은 기준 서열, 소정의 변형들 (modification), 명확하게는 적어도 하나의 아미노산의 결실 (deletion), 부가 (addition) 또는 치환 (substitution), 절단 (truncation) 또는 연장 (extension)을 포함한다. 하나 이상의 연속적 또는 비-연속적 아미노산(들)의 치환들 경우에서, 치환된 아미노산은 "동등한" 아미노산에 의해 대체되는 치환이 바람직하다. 본 명세서에서 용어 표현 "동등한 아미노산들"은 해당하는 항체들의 생물학적 활성들을 변형시키지 않고도 구조적 아미노산들 및 하기 정의된 특정한 예들의 하나로 치환될 수 있는 임의의 아미노산들을 가리키도록 의미한다.
- [0181] 동등한 아미노산들은 치환된 아미노산들과의 그들의 구조적 상동성을 기초로 하거나 생성될 수 있는 다양한 항체들 간의 생물학적 활성의 비교 테스트들의 결과들을 기초로 하여 결정될 수 있다.
- [0182] 비-제한적인 예로서, 하기 표 1은 해당하는 변형된 항체의 생물학적 활성의 유의한 변형을 유발하지 않고도 수행될 수 있는 가능한 치환들을 정리하고 있고; 역 치환들 (inverse substitution)도 동일한 조건들 하에서 자연적으로 가능하다.

표 1

원 잔기	치환(들)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0183]

[0184] 본 발명의 상세한 관점은 ADC의 항체가 인슐린 수용체 (IR)과 결합하지 않는 것이다. 이러한 관점은 본 명세서에서 기술된 항체가 인슐린 대사를 의미하는 IR에 미치는 임의의 부정적 영향을 가지지 않을 것이기 때문에 흥미롭다.

[0185] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체의 보다 또 다른 관점은 이것이 인간 IGF-1R뿐만 아니라 원숭이 IGF-1R, 보다 상세하게는 머카크 원숭이 (cynomolous) IGF-1R과도 결합할 수 있는 것이다. 이러한 관점은 이것이 임상시험들에 요구되는 독성 평가를 용이하게 할 것이기 때문에 역시 흥미롭다.

[0186] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는 단일클론 항체로 구성된다.

[0187] 용어 "단일클론 항체" 또는 "Mab"는 본 명세서에서 사용되는 바 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 획득되고, 예로 집단의 개별적인 항체들은 소량들로 존재할 수 있는 가능한 자연적으로 생기는 돌연변이들을 제외하고는 일치한다. 단일클론 항체들은 매우 특이적이어서, 단일한 에피토프에게로 유도된다. 이러한 단일클론 항체들은 B 세포들 또는 하이브리도마의 단일한 클론에 의해 생산될 수 있다. 단일클론 항체들도 역시 재조합될 수 있고, 예로 단백질 공학 또는 화학적 합성에 의해 생산된다. 단일클론 항체들은 파지 항체 라이브러리들로부터도 역시 분리될 수 있다. 또한, 다양한 결정기들 또는 에피토프들에게로 유도되는 다양한 항체들을 전형적으로 포함하는 다중클론 항체들의 제조들과는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원의 단일한 에피토프에게로 유도된다.

[0188] 본 명세서에서의 단일클론 항체는 하기에 기술된 바와 같은 마우스, 키메라 및 인간화 항체를 포함한다.

- [0189] 항체는 바람직하게 프랑스 미생물 배양들의 기탁기관 (프랑스 파리, 시텍스 15, 75724, 닥터 루 거리 25, 파스퇴르 연구소, CNCM)에 제출된 마우스 기원의 하이브리도마로부터 유래되고, 상기 하이브리도마는 Balb/C 면역화된 마우스 비장세포들/림프세포들 및 골수종 Sp 2/0-Ag 14 세포주의 세포들의 융합에 의해 획득된다.
- [0190] 한 가지 구현예에서, 본 발명의 ADC의 IGF-1R 항체는 마우스 항체로 구성되며, 다음으로 m[항체의 명칭]이라고 언급된다.
- [0191] 한 가지 구현예에서, 본 발명의 ADC의 IGF-1R 항체는 키메라 항체로 구성되며, 다음으로 c[항체의 명칭]라고 언급된다.
- [0192] 한 가지 구현예에서, 본 발명의 ADC의 IGF-1R 항체는 인간화 항체로 구성되며, 다음으로 hz[항체의 명칭]라고 언급된다.
- [0193] 애매함의 회피를 위해, 다음의 명세서에서 용어 표현들 "IGF-1R 항체" 및 "[항체의 명칭]"은 유사하고 (반대의 특징이 없는 경우라면), 상기 IGF-1R 항체 및 상기 "[항체의 명칭]"의 마우스, 키메라 및 인간화 버전들을 포함한다. 필요한 때, 접두어 m- (마우스), c- (키메라) 또는 hz- (인간화)가 사용된다.
- [0194] 보다 명확하게, 다음의 표 2는 바람직한 항체들을 위한 IMGT에 따라 정의된 CDR 서열들을 도시한다.

표 2

	중쇄	경쇄	서열번호
공통	CDR-H1		1
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	4
		CDR-L2	5
		CDR-L3	6
208F2	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
212A11	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	10
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
214F8 및 213B10	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	12
219D6	CDR-H1		8
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11

- [0195]
- [0196] 상기에 기술된 바와 같은 6가지 CDR들의 임의의 조합이 본 발명의 일부로서 고려되어야 하는 점은 당업자에게

자명할 것이다.

- [0197] 이러한 표 2로부터 관찰될 수 있는 바와 같이, 본 명세서에서 기술된 모든 항체들은 CDR-H2, CDR-H3 및 CDR-L2를 위한 동일한 서열들을 가지고, 이러한 특성은 상기에 기술된 바와 같이 매우 흥미롭다.
- [0198] 특정한 관점은 ADC로서, 항체가 마우스와 이종유래의 중, 명백하게 사람의 항체로부터 유래한 중쇄 및 경쇄 불변 부위들도 역시 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스 항체인 ADC에 관한 것이다.
- [0199] 또 다른 특정한 관점은 ADC로서, 항체가 마우스와 이종유래의 중, 명백하게 사람의 항체로부터 유래한 중쇄 및 경쇄 불변 부위들도 역시 포함하는 것을 특징으로 하는 키메라 (c) 항체인 ADC에 관한 것이다.
- [0200] 키메라 항체는 주어진 종의 항체로부터 유래한 자연적 가변 부위 (경쇄 및 중쇄)를 상기 주어진 종과 이종유래 종의 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들과 조합하여 포함하는 것이다.
- [0201] 키메라 항체들은 재조합 유전학의 기법들을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 키메라 항체는 프로모터 그리고 본 발명의 비인간, 명확하게는 마우스 단일클론 항체의 가변 부위를 코딩하는 서열, 및 이종유래 중, 바람직하게 사람의 항체 불변 부위를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 DNA를 클로닝하여 생산될 수 있다. 한 가지 이러한 재조합 유전자에 의해 코딩되는 본 발명에 따른 ADC의 키메라 항체는 예를 들면, 이러한 항체의 특이도가 마우스 DNA로부터 유래한 가변 부위에 의해 결정되고 그의 이소형이 인간 DNA로부터 유래한 불변 부위에 의해 결정되는, 마우스-인간 키메라일 수 있다.
- [0202] 바람직하지만 이에 제한되지는 않는 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는
- [0203] a) 서열번호 13의 서열 또는 서열번호 13과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0204] b) 서열번호 14의 서열 또는 서열번호 14와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 10, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0205] c) 서열번호 15의 서열 또는 서열번호 15와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0206] d) 서열번호 16의 서열 또는 서열번호 16과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0207] e) 서열번호 17의 서열 또는 서열번호 17과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 12의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체:
- [0208]로부터 선택된다.
- [0209] "서열번호 13 내지 17과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열"에 의하여, 이것은 서열번호 1, 2 및 3의 3가지 중쇄 CDR들, 또한 CDR들에 해당하는 서열들 (예로, 서열번호 1, 2 및 3) 외부에서 서열번호 13 내지 17의 전장 서열들과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 서열을 각각 지정하도록 의도된다.
- [0210] 바람직하지만 이에 제한되지는 않는 또 다른 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는
- [0211] a) 서열번호 18의 서열 또는 서열번호 18과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0212] b) 서열번호 19의 서열 또는 서열번호 19와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0213] c) 서열번호 20의 서열 또는 서열번호 20과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0214] d) 서열번호 21의 서열 또는 서열번호 21과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 8, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0215] e) 서열번호 22의 서열 또는 서열번호 22와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체:



- [0216]로부터 선택된다.
- [0217] "서열번호 18 내지 22와 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열"에 의하여, 이것은 서열번호 4, 5 및 6의 3가지 경쇄 CDR들, 또한 CDR들에 해당하는 서열들 (예로, 서열번호 4, 5 및 6) 외부에서 서열번호 18 내지 22의 전장 서열들과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 서열을 각각 지정하도록 의도된다.
- [0218] 본 발명의 한 가지 구현에는 ADC로서, Ab가
- [0219] a) 서열번호 13의 서열 또는 서열번호 13과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 18의 서열 또는 서열번호 18과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인;
- [0220] b) 서열번호 14의 서열 또는 서열번호 14와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 19의 서열 또는 서열번호 19와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인;
- [0221] c) 서열번호 15의 서열 또는 서열번호 15와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 20의 서열 또는 서열번호 20과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인;
- [0222] d) 서열번호 16의 서열 또는 서열번호 16과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 21의 서열 또는 서열번호 21과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인; 및
- [0223] e) 서열번호 17의 서열 또는 서열번호 17과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 22의 서열 또는 서열번호 22와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인;
- [0224] 으로부터 선택되는, ADC에 관한 것이다.
- [0225] 본 명세서에 기술된 키메라 항체들은 불변 부위도 역시 특징으로 할 수 있고, 보다 상세하게 상기 키메라 항체들은 이에 제한되지 않지만 IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD 또는 IgE와 같이 선별되거나 지정될 수 있다. 더욱 바람직하게, 본 발명의 맥락에서 상기 키메라 항체는 IgG1 또는 IgG4이다.
- [0226] 본 발명의 구현에는 ADC로서, Ab가 IgG1 형식에서 상기 기술된 바와 같은 가변 도메인들 VH 및 VL을 포함하는 키메라 항체인 ADC에 관한 것이다. 더욱 바람직하게, 상기 키메라 항체는 서열번호 43의 서열의 VH를 위한 불변 도메인 및 서열번호 45의 서열의 VL을 위한 카파 도메인을 포함한다.
- [0227] 본 발명의 구현에는 ADC로서, Ab가 IgG4 형식에서 상기 기술된 바와 같은 가변 도메인들 VH 및 VL을 포함하는 키메라 항체인 ADC에 관한 것이다. 더욱 바람직하게, 상기 키메라 항체는 서열번호 44의 서열의 VH를 위한 불변 도메인 및 서열번호 45의 서열의 VL을 위한 카파 도메인을 포함한다.
- [0228] 바람직하지만 이에 제한되지는 않는 또 다른 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는
- [0229] a) 서열번호 23의 서열 또는 서열번호 23과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 28의 서열 또는 서열번호 28과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체;
- [0230] b) 서열번호 24의 서열 또는 서열번호 24와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 29의 서열 또는 서열번호 29와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체;
- [0231] c) 서열번호 25의 서열 또는 서열번호 25와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 30의 서열 또는 서열번호 30과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체;
- [0232] d) 서열번호 26의 서열 또는 서열번호 26과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 31의 서열 또는 서열번호 31과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체; 및
- [0233] e) 서열번호 27의 서열 또는 서열번호 27과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 32의 서열 또는 서열번호 32와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체;
- [0234] 으로부터 선택된다.

[0235] 보다 명확하게, 다음의 표 3은 바람직한 키메라 항체들을 위한 VH 및 VL의 서열들을 각각 도시한다.

표 3

	중쇄	경쇄	서열번호
c208F2	가변 도메인 (VH)		13
		가변 도메인 (VL)	18
	전장		23
		전장	28
c212A11	가변 도메인 (VH)		14
		가변 도메인 (VL)	19
	전장		24
		전장	29
c214F8	가변 도메인 (VH)		15
		가변 도메인 (VL)	20
	전장		25
		전장	30
c219D6	가변 도메인 (VH)		16
		가변 도메인 (VL)	21
	전장		26
		전장	31
c213B10	가변 도메인 (VH)		17
		가변 도메인 (VL)	22
	전장		27
		전장	32

[0236]

[0237] 또한 본 발명의 또 다른 특정한 관점은 ADC로서, "Ab"가 인간 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들이 각각 램다 또는 카파 부위 및 감마-1, 감마-2 또는 감마-4 부위인 것을 특징으로 하는 인간화 항체인 ADC에 관한 것이다.

[0238] "인간화 항체들"은 비인간 기원의 항체로부터 유래한 CDR 부위들을 포함하고, 항체 분자의 나머지 부분들은 하나의 (또는 여러) 인간 항체들로부터 유래하는 항체를 의미한다. 또한, 일정 골격 분절 잔기들 (FR이라고 불림)은 결합 친화도를 보존하도록 변형될 수 있다.

[0239] 인간화 항체들 또는 그의 단편들은 당업자에게 알려진 기법들에 의해 제조될 수 있다. 이러한 인간화 항체들은 시험관내 진단들 또는 생체내 예방적 및/또는 치료적 처치가 관여하는 방법들에서 사용하는 데 바람직하다. 다른 인간화 기법들도 역시, 예를 들면 유럽 특허들 제 EP 0 451 261호, 제 EP 0 682 040호, 제 EP 0 939 127

호, 제 EP 0 566 647호 또는 미국 특허들 제 US 5,530,101호, 제 US 6,180,370호, 제 US 5,585,089호 및 제 US 5,693,761호에서 PDL에 의해 기술된 "CDR 접합 (CDR grafting)"과 같은 기술분야의 당업자에게 숙지되어 있다. 미국 특허들 제 5,639,641호 또는 제 6,054,297호, 제 5,886,152호 및 제 5,877,293호도 역시 인용될 수 있다.

- [0240] 본 발명의 상세한 구현예로서, 그리고 다음의 실시예들에서 보다 자세하게 설명될 바와 같이, 본 명세서에서는 hz208F2로 구성되는 항체가 기술된다. 이러한 인간화는 본 발명의 다른 항체들 부분에도 역시 적용될 수 있다.
- [0241] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는
- [0242] i) 각각 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3,
- [0243] ii) 인간 생식계열 IGHV1-46\*01 (서열번호 46)로부터 유래한 FR1, FR2 및 FR3, 및
- [0244] iii) 인간 생식계열 IGHJ4\*01 (서열번호 48)로부터 유래한 FR4:
- [0245] 를 가지는 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다.
- [0246] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는
- [0247] i) 각각 서열번호 9, 5 및 11의 서열들의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3,
- [0248] ii) 인간 생식계열 IGKV1-39\*01 (서열번호 47)로부터 유래한 FR1, FR2 및 FR3, 및
- [0249] iii) 인간 생식계열 IGKJ4\*01 (서열번호 49)로부터 유래한 FR4:
- [0250] 를 가지는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다.
- [0251] 바람직하지만 이에 제한되지는 않는 본 발명의 구현예에서, 항체는
- [0252] a) 각각 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3, 인간 생식계열 IGHV1-46\*01 (서열번호 46)로부터 유래한 FR1, FR2 및 FR3, 및 인간 생식계열 IGHJ4\*01 (서열번호 48)로부터 유래한 FR4를 가지는 중쇄; 및
- [0253] b) 각각 서열번호 9, 5 및 11의 서열들의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3, 인간 생식계열 IGKV1-39\*01 (서열번호 47)로부터 유래한 FR1, FR2 및 FR3, 및 인간 생식계열 IGKJ4\*01 (서열번호 49)로부터 유래한 FR4를 가지는 경쇄;
- [0254] 를 포함한다.
- [0255] 한 가지 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는 서열번호 33 서열의 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 서열번호 35 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다. 상기 인간화 항체는 이하 본 명세서에서 hz208F2 ("변이체" 또는 "Var." 1)라고 불릴 것이다.
- [0256] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는 서열번호 33 서열의 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서, 상기 서열번호 33의 서열은 잔기들 20번, 34번, 35번, 38번, 48번, 50번, 59번, 61번, 62번, 70번, 72번, 74번, 76번, 77번, 79번, 82번 및 95번으로부터 선택된 적어도 1개의 역-돌연변이를 포함하는, 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0257] 용어 표현 "역-돌연변이" 또는 "역 돌연변이"에 의하여, 이것은 처음에 마우스 서열에 존재하는 해당하는 잔기로 생식계열에 존재하는 인간 잔기의 돌연변이 또는 대체를 의미한다.
- [0258] 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는 서열번호 33 서열의 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서, 상기 서열번호 33의 서열은 잔기들 20번, 34번, 35번, 38번, 48번, 50번, 59번, 61번, 62번, 70번, 72번, 74번, 76번, 77번, 79번, 82번 및 95번으로부터 선택되는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개 또는 17개의 역-돌연변이들을 포함하는, 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0259] 보다 명확하게, 다음의 표 4는 바람직한 역-돌연변이들을 도시한다.

표 4

잔기 번호	20	34	35	38	48	50	59	61
마우스	M	I	Y	K	L	W	K	N
인간	V	M	H	R	M	I	S	A

잔기 번호	62	70	72	74	76	77	79	82	95
마우스	E	L	A	K	S	N	A	F	F
인간	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

[0260]

[0261]

한 가지 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는 서열번호 35 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서, 상기 서열번호 35의 서열은 잔기들 22번, 53번, 55번, 65번, 71번, 72번, 77번 및 87번으로부터 선택되는 적어도 1개의 역-돌연변이를 포함하는, 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0262]

한 가지 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는 서열번호 35 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서, 상기 서열번호 35의 서열은 잔기들 22번, 53번, 55번, 65번, 71번, 72번, 77번 및 87번으로부터 선택되는 적어도 1개의 역-돌연변이를 포함하는, 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0263]

한 가지 구현예에서, 본 발명에 따른 항체는 서열번호 35 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서, 상기 서열번호 35의 서열은 잔기들 22번, 53번, 55번, 65번, 71번, 72번, 77번 및 87번으로부터 선택되는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 역-돌연변이를 포함하는, 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0264]

또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는

[0265]

a) 서열번호 33의 서열의 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서, 상기 서열번호 33의 서열은 잔기들 20번, 34번, 35번, 38번, 48번, 50번, 59번, 61번, 62번, 70번, 72번, 74번, 76번, 77번, 79번, 82번 및 95번으로부터 선택된 적어도 1개의 역-돌연변이를 포함하는, 중쇄 가변 도메인; 및

[0266]

b) 서열번호 35의 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서, 상기 서열번호 35의 서열은 잔기들 22번, 53번, 55번, 65번, 71번, 72번, 77번 및 87번으로부터 선택된 적어도 1개의 역-돌연변이를 포함하는, 경쇄 가변 도메인;

[0267]

을 포함한다.

[0268]

보다 명확하게, 다음의 표 5는 바람직한 역-돌연변이들을 도시한다.

표 5

잔기 번호	22	53	55	65	71	72	77	87
마우스	S	R	H	R	Y	S	N	F
인간	T	S	Q	S	F	T	S	Y

[0269]

[0270]

이러한 구현예에서, 본 발명에 따른 ADC의 항체는 상기에 언급된 모든 역-돌연변이들을 포함하고, 서열번호 34 서열의 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 서열번호 36 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항체에 해당한다. 상기 인간화 항체는 이하 본 명세서에서 hz208F2 ("변이체 3" 또는 "Var. 3")라고 불릴 것이다.

[0271]

또 다른 구현예에서, 변이체 1 및 변이체 3 사이 범위에 포함되는 모든 인간화 형태들도 역시 본 발명에 의해 포괄된다. 다른 말로 하면, 본 발명에 따른 항체는 서열번호 41의 "공통" 서열의 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 서열번호 42의 "공통" 서열의 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항체에 해당한다. 상기 인간화 항체는 전체적으로, 이하 본 명세서에서 hz208F2 ("변이체 2" 또는 "Var. 2")라고 불릴 것이다.

- [0272] 바람직하지만 이에 제한되지는 않는 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는
- [0273] a) 서열번호 33의 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0274] b) 서열번호 34의 서열 또는 서열번호 34와 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0275] 로부터 선택된다.
- [0276] "서열번호 33 또는 34와 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열"에 의하여, 이것은 서열번호 1, 2 및 3의 3가지 중쇄 CDR들, 또한 CDR들에 해당하는 서열들 (예로, 서열번호 1, 2 및 3) 외부에서 서열번호 33 또는 34의 전장 서열들과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 서열을 지정하도록 의도된다.
- [0277] 관련된 단락들에서 표시되지 않은 경우라면, 본 상세한 설명에서 임의의 서열에 의하여 또는 특정한 서열과 적어도 80% 일치도를 나타내는 서열에 의하여, 이것은 상기 서열이 참조된 서열과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 이들 서열들이 CDR 서열들을 포함하는 경우라면, 이것은 서열들이 적어도 기준 서열 CDR들과 일치하는 이들 CDR들, 이들 CDR들에 해당하는 서열들 외부에 위치하는 남은 서열에 대해 계산되어야 하는 전장의 서열과 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 나타내는 점을 지정하도록 의도된다.
- [0278] 바람직하지만 이에 제한되지는 않는 구현예에서, 본 발명의 항체는
- [0279] a) 서열번호 35의 서열 또는 서열번호 35와 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및
- [0280] b) 서열번호 36의 서열 또는 서열번호 36과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체;
- [0281] 로부터 선택된다.
- [0282] "서열번호 35 또는 36과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 임의의 서열"에 의하여, 이것은 서열번호 4, 5 및 6의 3가지 경쇄 CDR들, 또한 CDR들에 해당하는 서열들 (예로, 서열번호 4, 5 및 6) 외부에서 서열번호 35 또는 36의 전장 서열들과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 나타내는 서열을 지정하도록 의도된다.
- [0283] 본 명세서에서 기술된 인간화 항체들은 불변 부위도 역시 특징으로 할 수 있고, 보다 상세하게 상기 인간화 항체들은 이에 제한되지 않지만 IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD 또는 IgE와 같이 선별되거나 지정될 수 있다. 더욱 바람직하게, 본 발명의 맥락에서 상기 인간화 항체들은 IgG1 또는 IgG4이다.
- [0284] 본 발명의 구현예는 ADC로서, "Ab"가 IgG1 형식에서 상기 기술된 바와 같은 가변 도메인들 VH 및 VL을 포함하는 인간화 항체에 관한 것이다. 더욱 바람직하게, 상기 인간화 항체는 서열번호 43의 서열의 VH를 위한 불변 도메인 및 서열번호 45의 서열의 VL을 위한 카파 도메인을 포함하는, ADC에 관한 것이다.
- [0285] 본 발명의 구현예는 ADC로서, "Ab"가 IgG4 형식에서 상기 기술된 바와 같은 가변 도메인들 VH 및 VL을 포함하는 인간화 항체에 관한 것이다. 더욱 바람직하게, 상기 인간화 항체는 서열번호 44의 서열의 VH를 위한 불변 도메인 및 서열번호 45의 서열의 VL을 위한 카파 도메인을 포함하는, ADC에 관한 것이다.
- [0286] 또한 본 발명의 또 다른 구현예는 ADC로서, "Ab"가
- [0287] a) 서열번호 37의 서열 또는 서열번호 37과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 39의 서열 또는 서열번호 39와 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체; 및
- [0288] b) 서열번호 38의 서열 또는 서열번호 38과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 40의 서열 또는 서열번호 40과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하거나 이들로 구성되는 항체;
- [0289] 로부터 선택되는 ADC에 관한 것이다.

[0290] 보다 명확하게, 다음의 표 6a는 인간화 항체 hz208F2의 변이체 1 (Var. 1) 및 변이체 3 (Var. 3)를 위한 VH 및 VL 서열들의 비제한적인 예들을 도시한다. 이것은 변이체 2 (Var. 2)를 위한 공통 서열도 역시 포함한다.

표 6

	중쇄	경쇄	서열번호
hz208F2 (Var. 1)	가변 도메인 (VH)		33
		가변 도메인 (VL)	35
	전장		37
		전장	39
hz208F2 (Var. 3)	가변 도메인 (VH)		34
		가변 도메인 (VL)	36
	전장		38
		전장	40
hz208F2 (Var. 2)	가변 도메인 (VH)		41
		가변 도메인 (VL)	42

[0291]

[0292] 바람직하지만 이에 제한되지는 않는 또 다른 구현예에서, 본 발명의 ADC의 항체는

[0293] a) 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80 또는 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 9, 5 및 11의 서열들의 3가지 경쇄 CDR들을 포함하는 항체;

[0294] b) 서열번호들 57 또는 60 또는 서열번호 57 또는 60과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 7, 2 및 3의 서열들의 3가지 중쇄 CDR들을 포함하는 항체; 및

[0295] c) 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80 또는 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 중쇄 가변 도메인 및 서열번호들 57 또는 60 또는 서열번호들 57 또는 60과 적어도 80%, 바람직하게 85%, 90%, 95% 또는 98% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 도메인:

[0296] 으로부터 선택된다.

[0297] 또한 본 발명의 또 다른 구현예는 ADC로서, "Ab"가

[0298] a) 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80의 서열 또는 서열번호들 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 및 80과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 57의 서열 또는 서열번호 57과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하는 항체; 및

[0299] b) 서열번호들 56, 64, 68 및 78의 서열 또는 서열번호들 56, 64, 68 및 78과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 중쇄 및 서열번호 60의 서열 또는 서열번호 60과 적어도 80% 일치도를 나타내는 임의의 서열의 경쇄를 포함하는 항체:

[0300] 로부터 선택되는 항체인, ADC에 관한 것이다.

[0301] 또한 본 발명의 또 다른 구현예는 ADC로서, Ab가



- [illegible]

항체:

[0317]로부터 선택되는 항체인, ADC에 관한 것이다.

[0318] 다른 말로 하면, 본 발명은 ADC로서, Ab가

[0319] a) 서열번호들 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 및 81 또는 서열번호들 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 및 81과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 중쇄; 및

[0320] b) 서열번호들 59 및 61 또는 서열번호들 59 및 61과 적어도 80% 일치도를 가진 임의의 서열로부터 선택된 서열의 경쇄:

[0321]을 포함하는 항체인, ADC에 관한 것이다.

[0322] 보다 명확하게, 다음의 표 6b는 인간화 항체 hz208F2의 서로 다른 변이체들을 위한 VH 및 VL의 서열들 (가변 도메인 및 전장)의 비제한적인 예들을 도시한다.

	중쇄	경쇄	서열번호
hz208F2 H037/L018	가변 도메인 (VH)  전장	가변 도메인 (VL)  전장	56
			57
			58
			59
Hz208F2 H037/L021	가변 도메인 (VH)  전장	가변 도메인 (VL)  전장	56
			60
			58
			61
Hz208F2 H047/L018	가변 도메인 (VH)  전장	가변 도메인 (VL)  전장	62
			57
			63
			59
Hz208F2 H049/L018	가변 도메인 (VH)  전장	가변 도메인 (VL)  전장	64
			57
			65
			59
Hz208F2 H049/L021	가변 도메인 (VH)  전장	가변 도메인 (VL)  전장	64
			60
			65
			61
Hz208F2 H051/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	66
			57
			67

[0323]



	전장	전장	59
Hz208F2 H052/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	68
			57
	전장	전장	69
			59
Hz208F2 H052/L021	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	68
			60
	전장	전장	69
			61
Hz208F2 H057/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	70
			57
	전장	전장	71
			59
Hz208F2 H068/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	72
			57
	전장	전장	73
			59
Hz208F2 H070/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	74
			57
	전장	전장	75
			59
Hz208F2 H071/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	76
			57
	전장	전장	77
			59
Hz208F2 H076/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	78
			57
	전장	전장	79
			59

[0324]

Hz208F2 H076/L021	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	78
			60
	전장	전장	79
			61
Hz208F2 H077/L018	가변 도메인 (VH)	가변 도메인 (VL)	80
			57
	전장	전장	81
			59

[0325]

- [0326] 본 발명의 또 다른 관점은 ADC로서, Ab가
- [0327] i) 프랑스 파스티르 연구소, CNCM에 각각 2013년 5월 30일, 2013년 6월 26일, 2013년 6월 26일, 2013년 4월 24일 및 2013년 6월 26일에 기탁된 하이브리도마 I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 또는 I-4774에 의해 생산된 항체; ii) i)의 항체와 IGF-1R과의 결합을 경쟁하는 항체; 및 iii) i)의 항체가 결합하는 것과 동일한 IGF-1R의 에피토프와 결합하는 항체:로부터 선택된 항체인, ADC이다.
- [0328] 따라서 본 명세서에서는 프랑스 파스티르 연구소, CNCM에 각각 2013년 5월 30일, 2013년 6월 26일, 2013년 6월 26일, 2013년 4월 24일 및 2013년 6월 26일에 기탁된 하이브리도마 I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 및 I-4774로부터 선택되는 마우스 하이브리도마가 기술된다.
- [0329] 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 분리된 핵산도 역시 기술된다.
- [0330] 발명의 상세한 설명에서 상호교환적으로 사용되는 용어들 "핵산 (nucleic acid)", "핵산 서열 (nucleic sequence)", "핵산 서열 (nucleic acid sequence)", "폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide)", "올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)", "폴리뉴클레오타이드 서열 (polynucleotide sequence)" 및 " 뉴클레오타이드 서열 (nucleotide sequence)"은, 변형 여부와 상관없이 핵산의 단편 또는 부위를 정의하고, 비자연적 뉴클레오타이드를 포함하기도 하고, 이중가닥 DNA, 단일가닥 DNA 또는 상기 DNA들의 전사 산물들 중 어느 하나로 존재하는 뉴클레오타이드들의 정확한 서열을 의미한다.
- [0331] 이들 서열들은 분리되었고/거나 정제되었고, 예로 그들은 예를 들면 그들의 환경이 적어도 부분적으로 변형되었던 사본에 의해 직접 또는 간접적으로 수집되었다. 재조합 유전학에 의해, 예를 들면 숙주 세포들에 의해 획득되거나, 화학적 합성에 의해 획득된 분리된 핵산들도 역시 본 명세서에서 언급되어야 한다.
- [0332] 본 발명에 따른 ADC의 항체, 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 상세하게는 이러한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 클로닝 및/또는 발현 벡터들도 역시 기술된다.
- [0333] 벡터들은 바람직하게 주어진 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열들의 발현 및/또는 분비를 허용하는 요소들을 포함한다. 따라서 벡터는 프로모터, 해독 개시 및 종결 신호들, 뿐만 아니라 적합한 전사 조절 부위들을 포함할 수 있다. 이것은 숙주세포에서 안정한 방식으로 유지될 수 있어야 하고, 선택적으로 해독된 단백질의 분비를 특정하는 특이적 신호들을 가질 수 있다. 이들 다양한 요소들은 사용된 숙주 세포에 따라 당업자에 의해 선택되고 최적화된다. 이러한 목적을 위해, 뉴클레오타이드 서열들은 선택된 숙주 내의 자가-복제하는 벡터들 내에 삽입되거나 선택된 숙주의 통합 벡터들일 수 있다.
- [0334] 본 벡터들은 예를 들면 플라스미드 또는 바이러스 기원의 벡터들이다. 그들은 본 발명의 뉴클레오타이드 서열들을 클론하거나 발현하기 위하여 숙주 세포들을 형질전환하는 데 사용된다.
- [0335] 이러한 벡터들은 당업자에 의해 전형적으로 사용되는 방법들에 의해 제조되고, 결과로 얻은 클론들은 리포펙션, 전기천공법, 접합, 열 충격법 또는 화학적 방법들과 같은 표준 방법들에 의해 적합한 숙주 내로 도입될 수 있다.
- [0336] 이들 분리된 숙주 세포들은 상기 기술된 바와 같은 벡터에 의해 형질전환되거나 이를 포함한다.
- [0337] 숙주 세포들은 예를 들면 박테리아 세포들뿐만 아니라 효모 세포들 또는 동물 세포들, 명확하게는 포유동물 세포들 (인간을 제외함)과 같은 원핵 또는 진핵 시스템들 중에서 선택될 수 있다. 곤충 또는 식물 세포들도 역시 사용될 수 있다.
- [0338] 본 발명에 따른 ADC의 항체, 또는 그의 항원 결합 단편의 생산 방법으로서,
- [0339] a) 상기 기재된 바와 같이 숙주 세포에 적합한 배양 조건들을 가진 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0340] b) 이에 따라 배양 배지로부터 또는 상기 배양된 세포들로부터 생산된 항체를 회수하는 단계:
- [0341] 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법도 역시 기재된다.
- [0342] 형질전환된 세포들은 본 발명에 따른 ADC의 재조합 항체들의 제조 방법들에 사용된다. 상기 기재된 바와 같이 벡터 및/또는 벡터에 의해 형질전환된 세포를 사용하는, 재조합 형태로의 항체들의 제조 방법들도 역시 본 명세서에 포함된다. 바람직하게, 상기에 기술된 바와 같이 벡터에 의해 형질전환된 세포는 상기 언급된 항체의 발현 및 상기 항체의 회수를 허용하는 조건들 하에서 배양된다.

[0343] 이미 언급된 바와 같이, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 시스템들 중에서 선택될 수 있다. 상세하게, 이러한 원핵 또는 진핵 시스템들에서 분비를 용이하게 하는 뉴클레오타이드 서열들을 확인하는 것이 가능하다. 이러한 서열을 보유하는 상기 기재된 바와 같은 벡터는 이에 따라 분비될 재조합 단백질들의 생산에 유리하게 사용될 수 있다. 따라서, 이들 관심 있는 재조합 단백질의 정제는 그들이 숙주 세포들 내부가 아닌 세포 배양의 상청액에 존재하는 사실에 의해 용이하게 될 것이다.

[0344] 본 발명의 ADC의 항체는 화학적 합성에 의해서도 역시 제조될 수 있다. 이러한 제조 방법도 역시 본 발명의 목적이다. 당업자라면 단편들의 농축에 의하거나 통상적인 용액으로의 합성에 의한 고체-상 기법들 또는 부분적 고체-상 기법들과 같은 화학적 합성의 방법들을 숙지하고 있다. 화학적 합성에 의해 획득되고 해당하는 비천연 아미노산들을 포함할 수 있는 폴리펩타이드들도 역시 인용될 수 있다.

[0345] 상기 기술된 방법에 의해 획득될 수 있는 항체도 역시 본 발명에 포함된다.

[0346] 상세한 관점에 따르면, 본 발명은 ADC로서, Ab가 숙주 표적 부위에 세포독성 제제를 전달하는 어드레싱 운반체로서 사용되는, 상기에 기술된 바와 같은 항체, 또는 그의 항원 결합 단편이고, 상기 숙주 표적 부위는 IGF-1R, 바람직하게 IGF-1R 세포의 도메인, 더욱 바람직하게 인간 IGF-1R (서열번호 50), 훨씬 더 바람직하게는 인간 IGF-1R 세포의 도메인 (서열번호 51), 훨씬 더 바람직하게는 인간 IGF-1R 세포의 도메인의 N 말단 (서열번호 52), 또는 그들의 임의의 자연적 변이체 서열 내에 정착된 에피토프로 구성되는, ADC에 관한 것이다.

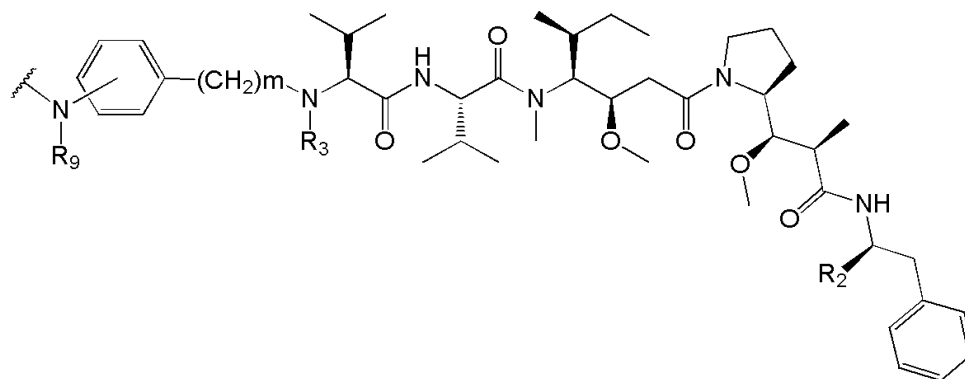
[0347] 바람직한 구현예에서, 상기 숙주 표적 부위는 포유동물 세포, 더욱 바람직하게 인간 세포, 더욱 바람직하게 자연적으로 또는 유전적 재조합에 의해 IGF-1R을 발현하는 세포들의 표적 부위이다.

[0348] 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 표적 부위는 암, 바람직하게 IGF-1R을 발현하는 암 또는 IGF-1R 관련된 암들을 가진 환자, 바람직하게는 인간의 세포의 표적 부위이다.

[0349] IGF-1R을 발현하는 암 또는 IGF-1R 관련된 암들은 상세하게 종양성 세포들이 그들의 표면에 IGF-1R의 전부 또는 일부를 발현하거나 과다-발현하는 암들을 포함한다.

## [0350] II - 약물 (D)

[0351] 본 발명에 따른 약물 분체는 다음의 화학식 (II)를 가진다:



[0352]

[0353] (II)

[0354] 여기에서

[0355] R<sub>2</sub>는 COOH, COOCH<sub>3</sub> 또는 티아조릴 (티아졸-2-일과 같음)이고;

[0356] R<sub>3</sub>는 H 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬 (메틸과 같음), 상세하게 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬기이고;

[0357] R<sub>9</sub>는 H 또는 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬 (메틸과 같음)이고;

[0358] m은 1 및 8 사이 범위에 포함된 정수이고;

[0359] 물결선은 L과의 부착점을 가리킨다.

[0360] 본 발명에서 "알킬"에 의하여, 직쇄 또는 분지쇄, 포화 탄화수소 사슬을 의미한다. 예를 들면, 메틸, 에틸, 프

로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, *세크*-부틸, *테르*-부틸, 펜틸 또는 헥실 기들이 언급될 수 있다.

[0361] 본 발명에서 "(C<sub>x</sub>-C<sub>y</sub>)알킬"에 의하여, x개 내지 y개의 탄소 원자들을 포함하는 상기 정의된 바와 같은 알킬 사슬을 의미한다. 따라서, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬기는 1개 내지 6개의 탄소 원자들을 가지는 알킬이다.

[0362] "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬"은 유리하게 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)알킬, 바람직하게 (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)알킬이다.

[0363] 본 발명의 화합물들 중에서, 하나의 상세하게 인정된 부류의 약물 분체들은 R<sub>2</sub>가 COOH 기를 나타내는 화학식 (II) 약물 분체들에 해당한다.

[0364] 또 다른 상세하게 인정된 부류의 분체들은 R<sub>2</sub>가 티아졸 (상세하게는 티아졸-2-일 기)인 화학식 (II) 분체들에 해당한다.

[0365] 또 다른 부류의 상세하게 인정된 분체들은 R<sub>2</sub>가 COOMe인 화학식 (II) 분체들에 해당한다.

[0366] 본 발명의 한 가지 상세한 구현예에 따르면, R<sub>2</sub>는 보다 상세하게 COOH, COOMe 또는 티아졸-2-일 기이다.

[0367] 첫 번째 바람직한 구현예에 따르면, R<sub>2</sub>는 COOH이다.

[0368] 두 번째 바람직한 구현예에 따르면, R<sub>2</sub>는 COOMe이다.

[0369] R<sub>3</sub>는 상세하게 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬, 유리하게는 메틸기를 나타낸다.

[0370] m은 1 및 8 사이 범위, 상세하게 1 및 6 사이 범위, 유리하게 1 및 4 사이 범위에 포함되는 정수, 바람직하게 1 또는 2이다.

[0371] 바람직한 구현예에서, R<sub>2</sub>는 COOH이고, R<sub>3</sub>는 메틸기이고, m은 1 또는 2이다.

[0372] 본 발명의 약물 분체들 중에서, 하나의 상세하게 인정된 부류의 약물 분체들은 R<sub>9</sub>가 메틸기 또는 수소인 화학식 (II) 약물 분체들에 해당한다.

[0373] 바람직한 구현예에서,

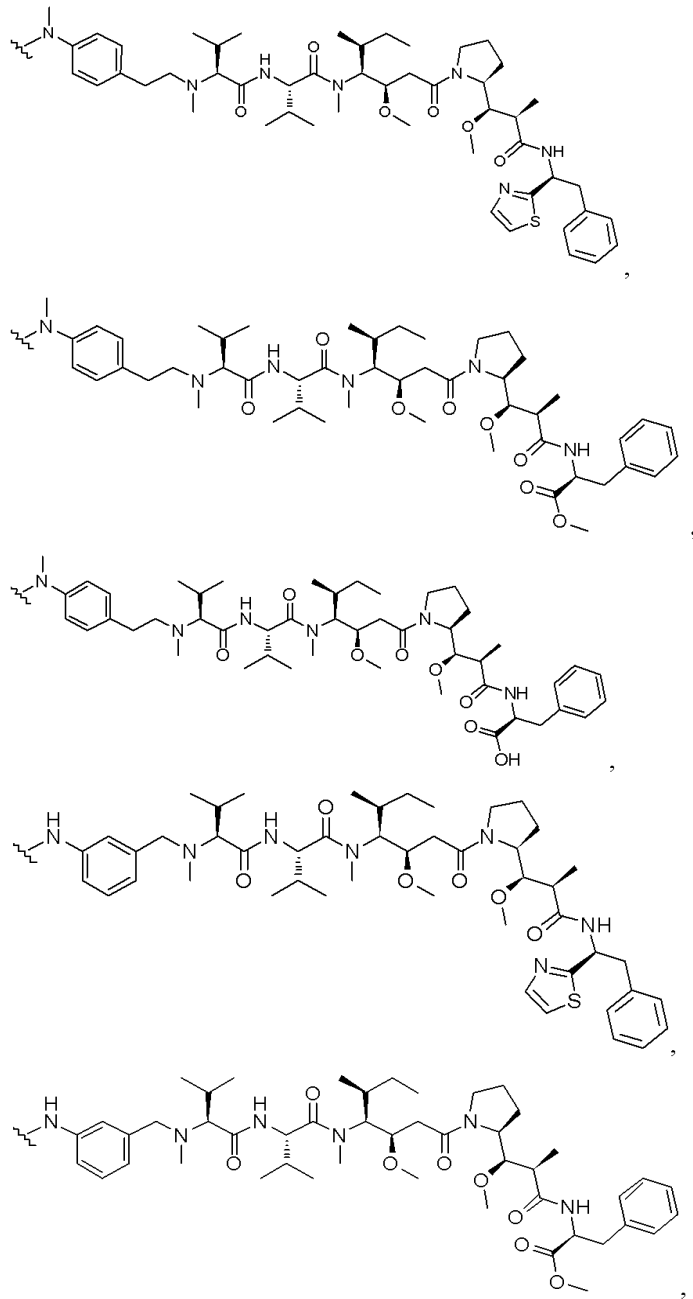
[0374] - R<sub>2</sub>는 COOH이고, R<sub>3</sub>는 메틸기이고, R<sub>9</sub>는 메틸기이고, m은 1 또는 2이거나,

[0375] - R<sub>2</sub>는 COOH이고, R<sub>3</sub>는 메틸기이고, R<sub>9</sub>는 메틸기이고, m은 1 또는 2이다.

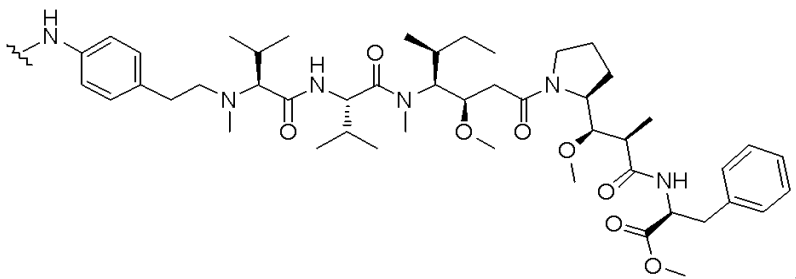
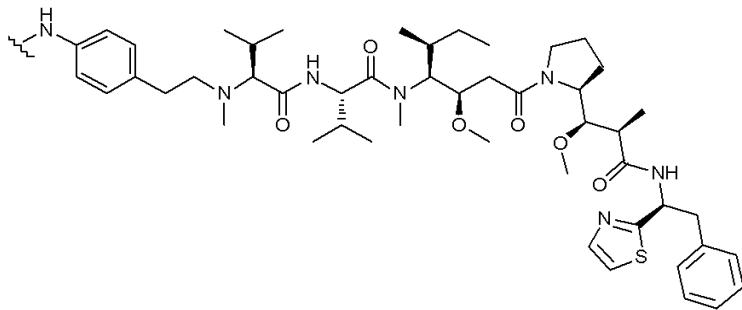
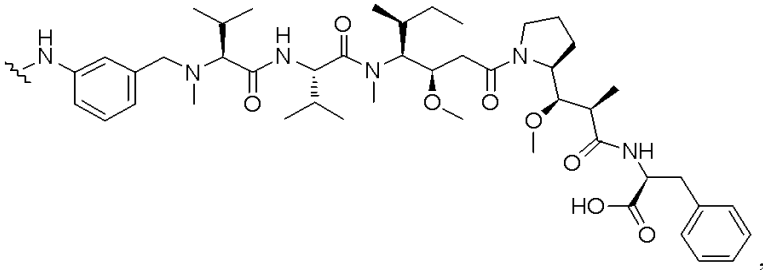
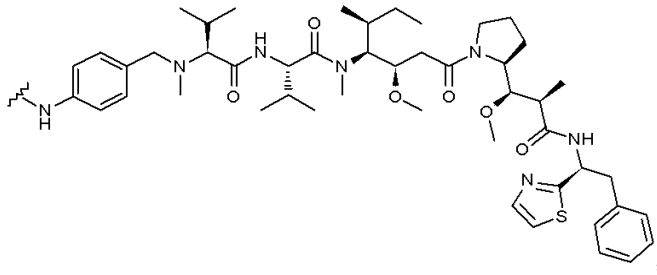
[0376] 바람직한 구현예에 따르면, NR<sub>9</sub> 기는 (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> 기와 관련하여 파라 위치의 페닐 고리 위에 위치한다.

[0377]

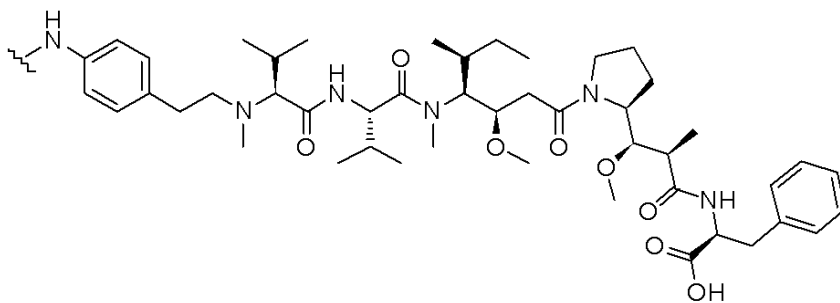
유리하게, 약물 분체는 다음의 분체들 중에서 선택된다:



[0378]



[0379]



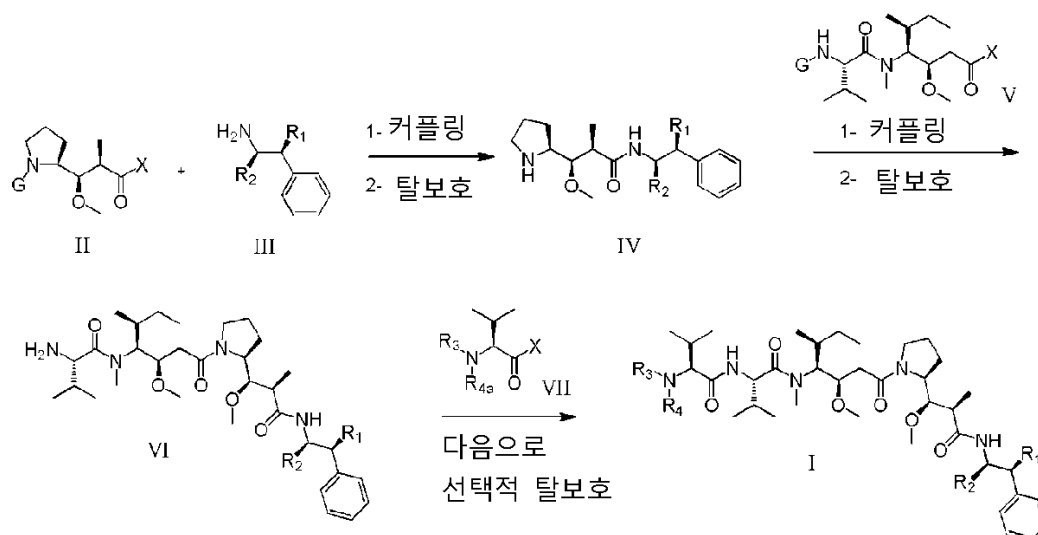
[0380]

[0381]

(화학식 DH의) 약물의 제조:

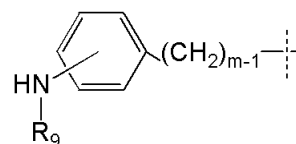
[0382]

약물은 선택적으로 필요할 때 문헌에 기술되거나 당업자에게 잘 숙지되어 있는 임의의 표준 작동법에 의해 보완되는 다음의 합성 반응식들에 기술되거나 본 명세서에서 실험적 부분들의 실시예들에 기술된 일반적인 방법들 사용하여 제조될 수 있다.



반응식 1

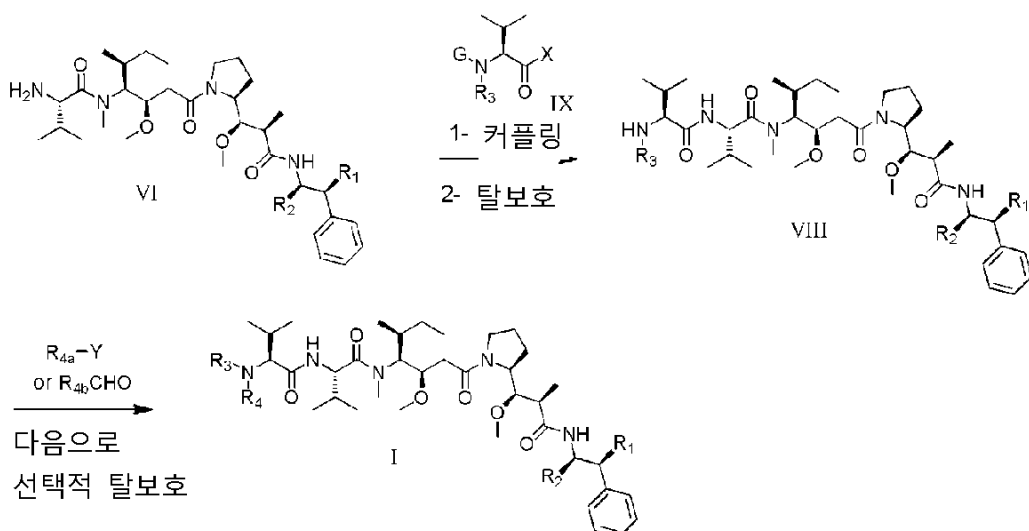
반응식 1은 약물을 제조하는 데 사용될 수 있는 첫 번째 일반적인 방법을 도시한다. 상기 일반 화학식들에서,  $R_1$



= H,  $R_2$  및  $R_3$ 는 화학식 II를 위해 이전에 정의된 바와 같고,  $R_4$ 는  $R_3$ 를 나타내고,  $R_{4a}$ 는 선택적으로 보호된 형태에서 이전에 정의된 바와 같은  $R_4$  기이고, G는 보호기이다.

첫 번째 단계는 보호기 G에 의해 그의 아민 기능기 위에 보호된 화합물 (II)의 화합물 (III)과의 응축으로 구성된다. X는 염소와 같은 이탈기를 나타낼 수 있다. 이러한 경우에 첫 번째 단계는 염산 및 아민 간의 반응으로 구성된다. 이러한 반응은 당업자들에게 잘 숙지된 방법들 및 기법들을 사용하여 시행될 수 있다. 한 가지 상세하게 인정된 방법에서, 두 가지 실체들은 THF, 디클로로메탄, DMF, DMSO와 같은 용매에서 유기 또는 무기염 예로  $Et_3N$ ,  $iPr_2NEt$ , 피리딘, NaH,  $Cs_2CO_3$ ,  $K_2CO_3$ 의 존재 시 온도 명확하게  $-20^\circ C$  및  $100^\circ C$  사이 범위에서 반응하도록 유도된다. X는 또한 하이드록실 (OH)일 수도 있다. 이러한 경우에, 첫 번째 단계는 카복실산 (II) 및 아민 (III) 간의 응축 반응이다. 이러한 반응은 당업자들에게 잘 숙지된 다음의 방법들 및 기법들에 따라 수행될 수 있다. 한 가지 상세하게 인정된 방법에서, 이들 두 가지 실체들은 디클로로메탄 또는 DMF와 같은 극성 비양자성 용매에서 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸-카르보이미드 (EDC), 3-하이드록시-1,2,3-벤조트리아진-4(3H)-온, 디이소프로필에틸아민과 같은 삼차 아민과 같은 커플링 제제의 존재 시 온도 명확하게  $-15^\circ C$  및  $40^\circ C$  사이 범위에서 반응하도록 유도된다. 또 다른 상세하게 인정된 방법에서, 이들 두 가지 실체들은 디클로로메탄 또는 DMF와 같은 극성 비양자성 용매에서 디에틸 포스포로시아니데이트 (DEPC), 트리에틸아민과 같은 삼차 아민의 존재 시 온도 명확하게  $-15^\circ C$  및  $40^\circ C$  사이 범위에서 반응하도록 유도된다. 또 다른 상세하게 인정된 방법에서, 이들 두 가지 실체들은 디클로로메탄 또는 DMF와 같은 극성 비양자성 용매에서 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸-우로늄헥사플루오로포스페이트 (HATU), 디이소프로필에틸아민과 같은 삼차 아민의 존재 시 온도 명확하게  $-15^\circ C$  및  $100^\circ C$  사이 범위에서 반응하도록 유도된다.

당업자들에게 잘 숙지된 기법들을 사용한 중간체의 탈보호 이후에 (《Protective Groups in Organic Synthesis》, T. W. Greene, John Wiley & Sons, 2006 및 《Protecting Groups》, P. J. Kocienski, Thieme Verlag, 1994), 화합물 (IV)은 상기에 기술된 방법들 및 기법들에 이어서 화합물 (V)와 응축되고 탈보호 단계 이후에 화합물 (VI)를 유도할 수 있다. 이러한 화합물은 다음으로 중간체 (VII)와의 응축 및 선택적 탈보호 이후에 약물의 형성을 유도할 수 있다. 화합물 (VI)도 역시  $R'_3$ 가  $R_3$ 의 전구체, 상세하게 보호기에 의해 보호된  $R_3$  기인 화합물 (VII')와 결합될 수 있다.  $R_3$ 를 유도하도록  $R'_3$ 기의 탈보호에 이어지는 결합은 이전에 기술된 바와 동일한 과정들에 따라 수행될 수 있다.



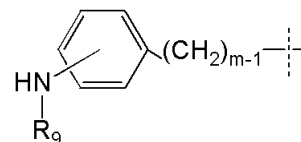
[0388]

[0389]

[0390]

반응식 2

반응식 2는 약물을 제조하는 데 사용될 수 있는 두 번째 일반적인 방법을 도시한다. 상기 일반 화학식들에서, G



는 보호기이고,  $R_1 = H$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  및  $R_{4a}$ 는 이전에 정의된 바와 같고,  $R_{4b}$ 는 나타낸다.

[0391]

첫 번째 단계에서, 보호기 G에 의해 그의 아민 기능기 위에 보호된 화합물 (IX)은 화합물 (VI)과 응축된다. X는 이탈기 예로 염소를 나타낼 수 있다. 이러한 경우에, 첫 번째 단계는 염산 및 아민 간의 반응으로 구성된다. 이러한 반응은 당업자들에게 잘 숙지된 방법들 및 기법들을 사용하여 수행될 수 있다. 한 가지 상세하게 인정된 방법에서, 두 가지 실체들은 THF, 디클로로메탄, DMF, DMSO와 같은 용매에서  $Et_3N$ ,  $iPr_2NEt$ , 피리딘, NaH,  $Cs_2CO_3$ ,  $K_2CO_3$ 와 같은 유기 또는 무기 염의 존재 시 온도 명확하게  $-20^\circ C$  및  $100^\circ C$  사이 범위에서 반응하도록 유도된다. X는 또한 하이드록실 (OH)일 수도 있다. 이러한 경우에, 첫 번째 단계는 카르복실산 (IX) 및 아민 (VI) 간의 응축 반응이다. 이러한 반응은 당업자들에게 잘 숙지된 다음의 방법들 및 기법들에 따라 수행될 수 있다. 한 가지 상세하게 인정된 방법에서, 이들 두 가지 실체들은 디클로로메탄 또는 DMF와 같은 극성 비양자성 용매에서 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸-카르보이미드 (EDC), 3-하이드록시-1,2,3-벤조트리아진-4(3H)-온, 디이소프로필에틸아민과 같은 삼차 아민의 존재 시 온도 명확하게  $-15^\circ C$  및  $40^\circ C$  사이 범위에서 반응하도록 유도된다. 또 다른 상세하게 인정된 방법에서, 이들 두 가지 실체들은 디클로로메탄 또는 DMF와 같은 극성 비양자성 용매에서 디에틸 포스포로시아니데이트 (DEPC), 트리에틸아민과 같은 삼차 아민의 존재 시 온도 명확하게  $-15^\circ C$  및  $40^\circ C$  사이 범위에서 반응하도록 유도된다.

[0392]

당업자들에게 잘 숙지된 기법들을 사용한 중간체의 탈보호 이후에, 획득된 화합물 (VIII)은  $R_4Y$ 와 반응 이후에 약물을 유도할 수 있다. 이러한 경우에, Y는 Cl, Br, I,  $OSO_2CH_3$ ,  $OSO_2CF_3$  또는 O-토실과 같은 이탈기이다. 반응은 디클로로메탄, THF, DMF, DMSO와 같은 극성 비양자성 용매에서  $Et_3N$ ,  $iPr_2NEt$ , 피리딘, NaH,  $Cs_2CO_3$ ,  $K_2CO_3$ 와 같은 유기 또는 무기 염의 존재 시 온도 명확하게  $-20^\circ C$  및  $100^\circ C$  사이 범위에서 시행된다. 또 다른 상세하게 인정된 방법에서, 화합물 (VIII)은 화학식  $R_{4b}-CHO$ 의 알데하이드와 반응하도록 유도되고, 여기에서  $R_{4b}$ 는  $R_4$ 의 전구체에 해당한다. 이러한 경우에, 반응은 1,2-디클로로에탄, 디클로로메탄, THF, DMF, MeOH와 같은 극성 용매에서 선택적인 티타늄 이소프로폭사이드 (IV)의 존재 시 아세트산과 같은 산의 첨가에 의해 조절될 수 있는 pH로  $NaBH_4$ ,  $NaBH_3CN$ ,  $NaBH(OAc)_3$ 와 같은 환원제의 존재 시 온도, 명확하게  $-20^\circ C$  및  $100^\circ C$  사이 범위에서 환원적 아민화이다.

[0393]

진술한 합성 반응식들에서, 약물은 예를 들면 당업자들에게 잘 숙지된 방법들을 사용하는 비누화와 같은 추가적인 반응 단계 이후에 또 다른 약물을 유도할 수 있고, 여기에서 에스테르 ( $COOMe$ )를 나타내는  $R_2$ 기는 카르복실



산 (COOH)를 나타내는 R<sub>2</sub> 기로 전환된다.

[0394] 산 첨가 염의 상태에서 적어도 하나의 염기 기능을 포함하는 약물을 분리하는 것이 바람직한 경우라면, 이것은 (적어도 하나의 염기 기능을 포함하는) 약물의 자유 염기를 적합한 산으로, 바람직하게는 동등한 정량으로 처리하는 것에 의해 가능하다. 적합한 산은 상세하게 트리플루오로아세트산일 수 있다.

### [0395] III - 링커 (L)

[0396] "링커 (linker)", "링커 단위 (linker unit)", "L" 또는 "링크 (link)"는 항체를 적어도 하나의 약물과 공유적으로 부착시키는 공유 결합 또는 원자들의 사슬을 포함하는 화학적 분체를 의미한다.

[0397] 링커들은 N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP), 숙시니미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티오레인 (IT), 이미노에스테르들의 이중기능적 유도체들 (디메틸 아디피미테이트 HCl와 같음), 활성을 가진 에스테르들 (디숙시니미딜 수베레이트와 같음), 알데하이드들 (글루타르알데하이드와 같음), 비스-아지도 화합물들 (비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민과 같음), 비스-디아조니움 유도체들 (비스-(p-디아조니움벤조일)-에틸렌디아민과 같음), 디이소시아네이트들 (톨루엔 2,6-디아소시아네이트와 같음), 및 비-활성을 가진 불소 화합물들 (1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠과 같음)과 같은 다양한 이중기능적 단백질 결합 제제들을 사용하여 만들어질 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 테트라아민헨타아세트산 (MX-DTPA)은 어드레싱 시스템과 세포독성 제제들의 결합을 위한 대표적인 킬레이팅 제제이다. 기타 교차-링커 시약들은 시판되고 있는 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, SVSB (숙시니미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트) (예로, 미국 일리노이주 록포드시, 피어스 바이오테크놀로지사 (Pierce Biotechnology, Inc)로부터 나옴)일 수 있다.

[0398] 링커는 "절단 불가능" 또는 "절단가능"할 수 있다.

[0399] 바람직한 구현예에서, 이것은 세포에서 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"로 구성된다. 예를 들면, 산-불안정 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광불안정 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드-포함 링커가 사용될 수 있다. 링커는, 바람직한 구현예에서, 링커의 절단이 세포내 환경에서 항체로부터 약물을 방출하도록 세포내 조건들 하에서 절단가능하다.

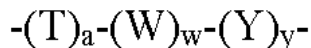
[0400] 예를 들면, 일정 구현예들에서, 링커는 세포내 환경에 (예로, 리소좀 또는 엔도솜 또는 함몰 소포 (caveolea) 내에) 존재하는 절단화 제제에 의해 절단가능하다. 링커는 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니지만 리소좀 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커일 수 있다. 전형적으로, 펩티딜 링커는 적어도 2개의 연속적 아미노산들 또는 적어도 3개의 연속적 아미노산들을 포함하거나 적어도 2개 아미노산들 길이 또는 적어도 3개 아미노산들의 길이이다. 절단 제제들은 카텡신 B 및 D 그리고 플라스민을 포함할 수 있고, 이들 모두는 디펩타이드 약물을 가수분해하여 표적 세포들 내부에 활성을 가진 약물의 방출을 유도하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 암성 조직에서 높게 발현되는 티올-의존성 프로테아제 카텡신-B에 의해 절단가능한 펩티딜 링커가 사용될 수 있다 (예로, Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly를 포함하거나 이들인 링커). 상세한 구현예들에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit 또는 Phe-Lys를 포함하거나 이들이다. 약물의 세포내 단백질분해성 방출을 사용하는 한 가지 장점은 약물이 결합될 때 전형적으로 약화되고 결합체들의 혈청 안정성들이 전형적으로 높은 것이다.

[0401] 다른 구현예들에서, 절단가능한 링커는 pH-민감하고, 예로 소정의 pH 수치들에서 가수분해에 대해 민감하다. 전형적으로, pH-민감성 링커는 산성 조건들 하에서 가수분해가능하다. 예를 들면, 리소좀에서 가수분해가능한 산-불안정 링커 (예로, 하이드라존, 세미카바존, 티오세미카바존, 시스-아콘니틱 아마이드, 오소에스테르, 아세탈, 케탈 등)이 사용될 수 있다. 이러한 링커들은 혈액에서의 조건들과 같은 중성의 pH 조건들 하에서 비교적 안정하지만, pH 5.5 또는 5.0 미만인 대략적인 리소좀의 pH에서는 불안정하다. 소정의 구현예들에서, 가수분해가능한 링커는 티오에테르 링커 (예로, 아실하이드라존 결합을 통해 약물과 부착된 티오에테르와 같음)이다.

[0402] 보다 다른 구현예에서, 링커는 환원화 조건들 하에서 절단가능하다 (예로, 디설파이드 링커). 다양한 디설파이드 링커들이, 예를 들면 SATA (N-숙시니미딜-S-아세틸티오아세테이트), SPDP (N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SPDB (N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티오)부틸레이트), SMPT (N-숙시니미딜-옥시카르보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔)-, SPDB (N-숙시니미딜-3-(2-피리딜티오)부틸레이트) 및 SMPT (N-숙시니미딜-옥시카르보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)톨루엔)을 사용하여 형성될 수 있는 것들을 포함하여 당해

기술분야에 속지되어 있다.

[0403] 소정의 바람직한 구현예들에서, 링커 단위는 다음의 일반 공식을 가질 수 있다:



[0404]

여기에서

[0405]

T는 연장인자 (stretcher) 단위이고;

[0406]

a는 0 또는 1이고;

[0407]

W는 아미노산 단위이고;

[0408]

w는 0부터 12까지 범위를 가진 정수이고;

[0409]

Y는 스페이서 (spacer) 단위이고;

[0410]

y는 0, 1 또는 2이다.

[0411]

[0412] 연장인자 단위 (T)는 존재 시 항체를 존재 시 아미노산 단위 (W)와, 또는 존재 시 스페이서 단위와, 또는 약물과 직접적으로 연결시킨다. 항체 상에 존재할 수 있는 유용한 기능 기들은 자연적으로 또는 화학적 조작을 통해, 설프하이드릴, 아미노, 하이드록실, 탄수화물의 아노머 하이드록실 기, 및 카르복실을 포함한다. 적합한 기능 기들은 설프하이드릴 및 아미노이다. 설프하이드릴 기들은 존재 시 항체의 분자내 디설프아이드 결합들의 환원에 의해 생성될 수 있다. 대안적으로, 설프하이드릴 기들은 2-이미노티올레인 또는 다른 설프하이드릴을 생성하는 시약들과 항체의 라이신 분체의 아미노 기의 반응에 의해 생성될 수 있다. 상세한 구현예들에서, 항체는 하나 이상의 라이신들을 보유하도록 조작된다. 더욱 바람직하게, 항체는 하나 이상의 시스테인들 (참고로 티오 Mab들)을 보유하도록 조작될 수 있다.

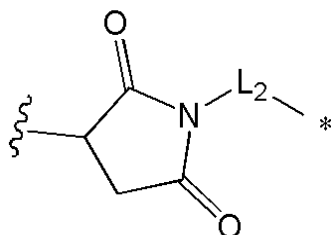
[0413] 소정의 상세한 구현예들에서, 연장인자 단위는 항체의 황 원자와 결합을 형성한다. 황 원자는 환원된 항체의 설프하이드릴 (-SH) 기로부터 유래될 수 있다.

[0414] 소정의 다른 상세한 구현예들에서, 연장인자 단위는 항체의 황 원자 및 연장인자 단위의 황 원자 간의 디설프아이드 결합을 통해 항체와 결합된다.

[0415] 다른 상세한 구현예들에서, 연장인자의 반응기는 항체의 아미노기와 반응할 수 있는 반응성 부위를 포함한다. 아미노기는 아르기닌 또는 라이신의 아미노기일 수 있다. 적합한 아민 반응성 부위들은 이에 제한되는 것은 아니지만, 숙시니마이드 에스테르들, 4-니트로페닐 에스테르들, 펜타플루오로페닐 에스테르들, 무수물들, 산 염화물들, 설포닐 염화물들, 이소시아네이트들 및 이소티오시아네이트들과 같은 활성화된 에스테르들을 포함한다.

[0416] 보다 또 다른 관점에서, 연장인자의 반응성 기능은 항체 상에 존재할 수 있는 변형된 탄수화물 기와 반응하는 반응성 부위를 포함한다. 상세한 구현예에서, 항체는 탄수화물 분체를 제공하도록 효소적으로 글리코실화되거나 자연적으로 글리코실화된다. 탄수화물은 소듐 페리오데이트와 같은 시약으로 온화하게 산화될 수 있고, 결과로 나온 산화된 탄수화물의 카르보닐 단위는 하이드라자이드, 옥심, 반응성 아민, 하이드라진, 티오세미카바자이드, 하이드라진 카르복실레이트, 또는 아릴하이드라자이드와 같은 기능성을 포함하는 연장인자와 응축될 수 있다.

[0417] 상세한 구현예에 따르면, 연장인자 단위는 다음의 화학식을 가진다:



[0418]

여기에서

[0419]

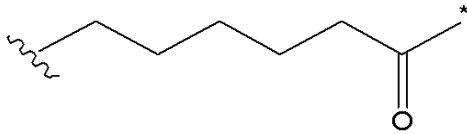
[0420] L<sub>2</sub>는 (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>)고리알킬-카르보닐, (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)알킬 또는 (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)알킬-카르보닐 (고리알킬 또는 알킬 분체들은 말레이미

드 분체의 질소 원자와 연결됨)이고, 별표는 존재하는 경우라면 아미노산 단위와, 존재하는 경우라면 스페이서 단위와, 또는 약물 **D**와의 부착점을 가리키고,

[0421] 물결선은 항체 **Ab**와의 부착점을 가리킨다.

[0422] 본 발명에서 "(C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>)고리알킬"에 의하여 이에 제한되는 것은 아니지만, 고리펜틸 및 고리헥실 등을 포함하는 4 개 내지 10개의 탄소 원자들을 가지는 탄화수소 고리를 의미한다.

[0423] L<sub>2</sub>는 유리하게 다음의 화학식의 펜틸-카르보닐과 같은 (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)알킬-카르보닐일 수 있다:



[0424]

[0425] 여기에서

[0426] 별표는 존재하는 경우라면 아미노산 단위와, 존재하는 경우라면 스페이서 단위와, 또는 약물 **D**와의 부착점을 가리키고,

[0427] 물결선은 말레이미드 분체의 질소 원자와의 부착점을 가리킨다.

[0428] 아미노산 단위 (W)는 존재 시 연장인자 단위 (T)가 존재하는 경우라면 이와 연결시키거나, 달리 항체는 스페이서 단위가 존재하는 경우라면 스페이서 단위 (Y)와, 또는 스페이서 단위가 부재하는 경우라면 약물과 연결시킨다.

[0429] 상기에 언급된 바와 같이, (W)<sub>w</sub>는 부재하거나 (w = 0), 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드, 펜타펩타이드, 헥사펩타이드, 헵타펩타이드, 옥타펩타이드, 노나펩타이드, 데카펩타이드, 운데카펩타이드 또는 도데카펩타이드일 수 있고, 여기에서 펩타이드들을 형성하는 아미노산들은 서로 다를 수 있다.

[0430] 따라서 (W)<sub>w</sub>는 다음의 화학식: (W<sub>1</sub>)<sub>w1</sub>(W<sub>2</sub>)<sub>w2</sub>(W<sub>3</sub>)<sub>w3</sub>(W<sub>4</sub>)<sub>w4</sub>(W<sub>5</sub>)<sub>w5</sub>로 나타낼 수 있고, 여기에서 W<sub>1</sub> 내지 W<sub>5</sub> 각각은 서로 독립적으로 아미노산 단위를 나타내고 w<sub>1</sub> 내지 w<sub>5</sub> 각각은 0 또는 1이다.

[0431] 일정 구현예들에서, 아미노산 단위 (W)<sub>w</sub>는 자연적으로 생기는 것들과 같은 아미노산 잔기들, 뿐만 아니라 시트룰린과 같은 소수의 아미노산들 및 비-자연적으로 생기는 아미노산 유사체들을 포함할 수 있다.

[0432] 아미노산 단위 (W)<sub>w</sub>는의 아미노산 잔기들은 이에 제한되는 것은 아니지만, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 아세틸 또는 포르밀로 보호되거나 보호되지 않는 라이신, 아르기닌, 토실 또는 니트로 기들로 보호되거나 보호되지 않는 아르기닌, 히스티딘, 오르니틴, 아세틸 또는 포르밀로 보호되거나 보호되지 않는 오르니틴 및 시트룰린을 포함한다. 대표적인 아미노산 링커 성분들은 바람직하게 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드 또는 펜타펩타이드, 명확하게 디펩타이드 또는 트리펩타이드를 포함한다.

[0433] 대표적인 디펩타이드들은: Val-Cit, Ala-Val, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N<sup>9</sup>-토실-Arg, Phe-N<sup>9</sup>-니트로-Arg을 포함한다.

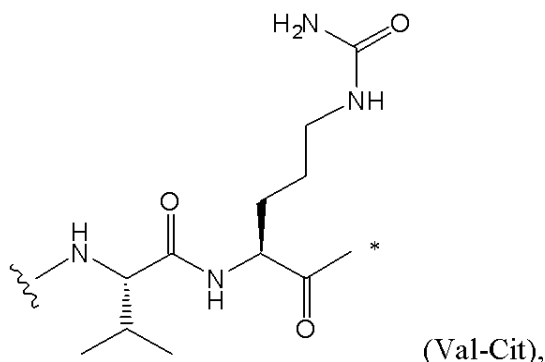
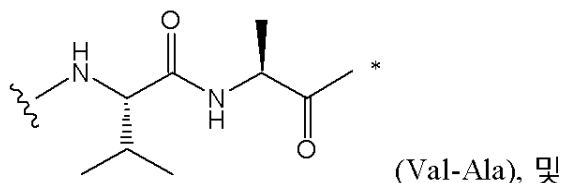
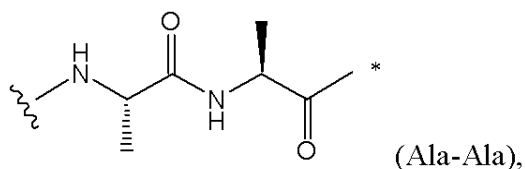
[0434] 대표적인 트리펩타이드들은: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys을 포함한다.

[0435] 대표적인 테트라펩타이드는: Gly-Phe-Leu-Gly (서열번호 53), Ala-Leu-Ala-Leu (서열번호 54)을 포함한다.

[0436] 대표적인 펜타펩타이드는: Pro-Val-Gly-Val-Val (서열번호 55)을 포함한다.

[0437] 상세한 구현예에 따르면, (W)<sub>w</sub>는 Val-Cit과 같은 디펩타이드 (예로, w = 2)일 수 있거나, 링커가 아미노산 단위를 결여한다 (w = 0). 링커가 아미노산 단위를 결여할 때, 바람직하게 이것은 스페이서 단위도 결여한다.

[0438] 상세한 구현예에 따르면, w = 0 (예로, (W)<sub>w</sub>가 단일 결합) 또는 w = 2 (예로, (W)<sub>w</sub>가 디펩타이드)이고, 이에 따라 (W)<sub>w</sub>는



[0439]

[0440]

[0441]

[0442]

[0443]

[0444]

[0445]

[0446]

[0447]

[0448]

[0449]

로부터 선택되고, 상세하게 Val-Cit이다:

여기에서

별표는 존재하는 경우라면 스페이서 단위 또는 약물 D와의 부착점을 가리키고, 물결선은 L<sub>2</sub>와의 부착점을 가리킨다.

아미노산 링커 성분들은 특정한 효소, 예를 들면 종양-연관된 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그들의 선택도 (selectivity)로 설계되고 최적화될 수 있다.

링커의 아미노산 단위는 이에 제한되는 것은 아니지만, 종양-연관된 프로테아제를 포함하는 효소에 의해 약물을 방출하도록 효소적으로 절단될 수 있다.

아미노산 단위는 특정한 종양-연관된 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 선택도로 설계되고 최적화될 수 있다. 적합한 단위들은 절단이 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민에 의해 촉매화되는 것들이다.

스페이서 단위 (Y)는 존재 시 아미노산 단위가 존재하는 경우라면 이와, 또는 연장인자 단위가 존재하는 경우라면 이와 연결시킨다. 스페이서 단위들은 2가지 일반적인 유형들을 가진다: 자가-희생 (self-immolative) 및 비자가-희생. 비자가-희생적 스페이서는 스페이서 단위의 일부 또는 전부가 항체-약물 결합체로부터 아미노산 단위의 효소적 절단 이후에 약물과 결합 되어 남는다. 비자가-희생적 스페이서 단위의 예들로는 이에 제한되는 것은 아니지만, (글리신-글리신) 스페이서 단위 및 글리신 스페이서 단위를 포함한다. 약물을 방출하기 위하여, 독립적인 가수분해 반응이 글리신-약물 단위 결합을 절단하도록 표적 세포 내에서 일어나야 한다.

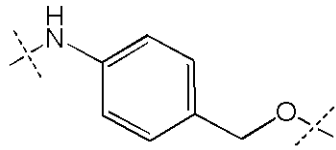
상세한 구현예에서, 비자가-희생적 스페이서 단위 (Y)는 Gly이다.

대안적으로, 자가-희생적 스페이서 단위를 포함하는 항체-약물 결합체는 별도의 가수분해 단계를 필요로 하지 않고도 약물을 방출할 수 있다. 이들 구현예들에서, (Y)는 PAB 기의 질소 원자를 통해 (W)<sub>n</sub>와 결합되고 카보네이트, 카바메이트 또는 에테르 기를 통해 약물과 직접적으로 연결된 p-아미노벤질 알코올 (PAB)의 잔기이다.

자가-희생적 스페이서들의 다른 예들로는 이에 제한되는 것은 아니지만, 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체들 및 오소 또는 파라-아미노벤질아세탈들의 잔기들과 같은 PAB 기와 전자적으로 동등한 방향족 화합물들을 포함한다. 아마이드 결합 가수분해 시 용이한 고리화를 거치는 스페이서들이 치환 및 미치환된 4-아미노부틸산 아마이드들, 적당하게 치환된 이중고리[2.2.1] 및 이중고리[2.2.2] 고리 시스템들 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드들과 같이 사용될 수 있다.

[0450] 대안의 구현예에서, 스페이서 단위는 분지된 비스(하이드록시메틸)스티렌 (BHMS) 단위이고, 이는 추가적인 약물들을 도입하는 데 사용될 수 있다.

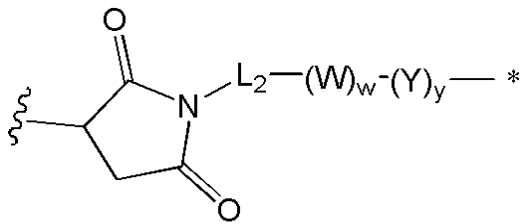
[0451] 상세한 구현예에서, 스페이서 단위 (Y)는 PAB가



[0452]

[0453] (PAB 단위의 산소는 카르보닐과 연결됨)인 PAB-카르보닐 및  $y = 1$ 이거나 링커가 스페이서 단위를 결여한다 ( $y = 0$ ).

[0454] 상세한 구현예에서, 링커는 다음의 화학식 (III)을 가진다:



[0455]

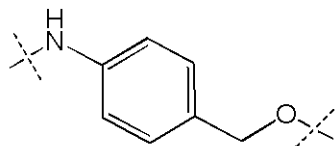
[0456] (III)

[0457] 여기에서

[0458]  $L_2$ 는  $(C_4-C_{10})$ 고리알킬-카르보닐,  $(C_2-C_6)$ 알킬 또는  $(C_2-C_6)$ 알킬-카르보닐 (이들 분체들의 카르보닐은 존재 시  $(W)_w$ 과 연결됨)이고,

[0459]  $W$ 는 아미노산 단위를 나타내고,  $w$ 는 0 및 5 사이 범위에 포함된 정수를 나타내며,

[0460]  $Y$ 는 PAB가



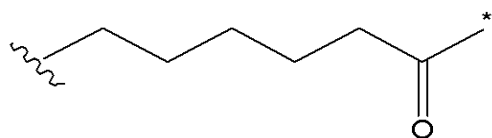
[0461]

[0462] (PAB 단위의 산소는 카르보닐과 연결됨)인 PAB-카르보닐이고,  $y$ 는 0 또는 1이며 (바람직하게  $w$ 가 0일 때  $Y$ 는 0이고,  $w$ 가 1 및 5 사이 범위에 포함될 때  $y$ 는 0 또는 1이다),

[0463] 별표는 약물 **D**와의 부착점을 가리키고,

[0464] 물결선은 항체 **Ab**와의 부착점을 가리킨다.

[0465] 유리하게,  $L_2$ 는 다음 화학식의 펜틸-카르보닐과 같은  $(C_2-C_6)$ 알킬-카르보닐이다:

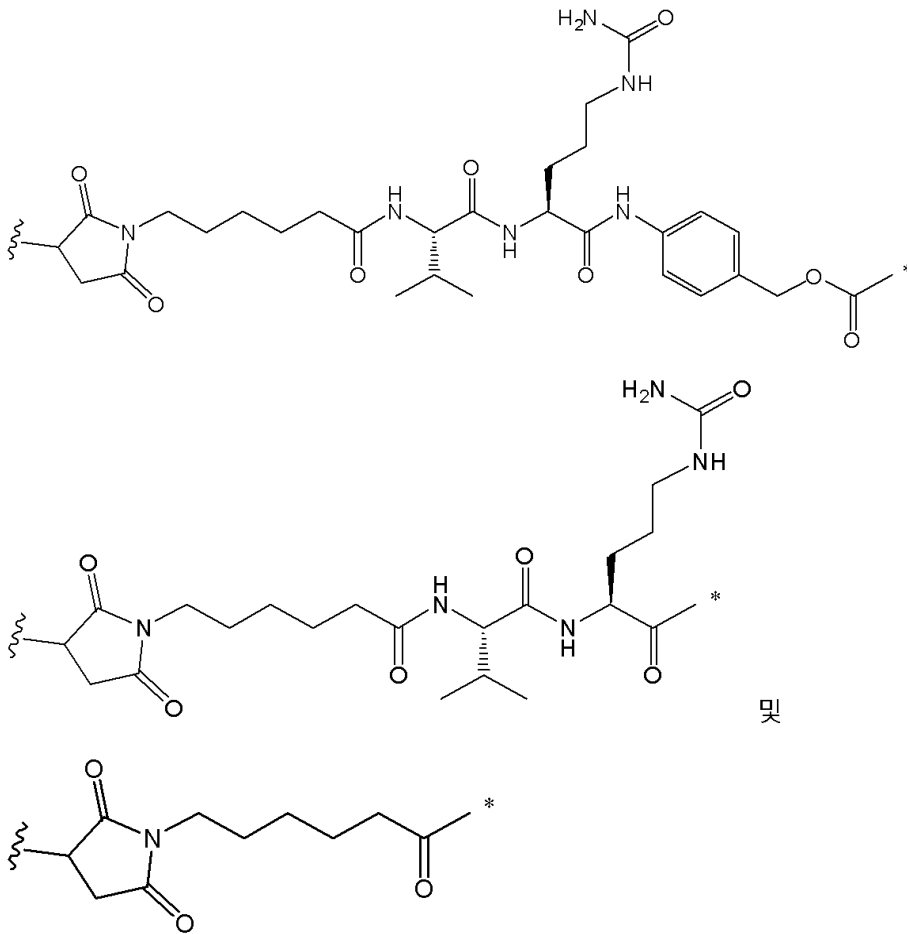


[0466]

[0467] 여기에서 별표는  $(W)_w$ 과의 부착점을 가리키고,

[0468] 물결선은 말레이미드 분체의 질소 원자와의 부착점을 가리킨다.

[0469] 바람직한 구현예에 따르면, 링커 L은



[0470]

[0471] 으로부터 선택된다:

[0472] 여기에서 별표는 약물 D와의 부착점을 가리키고, 물결선은 항체 Ab와의 부착점을 가리킨다.

[0473] **IV - 항체-약물-결합체 (ADC)**

[0474] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체-약물 결합체는 이에 제한되는 것은 아니지만, i) 항체의 핵친화기의 이가 링커와 반응에 이어서 약물의 핵친화기와 반응 또는 ii) 약물의 핵친화기의 이가 링커 시약과 반응에 이어서 항체의 핵친화기와 반응과 같은 당업자에게 숙지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0475] 항체 상의 핵친화기들은 이에 제한되는 것은 아니지만, N-말단 아민기들, 측쇄 아민기들 (예로, 라이신), 측쇄 티올기들, 및 항체가 글리코실화될 때 당 하이드록실 또는 아미노기들을 포함한다.

[0476] 약물 상의 핵친화기들은 이에 제한되는 것은 아니지만, 아민, 티올 및 하이드록실 기들, 바람직하게는 아민기들을 포함한다.

[0477] 아민, 티올 및 하이드록실 기들은 핵친화적이고 이에 제한되는 것은 아니지만, NHS 에스테르들, HOBt 에스테르들, 할로포르메이트들 및 산 할로겐화물들과 같은 활성 에스테르들; 할로아세타마이드들과 같은 알킬 및 벤질 할로겐화물; 알데하이드들; 케톤들; 카르복실; 및 말레이미드 기들을 포함하는 링커 분체들 및 링커 시약들 상의 전자친화성 기들과 공유 결합을 형성하도록 반응할 수 있다. 항체는 환원가능한 사슬간 디설파이드들, 예로 시스테인 연결들을 가질 수 있다. 항체는 DTT (디티오프레이톨)와 같은 환원 시약으로 처리에 의해 링커 시약들과 결합을 위한 반응성을 가지도록 만들어질 수 있다. 각각의 시스테인 연결은 이에 따라 이론적으로 두 개의 반응성 티올 친핵체들을 형성할 것이다. 추가적인 핵친화기들이 당업자에게 숙지된 임의의 반응을 통하여 항체 내로 도입될 수 있다. 비제한적인 예로서, 반응성 티올기들이 하나 이상의 시스테인 잔기들을 도입하여 항체 내로 도입될 수 있다.

[0478] 항체-약물 결합체들은 전자친화성 분체들을 도입하는 항체의 변형에 의해 역시 생산될 수 있고, 이는 링커 시약



에서 핵친화성 치환기들과 반응할 수 있다. 글리코실화 항체의 당들은 링커 시약들 또는 약물의 아민기와 반응할 수 있는 알데하이드 또는 케톤 기들을 형성하도록 산화될 수 있다. 결과로 얻은 이민 쉬프 염기 그룹들은 안정한 연결을 형성할 수 있거나, 안정한 아민 연결들을 형성하도록 환원될 수 있다. 한 가지 구현예에서, 글리코실화 항체의 탄수화물 부분의 갈락토스 또는 소듐 메타-페리오데이트 둘 중 하나와 반응은 약물 상의 적당한 기들과 반응할 수 있는 단백질에서 카르보닐 (알데하이드 및 케톤) 기들을 수득할 수 있다. 또 다른 구현예에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기들을 포함하는 단백질들은 소듐 메타-페리오데이트와 반응할 수 있고, 첫 번째 아미노산 대신에 알데하이드의 생산을 가져온다.

[0479] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체-약물 결합체는 약물-링커 분체의 제조에 의해 제조되고, 항체의 핵친화기 (예를 들면, 시스테인 분체의 SH기) 및 약물-링커 분체의 핵친화기 (예를 들면, 말레이미드) 간의 커플링이 이 어진다.

[0480] 1. 약물-링커

[0481] 약물-링커 분체는

[0482] - 약물과 링커,

[0483] - 링커의 합성을 완성하기 이전에 약물과 링커의 일부,

[0484] - 약물의 합성을 완성하기 이전에 약물의 일부 또는 전구체와 링커,

[0485] - 링커 및 약물의 합성을 완성하기 이전에 약물의 일부 또는 전구체와 링커의 일부:

[0486] 의 커플링에 의해 제조될 수 있다.

[0487] 커플링 반응들은 당업자에게 잘 숙지된 핵친화기 및 전자친화기 간의 반응들이다.

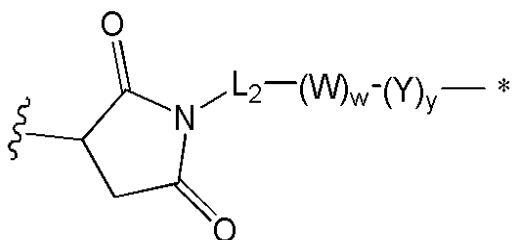
[0488] 핵친화기는 상세하게 아민, 티올 또는 하이드록실 기일 수 있다. 바람직한 구현예에서 이것은 일차 또는 이차 아민기이다.

[0489] 전자친화기는 선택적으로 활성화 형태 또는 활성화 카보네이트 에스테르 분체에서 카르복실산 기 (COOH)일 수 있다.

[0490] 카르복실산의 "활성화 형태"에 의하여 COOH 기능의 OH 분체는 아마이드 결합을 형성하여 화합물 LG-H를 방출하기 위하여 아미노기와 활성화 카르복실산 기의 커플링을 가능하게 하는 활성화 이탈기 (LG)로 치환되었던 카르복실산을 의미한다. 활성화 형태들은 활성화 에스테르들, 활성화 아마이드들, 무수화물들 또는 아실 염화물들과 같은 아실 할로겐화물들일 수 있다. 활성화 에스테르들은 카르복실산 기의 N-하이드록시벤조트리아졸 또는 N-하이드록시숙시니미드와 반응에 의해 형성된 유도체들을 포함한다.

[0491] "활성화 카보네이트 에스테르"에 의하여 OR이 카바메이트 분체를 형성하고 화합물 ROH를 방출하기 위하여 아미노기와 활성화 카보네이트 에스테르의 커플링을 가능하게 하는 좋은 이탈기를 나타내는 -OC(O)OR 분체를 포함하는 카보네이트 에스테르를 의미한다. 활성화 카보네이트 에스테르의 R기는 이에 제한되는 것은 아니지만, p-니트로-페닐, 펜타플루오로페닐, 2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일 및 벤질 기들, 바람직하게 p-니트로-페닐 및 펜타플루오로페닐 기들을 포함한다.

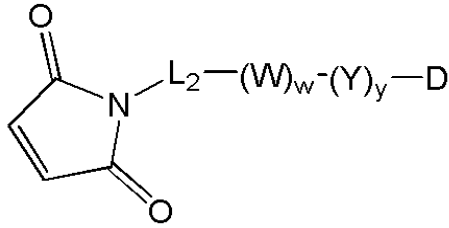
[0492] 링커가 다음의 화학식 (III)을 가질 때:



[0493]

[0494] (III)

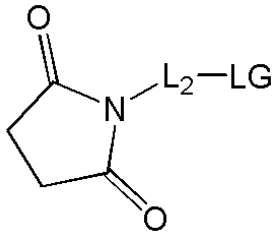
[0495] 약물-링커 분체는 다음 화학식 (IV)를 가지고:



[0496]

[0497] (IV)

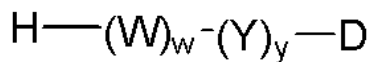
[0498] 약물-링커 분체의 합성의 마지막 단계는 일반적으로 다음 화학식 (V)의 화합물 간의 커플링이다:



[0499]

[0500] (V)

[0501] 여기서 L<sub>2</sub>는 이전에 정의된 바와 같고, LG는 이탈기 명확하게 염소와 같은 할로겐화물 또는 N-하이드록시숙시니미드로부터 유래된 기 및 다음 화학식 (VI)의 화합물을 나타낸다:



[0502]

[0503] (VI).

[0504] y = 1이고 Y = PAB-카르보닐일 때, 화학식 (VI)은 약물 (DH) 및 다음 화학식 (VII), 바람직하게 그의 보호된 형태 간의 커플링에 의해 제조될 수 있다:



[0505]

[0506] (VII)

[0507] 여기서 W 및 w는 이전에 정의된 바와 같고, R은 "활성화 카보네이트 에스테르"의 정의에서 정의된 바와 같고, G는 H 또는 보호기이다.

[0508] 화합물 (VII)의 화합물이 보호된 형태로 존재할 때, 탈보호의 최종 단계가 필요하다.

[0509] y = 0일 때, 화합물 (VI)은 화학식  $\text{H}-(\text{W})_w-\text{D}$  를 가지고, 여기서 (W)<sub>w</sub> 바람직하게 D가 아미노산 단위로 구성된다. 결론적으로, 화합물 (VI)은 이러한 경우에 당업자에게 잘 숙지된 통상적인 펩타이드 합성 방법에 의해 제조될 수 있다.

## [0510] 2. Ab-링커-약물

[0511] 본 발명에 따른 바람직한 구현에는 항체에 존재하는 시스테인 및 약물-링커 분체의 전자친화기 간의, 바람직하게는 약물-링커 분체에 존재하는 말레이미드 분체와 커플링으로 구성된다.

[0512] 말레이미드-시스테인 커플링은 당업자에게 잘 숙지된 방법들에 의해 수행될 수 있다.

[0513] 일반적으로, 항체들은 약물 분체와 연결될 수 있는 자유 및 반응성 시스테인 티올 기들을 적게는 있을 수 있더라도, 많이 포함하지 않는다. 항체들에서 대부분의 시스테인 티올 잔기들은 디설파이드 연결들로서 존재하고 디티오프레이톨 (DTT) 또는 TCEP와 같은 환원제로 부분적 또는 전체적 환원화 조건들 하에서 환원되어야 한다.



ADC의 부하 (약물/항체 비율)는 (i) 항체와 대비한 약물-링커 중간체 (D-L) 또는 링커 시약의 몰 과다를 제한하는 단계, (ii) 결합 반응 시간 또는 온도를 제한하는 단계, 및 (iii) 시스테인 티올 변형을 위한 부분적 또는 제한된 환원화 조건들:을 포함하는 여러 가지 서로 다른 방식으로 조절될 수 있다.

[0514] 인간 IgG들의 디설파이드 결합 구조는 현재 잘 확립되어 있다 (Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23에 리뷰됨). 사실상 4가지의 인간 IgG 서브클래스들, 즉 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 디설파이드 결합 구조들에 관하여 많은 유사점들 및 일정 차이점들이 존재한다. 모든 IgG 서브클래스들은 일정 불변하게 12개의 사슬내 디설파이드 연결들을 포함하고, 그들의 중쇄 및 경쇄 간에 형성되는 사슬내 디설파이드 결합들에 차이들이 존재한다. 각각의 사슬내 디설파이드 결합은 개별적 IgG 도메인, 예로 가변 (VL 또는 VH) 및 불변 (CL, CH1, CH2 및 CH3) 도메인들과 연관된다. 2개의 중쇄들은 그들의 힌지 부위에서 다양한 수의 디설파이드 연결들 IgG1 및 IgG4의 경우 2개, IgG2의 경우 4개 및 IgG3의 경우 11개:에 의해 연결된다. IgG1의 중쇄 및 경쇄는 경쇄의 마지막 시스테인 잔기 및 중쇄의 다섯 번째 잔기 간의 디설파이드 결합에 의해 연결되는 한편, 다른 서브클래스들, IgG2, IgG3 및 IgG4의 경우는, VH 및 CH1의 경계면에 위치하는 경쇄의 마지막 시스테인 잔기 및 중쇄의 세 번째 시스테인 잔기 간의 디설파이드 결합에 의해 경쇄가 중쇄와 연결된다. 이들 고전적인 구조들이 아닌 디설파이드 결합 구조들은 IgG2 및 IgG4를 위해 기술되어 왔다 (Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23에 리뷰됨). 사슬간 디설파이드 결합들은 높게 용매에 노출되고, 결론적으로 각각의 도메인 내의 엇갈린 베타-시트 구조들에 묻히고 용매에 노출되지 않는 사슬내 디설파이드 결합들보다 훨씬 더 큰 반응성을 가진다. 이들 이유들로, 항체 이소형에 상관없이, 커플링이 온화한 환원 이후에 노출된 사슬간 시스테인 잔기들 상에서 일어날 것이다. 각각의 사슬간 디설파이드 연결은 따라서 이론적으로는 두 개의 결합 부위들을 형성할 수 있다.

[0515] 추가적인 핵친화기들이 아민의 티올로의 전환을 가져오는 2-이미노티올란 (트라우드 시약)과 라이신의 반응을 통하여 항체들 내로 도입될 수 있다. 반응성 티올기들도 역시 1개, 2개 3개 또는 4개 이상의 시스테인 잔기들을 조작하여 (예로, 하나 이상의 가공된 시스테인 아미노산 잔기들을 포함하는 돌연변이 항체들을 제조하여) 항체 (또는 그의 단편) 내로 도입될 수 있다. 미국 특허 제 US 7521541호는 반응성 시스테인 아미노산들의 도입에 의해 항체들을 조작하는 것을 제시하고 있다.

[0516] 시스테인 아미노산들은 항체의 반응성 부위들에서 조작될 수 있고, 이는 사슬간 또는 분자간 디설파이드 연결들을 형성하지 않는다 (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8): 925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13): 2721-2729; 미국 특허 제 US 7521541호; 제 US 7723485호; 국제특허출원 제 20 09/052249호). 조작된 시스테인 티올들은 시스테인 조작된 항체들 및 약물 분체들과 ADC를 형성하도록 말레이미드 또는 알파-할로 아미드들과 같은 티올-반응성 전자친화기들을 가지는 본 발명의 링커 시약들 또는 약물-링커 시약들과 반응할 수 있다. 약물 분체의 위치는 이에 따라 설계되고, 통제되고, 알려질 수 있다. 약물 부하는 조작된 시스테인 티올 기들이 전형적으로 티올-반응성 링커 시약들 또는 약물-링커 시약들과 높은 수율로 반응하기 때문에 통제될 수 있다. 중쇄 또는 경쇄 상의 단일 부위에서 치환에 의해 시스테인 아미노산을 도입하도록 IgG 항체를 조작하는 것은 대칭적인 항체 상에 두 개의 새로운 시스테인들을 준다. 2 근처의 약물 부하는 결합 산물 ADC의 근접한 균질성으로 달성될 수 있다.

[0517] 항체의 하나 이상의 핵친화기 또는 전자친화기가 약물-링커 중간체 또는 링커 시약, 이어서 약물 분체 시약과 반응하는 곳에서, 그 다음 결과로 얻은 산물은 항체와 부착된 약물 분체들의 분포, 예로 1, 2, 3 등을 가진 ADC 화합물들의 혼합물이다. 중합체형 역상 (PLRP) 및 소수성 상호작용 (HIC)와 같은 액체 크로마토그래피 방법들이 약물 부하 수치에 의해 혼합물에서 화합물들을 분리할 수 있다. 단일한 약물 부하 수치 (p)로 ADC의 조제물들은 분리될 수 있지만, 이들 단일한 부하 수치 ADC들은 여전히 약물 분체들이 링커를 통해 항체 상의 서로 다른 부위들에서 부착될 수 있기 때문에 균질한 혼합물들일 수 있다.

[0518] 일정 항체-약물 결합체들의 경우, 약물 비율은 항체 상에서 부착 부위들의 수에 의해 제한될 수 있다. 높은 약물 부하는, 예로 약물 비율 > 5, 소정의 항체-약물 결합체들의 응집, 불용성, 독성 또는 세포 투과성의 손실을 유발할 수 있다. 전형적으로, 이론적인 최대값보다 적은 약물 분체들이 결합 반응 동안 항체와 결합된다.

[0519] 약물-항체 비율 (DAR)이라도 역시 약정되는 약물 부하는 세포 결합 제제 당 PBD 약물들의 평균 수이다.

[0520] 항체 IgG1 및 IgG4 이소형들의 경우, 약물들이 부분적인 항체 환원 이후에 시스테인들과 결합하는 곳에서, 약물 부하는 항체 당 1개부터 8개까지의 약물 (D)의 범위를 가질 수 있고, 예로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 및 8개의 약물 분체들이 항체와 공유적으로 부착된다.

[0521] 항체 IgG2 이소형의 경우, 약물들이 부분적인 항체 환원 이후에 시스테인들과 결합하는 곳에서, 약물 부하는 항

체 당 1개부터 12개까지의 약물 (D)의 범위를 가질 수 있고, 예로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 및 12개의 약물 분체들이 항체와 공유적으로 부착된다.

- [0522] ADC의 조성물들은 1개 내지 8개 또는 1개 내지 12개로부터 나온 약물들의 범위로 결합된 세포 결합 제제들, 예로 항체들의 집합들을 포함한다.
- [0523] 결합 반응들로부터 나온 ADC의 조제물들에서 항체 당 약물들의 평균 수는 UV, 역상 HPLC, HIC, 질량 분광분석법, 엘라이자 검정법 및 전기영동법과 같은 통상적인 수단에 의해 특성화될 수 있다.
- [0524] 비제한적인 구현예로서, 본 명세서에서 항체 c208F2와 결합이 제시된다. 이러한 경우에, 약물은 i) 서열번호 28의 서열의 경쇄의 경우, 214번 위치에서 Cys 잔기, 및 ii) 서열번호 23의 서열의 중쇄의 경우, 223, 229 및 232번 위치에서 Cys 잔기들로부터 선택되는 적어도 하나의 시스테인과 커플 형성된다.
- [0525] 비제한적인 구현예로서, 본 명세서에서 항체 c208F2와 결합이 제시된다. 이러한 경우에, 약물은 i) 서열번호 28의 서열의 경쇄의 경우, 214번 위치에서 Cys 잔기, 및 ii) 서열번호 23의 서열의 중쇄의 경우, 223, 229 및 232번 위치에서 Cys 잔기들로부터 선택되는 두 개, 세 개 또는 네 개의 시스테인들과 커플이 형성된다.
- [0526] 비제한적인 구현예로서, 본 명세서에서 항체 hz208F2 (var. 1)와 결합이 제시된다. 이러한 경우에, 약물은 i) 서열번호 39의 서열의 경쇄의 경우, 214번 위치에서 Cys 잔기, 및 ii) 서열번호 37의 서열의 중쇄의 경우, 223, 229 및 232번 위치에서 Cys 잔기들로부터 선택되는 적어도 하나의 시스테인과 커플이 형성된다.
- [0527] 비제한적인 구현예로서, 본 명세서에서 항체 hz208F2 (var. 3)와 결합이 제시된다. 이러한 경우에, 약물은 i) 서열번호 40의 서열의 경쇄의 경우, 214번 위치에서 Cys 잔기, 및 ii) 서열번호 38의 서열의 중쇄의 경우, 223, 229 및 232번 위치에서 Cys 잔기들로부터 선택되는 두 개, 세 개 또는 네 개의 시스테인들과 커플이 형성된다.
- [0528] 대안은 라이신 커플링에 있다. 항체는 예를 들면 약물-링커 중간체 (D-L) 또는 링커 시약과 반응하지 않는 많은 라이신 잔기들을 포함할 수 있다. 대부분의 반응성 라이신 기들만이 아민-반응성 링커 시약과 반응할 수 있다. 또한, 대부분의 반응성 시스테인 티올기들만이 티올-반응성 링커 시약과 반응할 수 있다.
- [0529] 본 발명의 화합물들이 라이신들과 결합하는 곳에서, 약물 부하는 40개, 20개, 10개 또는 8개의 상부 한계가 바람직할 수 있더라도, 세포 항체 당 1개부터 80개까지의 약물들 (D)의 범위를 가질 수 있다. ADC의 조성물들은 1개부터 80개까지, 1개부터 40개까지, 1개부터 20개까지, 1개부터 10개까지 또는 1개부터 8개까지 범위의 약물들과 결합된 세포 결합 제제들, 예로 항체들의 집합들을 포함한다.
- [0530] 본 발명에 따른 화학식 (I)의 ADC는 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 일 수 있다.
- [0531] 본 발명에서 "약제학적으로 허용가능한"에 의하여 일반적으로 안전하고, 비-독성이고 생물학적이거나 달리 바람직하지 않지 않은 약제학적 조성물의 제조에 사용될 수 있고, 수의학적 사용에 뿐만 아니라 인간 약제학적 사용에 허용가능한 것을 의미한다.
- [0532] 화합물의 "약제학적으로 허용가능한 염"에 의하여 본 명세서에서 정의된 바와 같이 약제학적으로 허용가능하고, 부모 화합물의 원하는 약학적 활성을 가지는 염을 의미한다.
- [0533] 약제학적으로 허용가능한 염들은 명확하게
- [0534] i) 염산, 브롬산, 인산, 황산 및 유사한 산들과 같은 약제학적으로 허용가능한 무기산들로 형성되거나; 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프로피온산, 숙신산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코브산, 말레산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 스테아르산, 락트산 및 유사한 산들과 같은 약제학적으로 허용가능한 유기산들로 형성된 약제학적으로 허용가능한 산의 첨가 염들; 및
- [0535] ii) 부모 화합물에 존재하는 산 양성자가 금속성 이온 예로 알칼리 금속 이온, 알칼리-토금속 이온 또는 알루미늄 이온으로 치환되거나; 라이신 및 아르기닌 등과 같은 약제학적으로 허용가능한 유기 염기; 또는 수산화나트륨, 겟물 및 수산화칼슘 등과 같은 약제학적으로 허용가능한 무기 염기와 조화될 때 형성되는 약제학적으로 허용가능한 염기의 첨가 염들;
- [0536] 을 포함한다.
- [0537] 이들 염들은 염기 또는 산 기능을 포함하는 본 발명의 화합물들 및 해당하는 산들 또는 염기들로부터 통상적인 화학적 방법들을 사용하여 제조될 수 있다.

- [0538] **V - 치료**
- [0539] 마지막으로, 본 발명은 약물로서, 상세하게 암의 치료에 사용되는 상기에 기술된 바와 같은 ADC에 관한 것이다.
- [0540] 또한 본 발명의 주제는 의약적 산물로서, 상세하게 암의 치료에 사용되는 상기에 기술된 바와 같은 화학식 (I) 화합물이다.
- [0541] 본 발명은 또한 의약적 산물을 생산하기 위한, 상세하게 암의 치료를 목적으로 하는 상기에 기술된 바와 같은 화학식 (I) 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0542] 본 발명은 또한 상기에 기술된 바와 같은 화학식 (I) 화합물의 유효량의 이를 필요로 하는 사람에게 투여 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0543] 암들은 바람직하게 그들의 표면에서 단백질 IGF-1R의 전부 또는 일부를 발현하거나 과다-발현하는 종양성 세포들을 포함하는 IGF-1R-관련된 암들을 통하여 선택될 수 있다.
- [0544] 보다 상세하게, 상기 암들은 유방암, 결장암, 식도암, 간세포암, 위암, 신경아교종, 폐암, 흑색세포종, 골육종, 난소암, 전립선암, 횡문근육종, 신장암, 갑상샘암, 자궁내막암, 신경집종, 신경모세포종, 구강 편평세포암, 중피종, 평활근육종 및 임의의 약물 저항성 현상들 또는 암들이다.
- [0545] 애매함의 회피를 위해, 약물 저항성 IGF-1R-발현 암들에 의하여, 처음부터 IGF-1R을 발현하는 저항성 암들뿐만 아니라 처음에는 IGF-1R를 발현하거나 과다발현하지 않지만 일단 그들이 이전의 치료에 저항성을 가지게 되면 IGF-1R를 발현하는 암들인 것으로 이해되어야 한다.
- [0546] 본 발명의 또 다른 주제는 본 명세서에서 기술된 바와 같은 ADC를 포함하는 억제학적 조성물이다.
- [0547] 보다 상세하게, 본 발명은 적어도 부형제 및/또는 억제학적으로 허용가능한 운반체와 함께 본 발명의 ADC를 포함하는 억제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0548] 본 발명의 상세한 설명에서, 용어 표현 "억제학적으로 허용가능한 운반체" 또는 "부형제"는 이차 반응들을 유발하지 않고, 예를 들면 활성을 가진 화합물(들)의 투여의 용이화, 신체에서 그의 수명에서 및/또는 효능에서 증가, 용액에서 그의 용해도의 증가 또는 이외에도 그의 보존에서 개선을 허용하는, 억제학적 조성물 내로 진입하는 화합물 또는 화합물들의 조합을 가리키도록 의도된다. 이들 억제학적으로 허용가능한 운반체들 및 부형제들은 잘 숙지되어 있고, 선택된 활성을 가진 화합물(들)의 특성의 기능 및 투여의 방식으로 당업자에 의해 적용될 것이다.
- [0549] 활성 성분은 통상적인 억제학적 담체들과의 혼합물에서 투여의 단위 형태들로 동물들에게 또는 인간들에게 투여될 수 있다. 적합한 투여의 단위 형태들은 경구적 경로를 통한 형태들 및 비경구적 경로 (피하, 피부내, 근육내 또는 정맥내)를 통한 투여를 위한 형태들을 포함한다.
- [0550] 경구적 투여를 위한 고체 조성물들로서, 정제들, 환들, 분말들 (경질 또는 연질 젤라틴 캡슐들) 또는 과립들이 사용될 수 있다. 이들 조성물들에서, 본 발명의 활성 성분은 아르곤 증기에서 전분, 셀룰로스, 슈크로스, 락토스 또는 실리카와 같은 하나 이상의 불활성 희석제들과 혼합된다. 이들 조성물들은 또한 희석제들이 아닌 물질들, 예를 들면 마그네슘 스테아레이트 또는 탈크, 채색제, 코팅제 (코팅된 정제들) 또는 바니쉬와 같은 하나 이상의 활택제들도 포함한다.
- [0551] 비경구적 투여를 위한 무균의 조성물들은 바람직하게 수용성 또는 비-수용성 용액들, 현탁액들 또는 에멀전들일 수 있다. 용매 또는 운반체로서, 물, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일들 상세하게 올리브유, 주사가능한 유기 에스테르들 예로 에틸 올레이트 또는 기타 적합한 유기 용매들이 사용될 수 있다. 이들 조성물들은 아췌만트들 상세하게 습윤화, 등장성, 에멀전화, 분산화 및 안정화 제제들도 역시 포함할 수 있다. 무균화는 다수의 방식으로, 예를 들면 여과를 위생화하여, 무균화 제제들을 조성물 내로 도입하여, 방사선 조사에 의해 또는 가열에 의해 수행될 수 있다. 그들은 또한 무균의 물 또는 임의의 다른 주사가능한 무균의 배지에서 사용 시점에 용해될 수 있는 고체 무균의 조성물들의 형태로 제조될 수 있다.
- [0552] 바람직하게, 이들 ADC들은 전신적 경로에 의해, 상세하게는 정맥내 경로에 의해, 근육내, 피부내, 복강내 또는 피하 경로에 의해, 또는 경구적 경로에 의해 투여될 것이다. 더욱 바람직한 방식으로, 본 발명에 따른 ADC들을 포함하는 조성물은 연속적 방식으로 여러 번 투여될 것이다.
- [0553] 따라서 본 발명은 또한 i) 본 발명에 따른 항체-약물-결합체 및/또는 본 발명에 따른 억제학적 조성물 및 ii)

상기 항체-약물-결합체 및/또는 조성물이 배치되는 주사기, 바이알 또는 앰플을 적어도 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0554] 그들의 투여의 방식들, 용량들 및 최적의 약제학적 형태들은, 예를 들면 환자의 연령 또는 체중, 그/그녀의 일반 병태의 중증도, 치료에 대한 내성 및 주목된 부작용들과 같은 일반적으로 환자에게 적응된 치료의 확립에서 고려되는 판정기준들에 따라 결정될 수 있다.

[0555] 본 발명의 다른 특징들 및 장점들은 실시예들 및 하기에 간단한 설명이 주어진 도면들과 함께 상세한 설명과 계속하여 기술된다.

### 도면의 간단한 설명

[0556] 도 1a 내지 1c는 FACS 분석들에 의해 인간 미가공 IGF-1R과 항체의 결합을 나타낸 것이다. 도 1a는 MCF-7 세포주에서 역가측정 곡선을 나타낸다. MFI는 형광 강도의 평균을 나타낸다. 도 1b는 MCF-7 세포주에서 마우스 및 키메라 항-IGF-1R 항체들 둘 다의 EC<sub>50</sub>을 나타낸다. 도 1c는 MCF-7 세포주에서 키메라 항-IGF-1R 항체의 B<sub>3</sub>대를 나타낸다.

도 2a 및 2b는 형질전환 대비 미형질전환된 세포들을 사용한 hIGF-1R 인식의 평가를 나타낸 것이다. 도 2a는 IGF-1R<sup>+</sup> 세포주에서 역가측정 곡선들을 나타낸다. MFI는 형광 강도의 평균을 나타낸다. 도 2b는 IGF-1R<sup>-</sup> 세포주에서 키메라 항-IGF-1R Ab들의 결합을 나타낸다.

도 3a 및 3b는 형질전환된 세포들을 사용한 Ab들의 IGF-1R 대비 hIR과 특이도의 평가를 나타낸 것이다. 도 3a는 hIR<sup>+</sup> 형질전환된 세포주에서 마우스 항-IGF-1R Ab의 결합을 나타낸다. 도 3b는 IR<sup>+</sup> 세포주에서 키메라 항-IGF-1R Ab의 결합을 나타낸다. MFI는 형광 강도의 평균을 나타낸다. GR05 항-hIR Mab (캘바이오캡사)가 양성 대조군으로서 도입되었다.

도 4는 IM-9 세포주에서 마우스 항-IGF-1R Ab의 결합을 나타낸 것이다. MFI는 형광 강도의 평균을 나타낸다. GR05 항-hIR Mab는 양성 대조군으로서 도입되었다.

도 5a 내지 5c는 원숭이 IGF-1R의 인식의 평가를 나타낸 것이다. 도 5a는 COS-7 세포주에서 키메라 항-IGF-1R Ab의 역가측정 곡선들을 나타낸다. MFI는 형광 강도의 평균을 나타낸다. 도 5b는 COS-7 세포주에서 마우스 및 키메라 항-IGF-1R 항체들 둘 다의 EC<sub>50</sub>을 나타낸다. 도 5c는 NIH 3T3 형질전환된 세포들 hIGF-1R<sup>+</sup> 및 COS-7 세포주들 둘 다에서 키메라 항-IGF-1R 항체들의 EC<sub>50</sub>을 나타낸다.

도 6은 카르복시메틸 텍스트란 기질에 화학적으로 이식된 11,000 RU 이상의 마우스 항-태그 His 항체로 활성화된 CM5 칩을 사용하여 SRP 기술학 기초한 비아코아 X100으로 획득된 센서그램들을 나타낸 것이다. 실험은 전개 및 시료 희석 완충액으로서 HBS-EP+를 사용하여 25°C에서 30 μL/분의 유속으로 전개되었다. 도면은 분석물들의 첫 번째 주입 시작 시에 X-축 그리고 이러한 첫 번째 주입 직전에 정의된 기저선에 의해 y-축 상에 정렬된 4가지 독립적인 센서그램들의 중첩을 보여주었다. 재조합 용해성 IGF-1R의 인간 기초한 서열의 포집으로 획득된 센서그램들은 다이아몬드들로 표시된다. 재조합 용해성 IGF-1R의 머카크 원숭이 기초한 서열의 포집으로 획득된 센서그램들은 삼각형들로 표시된다. 흰색 기호들은 공시료 주기들에 해당하고 (전개 완충액의 5번 주입들), 검은색 기호들은 c208F2의 증가하는 농도들 범위 (5, 10, 20, 40 및 80 nM)의 주입에 해당한다.

도 7은 IGF-1과 비교하여 수용체 인산화에 미치는 항-hIGF-1R 항체들의 본질적인 효과의 평가를 나타낸 것이다.

도 8은 마우스 항-hIGF-1R에 의해 IGF-1과 반응한 IGF-1R 인산화의 저해를 나타낸 것이다.

도 9는 항-IGF-1R 항체들의 세포 표면 신호 강도가 37°C에서 세포 배양 이후에 저하-조절되는 것을 나타낸 것이다. MCF-7 세포들은 4°C 또는 37°C에서 4시간 동안 10 μg/mL의 Ab들과 배양되었다. 도면은 ΔMFI를 나타낸다.

도 10a 및 10b는 항체 표면 붕괴를 나타낸 것이다. 세포 표면 결합 항체는 37°C에서 10, 20, 30, 60 및 120분 이후에 평가되었다. 도 10a는 4°C에서 측정된 신호 강도와 비교하여 잔여 IGF-1R %를 나타낸다. 도 10b는 프리즘 소프트웨어를 사용하고 지수적 붕괴 적정을 사용하는 반감기 계산을 나타낸다.

도 13은 항-hIGF-1R Ab들이 내재화되는 것을 나타낸 것이다. 세포들은 10 μg/mL의 마우스 Ab들과 37°C에서 0, 30 또는 60분 동안 배양되었다. 세포들은 투과화되는지 여부와 상관없이 이차 항-마우스 IgG-알렉사 488과 배양되었다. 막은 투과화 없는 신호 강도에 해당한다. 전체는 세포 투과화 이후의 신호 강도에 해당하고, 세포질은

내재화된 Ab에 해당한다. 각각의 평가된 항체의 명칭은 각각의 그래프 꼭대기 위에 도시된다.

도 12a 및 도 12b는 Ab 내재화의 영상화를 나타낸 것이다. 도 12a는 MCF-7 세포들이 m208F2와 4℃에서 20분 동안 배양되었고, 배양 이전에 (W) 37℃에서 15분 (X), 30분 (Y) 및 60분 (Z) 동안 세척되었다. 세포들은 고정되고 투과화되었다. m208F2 Ab는 항-마우스 IgG 알렉사 488를 사용하여 시현되었으며, Lamp-1은 토끼 항-Lamp-1 항체 및 이차 항-토끼 IgG 알렉사 555를 사용하여 시현되었다. 도 12b는 MCF-7 세포들이 각각의 테스트될 나머지 항-hIGF-1R 마우스 항체들과 37℃에서 30분 동안 배양되고 상기에 기술된 바와 같이 염색되었다. 공동정착 (colocalization)은 이미지 J 소프트웨어의 공동정착 하이라이터 플러그-인을 사용하여 확인되었다.

도 13은 항체 분해에서 리소좀 경로의 관여를 나타낸 것이다.

도 14는 산성 pH가 다섯 가지의 마우스 항-IGF-1R 항체들의 결합 능력을 감소시키는 점을 나타낸 것이다.

도 15a 내지 15d는 c208F2 Mab의 첫 번째 인간화 형태의 결합 특징을 나타낸 것이다. hz208F2 VH3/VL3 mAb의 결합 특성들은 인간 세포주 MCF-7, 원숭이 세포주 COS-7 및 인간 인슐린 수용체를 발현하는 형질전환된 마우스 세포주에서 평가되었다. 마우스 및 키메라 208F2 mAb들 둘 다의 결합은 동시에 평가되었다. 항-hIR 항체 클론 GR05가 형질전환된 세포주에서 hIR의 발현을 검증하는 데 사용되었다.

도 16은 hz208F2 VH3/VL3 항체 표면 붕괴를 나타낸 것이다.

도 17은 전개 완충액으로서 HBS-EP+를 30  $\mu$ L/분의 유속으로 사용하고, 카르복시메틸 텍스트란 기질에 화학적으로 이식된 약 12,000 RU의 마우스 항-태그 His 단일클론 항체로 둘 다의 플로우셀 상에 활성화된 CM5 칩을 사용하는 SRP 기술학 기초한 비아코아 X100 장치를 사용하여 온도 25℃에서 획득된 센서그램들의 중복을 나타낸 것이다. 각각의 센서그램들 (첫 번째는 삼각형들로 표시되고 두 번째는 다이아몬드들로 표시됨)은 완전한 주기에 해당한다:

1. 두 번째 플로우셀 상에 재조합 h-IGF-1R (10  $\mu$ g/mL) 용액의 1분 동안 주입.
2. 첫 번째 센서그램을 위해, 각각 90초 동안 전개 완충액의 5번 주입들,

두 번째 센서그램을 위해, 각각 90초 동안 항-IGF-1R c208F2 항체 용액들의 증가하는 농도들 범위로 5번 주입들.

3. 해리 역학적 속도들의 결정을 위한 300초의 지연.
4. 10 mM 글리신, HCl pH 1.5 완충액의 45초 동안 주입에 의한 표면의 재생.

도 18은 공시료 센서그램 대비 항-IGF-1R c208F2 용액들의 증가하는 농도들 범위로 획득된 센서그램의 차감에 해당하는 센서그램을 나타낸 것이다. 이는 회색으로 표현된다. 이론적인 센서그램은 다음의 변수들을 가진 1 : 1 모델에 해당한다:  $k_{on} = (1.206 \pm 0.036) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $k_{off} = (7.81 \pm 0.18) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ,  $R_{최대} = 307.6 \pm 0.3$ . RU는 얇은 검은색 선으로 표현된다. c208F2의 계산된 농도들이 그래프 상에서 보고된다: 최고 농도 (24 nM)만이 상수로써 고려된다.

도 19는 해리 상수들이 각각의 항체의 4번 시험들 진행의 평균에 해당하고, pM 단위로 표현되는 비율:  $k_{off}/k_{on} \times 10^{12}$ 에 해당하는 것을 나타낸 것이다. 오차 막대들은 표준 오차 ( $n = 4$ )에 해당한다.

도 20은 반감기들이 각각의 항체의 4번 시험들 진행의 평균에 해당하고, 시간 단위로 표현되는 비율:  $\ln(2)/k_{off}/3600$ 에 해당하는 점을 나타낸 것이다. 오차 막대들은 표준 오차 ( $n = 4$ )에 해당한다.

도 21은 세 가지의 서로 다른 화합물들과 결합된 항-IGF-1R의 세포독성을 나타낸 것이다. 다섯 가지의 키메라 항체들 항-IGF-1R이 E-13, G-13 또는 F-63 중 어느 하나와 결합되었다. 부적절한 항체 c9G4도 역시 동일한 화합물들과 결합되었다.

도 22a 내지 22c는 MCF-7 이중이식 모델에서 c208F2-E-13 (도 22a), c208F2-G-13 (도 22b) 및 c208F2-F-63 (도 22c)의 생체내 평가를 나타낸 것이다.

도 23a 및 23b는 MCF-7 이중이식 모델에서 ADC들 대조군 (c9G4-E13 및 c9G4-G-13)과 비교하여 c208F2-E-13 (도 23a) 및 c208F2-G-13 (도 23b) 둘 다의 생체내 평가를 나타낸 것이다.

도 24a 및 24b는 산성 pH가 인간화 IGF-1R 항체들 hz208F2 H076/L024 (A) 및 hz208F2 H077/L018 (B)의 결합 능



력을 감소시키는 점을 나타낸 것이다.

도 25는 정상 세포들에서 c208F2-G-13의 세포독성의 평가를 나타낸 것이다.

도 26은 G-13과 결합된 hz208F2의 인간화 변이체들의 세포독성을 나타낸 것이다. 부적절한 항체 c9G4도 역시 동일한 화합물과 결합된다.

도 27은 MCF-7 이중이식 모델에서 208F2-G-13의 인간화 형태들 대비 c208F2-G-13의 생체내 평가를 나타낸 것이다.

도 28a 및 28b는 MCF-7 이중이식 모델에서 한 번 주사와 대비하여 4번 주사된 c208F2-G-13 (도 28a) 또는 hz208F2-4-G-13 (도 28b) 둘 중 하나의 생체내 평가를 나타낸 것이다.

도 29a 및 29b는 CaOV-3 이중이식 모델에서 c208F2-E-13 (도 29a) 및 c208F2-G-13 (도 29b)의 생체내 평가를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0557] 실시예 1: IGF-1R ECD에 대해 상승된 마우스 항체들의 생산

[0558] 인간 IGF-1 수용체 (hIGF-1R)의 인간 세포의 도메인 (ECD)에 대한 마우스 단일클론 항체들 (Mab들)을 생산하기 위하여, 5마리의 BALB/c 마우스들이 10 µg의 rhIGF-1R 단백질 (R&D 시스템사, 카탈로그 번호 391-GR)로 3번 피하로 (s.c.) 면역접종되었다. 대안으로서, 10 µg의 IGF-1R의 마우스 세포의 도메인 (ECD) (R&D 시스템사, 카탈로그 번호 6630-GR/Fc)의 3번 추가적인 면역접종들이 일정 동물들 상에서 수행되었다. 첫 번째 면역접종은 완전한 프런트 아주반트 (시그마사, 미국 MD 세인트루이스시)의 존재 시 수행되었다. 불완전한 프런트 아주반트 (시그마사)가 면역접종들 이후에 첨가되었다. 융합 이전 3일째, 면역접종된 마우스들은 복강내로 (i.p.) 10 µg의 rhIGF-1R 단백질 (연구실 산물)로 추가자극되었다. 다음으로, 비장세포들 및 림프세포들이 각각 비장의 관류에 의해 그리고 말단 림프절들의 분쇄에 의해 제조되었고, 5마리의 면역접종된 마우스들 중 1마리로부터 (모든 마우스의 혈청들의 역가측정 이후에 선택됨) 수확되었으며, SP2/0-Ag14 골수종 세포들 (ATCC사, 미국 MD 록빌시)와 융합되었다. 융합 프로토콜은 코홀러 및 밀스타인 (Kohler and Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975)에 의해 기술되어 있다. 다음으로 융합된 세포들은 HAT 선별에 착수된다. 일반적으로, 특히 마우스 기원의 단일클론 항체들 또는 그들의 기능적 단편들의 제조를 위해, 상세하게는 "항체들" 매뉴얼 (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 콜드 스프링 하버 연구소, 콜드 스프링 하버 NY, pp. 726, 1988)에서 기술된 기법들을 참조하는 것이 가능하다. 융합 이후 대략 10일째, 하이브리드 세포들의 콜로니들이 검색되었다. 일차 검색을 위해, 인간 유방 MCF7 종양 세포들 (ATCC) 및 원숭이 IGF-1R을 그들의 세포 표면 상에 발현하는 원숭이 COS7 세포들 (아프리카 녹색 원숭이 간-SV40 형질전환됨)을 사용하여 하이브리도마들의 상청액들이 FACS에 의해 rhIGF-1R ECD 단백질에 대해 증가된 Mab들의 분비를 고려하여 평가되었다. 보다 명확하게, 유동세포측정법에 의한 선별을 위해, 10<sup>5</sup>개 세포들 (MCF7 또는 COS7 둘 중 하나)이 4℃에서 1% BSA 및 0.01% 소듐 아자이드를 포함하는 PBS (FACS 완충액)로 96 웰-플레이트의 각 웰에 도말되었다. 2,000 rpm에서 2분 원심분리 이후에, 완충액이 제거되었고 테스트될 하이브리도마 상청액들이 첨가되었다. 4℃에서 20분의 배양 이후에, 세포들은 2회 세척되었으며, FACS 완충액 (#A11017, 몰레cula 프로브사, 미국 유진시)으로 1/500 희석된 알렉사 488-결합 염소 항-마우스 항체가 첨가되었고, 4℃에서 20분 동안 배양되었다. FACS 완충액으로 최종 세척 이후에, 세포들은 각각의 튜브에 40 µg/mL의 최종 농도로 프로피디움 요오드의 첨가 이후에 FACS (팩스칼리버, 벅튼-디킨슨사)에 의해 분석되었다. 세포들 단독 및 이차 알렉사 488-결합 항체로 배양된 세포들을 포함하는 웰들이 음성 대조군으로서 포함되었다. 이소형 대조군들이 각각의 실험에 사용되었다 (시그마사, 제품 번호 M90351MG). 적어도 5,000개의 세포들이 형광 강도 (MFI)의 평균 수치를 계산하도록 평가되었다.

[0559] 추가적으로 내재화 검정법이 내재화 항체들만을 선별하기 위하여 수행되었다. 본 검정법을 위해, MCF7 종양 세포주가 페놀 레드 없이 1% L-글루타민 및 10% FACS를 가진 RPMI 1640로 실험 전 3일 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 트립신을 사용하여 탈착되었고, 4 × 10<sup>5</sup>개 세포/mL 농도의 100 µL의 세포 현탁액이 페놀 레드 없이 1% L-글루타민 및 5% FBS를 가진 RPMI 1640으로 96 웰 플레이트에 도말된다. 2,000 rpm에서 2분 원심분리 이후에, 세포들은 50 µL의 하이브리도마 상청액 또는 대조군 항체 용액들 (1 µg/mL에서 양성 및 이소형 대조군) 둘 중 하나로 재현탁되었다. 4℃에서 20분 배양 시간 이후에, 세포들은 2,000 rpm에서 2분 원심분리되었고, 차가운 (4℃) 또는 따뜻한 (37℃) 둘 중 하나의 완전 배양 배지에서 재현탁되었다. 다음으로 세포들은 4℃ 또는 37℃ 둘 중 하나에서 2시간 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 FACS 완충액으로 3회 세척되었다. 알렉사 488-표지된

염소 항-마우스 IgG 항체가 20분 동안 배양되었고 세포들은 프로피디움 요오드 음성 세포 집단에 관한 FACS 분석 이전에 3회 세척되었다.

[0560] FACS 분석 이후에, 두 가지 변수들이 결정되었다: (i) 37°C에서 하나의 하이브리도마 상청액과 배양된 세포들로 획득된 형광 신호들과 4°C에서 배양된 세포들의 표면 상에서 검출된 형광 신호와의 차이 및 (ii) 세포 표면 상에 잔여 IGF-1R의 백분율.

[0561] 잔여 hIGF-1R의 백분율이 다음과 같이 계산되었다:

[0562] 
$$\text{잔여 IGF-1R \%} = (\text{MFI}_{\text{Ab } 37^{\circ}\text{C}} / \text{MFI}_{\text{Ab } 4^{\circ}\text{C}}) \times 100$$

[0563] 또한 3가지의 엘라이자들이 재조합 인간 (hIGF-1R) 및 마우스 (mIGF-1R) 단백질을 상, 및 재조합 인간 인슐린 수용체 (hIR) 단백질 상에 항체들의 결합을 연구하도록 수행되었다. rh- 및/또는 rm-IGF-1R 상의 결합 및 rhIR 상의 미결합을 보여주는 항체를 분비하는 하이브리도마가 보유되었다. 간략하게, 96-웰 엘라이자 플레이트들 (Costar 3690, 코닝사, 미국 뉴욕)이 10 uL/웰의 PBS에 넣은 0.6 ug/mL의 rhIGF-1R 단백질 (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 391-GR) 또는 1 ug/mL의 rmIGF-1R 단백질 (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 6630-GR/Fc) 또는 1 ug/mL의 rhIR 단백질 (R & D 시스템사, 카탈로그 번호 1544-IR/CF) 중 어느 하나와 4°C에서 밤샘 코팅되었다. 다음으로 플레이트들은 0.5% 젤라틴 (#22151, 세르바 전기영동사, 독일 하이델베르크)을 포함하는 PBS로 37°C에서 2시간 동안 차단되었다. 일단 포화 완충액이 플레이트들을 털어 제거되면, 100 uL의 각 상청액 희석물이 각각의 웰로 첨가되었고 (미희석된 하이브리도마 상청액 또는 상청액의 일련 희석물들) 37°C에서 1시간 동안 배양되었다. 3회 세척을 이후에, 100 uL의 호스래디쉬 퍼옥시다제-결합된 다중클론 염소 항-마우스 IgG (#115-035-164, 잭슨 이뮤노-리서치 연구소사, 미국 PA 웨스트그로브)가 0.1% 젤라틴 및 0.05% 트윈 20 (w:w)을 포함하는 PBS로 1/5,000 희석되어 37°C에서 1시간 동안 첨가되었다. 다음으로 엘라이자 플레이트들이 3회 세척되었으며 TMB (#UP664782, 옵티마사, 프랑스 엔테르침) 기질이 첨가되었다. 상온에서 10분 배양 이후에, 반응은 1 M 황산을 사용하여 정지되었고, 450 nm에서 광학 밀도가 측정된다.

[0564] 관심 있는 항체를 분비하는 하이브리도마는 증식되었고 제한 희석법에 의해 클론되었다. 일단 이소형이 결정되면, 각각의 암호의 한 가지 클론이 증식되었고 냉동되었다. 관심 있는 각각의 항체는 추가 특성화를 위해 CellLine (인테그라 바이오사이언스사)이라고 명명된 시험관내 생산 시스템에서 생산되었다.

[0565] FACS 분석들에 의한 결합 특이도를 어드레싱하는 추가적인 검정법들이 IM9 세포들 (인간 IR을 발현하는 B 림프 세포들)뿐만 아니라 hIGF-1R 형질전환된 세포들 대비 미형질전환 세포들 상에서 수행되었다.

[0566] 선별된 항체들에 해당하는 데이터들 모두는 표 7에 요약되어 있고, 다섯 가지의 선별된 항체들이 MCF-7 유방암 세포들 또는 형질전환된 세포들 둘 중 하나에서 발현된 미가공 인간 IGF-1R을 강하게 인식하는 점을 확인하였다. 그들은 COS-7 세포들에서 원숭이 IGF-1R도 역시 인식한다. 이들 항체들은 IM9 세포들에서 높게 발현된 인간 인슐린 수용체와는 교차반응하지 않는다. 이들 항체들이 엘라이자 플레이트들에 직접적으로 코팅될 때 rhIGF-1R ECD를 희미하게 인식하는 점도 주목되어야 한다.

표 7

hybridoma name	isotype	CM CM	ELISA (SNT at 5 µg/ml)			MCF7 Internalisation Assay (SNT at 5 µg/ml)			FACS (SNT at 5µg/ml)			
			D.O 450 nm			MFI			MFI			
			rh IGF-1R	rh IGF-1R	rh Insulin R	4°C	37°C	% remaining rh IGF1R Δ (MFI 4°C - MFI 37°C)	IM9 (h.IR <sup>+</sup> )	Cos-7 (monkey IGF1R <sup>+</sup> )	TI hIGF1R <sup>+</sup> (h IGF1R)	non TI cells (h IGF1R)
208F2	IgG1 K	I-4757	0.163	0.099	0.140	355	94	27	4	106	2197	22
212A11	IgG1 K	I-4773	0.232	0.102	0.141	390	106	284	7	125	2187	23
213B10	IgG1 K	I-4774	0.399	0.127	0.110	386	115	271	7	122	2055	23
214F8	IgG1 K	I-4775	0.349	0.102	0.115	386	111	275	7	132	2137	20
219D6	IgG1 K	I-4736	0.329	0.112	0.106	349	106	243	7	114	2110	21

[0567]

[0568] 실시예 2: FACS 분석들에 의한 인간 미가공 IGF-1R과의 항체 결합

[0569] 다섯 가지의 마우스 IGF-1R 항체들이 키메라화되었다. 마우스 및 키메라 IGF-1R 항체들 둘 다의 결합 특성들이 인간 MCF-7 유방 샘암종 세포주 (ATCC#HTB-22)에서 증가하는 항체 농도들을 사용하여 FACS에 의해 평가되었다. 이러한 목적을 위해, 세포들 ( $1 \times 10^6$  개 세포들/mL)이 FACS 완충액 (PBS, 0.1% BSA, 0.01% NaN<sub>3</sub>)에서 IGF-1R 항체들과 4°C로 20분 동안 배양되었다. 다음으로 3회 세척되었으며, FACS 완충액으로 3회 세척되기 이전에 암소에서 4°C로 추가 20분 동안 적당한 알렉사 488과 결합된 이차 항체와 배양되었다. 항-IGF-1R 항체들의 결합은 생존가능한 세포들에서 즉시 수행되었고, 이는 프로피디움 요오드 (죽은 세포들을 염색함)를 사용하여 확인되었다. 각각의 항체로 획득된 신호 강도의 최대값은 B<sub>최대</sub>로서 설계되었고, 형광 강도의 평균 (MFI)으로 표현된다.



몰 농도 (M)로 표현되는 결합의  $EC_{50}$ 는 비선형 회귀 분석 (GraphPad 프리즘 4.0)을 사용하여 계산되었다.

[0570] 각각의 마우스 또는 키메라 Ab의 역가측정 곡선은 생산된 항체들 모두가 전형적인 포화 프로파일로 미가공 IGF-1R 형태를 인식할 수 있는 점을 보여주었다 (도 1a). 항체들의 순위를 매기고 마우스 및 키메라 Ab들 둘 다의 결합 특성들을 비교하기 위하여, 각각의 화합물의 결합  $EC_{50}$ 가 비선형 회귀 분석을 사용하여 결정되었다. 각각의 마우스 Ab의  $EC_{50}$ 의 해당하는 키메라 형태와의 비교는 2가지 형태들이 동일한 결합 특성들을 전사하는 점을 확인하였고, Ab 키메라화가 IGF-1R 인식에 영향을 주지 않았던 점을 보여준다 (도 1b 및 1c).  $EC_{50}$  및  $B_{\text{최대}}$  수치들은 표 8에 요약된다.

표 8

AC	$B_{\text{max}}$	$EC_{50}$
<b>c208F2</b>	981	6.7E-10
<b>c212A11</b>	991	6.7E-10
<b>c214F8</b>	1069	5.0E-10
<b>c219D6</b>	993	4.7E-10
<b>c213B10</b>	1103	4.4E-10

[0571]

[0572] 실시예 3: IGF-1R 또는 IR 형질전환된 세포들 또는 유의한 수준들의 IR을 발현하는 IM9 세포들을 사용한 항체 특이도의 검증

[0573] IGF-1R 대비 IR에 대한 생산된 항체들의 특이성을 검증하기 위하여, hIGF-1R 또는 hIR 둘 중 하나를 발현하는 안정한 형질전환체들이 FACS 분석들에 의해 평가되었다. 간략하게, 증가하는 농도들의 키메라 mAb들이 FACS 완충액 (PBS, 0.1% BSA, 0.01%  $NaN_3$ )에서 세포들과 4℃로 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 3회 세척되었으며, 암소에서 4℃로 추가 20분 동안 배양되기 이전에 알렉사 488과 결합된 이차 항체와 배양되었고, 다음으로 FACS 완충액으로 3회 세척되었다. 항-IGF-1R 항체들의 결합은 생존가능한 세포들에서 즉시 수행되었고, 이는 프로피디움 요오드 (죽은 세포들을 염색함)를 사용하여 확인되었다. 몰 농도 (M)로 표현되는 결합  $EC_{50}$ 는 비선형 회귀 분석 (GraphPad 프리즘 4.0)을 사용하여 계산되었다.

[0574] hIGF-1R 형질전환된 세포주 (도 2a) 대비 미형질전환된 세포들 (도 2b)에서 획득된 역가측정 곡선들이 인간 IGF-1R에 대한 키메라 Ab들의 결합 특이도를 검증하였다.  $EC_{50}$  및  $B_{\text{최대}}$  수치들은 표 9에 요약되었다.

표 9

Ac	$B_{\text{max}}$	$EC_{50}$ (M)
<b>c208F2</b>	2008	3.2E-10
<b>c212A11</b>	2513	4.4E-10
<b>c214F8</b>	2094	2.7E-10
<b>c219D6</b>	2521	5.5E-10
<b>c213B10</b>	2029	3.3E-10

[0575]

- [0576] hIR 상에서 마우스 및 키메라 항체들 둘 다의 결합 부재를 확인하기 위하여, 인간 IR (hIR)을 발현하는 안정한 세포주가 사용되었다. 마우스 및 키메라 Ab들 둘 다에 의한 인간 세포 표면 hIR의 인식은 FACS 분석들에 의해 수행되었다. 증가하는 농도의 마우스 또는 키메라 mAb들 둘 중 하나가 FACS 완충액 (PBS, 0.1% BSA, 0.01%  $\text{NaN}_3$ )에서  $\text{hIR}^+$  형질전환된 세포주와 4℃로 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 3회 세척되었으며, 암소에서 4℃로 추가 20분 동안 배양되기 이전에 알렉사 488과 결합된 이차 항체와 배양되었으며, 다음으로 FACS 완충액으로 3회 세척되었다. 항-IGF-1R 항체들의 결합은 생존가능한 세포들에서 즉시 수행되었고, 이는 프로피디움 요오드 (죽은 세포들을 염색함)를 사용하여 확인되었다. 물 농도 (M)로 표현되는 결합  $\text{EC}_{50}$ 는 비선형 회귀 분석 (GraphPad 프리즘 4.0)을 사용하여 계산되었다. 시판되는 특이적 IGF-1R 항체, 클론 GR11L 및 항-hIR 항체 클론 GR05은 양성 대조군으로서 사용되었다. 항-hIR 항체 클론 GR05가 양성 대조군들로서 사용되었다. 마우스 및 키메라 9G4 항체들은 부적절한 항체로서 도입되었다.
- [0577] 형질전환된 세포들의 세포 표면 위에서 hIR의 높은 수준의 발현은 시판되는 항-hIR 항체 GR05를 사용하여 검증되었다 (도 3a 및 3b). 심지어 높은 농도들의 마우스 (도 3a) 또는 키메라 (도 3b) 항-hIGF-1R Ab들을 사용하여 도, 결합이  $\text{hIR}^+$  형질전환된 세포들의 표면에서는 전혀 관찰되지 않았다. 이들 결과들은 마우스 또는 키메라 항-hIGF-1R Ab들이 어느 것도 hIR를 인식하지 않는 점을 보여주었다.
- [0578] IR 대비 hIGF-1R의 이러한 인식의 특이도가 FACS 분석들에 의해 IM9 세포들, hIR을 발현하는 B-림프종 세포주를 사용하여 역시 관찰되었다 (도 4). 이러한 FACS 분석법을 위해, 프로토콜은 상기 기술된 것과 동일하였고 마우스 항-IGF-1R 항체들이 이차 항-인간 Ab의 교차 반응성을 방해하기 위하여 사용되었다 (IM9 세포들은 그들의 세포 표면에 인간 Ig를 발현한다). 도 4에 제시된 결과들은 예상된 신호가 GR05 항-hIR 항체를 사용하여 관찰되었던 한편 평가된 마우스 항체는 이러한 세포주에서 임의의 유의한 결합 신호를 전혀 전시하지 않았던 점을 다시 한 번 보여주었다.
- [0579] **실시예 4: FACS 및 비아코아 분석들에 의한 원숭이 미가공 IGF-1R과 항체 결합**
- [0580] 조절성 독성학 연구들을 위한 첫 번째 선결조건 중 하나는 선택된 화합물을 평가하기 위하여 적절한 동물 종을 찾는 것이다. 본 명세서에서 기술된 일련의 항체들이 마우스 IGF-1R을 인식할 수 없기 때문에, 독성학적 평가를 위해 가장 가능한 종은 비인간 영장류 (NHP)이다.
- [0581] 원숭이 IGF-1R에서 항-IGF-1R 항체들의 결합을 평가하기 위하여, 마우스 및 키메라 항-hIGF-1R 항체들 둘 다의 결합이 증가하는 항체 농도들을 사용하여 COS-7에서 FACS 분석에 의해 처음 평가되었다. 세포들 ( $1 \times 10^6$  개 세포들/mL)이 FACS 완충액 (PBS, 0.1% BSA, 0.01%  $\text{NaN}_3$ )에서 항-IGF-1R 항체들과 4℃로 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 3회 세척되었고, 암소에서 4℃로 추가 20분 동안 배양되기 이전에 알렉사 488과 결합된 이차 항체와 배양되었으며, 최종적으로 FACS 완충액으로 3회 세척되었다. 항-IGF-1R 항체들의 결합은 생존가능한 세포들에서 즉시 수행되었고, 이는 프로피디움 요오드 (죽은 세포들을 염색함)를 사용하여 확인되었다. 물 농도 (M)로 표현되는 결합  $\text{EC}_{50}$ 는 비선형 회귀 분석 (GraphPad 프리즘 4.0)을 사용하여 계산되었다.
- [0582] COS-7 원숭이 세포주에서 획득된 역가측정 곡선들은 항-hIGF-1R Ab들 모두가 원숭이 세포주의 표면에서 발현되는 IGF-1R를 특이적으로 인식하는 점을 보여주었다 (도 5a). 각각의 마우스 및 키메라 Ab들의  $\text{EC}_{50}$  결정은 2가지 형태들이 원숭이 IGF-1R 상에서 그들의 결합 특성들에 관하여 잘 대비되는 점을 보여주었다 (도 5b). 이들 결과들은 생성된 항-hIGF-1R 모두가 원숭이 IGF-1R를 인식하는 점을 보여주었다.
- [0583] COS-7 세포들 대비 형질전환된 IGF-1R 세포들에서 결합  $\text{EC}_{50}$ 의 비교는 인간 대비 원숭이 IGF-1R에서 키메라 항체 인식의 크기를 확인하기 위하여 수행되었다. 도 5c에 나타난 결과들은 모든 항체들에 의한 인간 및 원숭이 IGF-1R들의 유사한 인식을 보여주었다.
- [0584] 또 다른 유형의 원숭이에서 인식을 검증하기 위하여, 세포들은 용해성 원숭이 IGF-1R ECD를 생산하도록 머카크 원숭이의 IGF-1R 형태로 형질전환되었고, 비아코아 실험들이 키메라 항체들 (c208F2) 중 하나로 hIGF-1R 또는 머카크 IGF-1R 둘 중 하나와 그의 결합 특성들을 비교하기 위하여 수행되었다.
- [0585] 인식 실험들은 항-태그 His 항체 (His 포집 키트, GE 헬스케어사, 카탈로그 번호 28-9950-56)에 의해 활성화된 CM5 센서칩을 사용하여 비아코아 X 장치 위에서 진행되었다. 11,000 RU 이상의 항체들이 아민 키트 화학을 사용

하여 카르복시메틸텍스트란 기질 위에 화학적으로 이식되었다. 실험들은 전개 및 시료 희석 완충액으로서 HBS-EP 완충액 (GE 헬스케어사)을 사용하여 25℃에서 30 uL/분의 유속으로 수행되었다. 단일한 순환 역학적 설계가 머크 IGF-1R과 비교하여 hIGF-1R 상에서 208F2 항체 (c208F2)의 키메라 형태의 결합의 역학적 변수들을 정의하는 데 사용되었다.

[0586] 인간 (R & D 시스템스사 카탈로그 번호 305-GR-50) 또는 머크 원숭이 (사육으로 생산됨) 중 하나의 서열을 기초로 하여, 추가적인 c-말단 10개의 His 태그와 함께 발현되는 2개의 α 사슬들 및 2개의 β 사슬들의 세포외 도메인들로 구성되는 IGF-1R 헤테로-사량체의 용해성 재조합 버전의 용액이 약 160 RU의 항원을 포집하도록 정의된 희석으로 두 번째 플로우셀에 1분 주입되었다. 포집 단계 이후에, 전개 완충액 둘 중 하나가 5번 주입되고 (각각의 주입은 90초), 증가하는 5가지 농도들 범위의 c208F2가 플로우셀 둘 다에 주입되었다 (각각의 주입은 90초). 다섯 번째 주입의 마지막에, 전개 완충액이 해리 속도를 정의하기 위하여 통과되었다.

[0587] 다음으로 표면이 10 mM 글리신, HCl pH 1.5 완충액의 주입으로 30초 동안 재생되었다.

[0588] 계산된 신호는 (포집된 IGF-1R을 가진) 플로우셀 2의 반응 및 (포집된 IGF-1R 분자들이 없는) 플로우셀 1의 반응 간의 차이에 해당한다 (도 6).

[0589] 각각의 IGF-1R 분자 (인간 또는 머카크)의 경우, 증가하는 농도들 범위의 c208F2의 주입들로 인한 신호는 완충액의 5번 주입들로 획득된 신호의 차감에 의해 교정되었다 (이중 기준 참조). 결과로 얻은 센서그램들은 1 : 1 모델로 비아코아 평가 소프트웨어를 사용하여 분석되었다. 역학적 속도들은 독립적으로 (각각의 IGF-1R 상에서 c208F2 결합의 2가지 역학적 속도들) 또는 공통적으로 (인간 및 머크 원숭이 IGF-1R 상에서 c208F2 결합의 동일한 역학적 속도들) 평가된다. 적정성은 0.05 RU보다 낮은 Chi2/R<sub>max</sub> 비율에 의해 평가되었다.

[0590] 각각의 IGF-1R에 대해 개별적으로 정의되는 결합의 역학 속도들은 밀접하고 (표 10 참조), 동일한 역학 속도들과 센서그램들 둘 다의 적정성은 좋다.

[0591] c208F2 항체는 재조합 인간 및 머크 IGF-1R들을 약 0.2 nM의 해리 상수 (KD)로 동시에 인식한다. 본 연구에서 정의된 친화도들은 약 160 RU의 포집된 인간 및 머카크 IGF-1R의 수준에 대한 항체들의 기능적 친화도들 (또는 결합도들)에 해당한다.

표 10

IGF1R	kon [1/M.s]	koff [1/s]	Kd [nM]	Chi2/Rmax
인간 an	1.52E+06	3.40E-04	0.23	0.045
머카크 원숭이	1.85E+06	3.10E-04	0.17	0.032
인간 및 머카크	1.52E+06	3.33E-04	0.22	0.039

[0592]

[0593]

[0594] **실시예 5: IGF-1R 인산화에 미치는 생산된 항체들의 본질적인 효과**

[0595] 항체들이 타이로신 키나제 수용체들과 결합할 때 작동제 효과를 유도할 수 있는 점은 잘 알려져 있다. 우리는 이러한 작동제 항체들을 선별하도록 원하지 않기 때문에, hIGF-1R 인산화의 평가가 키메라 항체들을 사용하여 연구되었다.

[0596] 이러한 목적을 위해, MCF-7 세포들이 무혈청 배지로 밤샘 동안 배양되었다. 다음으로 테스트될 IGF-1 (100 nM) 또는 Ab들이 37℃에서 10분 동안 첨가되었다. 배지가 제거되었고, 세포들은 10 mM 트리스 HCl 완충액 (pH 7.5), 15% NaCl (1 M), 10% 계면활성제 믹스 (10 mM 트리스-HCl, 10% Igepal 용출 완충액) (시그마 케미칼사), 5% 소듐 데옥시콜레이트 (시그마 케미칼사), 1가지 프로테아제 저해제 각테일 완전 TM 정제 (로슈사), 1% 포스파타제 저해제 각테일 세트 II (캘바이오캠)을 포함하는 용출 완충액 (pH 7.5)으로 4℃에서 90분 동안 끓여주었다. 용출물들은 4℃에서 원심분리에 의해 정화되었고, 100℃에서 5분 동안 가열되었으며 -20℃로 보관하거나 4 내지 12% SDS-PAGE 젤들 상에 직접 로딩되었다. 일차 항체의 배양은 상온에서 2시간 동안 수행되었고 다음으로 HRP-결합된 이차 항체들과 배양이 상온에서 1시간 동안 시행되었다. 막들은 ECL로 단백질들의 영상화 이전에 TBST로 세척되었다. 블롯들은 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 정량되었다. 인산화-단백질 수치들은 GAPDH로 정상화되

었다. IGF-1과 반응한 hIGF-1R의 인산화는 100%의 자극으로서 고려되었다. hIGF-1R의 인산화에 미치는 항-hIGF-1R Ab들의 효과는 IGF-1에 의해 유도되는 인산화 %로서 결정되었다.

[0597] 도 7에 기술된 결과들은 IGF-1과 비교하여 3번의 독립적인 실험들  $\pm$  S.D.에서 키메라 항-IGF-1R Ab들과 반응한 pIGF-1R의 평균 %를 나타낸다. 도식된 바와 같이 MCF-7 세포들이 10 ug의 항-IGF-1R Ab들과 배양되었을 때, hIGF-1R의 유의한 또는 소수의 ( $< 20\%$ ) 인산화는 전혀 검출되지 않았다.

[0598] **실시예 6: 마우스 IGF-1R 항체들에 의한 IGF-1과 반응한 IGF-1R 인산화의 저해**

[0599] 선별된 항체들을 특성화하기 위하여, IGF-1R-유도성 인산화를 저해하는 그들의 능력이 연구되었다. 이러한 목적을 위해, MCF-7 세포들이 무혈청 배지로 배양 중인 배양되었다. 다음으로 세포들이 2분 동안 IGF-1의 첨가 이전에 마우스 항-hIGF-1 Ab들과 37°C에서 5분 동안 배양되었다. 배지가 제거되었고, 세포들은 10 mM 트리스 HCl 완충액 (pH 7.5), 15% NaCl (1 M), 10% 계면활성제 믹스 (10 mM 트리스-HCl, 10% Igepal 용출 완충액) (시그마 케미칼사), 5% 소듐 테옥시콜레이트 (시그마 케미칼사), 1가지 프로테아제 저해제 카테일 완전 TM 정제 (로슈사), 1% 포스파타제 저해제 카테일 세트 II (캘바이오텍)을 포함하는 용출 완충액 (pH 7.5)으로 4°C에서 90분 동안 끓여주었다. 용출물들은 4°C에서 원심분리에 의해 정화되었고, 100°C에서 5분 동안 가열되었으며, -20°C로 보관하거나 4 내지 12% SDS-PAGE 젤들 상에 직접 로딩되었다. 일차 항체의 배양은 상온에서 2시간 동안 수행되었고, 다음으로 HRP-결합된 이차 항체들과 배양이 상온에서 1시간 동안 시행되었다. 막들은 ECL로 단백질들의 영상화 이전에 TBST로 세척되었다. 블롯들은 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 정량되었다. 인산화-단백질 수치들은 GAPDH로 정상화되었다. IGF-1과 반응한 hIGF-1R의 인산화는 100%의 자극으로서 고려되었다. hIGF-1R의 인산화에 미치는 항-hIGF-1R Ab들의 효과는 IGF-1에 의해 유도되는 인산화 %로서 결정되었다.

[0600] 항-IGF-1R Ab들 모두는 IGF-1과 반응한 hIGF-1R 인산화를 강하게 억제하였다 (감소  $> 80\%$ ) (도 8). IGF-1-유도성 hIGF-1R 인산화의 최고 저해제들은 m208F2, m212A11 및 m214F8 Mab들이다.

[0601] **실시예 7: FACS 분석들에 의한 생산된 항-IGF-1R 항체들의 결합 이후에 IGF-1R 내재화의 연구**

[0602] MCF-7 세포들이 10 ug/mL의 키메라 항체들과 4°C에서 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들이 세척되었으며 4°C 또는 37°C에서 4시간 동안 배양되었다. 세포-표면 결합된 항체의 정량은 이차 항체를 사용하여 결정되었다. 4시간 배양 시간 이후에 4°C에서 측정된 MFI 및 37°C에서 측정된 MFI 간의 차이로서 정의된  $\Delta$ MFI는 내재화된 Ab의 정량에 해당하였다.  $\Delta$ MFI는 도 9 및 표 11에 제시되었다. 10 ug/mL의 Ab의 내재화 백분율이 다음과 같이  $100 \times (4^\circ\text{C에서 MFI} - 37^\circ\text{C에서 MFI}) / 4^\circ\text{C에서 MFI}$ 로 계산되었고, 표 11에 제시되었다.

**표 11**

Ab	내재화%	$\Delta$ MFI	$\Delta$ MFI_ EC <sub>50</sub>
c208F2	83	288	1.8E-10
c212A11	80	322	2.7E-10
c214F8	87	403	2.2E-10
c219D6	80	353	4.4E-10
c231B10	85	369	2.3E-10

[0603]

[0604] 원숭이 IGF-1R도 역시 인식하였던 항체들이 이러한 수용체를 내재화할 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 동일한 내재화 실험이 수행되었다. 표 12에 요약된 결과들은 테스트된 항체들 모두가 원숭이 IGF-1R 내재화를 매개할 수 있는 점을 보여주었다.

표 12

Ab	마우스 Ab		키메라 Ab	
	$\Delta$ MFI	내재화%	$\Delta$ MFI	내재화%
208F2	53	74	52	67
212A11	83	73	98	75
214F8	76	71	98	72
219D6	80	71	102	74
213B10	84	74	101	73

[0605]

[0606]

세포 표면 결합 항체의 역학도 또한 평가되었다. 이러한 목적을 위해, MCF-7 세포들이 96-웰 플레이트들에 접종되었고, 10 ug/mL의 마우스 항체와 4°C에서 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들이 미결합된 항체를 제거하도록 배지로 37°C에서 10, 20, 30, 60 또는 120분 동안 세척되었다. 각각의 시간대에서, 세포들이 원심분리되었고, 다음으로 세포 표면에 남아있는 항체의 양을 결정하도록 얼음 위에서 이차 항-마우스 IgG-알렉사 488로 표면 표지되었다. 각각의 마우스 Ab 및 각각의 시간대의 형광 강도는 4°C에서 신호에 의해 정상화되었고 (잔여 IGF-1R %), 반감기 ( $t_{1/2}$ )를 결정하도록 지수적 붕괴로 적정화되었다.  $t_{1/2}$ 는 4°C에서 측정된 신호의 50% 감소를 획득하는 데 필요한 시간으로서 고려되었다. 도 10에 도시된 바와 같이, 마우스 Ab들 모두의 표면 수준은 첫 번째 30분 동안 신속하게 강하하였고 감소는 60분 배양 이후에 거의 최대이었다 (도 10a). 계산된 반감기는 마우스 Ab에 대하여 10 내지 18분 사이 범위에 포함되었다 (도 10b).

[0607]

세포 표면 신호의 감소가 Ab 내재화로 인하고 수용체 박리로 인하지 않았던 점을 확인하기 위하여, 세포들이 마우스 Ab들과 37°C에서 0, 30 및 60분 동안 배양되었다 (도 11). 다음으로 세포 표면 결합 항체 (투과화 없음) 및 항체 세포-표면 결합 + 내재화된 Ab (투과화 있음)에 해당하는 전체 항체 신호를 결정하도록 투과화되거나 되지 않았다. 내재화된 Ab (세포질)의 정량은 다음과 같이 결정되었다: 투과화 이후 MFI - 투과화 없는 MFI. 이러한 실험은 세포-표면 결합된 Ab의 감소가 Ab들이 내재화되는 것을 보여주는 세포질 Ab들의 증가로 인하는 점을 관찰하였다 (도 11). 또한, Ab들의 분해는 투과화 (전체) 이후에 신호의 감소로 표시된 바와 같이 배양 1시간 이후에 시작하였다.

[0608]

#### 실시예 8: 공초점 분석들에 의한 생산된 IGF-1R 항체들의 결합 이후에 IGF-1R 내재화의 연구

[0609]

항체들 내재화를 더 검증하기 위하여, 공초점 현미경 분석법이 세포의 이동 (trafficking) 이후에 항체들의 세포하 분포를 평가하도록 시행되었다. 세포들은 항-hIGF-1R Ab들과 37°C에서 배양되었고, 고정되었으며, 투과화되었다. 따라서, 세포들이 이차 항체 알렉사-488를 사용하여 염색되었고, 이차 항-토끼 IgG 알렉사 555를 사용하여 토끼 항-Lamp-1 항체가 시현되었다. 37°C에서 배양 이전에, 마우스 208F2 Ab가 MCF-7 세포들의 막 위에 정착되었고 (도 12a), 리소솜 마커 lamp-1과 공동정착은 이미지 J 소프트웨어의 공동정착 하이라이터 플러그-인을 사용하여 확인되었다. 세포 표면 결합 항체는 37°C에서 15분 배양 이후에 극적으로 감소되었다. 세포 표면 결합 항체의 감소와 동시에, 세포내 항체가 소포들 내에서 검출되었다. lamp-1과의 공동정착은 거의 관찰될 수 없었다. 30분 배양 이후에, 세포 표면 결합 항체는 검출되지 않았다. 그러나, 리소솜 내에서 Ab의 공동정착이 증가되었다. 1시간 배양 이후에, 세포내 Ab 염색은 lamp-1과의 공동정착의 수와 마찬가지로 감소되었다. 이러한 세포 표면 결합 항체 및 그의 세포내 축적의 역학은 FACS에 의해 측정된 항체 표면 붕괴의 역학과 상관되었다. 또한, 이미 FACS 연구들로 기술된 바와 같이 공초점 현미경 분석법에 의해 마우스 Ab들의 분해가 1시간 배양 이후에 시작하였다.

[0610]

나머지 hIGF-1R 마우스 항체들 모두의 내재화 및 그들의 Lamp-1와 공동정착도 역시 평가되었다 (도 12b). 37°C에서 30분의 배양 이후에, 세포내 항체가 검출되었고 lamp-1과의 공동정착이 관찰되었으며 모든 선별된 항-IGF-1R 항체들이 리소솜들 내로 효과적으로 내재화되는 점을 가리킨다.



[0611] **실시예 9: 리소솜 저해제, 바필로마이신 A1을 사용한 Ab들 분해의 저해**

[0612] 항체들이 리소솜에 도달하고 분해되는 것을 검증하기 위하여, 세포들은 리소솜 기능들의 강력한 저해제인 바필로마이신 A1으로 처리되거나 처리되지 않았다. 다음으로 세포들은 4℃에서 10 ug/mL의 테스트될 Ab와 배양되었고, 세척되었으며, 37℃에서 2시간 동안 배양되었다. 내재화된 Ab가 세포 투과화 이후에 이차 항-마우스 IgG-알렉사 488 Ab를 사용하여 검출되었다. 바필로마이신 A1의 첨가는 세포내 Ab의 분해를 방해하였고 (도 13), 이는 Ab들이 효과적으로 내재화되고 리소솜들 내에서 분해되었던 점을 가리킨다.

[0613] **실시예 10: 항체 IGF-1R 결합에 미치는 pH 효과와의 상관성**

[0614] 항체들이 그들의 내재화 잠재력을 기초로 하여 선별되고 상기에서 리소솜 구획 내로 진입하기 이전에 초기 엔도솜들과 공동정착하는 것으로 관찰되었기 때문에, 흥미로운 접근법은 Ab-hIGF-1R 결합의 안정성이 pH 환경을 고려하여 조정되는 항체들, 바람직하게는 pH 환경이 산성이 될 때 바람직하게 IGF-1R로부터 해리되는 항체들을 선별하는 단계로 구성되었다. 이에 따라, 초기 엔도솜들 및 리소솜들 간의 일차적인 차이점은 그들의 내부 pH이다: 엔도솜 구획에서 pH는 대략 6인 반면 리소솜 구획에서 pH는 약 4.5이다.

[0615] 일단 리간드 결합 (IGF-1) 이후에 내재화되면, hIGF-1R은 재생화 경로를 통해 세포 표면으로 다시 돌아간다.

[0616] 이론으로 결부되지 않더라도, 본 명세서에서 기술된 가설은 산성 pH에서 그들의 표적으로부터 초기에 더욱 방출되는 경향이 있는 항체들이 아마도 막으로의 표적 재생화를 선호할 것이고 결론적으로 ADC 접근법들을 위한 더 나은 후보들로서 고려될 수 있는 점이다.

[0617] 본 발명자들의 항체들의 일부가 이러한 특성을 전시하는지 여부를 조사하고 이러한 특성을 세포독성 활성과 상관시키기 위하여, MCF-7 세포주들에서 마우스 항-hIGF-1R Mab들의 결합이 서로 다른 pH의 완충액들에서 시행되었다. 마우스 mAb들의 증가하는 농도들이 pH 5 내지 8 범위를 가지는 서로 다른 pH로 MCF-7 세포주 상에 4℃로 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 3회 세척되었으며, FACS 완충액에서 알렉사 488과 결합된 적당한 이차 항체와 배양되었다. 세포들은 암소에서 4℃로 추가 20분 동안 배양되었고, 다음으로 FACS 완충액으로 3회 세척되었다. 항-IGF-1R 항체들의 결합은 생존가능한 세포들에서 즉시 수행되었고, 이는 죽은 세포들을 염색한 프로피디움 요오드를 사용하여 확인되었다. 몰 농도 (M)로 표현되는 결합  $EC_{50}$ 는 비선형 회귀 분석 (GraphPad 프리즘 4.0)을 사용하여 계산되었다. 선별된 마우스 항-IGF-1R 항체들 모두는 도 14에 도시된 바와 같이 산성 pH에서 더 낮은 결합 능력을 보여주었다.

[0618] MCS-7 세포주에서 인간화 항-IGF-1R Mab들의 결합은 서로 다른 pH에서의 완충액들로 시행되었다. 인간화 mAb들의 증가하는 농도들이 pH 5 내지 8 범위를 가지는 서로 다른 pH로 MCF-7 세포주에서 4℃로 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들은 3회 세척되었으며, FACS 완충액에서 알렉사 488과 결합된 적당한 이차 항체와 배양되었다. 세포들은 암소에서 4℃로 추가 20분 동안 배양되었고, 다음으로 FACS 완충액으로 3회 세척되었다. 항-IGF-1R 인간화 항체들의 결합은 생존가능한 세포들에서 즉시 수행되었고, 이는 죽은 세포들을 염색한 프로피디움 요오드를 사용하여 확인되었다. 몰 농도 (M)로 표현되는 결합  $EC_{50}$ 는 비선형 회귀 분석 (GraphPad 프리즘 4.0)을 사용하여 계산되었다. 인간화 항-IGF-1R-항체들은 도 24에 도시된 바와 같이 산성 pH에서 더 낮은 결합 능력을 보여주었다.

[0619] **실시예 12: 208F2 Mab의 인간화 형태의 평가**

[0620] **12.1 첫 번째 인간화 형태 hz208F2 VH3/VL3 (hz208F2 H026/L024라고도 역시 명명됨)의 결합 및 내재화의 평가**

[0621] 첫 번째 인간화 형태 c208F2 mAb의 결합이 MCF-7, COS-7 및 NIH 3T3 IR<sup>+</sup> 세포주들에서 평가되었다. m208F2, c208F2 또는 hz208F2 VH3VL3의 증가하는 농도들이 각각의 세포주 상에 4℃로 20분 동안 첨가되었다. 다음으로 세포들이 세척되었으며 테스트된 Ab의 결합이 해당하는 이차 항체를 사용하여 시현되었다. 형질전환된 세포주 상의 인간 IR의 발현을 검증하기 위하여, 시판되는 항-hIR 항체 클론 GR05가 사용되었고 그의 인식 프로파일이 예시되었다 (도 15d).

[0622] MCF-7 (도 15a) 및 원숭이 COS-7 (도 15b) 세포들에서 인간화 형태의 마우스 또는 키메라 둘 중 하나의 형태와 비교는 3가지 테스트된 형태들의 밀접한 프로파일들을 보여주었다. 인간화 공정은 인간 인슐린 수용체 상의 교차 반응성의 부재를 고려하여 마우스 및 키메라 형태들과 완벽하게 비슷한 항체의 인식 특이도를 변형하지 않았다 (도 15c).

[0623] 인간 세포주 MCF-7 및 원숭이 세포주 COS-7에서 208F2의 첫 번째 인간화 형태의 계산된  $EC_{50}$ 은 mAb 208F2의 마우스 또는 키메라 형태 둘 중 하나로 결정된 것과 유사하였다.

[0624] mAb hz208F2 VH3/VL3의 내재화되는 능력은 유동세포측정법에 의해 평가되었다. MCF-7 세포들이 10 ug/mL의 항체들과 4℃에서 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들이 세척되었으며 4℃ 또는 37℃에서 4시간 동안 배양되었다. 세포-표면 결합된 항체의 정량은 이차 항체를 사용하여 결정되었다. 4시간 배양 시간 이후에 4℃에서 측정된 MFI 및 37℃에서 측정된 MFI 간의 차이로서 정의된  $\Delta MFI$ 는 내재화된 Ab의 정량에 해당하였다.  $\Delta MFI$ 는 도 16 및 표 13에 제시되었다. 10 ug/mL의 Ab의 내재화 백분율이 다음과 같이  $100 \times (4℃에서 MFI - 37℃에서 MFI)/4℃에서 MFI$ 로 계산되었고, 표 13에 제시되었다. 따라서, 인간화 hz208F2 VH3/VL3는 해당하는 마우스 및 키메라 208F2 항체들로 측정된 것과 유사한 결합 및 내재화 특성들을 가지고 있었다.

표 13

	$\Delta MFI$	내재화%
m208F2	294	88
c208F2	278	82
H208F2 VH3/VL3	344	87

[0625]

## [0626] 12.2 연속적인 hz208F2 인간화 형태의 결합 평가

[0627] mAb 208F2가 인간화되었고, 16가지의 인간화 변이체들 (12.1에 기술된 첫 번째 형태를 포함함)의 결합 특성들이 평가되었다. 인간화 변이체들의 결합 특성들은 인간 MCF-7 유방 샘암종 세포주 및 원숭이 세포주 Cos-7 상에서 증가하는 항체 농도들을 사용하여 FACS 분석들에 의해 평가되었다. 이러한 목적을 위해, 세포들 ( $1 \times 10^6$  개 세포들/mL)이 FACS 완충액 (PBS, 0.1% BSA, 0.01%  $NaN_3$ )에서 항-IGF-1R 항체들과 4℃로 20분 동안 배양되었다. 다음으로 그들은 3회 세척되었으며, FACS 완충액으로 3회 세척되기 이전에 암소에서 4℃로 추가 20분 동안 적당한 알렉사 488과 결합된 적당한 이차 항체와 배양되었다. 항-IGF-1R 항체들의 결합은 생존가능한 세포들에서 즉시 수행되었고, 이는 프로피디움 요오드 (죽은 세포들을 염색함)를 사용하여 확인되었다. 물 농도 (M)로 표현되는 결합의  $EC_{50}$ 은 비선형 회귀 분석 (GraphPad 프리즘 4.0)을 사용하여 계산되었다.

[0628] 인간화 변이체들의  $EC_{50}$ 은 인간화 변이체들이 인간 및 원숭이 세포주들 둘 다에서 동등한 결합 특성들을 전시는 점을 보여주었다.

[0629] 인간화 항체들의 EC<sub>50</sub>는 표 13b에 요약된다.

		EC <sub>50</sub> (M)	
		MCF-7	Cos-7
인간화 변이체	hz208F2 H026/L024	7.09E-10	5.1E-10
	hz208F2 H037/L018	4.9E-10	7.4E-10
	hz208F2 H047/L018	7.7E-10	9.2E-10
	hz208F2 H049/L018	4.9E-10	6.9E-10
	hz208F2 H051/L018	5.7E-10	7.2E-10
	hz208F2 H052/L018	8.4E-10	9.9E-10
	hz208F2 H057/L018	5.8E-10	8.3E-10
	hz208F2 H068/L018	1.1E-09	1.2E-09
	hz208F2 H070/L018	4.6E-10	7.3E-10
	hz208F2 H071/L018	5.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H076/L018	6.5E-10	1.1E-09
	hz208F2 H077/L018	7.7E-10	1.1E-09
	hz208F2 H037/L021	4.8E-10	8.2E-10
	hz208F2 H049/L021	6.6E-10	8.5E-10
	hz208F2 H052/L021	5.7E-10	1.2E-09
	hz208F2 H076/L021	5.8E-10	1.1E-09

[0630]

[0631] 12.3 또 다른 hz208F2 인간화 형태의 내재화의 평가

[0632] MCF-7 세포들이 10 ug/mL의 인간화 항체들과 4℃에서 20분 동안 배양되었다. 다음으로 세포들이 세척되었으며 4℃ 또는 37℃에서 4시간 동안 배양되었다. 세포-표면 결합된 항체의 정량은 FacsCalibur 유동세포측정기 (벡튼 디킨슨사) 상에서 이차 항체를 사용하여 결정되었다. 4시간 배양 시간 이후에 4℃에서 측정된 MFI 및 37℃에서 측정된 MFI 간의 차이로서 정의된 ΔMFI는 내재화된 Ab의 정량에 해당하였다. ΔMFI는 도 13c에 제시되었다. 10 ug/mL의 Ab의 내재화 백분율이 다음과 같이  $100 \times (4℃에서 MFI - 37℃에서 MFI) / 4℃에서 MFI$ 로 계산되었다. 인간화 항체 hz208F2 H077/L018는 IGF-1R의 유의한 내재화를 유도할 수 있다.

	ΔMFI	내재화%
hz208F2 H077/L018	468	88

[0633]

[0634] 실시예 13: 용해성 재조합 인간 IGF-1R에서 5가지 키메라 항-IGF-1R 항체들 (c208F2, c213B10, c212A11, c214F8 및 c219D6) 및 208F2 항체의 인간화 버전 (VH3/VL3)의 해리 상수 (K<sub>d</sub>)의 정의

[0635] 재조합 용해성 인간 IGF-1R에서 항체들의 결합의 해리 상수 (K<sub>d</sub>)는 해리 속도 (k<sub>off</sub>) 및 결합 속도 (k<sub>on</sub>) 간의 비율에 의해 정의되었다. 역학적 실험들은 마우스 항-태그 His 단일클론 항체에 의해 활성화된 CM5 센서칩을 사용하여 비아코아 X100 장치 상에서 진행되었다. 약 12,000 RU의 항체들이 아민 키트 화학을 사용하여 카르복시메틸텍스트란 기질 위에 화학적으로 이식되었다.

[0636] 실험들은 전개 및 시료 희석 완충액으로서 HBS-EP+ 완충액 (GE 헬스케어사)을 사용하여 25℃에서 30 uL/분의 유속으로 수행되었다.

[0637] 단일한 주기 역학적 설계가 그의 두 개 C-말단 10개 히스티딘-태그에 의해 포집된 용해성 재조합 인간 IGF-1R 상에서 항-IGF-1R 항체들의 결합의 역학적 변수들을 정의하는 데 사용되었다.



- [0638] 1. 인간 hIGF-1R 헤테로-사량체의 용해성 재조합 버전의 용액: 추가적인 C-말단 10개의 His 태그와 함께 발현되는 2개의  $\alpha$  사슬들 및 2개의  $\beta$  사슬들의 세포외 도메인들 (R & D 시스템사 카탈로그 번호 305-GR-50)이 10 ug/mL의 농도로 두 번째 플로우셀 상에 1분 동안 주입되었다. 평균 587 RU (24 RU의 표준 오차를 가짐)의 용해성 수용체가 본 연구를 위해 실현된 24회 주기를 각각에서 포집되었다.
- [0639] 2. 포집 단계 이후에, 전개 완충액이 플로우셀들 둘 다에 5번 (각각의 주입 90초) 6가지 항체들 중 하나의 증가하는 5가지 농도 범위들로 주입되었다 (각각의 주입 90초). 다섯 번째 주입의 마지막에, 전개 완충액이 해리 속도를 정의하기 위하여 5분 동안 통과되었다.
- [0640] 3. 다음으로 표면은 10 mM 글리신, HCl pH 1.5 완충액의 주입으로 45초 동안 재생되었다.
- [0641] 계산된 신호는 (포집된 IGF-1R을 가진) 플로우셀 2의 반응 및 (포집된 IGF-1R 분자들이 없는) 플로우셀 1의 반응 간의 차이에 해당한다.
- [0642] 각각의 IGF-1R의 경우, 증가하는 농도들 범위의 항체의 주입들로 인한 신호는 완충액의 5번 주입들로 획득된 신호의 차감에 의해 교정되었다 (이중 기준 참조). 도 17 참조.
- [0643] 결과로 얻은 센서그램들은 1 : 1 모델로 비아코아 평가 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.
- [0644] 네 번의 경험들이 두 가지 서로 다른 농도들의 범위들을 사용하여 각각의 항체를 위해 진행되었다: 각각의 항체를 위해 두 번의 첫 번째 실험들의 경우 40, 20, 10, 5 및 2.5 nM 그리고 두 번의 나중 실험들 진행의 경우 24, 12, 6, 3 및 1.5 nM.
- [0645] 본 실험에서는 테스트된 6가지 항체들을 위해, 실험적 데이터는 더 높은 농도가 상수로서 정의되고 나머지 다섯 농도들이 계산될 때 유의한  $k_{off}$  수치들로 1 : 1 모델과 잘 맞추어졌다 (도 18 참조).
- [0646] 비율  $k_{off}/k_{on}$ 로서 계산된 해리 상수들 ( $K_D$ ) 및 비율  $\ln(2)/k_{off}$ 로서 계산된 복합체들의 반감기는 도 19 및 도 20에 나타내었다. 그들은 각각의 항체들을 위한 독립적인 실험들 진행의 평균에 해당한다. 오차 막대들은 수치들의 표준 오차들 ( $n = 4$ )에 해당한다.
- [0647] 해리 상수들은 10 내지 100 pM의 범위이다. c208F2 항체는 h-IGF-1R에 대한 약한 친화도를 제시하고 ( $K_D$  약 75 pM), 그의 인간화 버전은 적어도 키메라 버전만큼 좋다 ( $K_D$  약 60 pM). 4가지의 나머지 항-IGF-1R 키메라 항체들은 hIGF-1R를 위한 매우 유사한 친화도를 제시한다 ( $K_D$  약 30 pM). 친화도들의 차이는 기본적으로 복합체들의 해리 속도 또는 결과로 나온 반감기와 연관되어 있다. 208F2를 사용하여 복합체의 반감기는 키메라 및 인간화 (VH3/VL3) 버전들로 2 및 3시간 사이 범위이다. 4가지의 나머지 항-IGF-1R 키메라 항체들의 경우는 평균 반감기들이 7.0 및 9.4시간 사이 범위이다.
- [0648] 이들 매우 느린 해리 역학은 항체들의 Fab 구조들 둘 다 내지 2개 인접한 h-IGF-1R 분자들에 의해 동시적으로 결합할 수 있는 항체들의 이가 구조와 분명하게 연관된다. 이러한 경우에 포집된 h-IGF-1R 분자들의 수준은 해리 속도에 미치는 영향을 가질 수 있다. 본 연구에서 정의된 친화도들은 포집된 h-IGF-1R의 수준 약 600 RU를 위한 기능적 친화도들 (또는 결합도들)에 해당한다.  $K_D$ 의 3배 차이가 상기에 나타난 데이터 간에 관찰되었고 (표 10), 실시예 13에 제시된 수치들은 포집된 hIGF-1R의 수준의 변화와 연관된다 (실시예 4에서 600 RU 대비 160 RU).
- [0649] **실시예 14: 본 발명의 약물들의 합성**
- [0650] 다음의 약어들이 다음의 실시예들에서 사용된다:
- [0651] aq. 수용성
- [0652] ee 광학이성질체의 과다
- [0653] equiv 당량
- [0654] ESI 전자스프레이 이온화
- [0655] LC/MS 질량 분광분석법과 결합된 액체 크로마토그래피
- [0656] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피

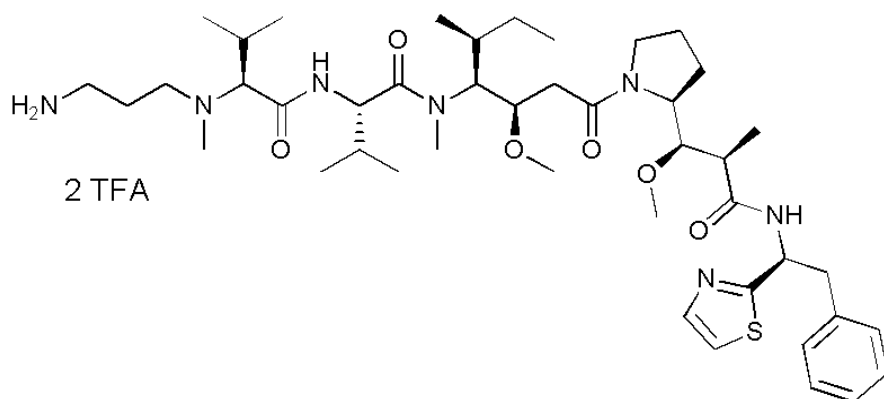
[0657] NMR 핵자기 공명

[0658] sat. 포화된

[0659] UV 자외선

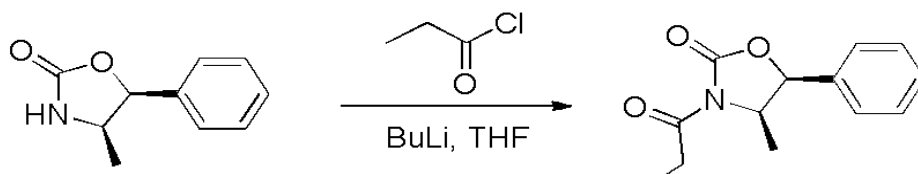
[0660] 기준 화합물 1

[0661] (S)-2-((S)-2-((3-아미노프로필)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N-((3R,4S,5S)-3-메톡시-1-((S)-2-((1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-((S)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일)-N,3-디메틸부탄아마이드, 비스 트리플루오로아세트산



[0662]

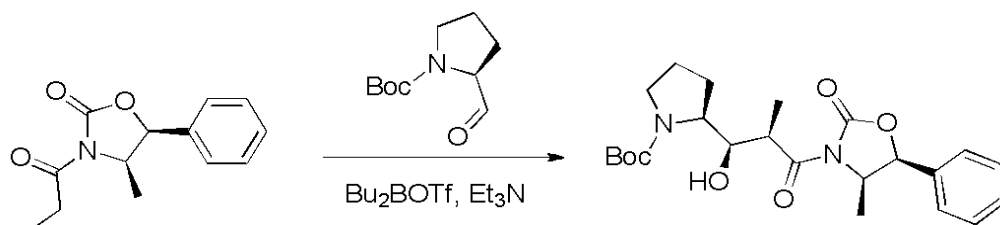
[0663] **화합물 1A:** (4R, 5S)-4-메틸-5-페닐-3-프로파노일-1,3-옥사조리딘-2-온



[0664]

[0665] (4R, 5S)-4-메틸-5-페닐-1,3-옥사조리딘-2-온 (5.8 g, 32.7 mmol, 1.00 당량)이 불활성 대기에서 테트라하이드로퓨란 (THF, 120 mL)에 용해되었다. 혼합물은  $-78^{\circ}\text{C}$ 로 냉각되었고 *n*-부틸리튬 (14.4 mL)이 한 방울씩 첨가되었다.  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안의 교반 이후에, 염화 프로판 (5.7 mL)이 첨가되었다. 교반이  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 다음으로 상온에서 밤샘 동안 계속되었다. 반응 혼합물은 농축된 다음 200 mL의 물에 재용해되었다. 용액의 pH는 소듐 바이카보네이트 포화된 수용성 용액으로 7로 조정되었다. 이러한 수용성 상은 100 mL의 에틸 아세테이트 (EtOAc)로 3회 추출되었다. 유기상은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되고, 여과되었으며, 노란색 오일의 형태로 6.8 g (89%)의 화합물 1A를 수득하도록 농축되었다.

[0666] **화합물 1B:** *tert*-부틸 (2S)-2-[(1R,2R)-1-하이드록시-2-메틸-3-[(4R,5S)-4-메틸-2-옥소-5-페닐-1,3-옥사조리딘-3-일]-3-옥소프로필]피롤리딘-1-카복실레이트

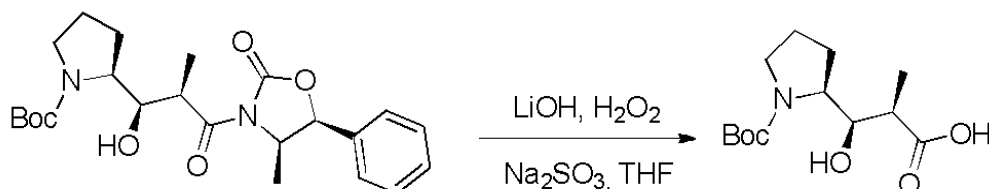


[0667]

[0668] 화합물 1A (17.6 g, 75.45 mmol, 1.00 당량)은 불활성 대기에서 디클로로메탄 (DCM, 286 mL)에 용해되었다. 이러한 용액은 얼음 수조로 냉각되었다. 트리에틸아민 (TEA, 12.1 mL, 1.15 당량) 및 Bu<sub>2</sub>BOTf (78.3 mL, 1.04 당량)가 반응 혼합물의 온도를  $2^{\circ}\text{C}$  미만으로 유지하면서 한 방울씩 첨가되었다. 교반이  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 45분 동안 계속되었고, 이후에 반응은  $-78^{\circ}\text{C}$ 로 냉각되었다. DCM (42 mL)에 넣은 *tert*-부틸 (2S)-2-포르밀피롤리딘-1- 카복실레이트 (8.5 g, 42.66 mmol, 0.57 당량)의 용액이 한 방울씩 첨가되었다. 교반은  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안, 다음으로 0

℃에서 1시간 동안, 마지막으로 상온에서 1시간 동안 계속되었다. 반응은 72 mL의 포스페이트 완충액 (pH = 7.2 - 7.4) 및 214 mL 메탄올로 중화되었고, 0℃로 냉각되었다. 메탄올 (257 mL)에 넣은 30% 과산화수소의 용액이 10℃ 미만의 온도를 유지하면서 한 방울씩 첨가되었다. 교반이 0℃에서 1시간 동안 계속되었다. 반응은 142 mL의 물로 중화되었고, 다음으로 감압 하에서 농축되었다. 결과로 얻은 수용성 용액은 200 mL EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 여과되어 농축되었다. 잔류물이 EtOAc 및 석유 에테르 (EtOAc:PE = 1:8)의 혼합물로 실리카 컬럼 상에서 무색 오일의 형태로 13.16 g (40%)의 화합물 **1B**가 수득하도록 정제되었다.

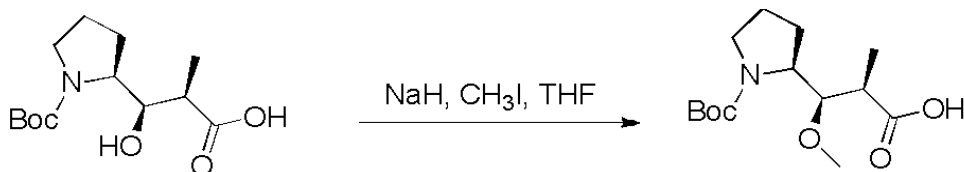
[0669] **화합물 1C:** (2R,3R)-3-[(2S)-1-[(*tert*-부톡시)카르보닐]피롤리딘-2-일]-3-하이드록시-2-메틸프로파노산



[0670]

[0671] 화합물 **1B** (13.16 g, 30.43 mmol, 1.00 당량)가 과산화수소 (물에서 30%, 15.7 mL)의 존재 시 THF (460 mL)에 용해되었고, 다음으로 얼음 수조로 냉각되었다. 수산화리튬 (0.4 mol/L, 152.1 mL)의 수용성 용액이 4℃ 미만의 반응 온도를 유지하면서 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물이 0℃에서 2.5시간 동안 교반되었다. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (1 mol/L, 167.3 mL)의 수용성 용액이 0℃에서 온도를 유지하면서 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물이 상온에서 14시간 교반되었고, 다음으로 150 mL의 차가운 소듐 바이카보네이트 포화 용액으로 중화되었으며, 50 mL의 DCM으로 3회 세척되었다. 수용성 용액의 pH는 1 M KHSO<sub>4</sub>의 수용성 용액으로 2 내지 3회 조정되었다. 이러한 수용성 용액은 100 mL의 EtOAc로 3회 세척되었다. 유기상들은 조합되었고, 포화 NaCl 용액으로 한 번 세척되었으며, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었고, 무색 오일의 형태로 7.31 g (88%)의 화합물 **1C**를 수득하도록 농축되었다.

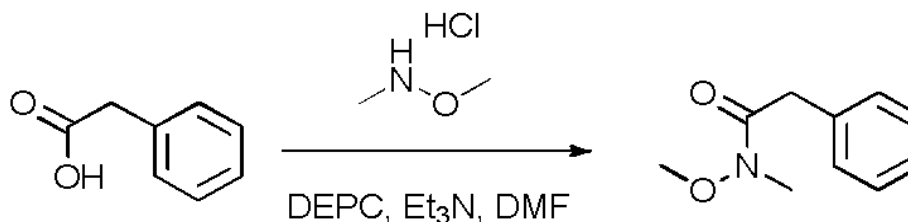
[0672] **화합물 1D:** (2R,3R)-3-[(2S)-1-[(*tert*-부톡시)카르보닐]피롤리딘-2-일]-3-메톡시-2-메틸프로파노산



[0673]

[0674] 화합물 **1C** (7.31 g, 26.74 mmol, 1.00 당량)가 요오드메탄 (25.3 mL)의 존재 시 불활성 대기에서 THF (135 mL)에 용해되었다. 반응 배지는 얼음 수조로 냉각되었고, 이후에 NaH (오일에서 60%, 4.28 g)가 일정량씩 첨가되었다. 반응은 0℃에서 3일 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 100 mL의 소듐 바이카보네이트 포화 수용성 용액으로 중화되었으며, 50 mL 에테르로 3회 세척되었다. 수용성 용액의 pH는 1 M 수용성 KHSO<sub>4</sub> 용액으로 3으로 조정되었다. 이러한 수용성 용액은 100 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 100 mL의 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (물에서 5%)로 한 번, NaCl-포화 용액으로 한 번 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었고, 5.5 g (72%)의 화합물 **1D**를 수득하도록 농축되었다.

[0675] **화합물 1E:** *N*-메톡시-*N*-메틸-2-페닐아세트아마이드

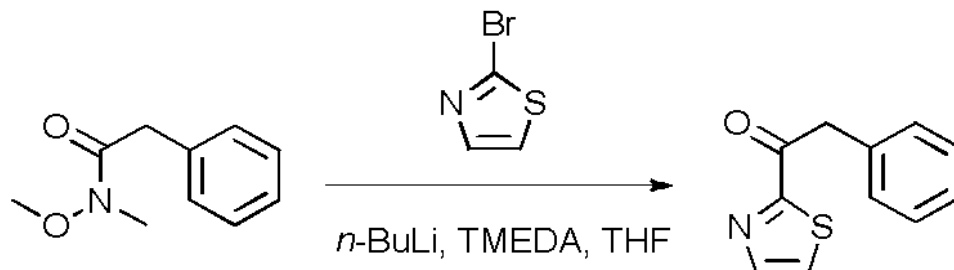


[0676]

[0677] 2-페닐아세트산 (16.2 g, 118.99 mmol, 1.00 당량)이 디메틸포름아마이드 (DMF, 130 mL)에 용해되었고, 다음으로 -10℃로 냉각되었다. 디에틸 포스포로시아니테이트 (DEPC, 19.2 mL), 메톡시(메틸)아민 염산 (12.92 g, 133.20 mmol, 1.12 당량) 및 트리에틸아민 (33.6 mL)이 첨가되었다. 반응 혼합물은 -10℃에서 30분 다음으로

상온에서 2.5시간 교반되었다. 다음으로 1 리터의 EtOAc로 두 번 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 500 mL의 NaHCO<sub>3</sub> (sat.)로 두 번, 400 mL의 물로 한 번 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에서 여과되어 농축되었다. 잔류물은 노란색 오일의 형태로 20.2 g (95%)의 화합물 **1E**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:100 내지 1:3)로 정제되었다.

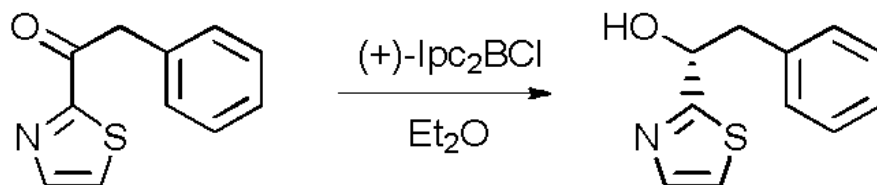
[0678] **화합물 1F**: 2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에탄-1-온



[0679]

[0680] 테트라메틸에틸렌디아민 (TMEDA, 27.2 mL)이 불활성 대기에서 THF 300 mL에 용해되었고, 다음으로 *n*-BuLi (67.6 mL, 2.5 M)의 한 방울씩 첨가 이전에 -78°C로 냉각되었다. 2-브로모-1,3-티아졸 (15.2 mL)이 한 방울씩 첨가되었고 교반이 -78°C에서 30분 계속되었다. THF (100 mL)에 용해된 화합물 **1E** (25 g, 139.50 mmol, 1.00 당량)가 한 방울씩 첨가되었다. 교반이 -78°C에서 30분, 다음으로 -10°C에서 2시간 동안 계속되었다. 반응은 500 mL의 KHSO<sub>4</sub> (sat.)으로 중화되었고, 1 리터의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 400 mL 물로 두 번 그리고 700 mL의 NaCl (sat.)로 두 번 세척되었으며, 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 노란색 오일의 형태로 25 g (88%)의 화합물 **1F**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:100 내지 1:10)로 정제되었다.

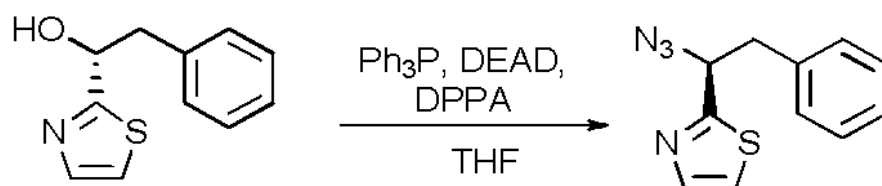
[0681] **화합물 1G**: (1R)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에탄-1-올



[0682]

[0683] 불활성 대기에서, 에테르 (300 mL)에 넣은 화합물 **1F** (15 g, 73.8 mmol, 1.00 equiv.)의 용액이 (+)-B-클로로 다이소피노캄페닐보레이트 ((+)-Ipc<sub>2</sub>BCl, 110.8 mL)로 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물은 0°C에서 24시간 교반되었고, 다음으로 300 mL의 NaOH (물에서 10%) 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (물에서 30%)의 (1:1) 혼합물로 중화되었으며, 마지막으로 500 mL의 EtOAc로 세 번 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 300 mL의 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (sat.)로 두 번, 500 mL의 NaCl (sat.)로 한 번 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 흰색 고체의 형태로 6.3 g (42%)의 화합물 **1G**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:20 내지 1:2)로 정제되었다.

[0684] **화합물 1H**: 2-[(1S)-1-아지도-2-페닐에틸]-1,3-티아졸

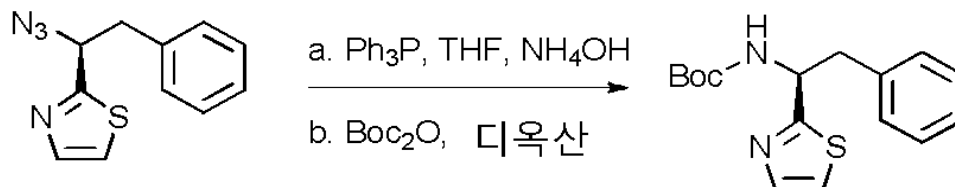


[0685]

[0686] 화합물 **1G** (6 g, 29.23 mmol, 1.00 당량)이 트리페닐포스파인 (13 g, 49.56 mmol, 1.70 당량)의 존재 시 불활성 대기에서 THF (150 mL)에 용해되었고, 다음으로 0°C로 냉각되었다. 디에틸아조디카복실레이트 (DEAD, 7.6

mL)가 한 방울씩 첨가되었고, 디페닐포스포릴아자이드 (DPPA, 11 mL)가 이어졌으며, 다음으로 차가운 수조가 제거되었고, 용액은 상온에서 48시간 교반 하에 방치되었다. 배지는 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 노란색 오일의 형태로 8 g의 부분적으로 정제된 화합물 **1H**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:100 내지 1:30)로 정제되었다. 화합물 **1H**는 다음의 단계에서 이와 같이 사용되었다.

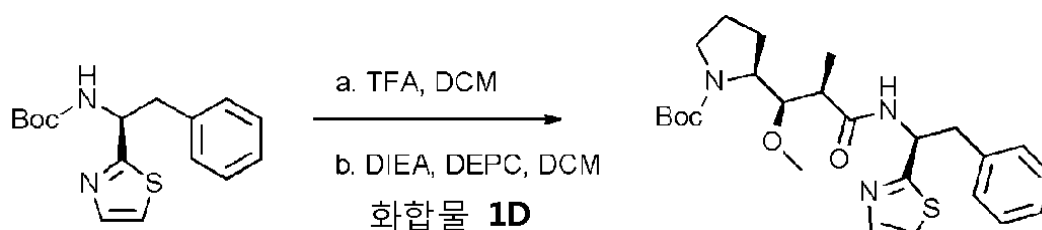
[0687] **화합물 1I**: *tert*-부틸 *N*-[(1*S*)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸] 카바메이트.



[0688]

[0689] 화합물 **1H** (6.5 g, 28.2 mmol, 1.00 당량)이 트리페닐포스파인 (6.5 g, 33.9 mmol, 1.20 당량)의 존재 시 불활성 대기에서 THF (100 mL)에 용해되었고, 50℃로 2시간 동안 가열되었다. 다음으로 암모니아 (70 mL)가 첨가되었고 가열이 3시간 동안 계속되었다. 반응은 냉각되었고, 500 mL 물로 중화되었으며, 다음으로 500 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 500 mL의 1 N HCl로 두 번 추출되었다. 수용성 상이 조합되었고, 수산화나트륨 용액 (물에서 10%)을 첨가하여 pH 8 내지 9로 가져왔고, 다음으로 500 mL의 DCM로 3회 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 소듐 설페이트 위에거 건조되어 여과되었으며, 노란색 오일의 형태로 4.8 g (83%)의 (1*S*)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에탄-1-아민을 수득하도록 농축되었다. 다음으로 본 화합물은 정제될 수 있도록 Boc기 ((*tert*-부톡시)카르보닐)로 보호되었다. 이것은 불활성 대기에서 1,4-디옥산 (40 mL)에 용해되었고, 다음으로 0℃로 냉각되었다. 20 mL의 1,4-디옥산에 희석된 (Boc)<sub>2</sub>O (10.26 g, 47.01 mmol, 2.00 당량)가 한 방울씩 첨가되었다. 차가운 수조가 제거되었고, 용액은 300 mL의 물로 중화되기 이전에 상온에서 교반 하에 밤샘 동안 방치되었으며 500 mL의 EtOAc로 두 번 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:100 to 1:20, ee = 93%)로 실리카 컬럼 상에서 정제되었다. 다음으로 흰색 고체의 형태로 6 g (84%)의 화합물 **1I**를 수득하도록 헥산/아세톤 혼합물 (~ 5 내지 10 / 1, 1g / 10 mL)에서 재결정화되었다 (ee > 99%).

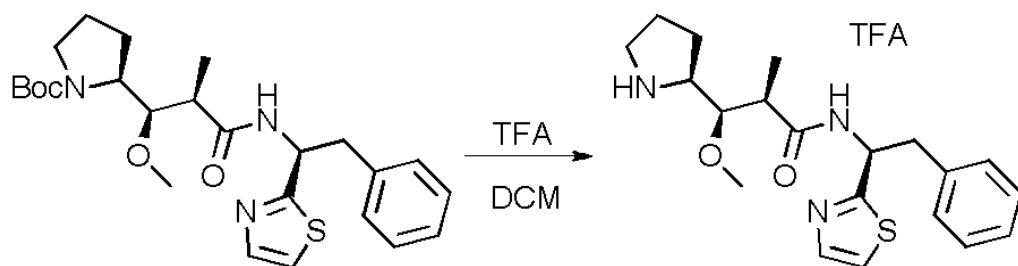
[0690] **화합물 1J**: *tert*-부틸 (2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-메톡시-2-메틸-2-[(1*S*)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]카바모일]에틸]피롤리딘-1-카복실레이트



[0691]

[0692] 화합물 **1I** (3 g, 9.86 mmol, 1.00 당량)이 불활성 대기에서 10 mL DCM에 용해되었다. 트리플루오로아세트산 (TFA, 10 mL)이 첨가되었고, 용액은 교반 하에 상온에서 밤샘 동안 방치되었고, 다음으로 노란색 오일의 형태로 2.0 g (64%)의 (1*S*)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에탄-1-아민; 트리플루오로아세트산을 수득하도록 감압 하에 농축되었다. 본 중간체는 20 mL의 DCM에 재용해되었고, 이후에 화합물 **1D** (1.8 g, 6.26 mmol, 1.05 당량), DEPC (1.1 g, 6.75 mmol, 1.13 당량) 및 디이소프로필에틸아민 (DIEA, 1.64 g, 12.71 mmol, 2.13 당량)이 첨가되었다. 반응 혼합물은 교반 하에 상온에서 밤샘 동안 방치되었고, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 흐린 노란색 고체의 형태로 2.3 g (81%)의 화합물 **1J**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:100 내지 1:3)로 정제되었다.

[0693] **화합물 1K**: (2*R*,3*R*)-3-메톡시-2-메틸-*N*-[(1*S*)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]-3-[(2*S*)-피롤리딘-2-일]프로판 아마이드; 트리플루오로아세트산



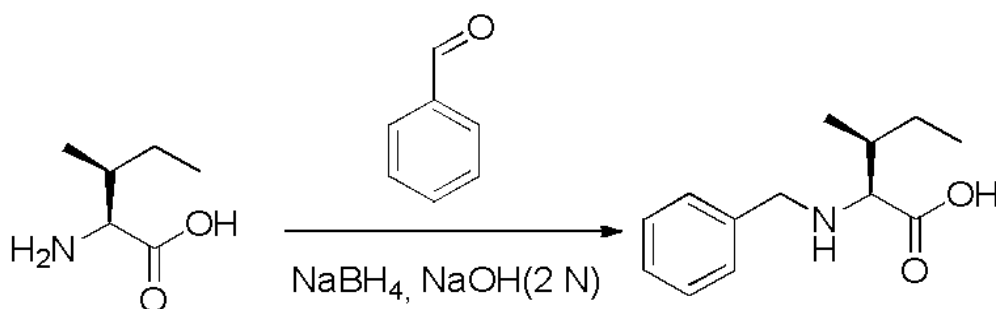
[0694]

[0695]

화합물 **1J** (2.25 g, 4.75 mmol, 1.00 당량)가 불활성 대기에서 10 mL의 DCM에 용해되었다. TFA (10 mL)가 첨가되었고, 용액은 교반 하에 상온에서 밤샘 동안 방치되었고, 다음으로 노란색 오일 형태로 2.18 g (94%)의 화합물 **1K**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[0696]

**화합물 1L**: (2S,3S)-2-(벤질아미노)-3-메틸펜타노산



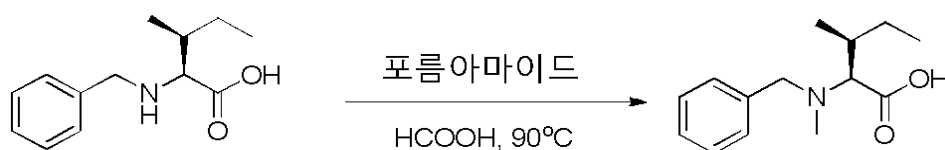
[0697]

[0698]

(2S,3S)-2-아미노-3-메틸펜타노산 (98.4 g, 750 mmol, 1.00 당량)이 상온에서 일정량씩 2 N 수산화나트륨 용액 (375 mL)에 첨가되었다. 벤질알데하이드 (79.7 g, 751.02 mmol, 1.00 당량)가 신속하게 첨가되었고 결과로 얻은 용액은 30분 교반되었다. 소듐 보로하이드라이드 (10.9 g, 288.17 mmol, 0.38 당량)가 5 및 15°C 사이 범위에서 온도를 유지하면서 적은 일정량들로 첨가되었다. 교반은 상온에서 4시간 동안 계속되었다. 반응 혼합물은 200 mL의 물로 희석되었고, 다음으로 200 mL의 EtOAc로 두 번 세척되었다. 수용성 용액의 pH는 2 N 염산 용액으로 7로 조정되었다. 형성된 침전물이 여과에 의해 수집되었고, 흰색 고체의 형태로 149.2 g (90%)의 화합물 **1L**을 주었다.

[0699]

**화합물 1M**: (2S,3S)-2-[벤질(메틸)아미노]-3-메틸펜타노산



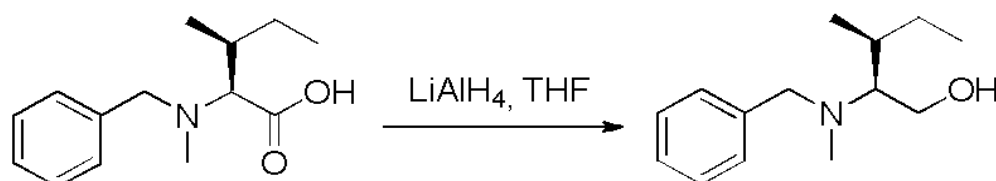
[0700]

[0701]

화합물 **1L** (25 g, 112.97 mmol, 1.00 당량)이 포름알데하이드 (물에서 36.5%, 22.3 g)의 존재 시 불활성 대기에서 포름산에 용해되었다. 용액은 90°C에서 3시간 교반되었고, 다음으로 감압 하에서 농축되었다. 잔류물은 250 mL의 아세톤에서 분쇄된 다음 농축되었다. 이러한 분쇄/증발 작동은 흰색 고체의 형태로 21.6 g (81%)의 화합물 **1M**을 수득하도록 500 mL의 아세톤으로 두 번 반복되었다.

[0702]

**화합물 1N**: (2S,3S)-2-[벤질(메틸)아미노]-3-메틸펜탄-1-올



[0703]

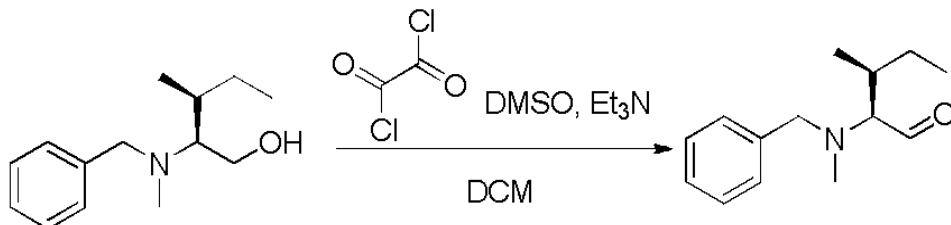
[0704]

LiAlH<sub>4</sub> (0.36 g)이 불활성 대기에서 10 mL의 THF에 0°C에서 현탁되었다. 화합물 **1M** (1.5 g, 6.37 mmol, 1.00 당량)이 0 및 10°C 사이 범위에서 온도를 유지하면서 적은 일정량들로 첨가되었다. 반응 혼합물은 65°C에서 2시



간 교반된 다음, 360  $\mu$ L의 물, 1 mL의 15% 수산화나트륨 및 360  $\mu$ L의 물의 연속적인 첨가들로 중화되기 이전에 다시 0°C로 냉각되었다. 침전된 알루미늄 염들이 여과에 의해 제거되었다. 여과물은 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 흐린 노란색 오일의 형태로 820 mg (58%)의 화합물 **1N**을 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:50)로 정제되었다.

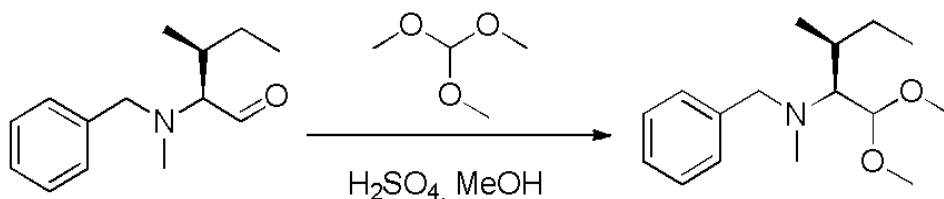
[0705] **화합물 10:** (2S,3S)-2-[벤질(메틸)아미노]-3-메틸펜타날



[0706]

[0707] 옥사릴 클로라이드 (0.4 mL)가 불활성 대기에서 DCM (15 mL)에 용해되었다. 용액은 -70°C로 냉각되었고, DCM (10 mL)에 넣은 디메틸설폭사이드 용액 (DMSO (0.5 mL)이 한 방울씩 15분 동안 첨가되었다. 반응 혼합물은 30분 교반되었고, 이후에 DCM (10 mL)에 넣은 화합물 **1N** (820 mg, 3.70 mmol, 1.00 당량)이 15분 동안 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물은 낮은 온도에서 30분 더 교반된 다음 트리에틸아민 (2.5 mL)이 천천히 첨가되었다. 반응 혼합물은 -50°C에서 1시간 교반되었고, 다음으로 차가운 수조가 제거되었으며, 반응은 온도가 정상으로 되도록 허용하면서 25 mL의 물로 중화되었다. 용액은 30 mL의 NaCl-포화 수용성 용액으로 한 번 세척된 다음, 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 노란색 오일의 형태로 0.42 g (52%)의 화합물 **10**을 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:200)로 정제되었다.

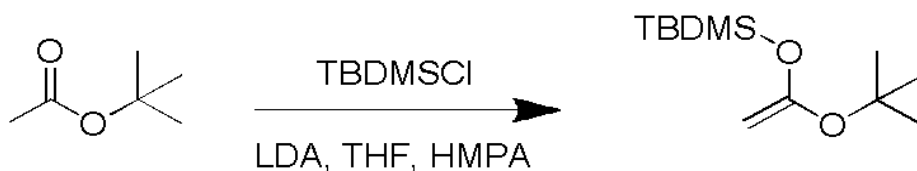
[0708] **화합물 1P:** (2S,3S)-N-벤질-1,1-디메톡시-N,3-디메틸펜탄-2-아민



[0709]

[0710] 화합물 **10** (4.7 g, 21.43 mmol, 1.00 당량)이 0°C에서 20 mL의 메탄올에 용해되었다. 농축된 황산 (4.3 mL)이 한 방울씩 첨가되었고, 교반이 0°C에서 30분 동안 계속되었다. 트리메틸 오소포르메이트 (21.4 mL)이 첨가되었고, 차가운 수조는 제거되었으며, 반응 배지가 상온에서 3시간 동안 교반 하에 방치되었다. 반응 배지는 200 mL의 EtOAc로 희석되었고, 연속적으로 100 mL의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 200 mL의 포화 NaCl로 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 흐린 노란색 오일의 형태로 3.4 g (60%)의 화합물 **1P**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[0711] **화합물 1Q:** [[1-(*tert*-부톡시)에테닐]옥시](*tert*-부틸)디메틸실란

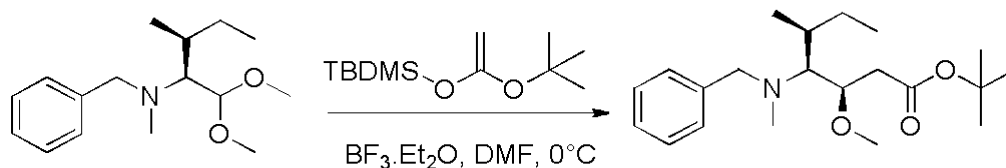


[0712]

[0713] 디이소프로필아민 (20 g, 186.71 mmol, 1.08 당량)이 불활성 대기에서 170 mL의 THF에 용해되었고, -78°C로 냉각되었다. nBuLi (2.4 M, 78.8 mL)가 한 방울씩 첨가되었고, 용액은 (LDA-리튬 디이소프로필아마이드를 얻도록) *tert*-부틸 아세테이트 (20 g, 172.18 mmol, 1.00 당량)를 첨가하기 이전에 낮은 온도에서 30분 교반되었다. 반응 혼합물이 35 mL의 THF에서 헥사메틸포스포아마이드 (HMPA, 25.8 mL) 및 *tert*-부틸디메틸클로로실란 (TBDMSCl, 28 g, 185.80 mmol, 1.08 당량)를 첨가하기 이전에 -78°C에서 20분 교반되었다. 교반은 낮은 온도에서 추가 20분 동안 계속되었고, 다음으로 차가운 수조가 제거되었다. 용액은 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 100 mL의 물에 재용해되었고, 100 mL의 PE로 3회 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 500 mL의 NaCl-포화 수용

성 용액으로 한 번 세척되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 무색 오일의 형태로 16.6 g (83%)의 화합물 **1Q**를 수득하도록 증류에 의해 정제되었다.

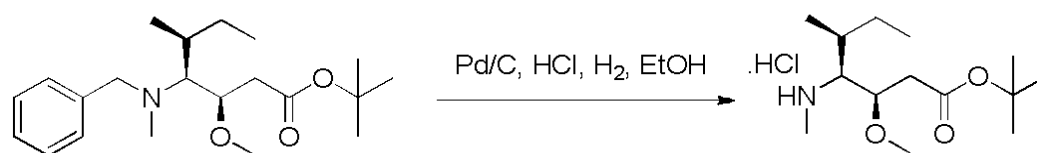
[0714] **화합물 1R:** *터르-부틸 (3R,4S,5S)-4-[벤질(메틸)아미노]-3-메톡시-5-메틸 헵타노에이트*



[0715]

[0716] 화합물 **1P** (2.0 g, 7.54 mmol, 1.00 당량) 및 화합물 **1Q** (2.6 g, 11.28 mmol, 1.50 당량)가 불활성 대기에서 33 mL의 DCM에 용해되었다. 용액은 0°C로 냉각되었다. DMF (1.2 g)가 7.5 mL의 DCM에 넣은 BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (2.1 g) 용액과 함께 한 방울씩 첨가되었다. 교반이 0°C에서 24시간 동안 계속되었다. 반응 배지는 30 mL의 소듐 카보네이트 (10 %)로 한 번, 50 mL의 NaCl-포화 수용성 용액으로 두 번 세척되었고, 다음으로 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 노란색 오일의 형태로 1.82 g (91%)의 화합물 **1R**을 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:100)로 정제되었다.

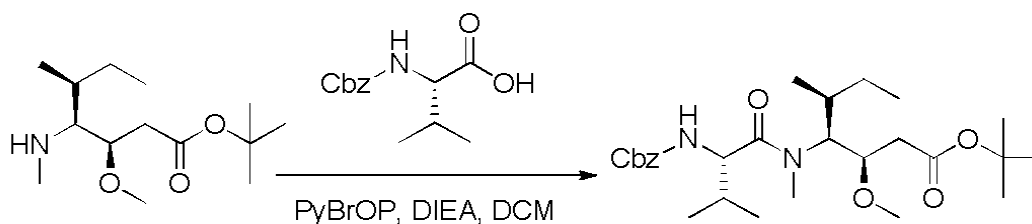
[0717] **화합물 1S:** (3R,4S,5S)-3-메톡시-5-메틸-4-(메틸아미노)헵타노에이트 하이드로 클로라이드



[0718]

[0719] 화합물 **1R** (2.4 g, 6.87 mmol, 1.00 당량)이 Pd/C (0.12 g) 및 농축된 염산 (0.63 mL)의 존재 시 불활성 대기에서 35 mL의 에탄올에 용해되었다. 질소 대기가 수소 대기로 교체되었고, 반응 배지는 상온에서 18시간 교반 하에 방치되었다. 반응 배지는 여과되었고 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 50 mL의 헥산에서 분쇄되었고, 상층 액은 제거되었으며, 이는 감압 하에 건조한 이후에 흰색 고체의 형태로 1.66 g (82%)의 화합물 **1S**를 주었다.

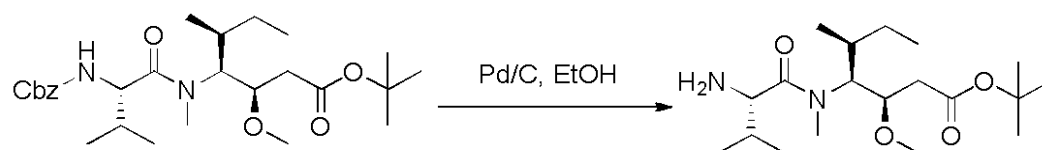
[0720] **화합물 1T:** *터르-부틸 (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[(벤질옥시)카르보닐]아미노]-N,3-디메틸부탄아미도]-3-메톡시-5-메틸헵타노에이트*



[0721]

[0722] (2S)-2-[(벤질옥시)카르보닐]아미노]-3-메틸부탄노산 (15 g, 0.40 mmol, 1.00 당량)가 DIEA (38.3 mL) 및 브로모트리피플리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBrOP, 32.3g)의 존재 시 300 mL의 DCM에 용해되었다. 용액은 화합물 **1S** (15.99g, 0.42 mmol, 1.07 당량)를 첨가하기 이전에 상온에서 30분 교반되었다. 반응 배지는 2시간 교반되었고, 다음으로 농축되었다. 잔류물은 무색 오일의 형태로 17 g (58%)의 화합물 **1T**를 수득하도록 아세토니트릴 (ACN) 및 물의 혼합물 (40분에서 30:70 내지 100:0)로 역상 (C18)에서 정제되었다.

[0723] **화합물 1U:** *터르-부틸 (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-아미노-N,3-디메틸부탄아미도]-3-메톡시-5-메틸헵타노에이트*



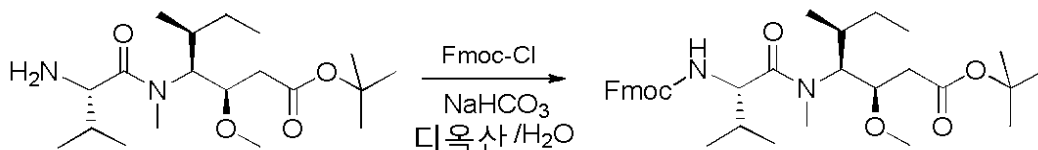
[0724]

[0725] 화합물 **1T** (76 mg, 0.15 mmol, 1.00 당량)이 Pd/C (0.05 g)의 존재 시 불활성 대기에서 10 mL의 에탄올에 용해되었다. 질소 대기가 수소 대기로 교체되었고, 반응은 상온에서 2시간 교반되었다. 반응 배지가 여과되었고, 무



색 오일의 형태로 64 mg의 화합물 **1U**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[0726] **화합물 1V**: (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[[9H-플루오렌-9-일-메톡시]카르보닐] 아미노]-N,3-디메틸부탄아미도]-3-메톡시-5-메틸헵타노에이트



[0727]

[0728] 화합물 **1U** (18.19 g, 50.74 mmol, 1.00 당량)가 소듐 바이카보네이트 (12.78 g, 152 mmol, 3.00 당량) 및 9H-플루오렌-9-일-메틸 클로로포르메이트 (Fmoc-Cl, 19.69 g, 76 mmol, 1.50 당량)의 존재 시 400 mL의 1,4-디옥산/물 혼합물 (1:1)에 용해되었고, 다음으로 상온에서 2시간 교반되었다. 반응 배지가 다음으로 500 mL의 물로 희석되었고, 200 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 200 mL의 NaCl-포화 수용성 용액으로 한 번 세척되었으며, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었고, 흐린 노란색 오일의 형태로 40 g의 부분적으로 정제된 화합물 **1V**를 수득하도록 농축되었다.

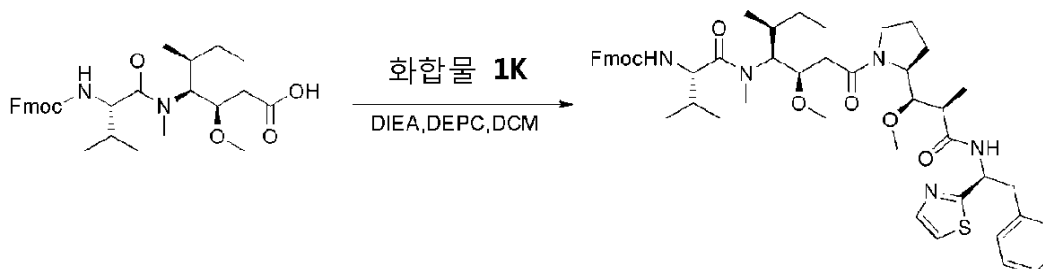
[0729] **화합물 1W**: (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[[9H-플루오렌-9-일-메톡시]카르보닐] 아미노]-N,3-디메틸부탄아미도]-3-메톡시-5-메틸헵타노산



[0730]

[0731] 화합물 **1V** (40 g, 68.88 mmol, 1.00 당량)이 중성 대기에서 600 mL의 DCM에 용해되었다. TFA (300 mL)가 첨가되었다. 용액은 상온에서 2시간 교반되었고, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물이 무색 오일 형태로 23.6 g (65%)의 화합물 **1W**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 메탄올 및 DCM의 혼합물 (1:10)로 정제되었다.

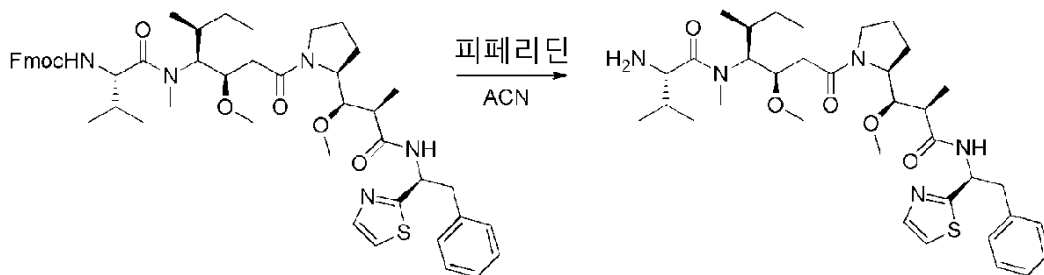
[0732] **화합물 1X**: 9H-플루오렌-9-일-메틸 N-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-2-[[[1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]카바모일]에틸]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일](메틸) 카바모일]-2-메틸프로필]카바메이트



[0733]

[0734] 화합물 **1W** (2.53 g, 4.82 mmol, 1.08 당량)가 화합물 **1K** (2.18 g, 4.47 mmol, 1.00 당량), DEPC (875 mg, 5.37 mmol, 1.20 당량) 및 DIEA (1.25 g, 9.67 mmol, 2.16 당량)의 존재 시 20 mL의 DCM에 용해되었다. 반응 혼합물은 상온에서 밤샘 동안 방치되었고, 다음으로 연속적으로 50 mL의 포화 KHSO<sub>4</sub> 및 100 mL의 물로 세척되었으며, 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 흐린 노란색 고체의 형태로 2.8 g (71%)의 화합물 **1X**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 메탄올 및 DCM의 혼합물 (1:200 내지 1:40)로 정제되었다.

[0735] **화합물 1Y**: (2S)-2-아미노-N-[(3R,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-2-[[[1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]카바모일]에틸] 피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N,3-디메틸부탄아마이드



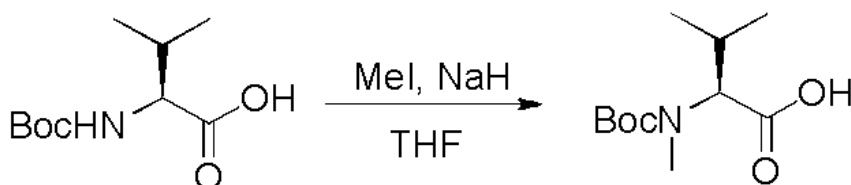
[0736]

[0737]

화합물 **1X** (2.8 g, 3.18 mmol, 1.00 당량)이 피페리딘 (3 mL)의 존재 시 아세토니트릴 (ACN, 12 mL)에 용해되었고, 상온에서 18시간 교반 하에 방치되었다. 반응은 50 mL의 물로 중화되었고, 다음으로 100 mL의 DCM으로 2회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 노란색 고체의 형태로 1.2 g (57%)의 화합물 **1Y**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에 메탄올 및 DCM 혼합물 (1:100 내지 1:40)로 정제되었다.

[0738]

**화합물 1ZA**: (2S)-2-[[*(tert*-부톡시)카르보닐](메틸)아미노]-3-메틸 부탄노산



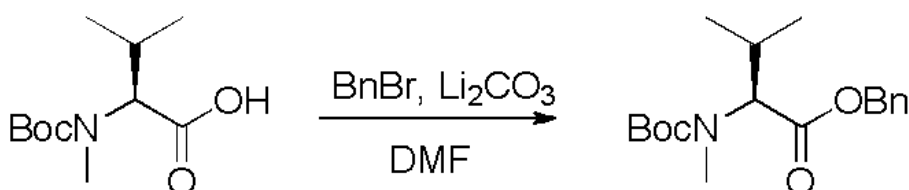
[0739]

[0740]

(2S)-2-[[*(tert*-부톡시)카르보닐]아미노]-3-메틸부탄노산 (63 g, 289.97 mmol, 1.00 당량)이 불활성 대기에서 요오드메탄 (181 mL)의 존재 시 THF (1000 mL)에 용해되었다. 용액은 소듐 하이드라이드 (116 g, 4.83 mol, 16.67 당량)를 적은 일정량들로 첨가하기 이전에 0°C로 냉각되었다. 반응 혼합물은 0°C에서 1.5시간 교반되었고, 다음으로 차가운 수조가 제거되었으며, 교반이 18시간 계속되었다. 반응은 200 mL의 물로 중화된 다음 감압 하에서 농축되었다. 잔류물 수용성 상은 4 리터의 물로 희석되었고, 200 mL의 EtOAc로 한 번 세척되었으며, 그의 pH가 1 N의 염산 용액으로 3 및 4 사이 범위로 조정되었다. 혼합물은 1.2 L의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 노란색 오일의 형태로 60 g (89%)의 화합물 **1ZA**를 수득하도록 농축되었다.

[0741]

**화합물 1ZB**: 벤질 (2S)-2-[[*(tert*-부톡시)카르보닐](메틸)아미노]-3-메틸부타노에이트

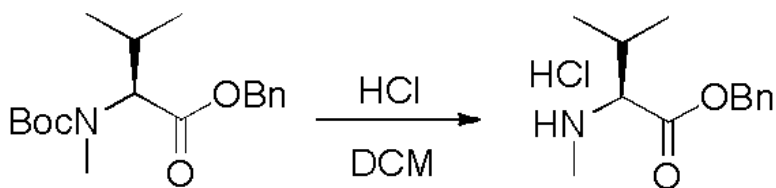


[0742]

[0743]

화합물 **1ZA** (47 g, 203.21 mmol, 1.00 당량)이 Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15.8 g, 213.83 mmol, 1.05 당량)의 존재 시 DMF (600 mL)에 용해되었다. 용액은 0°C로 냉각되었고, 벤질 브로마이드 (BnBr 57.9 g, 338.53 mmol, 1.67 당량)가 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물은 400 mL의 물로 중화되기 이전에 교반 하에 밤샘 동안 방치되었고, 여과되었다. 용액이 500 mL의 EtOAc로 2회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 농축되었다. 잔류물은 노란색 오일의 형태로 22.5 g (34%)의 화합물 **1ZB**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:100 내지 1:20)로 정제되었다.

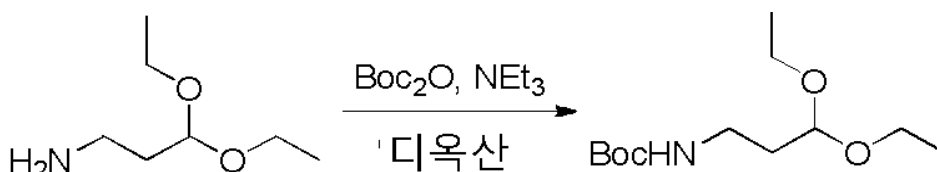
[0744] **화합물 1ZC:** 벤질 (2S)-3-메틸-2-(메틸아미노)부타노에이트 하이드로클로라이드



[0745]

[0746] 화합물 **1ZB** (22.5 g, 70.00 mmol, 1.00 당량)가 150 mL의 DCM에 용해되었다. 기체성 염산이 버블화되었다. 반응은 상온에서 1시간 교반된 다음, 노란색 고체의 형태의 17 g (94%)의 화합물 **1ZC**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

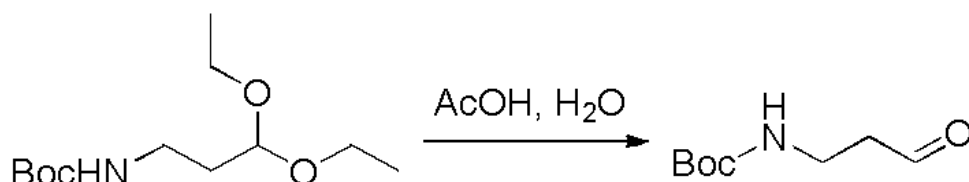
[0747] **화합물 1ZD:** *tert*-부틸 *N*-(3,3-디에톡시프로필)카바메이트



[0748]

[0749] 3,3-디에톡시프로판-1-아민 (6 g, 40.76 mmol, 1.00 당량)이 TEA (4.45 g, 43.98 mmol, 1.08 당량)의 존재 시 1,4-디옥산 (30 mL)에 용해되었고, 다음으로 0°C로 냉각되었다. 20 mL의 디옥산에 희석된 (Boc)<sub>2</sub>O (9.6 g, 43.99 mmol, 1.08 당량)가 한 방울씩 첨가되었다. 용액은 10 mL의 물로 중화되기 이전에 0°C에서 2시간, 다음으로 상온에서 밤샘 동안 교반되었다. pH가 HCl (1%)로 5로 조정되었다. 용액은 50 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 흐린 노란색 오일의 형태로 8.21 g (81%)의 화합물 **1ZD**를 수득하도록 농축되었다.

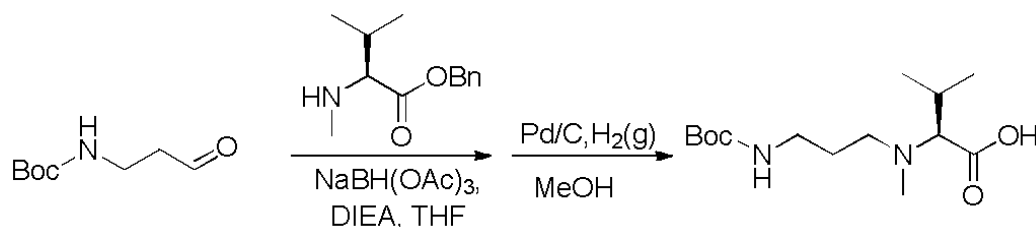
[0750] **화합물 1ZE:** *tert*-부틸 *N*-(3-옥소프로필) 카바메이트



[0751]

[0752] 화합물 **1ZD** (8.20 g, 33.15 mmol, 1.00 당량)가 18.75 mL의 아세트산에 용해되었고, 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었다. 다음으로 반응 배지는 30 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 30 mL의 포화 NaCl로 3회 세척되었으며, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었고, 질은 적색 오일의 형태로 5 g (87%)의 화합물 **1ZE**를 수득하도록 농축되었다.

[0753] **화합물 1ZF:** (2S)-2-[(3-[(*tert*-부톡시)카르보닐]아미노)프로필](메틸) 아미노]-3-메틸부탄노산



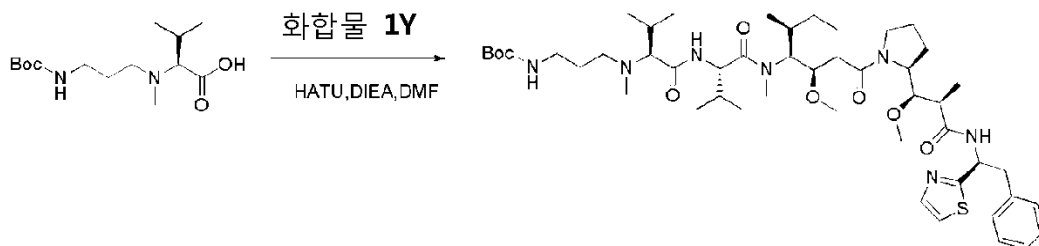
[0754]

[0755] 화합물 **1ZE** (2.4 g, 13.86 mmol, 1.00 당량)가 화합물 **1ZC** (3.56 g, 13.81 mmol, 1.00 당량) 및 DIEA (9.16 mL, 4.00 당량)의 존재 시 50 mL의 THF에 용해되었다. 반응 혼합물이 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (5.87 g, 27.70 mmol, 2.00 당량)를 첨가하기 이전에 상온에서 30분 교반되었다. 교반이 밤샘 동안 계속된 다음, 반응은 100 mL의 물로 중화되었으며, 50 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 농축되었다. 잔류물은 실리카 겔럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:4)로 부분적으

로 정제되었다. 획득된 조산물은 Pd/C (1.2 g)의 존재 시 20 mL의 메탄올에 재용해되었고, 정상 온도 및 압력에서 20분 동안 수소화되었다. 반응 배지는 여과되었고, 흰색 고체의 형태로 200 mg (5%)의 화합물 **1ZF**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[0756]

**화합물 1ZG:** *tert*-부틸 *N*-(3-[[[(1*S*)-1-[[[(1*S*)-1-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-메톡시-1-[(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-메톡시-2-메틸-2-[[[(1*S*)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]카바모일]틸]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4 일](메틸) 카바모일]-2-메틸프로필]카바모일]-2-메틸프로필](메틸)아미노]프로필) 카바메이트



[0757]

[0758]

화합물 **1Y** (50 mg, 0.08 mmol, 1.00 당량)가 화합물 **1ZF** (26.2 mg, 0.09 mmol, 1.20 당량), DIEA (37.7 mL) 및 *O*-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-*N,N,N',N'*-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HATU, 43.3 mg, 0.11 mmol, 1.50 당량)의 존재 시 2 mL의 DMF에 용해되었다. 반응이 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 10 mL의 물에 희석되었으며 5 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 부분적으로 정제된 무색 오일의 형태로 100 mg의 화합물 **1ZG**를 수득하도록 농축되었다.

[0759]

화합물 **1ZG** (90 mg, 0.10 mmol, 1.00 당량)가 중성 대기에서 2 mL의 DCM에 용해되었고, 용액이 얼음 수조에서 냉각되었다. TFA (1 mL)가 첨가되었고, 반응은 상온에서 2시간 동안 교반되었으며, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물이 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05%의 TFA에 완충된 물 / ACN; 18 내지 31% ACN 7분, 다음으로 31% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 위터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 **1**은 흰색 고체의 형태로 25% (23 mg)의 수율로 획득되었다.

[0760]

LC/MS/UV (에틀란티스 T3 컬럼, 3  $\mu$ m, 4.6 x 100 mm; 35°C; 1 mL /분, 물에서 30% 내지 60% ACN (6분에서 20 mM 암모늄 아세테이트); ESI ( $C_{44}H_{73}N_7O_6S$ , 정확한 질량 827.53)  $m/z$ : 829 ( $MH^+$ ), 5.84분 (93.7%, 254 nm).

[0761]

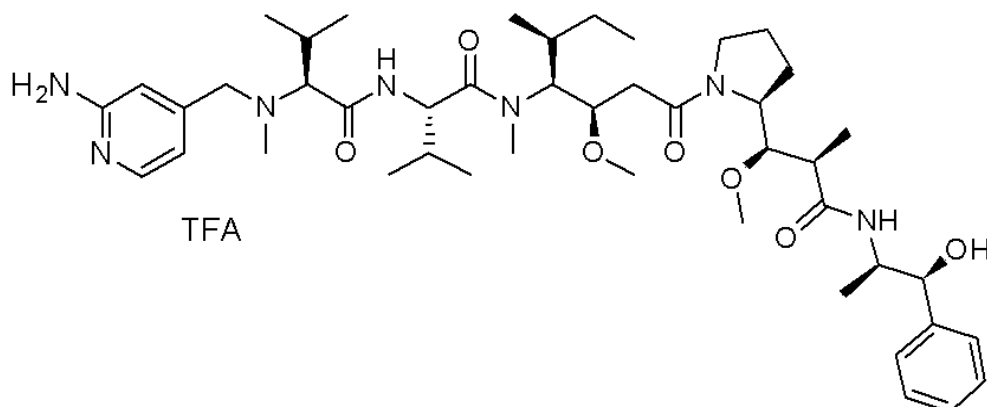
$^1H$  NMR (300MHz,  $CD_3OD$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 7.85 - 7.80 (m, 1H); 7.69 - 7.66 (m, 1H), 7.40 - 7.10 (m, 5H), 5.80 - 5.63 (m, 1H), 4.80 - 4.65 (m, 2H), 4.22 -4.00 (m, 1H), 3.89 - 0.74 (m, 58H).

[0762]

**기준 화합물 2**

[0763]

(*S*)-2-((*S*)-2-(((2-아미노피리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일)-*N*,3-디메틸부탄아마이드, 트리플루오로아세트산

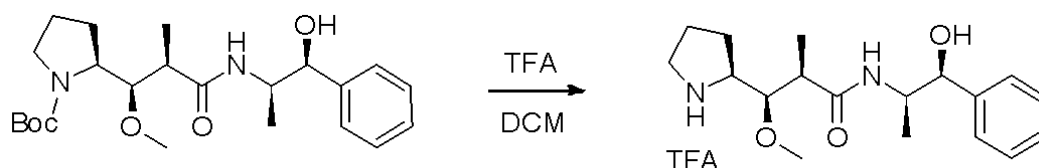


[0764]

[0765] **화합물 2A:** *터르-부틸 (S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-카복실레이트*

[0766] 화합물 **1D** (2.5 g, 8.70 mmol, 1.00 당량) 및 (1S,2R)-2-아미노-1-페닐프로판-1-올 (1.315 g, 8.70 mmol, 1.00 당량)이 불활성 대기에서 DMF (35 mL)에 용해되었다. 용액은 0℃로 냉각된 다음 DEPC (1.39 mL) 및 TEA (1.82 mL)가 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물이 0℃에서 2시간, 상온에서 4시간 교반되었다. 반응 혼합물은 200 mL의 물로 희석되었고, 50 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 50 mL의 KHSO<sub>4</sub> (1 mol/L)로 한 번, 50 mL의 NaHCO<sub>3</sub> (sat.)로 한 번, 50 mL의 NaCl (sat.)로 한 번 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에 서 건조되어 여과되었고, 노란색 고체의 형태로 3.6 g (98%)의 화합물 **2A**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

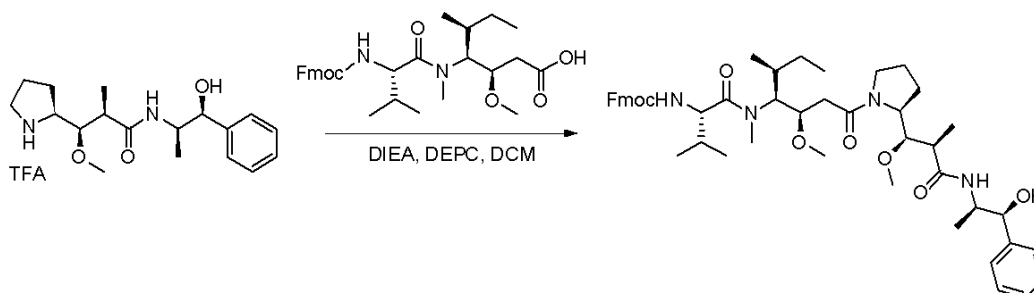
[0767] **화합물 2B:** (2R,3R)-*N*-((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)-3-메톡시-2-메틸-3-((S)-피롤리딘-2-일)프로판아마이드-2,2,2-트리플루오로아세테이트



[0768]

[0769] 화합물 **2A** (2.7 g, 6.42 mmol, 1.00 당량)이 불활성 대기에서 DCM (40 mL)에 용해되었고, 다음으로 0℃로 냉각되었다. TFA (25 mL)가 첨가되었고, 용액이 0℃에서 2시간 교반되었다. 반응 혼합물은 노란색 오일의 형태로 4.4 g의 화합물 **2B**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

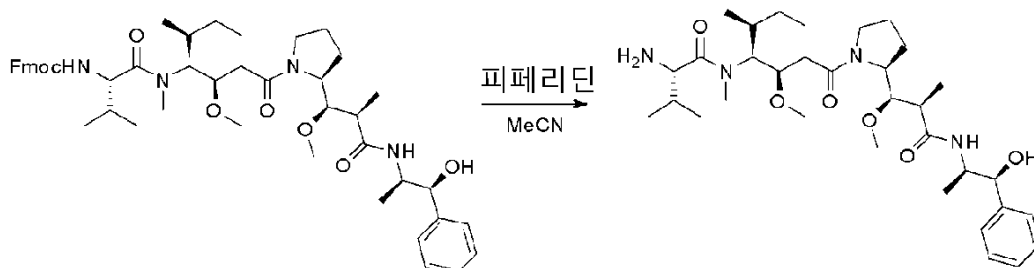
[0770] **화합물 2C:** (9H-플루오렌-9-일)메틸 ((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일) (메틸)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트



[0771]

[0772] 화합물 **2B** (4.4 g, 10.13 mmol, 1.00 당량) 및 **1W** (5.31 g, 10.12 mmol, 1.00 당량)가 불활성 대기에서 DCM (45 mL)에 용해되었다. 용액은 0℃로 냉각되었고, 다음으로 DEPC (1.62 mL) 및 DIEA (8.4 mL)가 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물이 0℃에서 2시간, 다음으로 상온에서 밤샘 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 100 mL의 물로 희석되었고, 50 mL의 DCM으로 3회 추출되었다. 유기상들이 조합되었고, 50 mL의 KHSO<sub>4</sub> (1 mol/L)로 한 번, 50 mL의 NaHCO<sub>3</sub> (sat.)로 한 번, 50 mL의 NaCl (sat.)로 한 번 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 노란색 고체의 형태로 3.3 g (39%)의 화합물 **2C**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

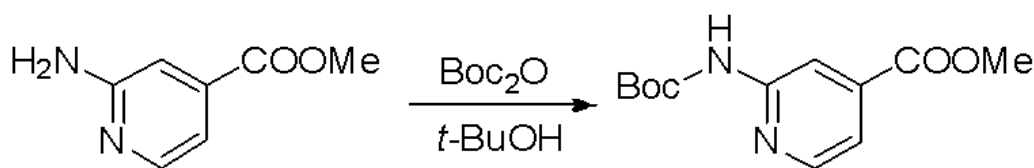
[0773] **화합물 2D:** (S)-2-아미노-*N*-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일)-*N*,3-디메틸부탄아마이드



[0774]

[0775] 화합물 **2C** (300 mg, 0.36 mmol, 1.00 eq.)가 불활성 대기에서 ACN (2 mL) 및 피페리딘 (0.5 mL)에 용해되었다. 용액은 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 감압 하에 증발되어 건조되었다. 잔류물은 흰색 고체의 형태로 150 mg (68%)의 화합물 **2D**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 DCM 및 MeOH의 혼합물 (1:100)로 정제되었다.

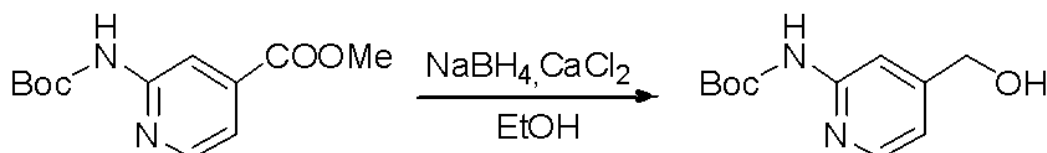
[0776] **화합물 2E:** 메틸 2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)이소노코티네이트



[0777]

[0778] 메틸 2-아미노피리딘-4-카복실레이트 (2 g, 13.14 mmol, 1.00 당량)가 *tert*-부탄올 (20 mL)에 용해되었고, 이후에 디-*tert*-부틸 디카보네이트 (4.02 g, 18.42 mmol, 1.40 당량)가 첨가되었다. 반응 혼합물이 60℃에서 밤샘 동안 교반된 다음, 반응이 수용성 1 M NaHCO<sub>3</sub> 용액 (50 mL)을 첨가하여 정지되었다. 고체가 여과에 의해 회수되었고, 50 mL의 EtOH로 세척된 다음 흰색 고체의 형태로 2.5 g (75%)의 화합물 **2E**를 수득하도록 진공에서 건조되었다.

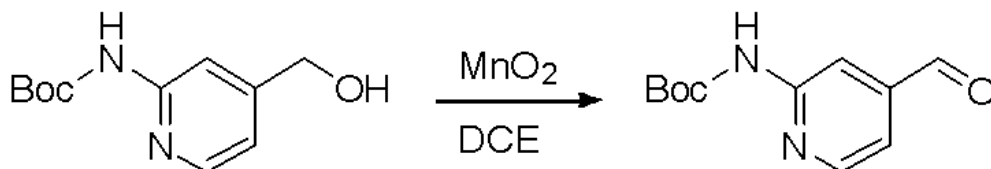
[0779] **화합물 2F:** *tert*-부틸 (4-(하이드록시메틸)피리딘-2-일)카바메이트



[0780]

[0781] 화합물 **2E** (2.5 g, 9.91 mmol, 1.00 당량) 및 CaCl<sub>2</sub> (1.65 g)가 EtOH (30 mL)에 용해되었다. 용액이 0℃로 냉각되었고, 다음으로 NaBH<sub>4</sub> (1.13 g, 29.87 mmol, 3.01 당량)가 점차로 첨가되었다. 용액은 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 반응이 물 (50 mL)의 첨가에 의해 정지되었다. 혼합물은 20 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 20 mL의 NaCl (sat.)로 두 번 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에 건조되어 여과되었고, 무색 고체의 형태로 2.0 g (90%)의 화합물 **2F**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[0782] **화합물 2G:** *tert*-부틸 (4-포르밀피리딘-2-일)카바메이트

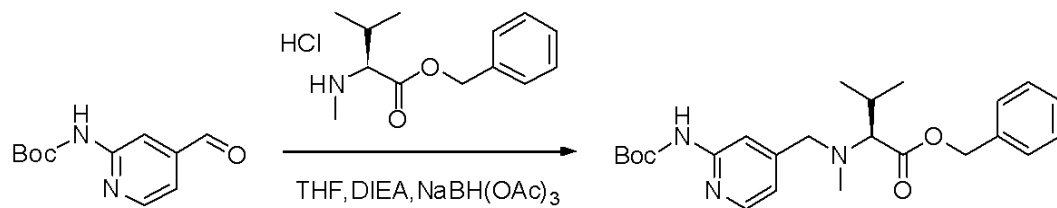


[0783]

[0784] 화합물 **2F** (2.5 g, 11.15 mmol, 1.00 당량)가 DCE (25 mL)에 용해되었고, 다음으로 19.4 g (223.14 mmol, 20.02 당량)의 MnO<sub>2</sub>가 첨가되었다. 혼합물은 70℃에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 고체들이 여과에 의해 제거되었다. 여과물은 흰색 고체의 형태로 1.4 g (57%)의 화합물 **2G**를 수득하도록 증발되었다.

[0785] **화합물 2H:** 벤질 (S)-2-(((2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)피리딘-4-일)메틸) (메틸)아미노)-3-메틸부타노에이

트



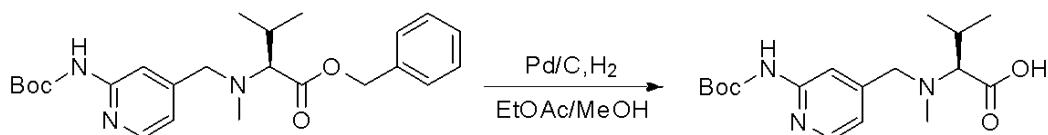
[0786]

[0787]

화합물 **2G** (2.3 g, 10.35 mmol, 1.00 당량)이 화합물 **1ZC** (2.93 g, 11.37 mmol, 1.10 당량), DIEA (5.39 g, 41.71 mmol, 4.03 당량) 및 NaBH(OAc)<sub>3</sub> (4.39 g, 20.71 mmol, 2.00 당량)의 존재 시 25 mL의 THF에 용해되었다. 반응 혼합물은 상온에서 6시간 교반되었고, 60 mL의 NaHCO<sub>3</sub> (sat.)로 중화되었으며, 20 mL의 AcOEt로 3회 추출되었다. 유기상들이 20 mL의 NaCl (sat.)로 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 흰색 고체의 형태로 2.7 g (61%)의 화합물 **2H**를 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:15)로 정제되었다.

[0788]

**화합물 2I:** (S)-2-(((2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)피리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄노산



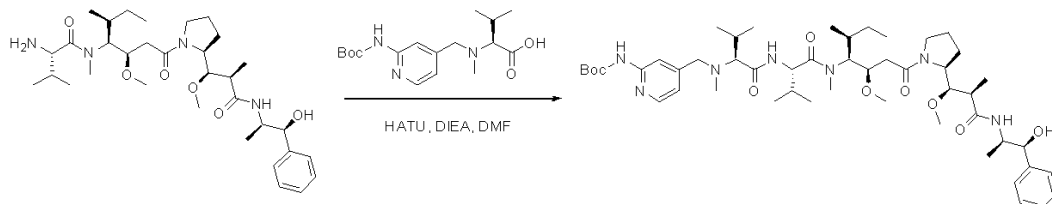
[0789]

[0790]

화합물 **2H** (500 mg, 1.17 mmol, 1.00 당량)가 Pd/C (250 mg)의 존재 시 10 mL의 AcOEt 및 2 mL의 메탄올에 용해되었고, 상온 및 대기압에서 3시간 동안 수소화되었다. 반응 배지는 여과되었고, 무색 오일의 형태로 254 mg (64%)의 화합물 **2I**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[0791]

**화합물 2J:** *tert*-부틸 (4-(((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-세크-부틸)-10-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-3,6-디이소프로필-2,8-디메틸-4,7-디옥소-11-옥사-2,5,8-트리아자도데실)피리딘-2-일) 카바메이트



[0792]

[0793]

화합물 **2J**이 화합물 **1ZG**와 유사한 방식으로 DMF (3 mL)에서 아민 **2D** (85.2 mg, 0.14 mmol, 1.50 당량), 산 **2I** (31.7 mg, 0.09 mmol, 1.00 당량), HATU (42.9 mg, 0.11 mmol, 1.20 당량) 및 DIEA (36.7 mg, 0.28 mmol, 3.02 당량)로부터 제조되었다. 증발하여 건조된 이후, 100 mg의 조산물이 흰색 고체의 형태로 획득되었다.

[0794]

화합물 **2J** (100 mg, 0.11 mmol, 1.00 당량)가 2 mL의 DCM 및 1 mL의 TFA에 용해되었다. 반응은 상온에서 1시간 동안 교반되었고, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물 (80 mg)은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05 % TFA에 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10 분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 **2**가 흰색 고체의 형태로 6% (6.3 mg)의 수율로 획득되었다.

[0795]

LC/MS/UV (아센티스 익스프레스 C18 컬럼, 2.7  $\mu$ m, 4.6 x 100 mm; 40°C; 1.8 mL/분, 물에서 10% 내지 95% ACN (0.05 % TFA) 6분); ESI (C<sub>45</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>, 정확한 질량 823.56)  $m/z$ : 824.5 (MH<sup>+</sup>) 및 412.9 (M.2H<sup>+</sup>/2, 100 %), 3.21분 (99.2%, 210 nm)

[0796]

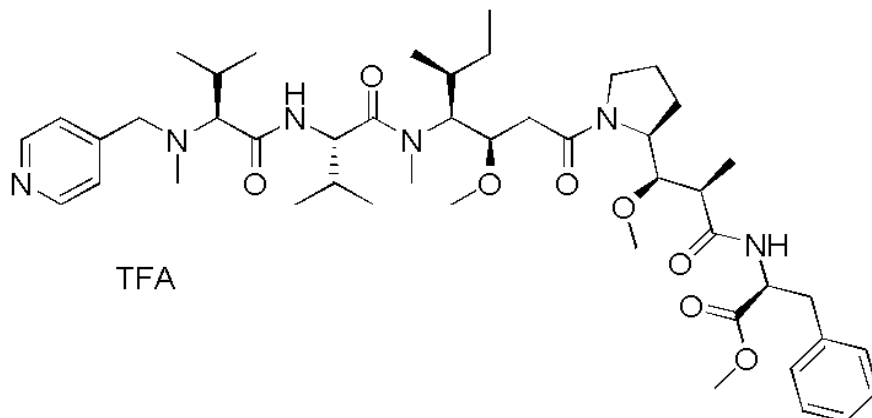
<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 7.81 - 7.79 (m, 1H); 7.39 - 7.29 (m, 5H); 6.61 - 6.59 (m, 2H); 4.84 - 4.52 (m, 1H); 4.32 - 4.02 (m, 1H); 3.90 - 2.98 (m, 10H); 2.90 - 2.78 (m, 1H);



2.55 - 0.81 (m, 39H).

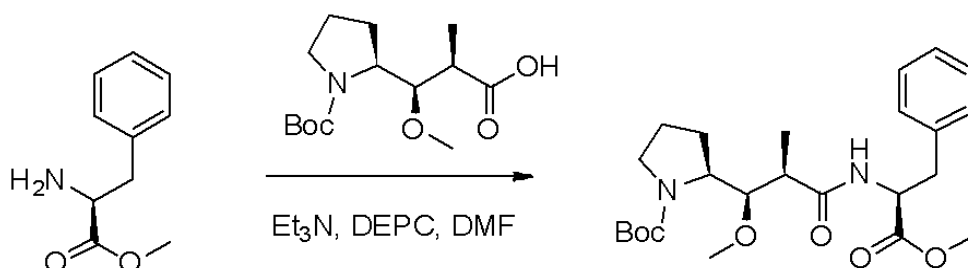
[0797] **기준 화합물 3**

[0798] 메틸 ((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸(피리딘-4-일-메틸)아미노)부탄아미도)부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판오에이트, 트리플루오로아세트산



[0799]

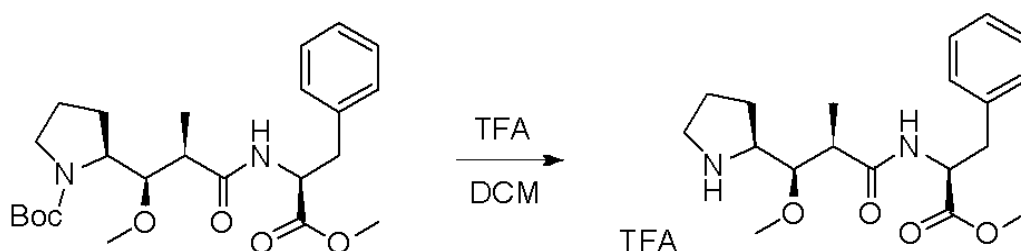
[0800] **화합물 3A:** *터르*-부틸 (S)-2-((1R,2R)-1-메톡시-3-(((S)-1-메톡시-1-옥소-3-페닐프로판-2-일)아미노)-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-카복실레이트



[0801]

[0802] 화합물 **1D** (3 g, 10.44 mmol, 1.00 당량) 및 메틸 (S)-2-아미노-3-페닐프로판오에이트 (2.25 g, 12.55 mmol, 1.20 당량)이 불활성 대기에서 DMF (40 mL)에 용해되었다. 용액은 0°C로 냉각되었고, 다음으로 DEPC (1.67 mL, 1.05 당량) 및 TEA (3.64 mL, 2.50 당량)가 한 방울씩 첨가되었다. 반응 혼합물이 0°C에서 2시간, 다음으로 상온에서 밤샘 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 100 mL의 물에 희석되었고, 50 mL EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 100 mL의 KHSO<sub>4</sub> (1 mol/L)으로 한 번, 100 mL의 NaHCO<sub>3</sub> (sat.)으로 한 번, 100 mL의 NaCl (sat.)으로 한 번 세척되었으며, 다음으로 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었고, 무색 오일의 형태로 4 g (85%)의 화합물 **3A**를 수득하도록 압력 하에 농축되었다.

[0803] **화합물 3B:** 메틸 (S)-2-((2R,3R)-3-메톡시-2-메틸-3-((S)-피롤리딘-2-일)프로판아미도)-3-페닐프로판오에이트의 2,2,2-트리플루오로아세테이트



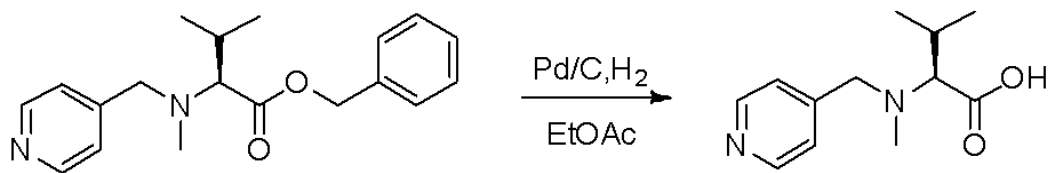
[0804]

[0805] 화합물 **3A** (5 g, 11.15 mmol, 1.00 당량)가 불활성 대기에서 DCM (40 mL)에 용해되었다. TFA (25 mL)가 첨가되었고, 용액은 2시간 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 노란색 오일의 형태로 8 g의 화합물 **3B**를 수득하도록 감압 하에서 농축되었다.





[0815] **화합물 3F:** (S)-3-메틸-2-(메틸(피리딘-4-일 메틸)아미노)부탄노산



[0816]

[0817] 화합물 **3E** (800 mg, 2.56 mmol, 1.00 당량)이 Pd/C (300 mg)의 존재 시 30 mL의 AcOEt에 용해되었고, 상온 및 대기압에서 3시간 동안 수소화되었다. 반응 배지가 여과되었고 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 흰색 고체의 형태로 100 mg (18%)의 화합물 **3F**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 DCM 및 MeOH의 혼합물 (100:1 내지 5:1)로 정제되었다.

[0818]

화합물들 **3D** (50 mg, 0.08 mmol, 1.00 당량) 및 **3F** (26.34 mg, 0.12 mmol, 1.50 당량)가 3 mL의 DCM에 용해되었다. 용액은 0°C로 냉각되었고, 다음으로 0.018 mL의 DEPC 및 0.0392 mL의 DIEA가 첨가되었다. 반응이 0°C에서 2시간 동안, 다음으로 상온에서 밤샘 동안 교반되었다. 반응 배지가 감압 하에서 농축되었고, 잔류물 (70 mg)이 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프렙 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05%의 TFA에 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 워터스 2545 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 **3**은 흰색 고체의 형태로 27% (20 mg)의 수율로 획득되었다.

[0819]

LC/MS/UV (아센티스 익스프레스 C18 컬럼, 2.7  $\mu$ m, 4.6 x 100 mm; 40°C; 1.5 mL/분, 물에서 10% 내지 95% ACN (0.05% TFA) 8분); ESI ( $C_{46}H_{72}N_6O_8$ , 정확한 질량 836.5)  $m/z$ : 837.5 ( $MH^+$ ) 및 419.4 ( $M.2H^+/2$  (100%)), 7.04분 (90.0%, 210 nm)

[0820]

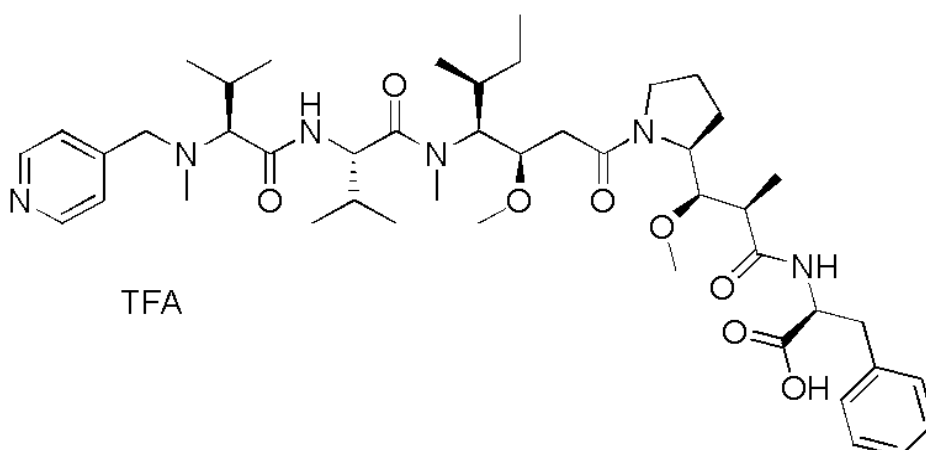
$^1H$  NMR (400MHz,  $CD_3OD$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 8.76 - 8.74 (m, 2H); 8.53 - 8.48 (m, 0.4H, NHCO 불완전한 교환); 8.29 - 8.15 (m, 0.8H, NHCO 불완전한 교환); 8.01 (s, 2H), 7.31 - 7.22 (m, 5H), 4.88 - 4.68 (m, 3H); 4.31 - 4.07 (m, 2H); 3.94 - 2.90 (m, 18H); 2.55 - 0.86 (m, 38H).

[0821]

#### 기준 화합물 4

[0822]

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸(피리딘-4-일 메틸)아미노)부탄아미도)부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로파노산, 트리플루오로아세트산



[0823]

[0824]

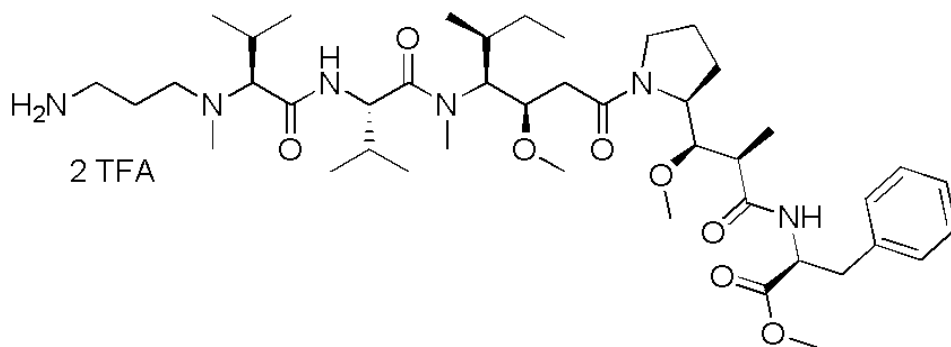
화합물 **3** (100 mg, 0.11 mmol, 1.00 당량)이 물 (5 mL), ACN (5 mL) 및 피페리딘 (2.5 mL)의 혼합물에 용해되었다. 반응 혼합물은 교반 하에 밤샘 동안 방치되었고, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물이 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프렙 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 워터스 2545 UV 검출기)에 의해 정제되었고, 흰색 고체의 형태로 20 mg (20 %)의 화합물 **4**를 수득하였다.

[0825] LC/MS/UV (아센티스 익스프레스 C18 컬럼, 2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 100 mm; 40°C; 1.5 mL/분, 물 (0.05% TFA)에서 10% 내지 95% ACN 8분; ESI ( $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_8$ , 정확한 질량 822.5)  $m/z$ : 823.5 ( $\text{MH}^+$ ) 및 412.4 ( $\text{M.2H}^+/2$ , 100 %), 6.84분 (89.1 %, 210 nm).

[0826]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 8.79 - 8.78 (m, 2H); 8.09 (m, 2H); 7.30 - 7.21 (m, 5H); 4.80 - 4.80 (m, 1H), 4.36 - 0.87 (m, 58H).

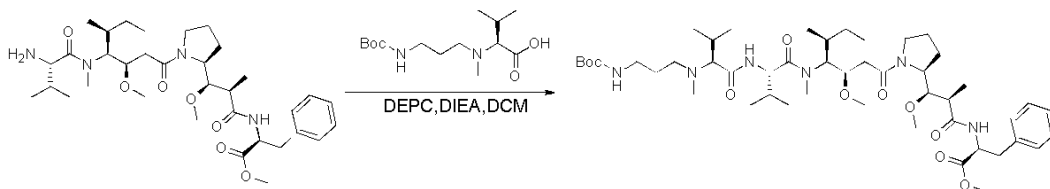
[0827] **기준 화합물 6**

[0828] 메틸 (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-아미노프로필) (메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판오에이트, 비스 트리플루오로아세트산



[0829]

[0830] **화합물 6A**: 메틸 (2S)-2-[(2R)-2-[(R)-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(3-[[ (터르-부톡시)카르보닐] 아미노]프로필) (메틸)아미노]-3-메틸 부탄아미도]-N,3-디메틸부탄아미도]-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일]-[메톡시]메틸]프로판아미도]-3-페닐프로판오에이트



[0831]

[0832] 화합물 3D (157.5 mg, 0.25 mmol, 1.00 당량)이 카복실산 1ZF (78.7 mg, 0.27 mmol, 1.10 당량), DEPC (46  $\mu\text{l}$ ) 및 DIEA (124  $\mu\text{l}$ )의 존재 시 불활성 대기에서 0°C로 3 mL의 DCM에 용해되었다. 반응 혼합물이 낮은 온도에서 2시간 교반되었고, 다음으로 차가운 수조가 제거되었으며, 교반이 4시간 동안 계속되었다. 다음으로 이것은 미가공 노란색 오일의 형태로 200 mg의 화합물 6A를 수득하도록 감압 하에 농축되었다. 이것은 이와 같이 다음의 단계에 사용되었다.

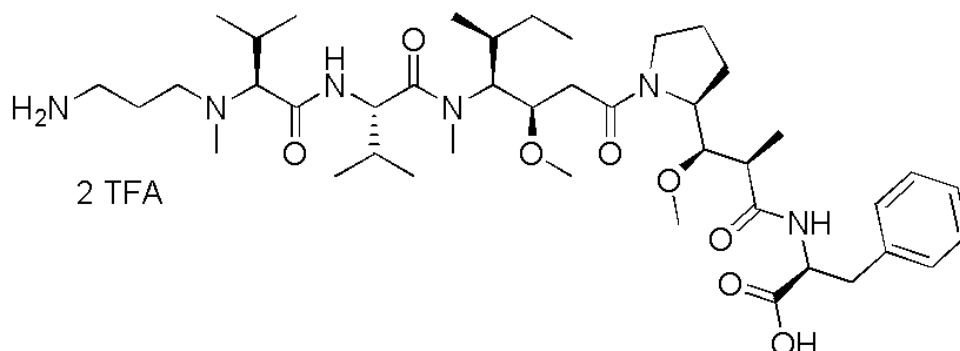
[0833] 화합물 6A (200 mg, 0.22 mmol, 1.00 당량)이 불활성 대기에서 0°C로 2 mL의 DCM에 용해되었다. TFA (1 mL)가 한 방울씩 첨가되었고, 차가운 수조가 제거되었다. 반응 혼합물이 상온에서 1시간 교반되었고, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu\text{m}$ , 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA에 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었고, 흰색 고체의 형태로 60 mg (26%, 2 단계들에서 수율)의 화합물 6를 수득하였다.

[0834] LC/MS/UV (조박스 에클립스 플러스 C8, 3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm; 1 mL/분, 40°C, 물 (0.1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )에서 30 내지 80% 메탄올 18분); ESI ( $\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{N}_6\text{O}_8$ , 정확한 질량 802.56)  $m/z$ : 804 ( $\text{MH}^+$ ); 11.50분 (91.5%, 210 nm).

[0835]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 8.52 (d, 0.3H, NHCO 불완전한 교환); 8.25 (d, 0.5H, NHCO 불완전한 교환); 7.30-7.22 (m, 5H); 4.9-4.6 (m, 3H); 4.2-4.0 (m, 1H); 4.0-0.86 (m, 61H).

[0836] 기준 화합물 7

[0837] (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-아미노프로필) (메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일) 피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판노산, 비스 트리플루오로아세트산



[0838]

[0839] 화합물 6 (70 mg, 0.08 mmol, 1.00 당량)이 물 (5 mL), ACN (2.5 mL) 및 피페리딘 (5 mL)의 혼합물에 용해되었다. 반응 혼합물이 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었고, 흰색 고체의 형태로 14.6 mg (21%)의 화합물 7를 수득하였다.

[0840]

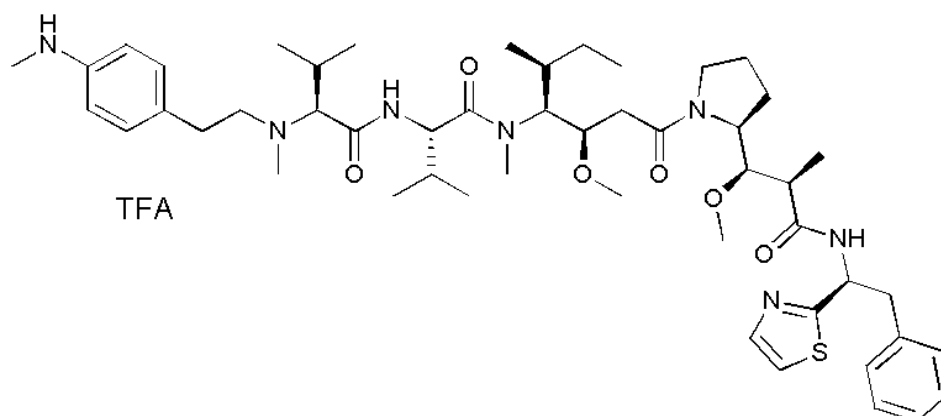
LC/MS/UV (아센티스 익스프레스 C18, 2.7  $\mu$ m, 4.6 x 100 mm; 1.5 mL/분, 40°C, 물 (0.05% TFA)에서 0 내지 80% 메탄올 8분); ESI ( $C_{42}H_{72}N_6O_8$ , 정확한 질량 788.54)  $m/z$ : 790 ( $MH^+$ ), 5.71분 (96.83%, 210 nm).

[0841]

$^1H$  NMR (300MHz,  $CD_3OD$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 8.42 (d, 0.3H, NHCO 불완전한 교환); 8.15 (d, 0.2H, NHCO 불완전한 교환); 7.31-7.21 (m, 5H); 4.9-4.6 (m, 3H); 4.25-4.0 (m, 1H); 4.0-0.86 (m, 59H).

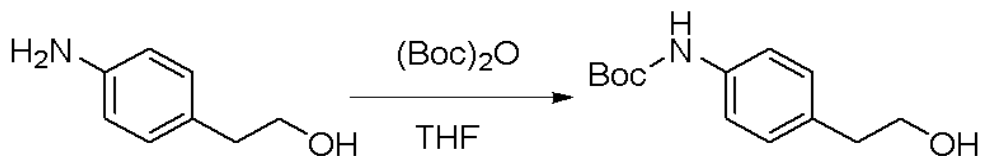
[0842] 화합물 11

[0843] (S)-N-((3R,4S,5S)-3-메톡시-1-((S)-2-((1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-((S)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸(4-(메틸아미노)펜에틸)아미노) 부탄아미도)부탄아마이드, 트리플루오로아세트산



[0844]

[0845] **화합물 11A:** *tert*-부틸 *N*-[4-(2-하이드록시에틸)페닐]카바메이트



[0846]

[0847] 디-*tert*-부틸 디카보네이트 (16.7 g, 77 mmol, 1.05 eq.)가 THF (200 mL)에 넣은 2-(4-아미노페닐)에탄올 (10 g, 72.9 mmol, 1 eq.)에 용해되었고, 반응은 상온에서 밤샘 동안 교반되었다. 혼합물은 EtOAc (200 mL)로 희석되었고, 물 (200 mL), 다음으로 HCl 1M (100 mL), 다음으로 포화된 수용성 NaHCO<sub>3</sub> 용액 (100 mL) 다음으로 염수 (100 mL)로 세척되었다. 유기상은 MgSO<sub>4</sub> 위에서 건조되었고, 감압 하에 증발되어 건조되었다. 조산물은 헵탄 (150 mL)으로 두 번 분쇄되었고, 흰색 고체로서 화합물 11A (14.7 g, 84%)를 공급하도록 진공 하에 건조되었다.

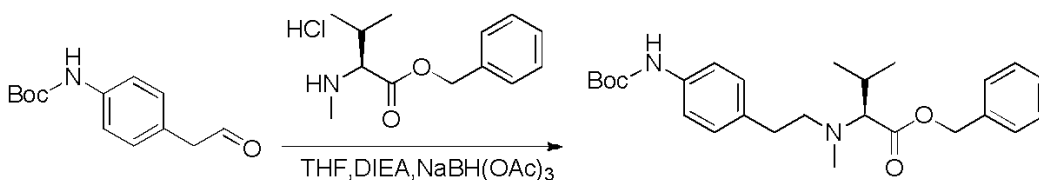
[0848] **화합물 11B:** *tert*-부틸 *N*-[4-(2-옥소에틸)페닐]카바메이트



[0849]

[0850] 화합물 11A (2.5 g, 10.5 mmol, 1.00 당량)가 25 mL의 DCM에 용해되었고, 다음으로 -78°C로 냉각되었다. DCM (10 mL)에 넣은 데스-마틴 페리도딘 용액 (DMP, 6.71 g, 15.8 mmol, 1.5 당량)이 한 방울씩 첨가되었다. 차가운 수조가 제거되었고, 교반이 상온에서 1시간 동안 계속되었다. 반응은 60 mL의 소듐 바이카보네이트-포화 수용성 용액 및 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-포화 수용성 용액의 50/50 혼합물로 중화되었다. 결과로 얻은 용액은 30 mL의 EtOAc으로 2회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, NaCl-포화 수용성 용액으로 두 번 세척되었으며, 무수 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 여과되어 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 흐린 노란색 고체의 형태로 1.0 g (40%)의 화합물 11B를 수득하도록 실리카겔 (EtOAc/PE 1/15) 상에서 정제되었다.

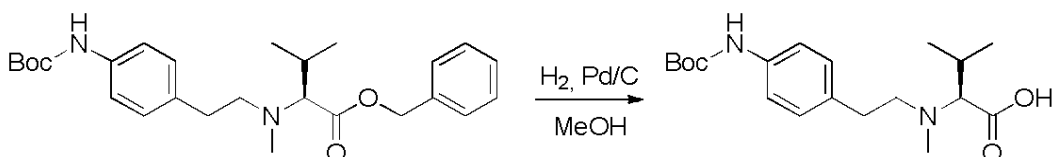
[0851] **화합물 11C:** 벤질 (2S)-2-[[2-(4-[[*tert*-부톡시)카르보닐]아미노]페닐)에틸](메틸)아미노]-3-메틸부타노에이트.



[0852]

[0853] 화합물 11C (3.5 g, 13.6 mmol, 1.1 당량)가 DIEA (6.4 g, 49.7 mmol, 4.0 당량), 알데하이드 11B (2.9 g, 12.3 mmol, 1.0 당량) 및 소듐 트리야세톡시보로하이드라이드 (5.23 g, 49.7 mmol, 2.0 당량)의 존재 시 THF (30 mL)에 용해되었다. 반응 혼합물은 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 60 mL의 소듐 바이카보네이트-포화 용액으로 중화되었다. 결과로 얻은 용액은 30 mL EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고 NaCl-포화 수용성 용액으로 두 번 세척되었으며, 무수 소듐 설페이트 위에서 건조되었고, 여과되어 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 노란색 오일의 형태로 3.7 g (68%)의 화합물 11C를 수득하도록 실리카겔 (EtOAc/PE 1:20) 상에서 정제되었다.

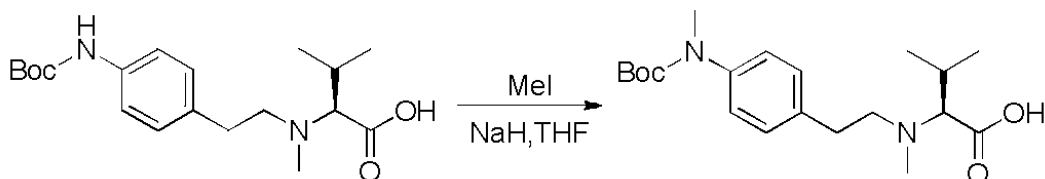
[0854] **화합물 11D:** (2S)-2-[[2-(4-[[*tert*-부톡시)카르보닐]아미노]페닐)에틸] (메틸)아미노]-3-메틸부탄노산



[0855]

[0856] 화합물 **11C** (2 g, 4.5 mmol, 1 당량)가 Pd/C (2 g)의 존재 시 10 mL의 메탄올에 용해되었고, 정상 온도 및 압력에서 2시간 동안 수소화되었다. 반응 배지는 여과되어 감압 하에 농축되었고, 노란색 오일의 형태로 1.2 g (75%)의 화합물 **11D**를 수득하였다.

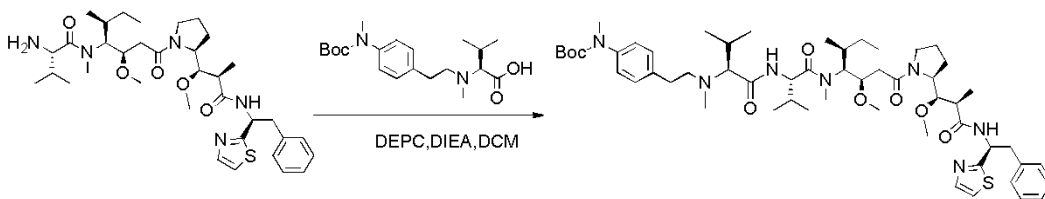
[0857] **화합물 11E**: (2S)-2-[[2-(4-[[[(*tert*-부톡시)카르보닐](메틸)아미노]페닐)에틸](메틸)아미노]-3-메틸부탄노산



[0858]

[0859] 화합물 **11D** (1.2 g, 3.4 mmol, 1.00 당량)가 불활성 대기에서 THF (20 mL)에 용해되었다. 반응 혼합물은 얼음 수조로 냉각되었고, 이후에 NaH (오일에서 60%, 549 mg, 13.7 mmol, 4.0 당량)가 일정량씩 첨가되었고, 요오드 메탄 (4.9 g, 34 mmol, 10 당량)이 이어졌다. 반응은 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 물로 중화되었으며, 100 mL의 EtOAc로 세척되었다. 수용성 용액의 pH는 1 N HCl로 6 내지 7로 조정되었다. 이러한 수용성 용액은 100 mL의 EtOAc로 3회 세척되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 노란색 고체의 형태로 800 mg (64%)의 화합물 **11E**를 수득하도록 농축되었다.

[0860] **화합물 11F**: *tert*-부틸 *N*-[4-(2-[[[(1S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-2-[[[(1S)-2-페닐-1-(1,3-티아졸-2-일)에틸]카바모일]에틸]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4 일] (메틸)카바모일]-2-메틸프로필]카바모일]-2-메틸프로필](메틸)아미노]에틸]페닐]-*N*- 메틸카바메이트



[0861]

[0862] 화합물 **11F**가 화합물 **6A**와 유사한 방식으로 아민 **1Y** (150 mg, 0.22 mmol, 1.2 당량) 및 산 **11E** (70 mg, 0.19 mmol, 1.0 당량)로부터 제조되었다. 실리카겔 (EtOAc/PE 1:1) 상의 정제 이후에, 100 mg (52%)의 원하는 산물이 흐린 노란색 고체의 형태로 획득되었다.

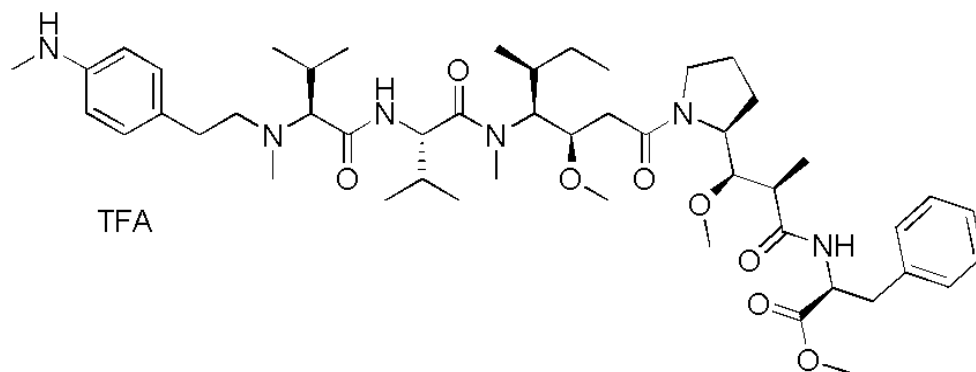
[0863] 화합물 **11**가 화합물 **1**과 유사한 방식으로 중간체 **11F** (100 mg, 0.1 mmol)로부터 제조되었다. 잔류물은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 **11**이 흰색 고체의 형태로 39% (39.7 mg)의 수율로 획득되었다.

[0864] LC/MS/UV (에클립스 플러스 C8, 3.5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; 1 mL/분, 40°C, 물 (0.05 % TFA)에서 50 내지 95% 메탄올 18분); ESI ( $C_{50}H_{77}N_7O_6S$ , 정확한 질량 903.57)  $m/z$ : 904.5 ( $MH^+$ ), 7.53분 (93.68%, 254 nm).

[0865]  $^1H$  NMR (300MHz,  $CD_3OD$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 8.84 (d, 0.5H, NHCO 불완전한 교환); 8.7-8.5 (m, 0.9H, NHCO 불완전한 교환); 7.76-7.73 (m, 1H); 7.55 - 7.4 (m, 1H); 7.28-7.22 (m, 7H); 7.08-7.05 (m, 2H); 5.51-5.72 (m, 1H); 4.9-4.80 (m, 2H); 4.3-0.7 (m, 60H).

[0866] **화합물 12**

[0867] 메틸 (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-*N*,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸(4-(메틸아미노)펜에틸)아미노)부탄아미도)부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판오에이트, 트리플루오로아세트산



[0868]

[0869]

화합물 1의 합성에서 최종 단계와 동일한 방식으로, 화합물 12가 아민 3D (118 mg, 0.19 mmol) 및 산 11E (82 mg, 0.22 mmol)로부터 두 단계들로 제조되었다. 최종 잔류물은 제조용 잔류물은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 12가 흰색 고체의 형태로 7% (13.7 mg)의 수율로 획득되었다.

[0870]

LC/MS/UV (에클립스 플러스 C8, 3.5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; 1 mL/분, 40°C, 물 (0.05 % TFA)에서 50 내지 95% 메탄올 18분); ESI ( $C_{49}H_{78}N_6O_8$ , 정확한 질량 878.59)  $m/z$ : 879.7 ( $MH^+$ ), 10.07분 (90.6 %, 254 nm).

[0871]

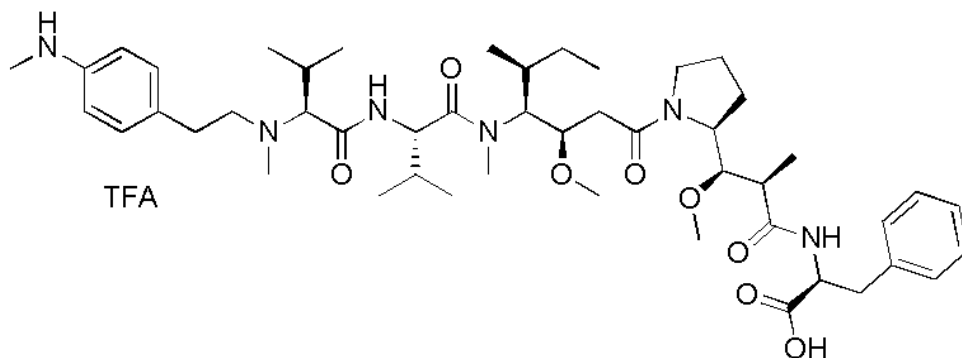
$^1H$ :NMR (300MHz,  $CD_3OD$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 7.40 (se, 2H); 7.38-7.22 (m, 7H); 4.95-4.7 (m, 3H); 4.2-4.0 (m, 1H); 3.9-0.86 (m, 62H).

[0872]

### 화합물 13

[0873]

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸(4-(메틸아미노)페닐)아미노)부탄아미도)부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸 헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판산, 트리플루오로아세트산



[0874]

[0875]

화합물 13이 화합물 7의 경우와 동일한 방식으로 화합물 12 (100 mg, 0.10 mmol)로부터 제조되었다. 잔류물은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 13이 흰색 고체의 형태로 20% (20 mg)의 수율로 획득되었다.

[0876]

LC/MS/UV (아센티스 익스프레스 C18, 2.7  $\mu$ m, 4.6 x 100 mm; 1.5 mL/분, 40°C, 물 (0.05 % TFA)에서 10 내지 95% 메탄올, 8분); ESI ( $C_{48}H_{76}N_6O_8$ , 정확한 질량 864.57)  $m/z$ : 865.6 ( $MH^+$ ), 6.05분 (90.9%, 210 nm).

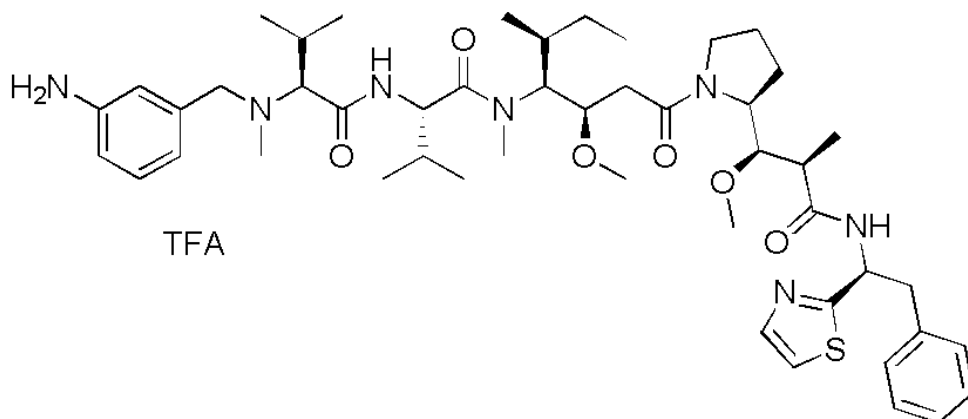
[0877]

$^1H$  NMR: (300MHz,  $CD_3OD$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 7.32-7.19 (m, 9H); 4.9-4.65 (m, 3H); 4.2-4.0 (m, 1H); 3.9-0.86 (m, 59H).



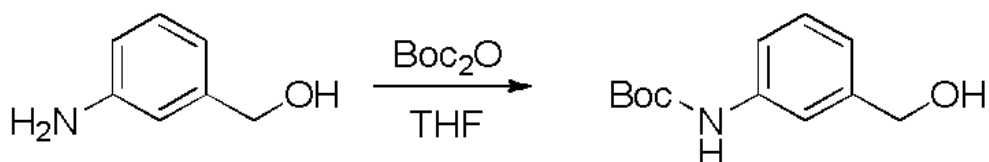
[0878] **화합물 14**

[0879] (S)-2-((S)-2-((3-아미노벤질)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N-((3R,4S,5S)-3-메톡시-1-((S)-2-((1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-((S)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일)-N,3-디메틸부탄아마이드, 트리플루오로아세트산



[0880]

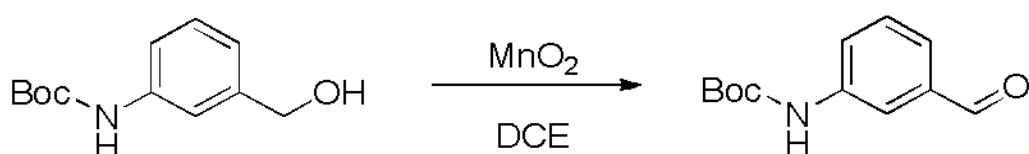
[0881] **화합물 14A:** *tert*-부틸 (3-(하이드록시메틸)페닐) 카바메이트



[0882]

[0883] (3-아미노페닐)메탄올 (3 g, 24.36 mmol, 1.00 당량)이 THF (60 mL)에 용해되었고, 이후에 디-*tert*-부틸 디카보네이트 (6.38 g, 29.23 mmol, 1.20 당량)가 다음으로 첨가되었다. 반응 혼합물은 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 반응이 200 mL의 물을 첨가하여 희석되었다. 산물은 100 mL의 AcOEt로 3회 추출되었고, 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 노란색 오일의 형태로 조산물 (13.85 g)의 화합물 14A)을 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

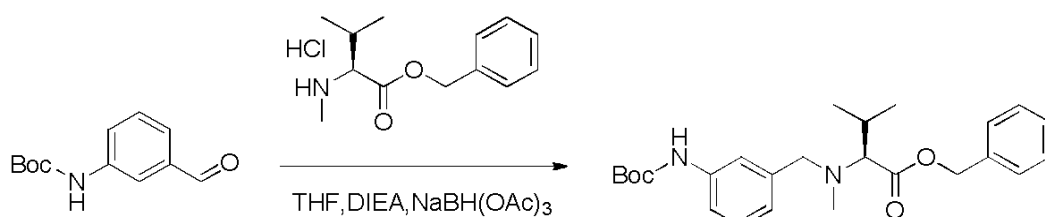
[0884] **화합물 14B:** *tert*-부틸 (3-포르밀페닐)카바메이트



[0885]

[0886] 화합물 14A (13.8 g, 61.81 mmol, 1.00 당량)이 DCE (400 mL)에 용해되었고, 다음으로 MnO<sub>2</sub> (54 g, 621.14 mmol, 10.05 당량)가 첨가되었다. 혼합물은 상온에서 교반 하에 3일 동안 방치되었고, 이후에 고체들이 여과에 의해 제거되었다. 여과물은 증발되어 건조되었고, 잔류물은 흰색 고체의 형태로 3 g (22%)의 화합물 14B를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:30)로 정제되었다.

[0887] **화합물 14C:** 벤질 (S)-2-((3-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)벤질) (메틸)아미노)-3-메틸부타노에이트



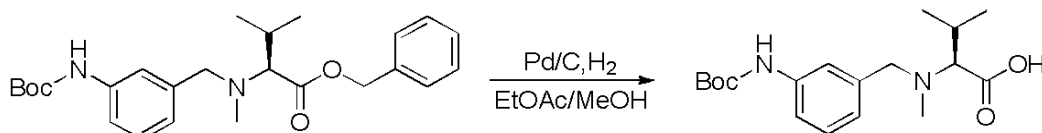
[0888]

[0889] 화합물 14B (1 g, 4.52 mmol, 1.00 당량)이 화합물 14C (1.16 g, 4.50 mmol, 1.00 당량), DIEA (3 mL) 및



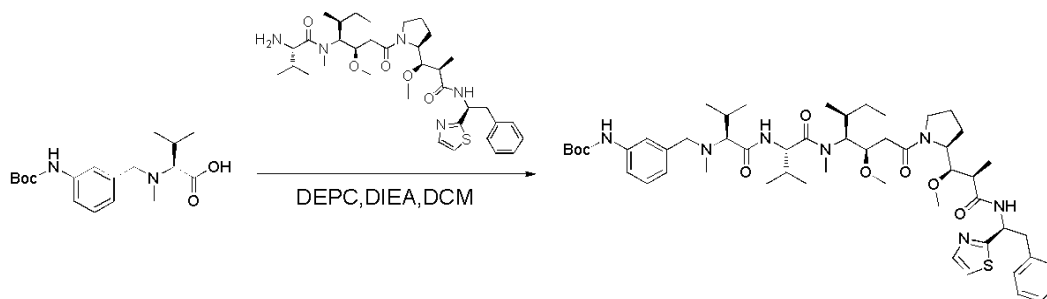
NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.92 g, 9.06 mmol, 2.01 당량)의 존재 시 20 mL의 THF에 용해되었다. 반응 혼합물은 상온에서 교반 하에 밤샘 동안 방치되었고, 다음으로 100 mL의 물로 중화되었으며, 50 mL의 AcOEt로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 소듐 설페이트 위에서 건조되었으며, 여과되어 농축되었다. 잔류물은 흰색 고체의 형태로 1.9 g (99%)의 화합물 **14C**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:50)로 정제되었다.

**화합물 14D:** (S)-2-((3-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)벤질)(메틸)아미노)-3-메틸부탄노산



화합물 **14C** (1 g, 2.34 mmol, 1.00 당량)가 Pd/C (400 mg)의 존재 시 30 mL의 AcOEt 및 4 mL의 메탄올에 용해되었고, 상온 및 대기압에서 1시간 동안 수소화되었다. 반응 배지는 여과되었고, 흰색 고체의 형태로 680 mg (86%)의 화합물 **14D**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

**화합물 14E:** *tert*-부틸 (3-((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-*s*-세크-부틸)-3,6-다이소프로필-10-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-(((S)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-2,8-디메틸-4,7-디옥소-11-옥사-2,5,8- 트리아자도데실)페닐) 카바메이트



화합물 **14E**가 화합물 **3**의 경우와 동일한 방식으로 DCM (3 mL)에서 아민 **1Y** (100 mg, 0.15 mmol, 1.00 당량), 산 **14D** (102.27 mg, 0.30 mmol, 2.00 당량), DEPC (0.053 mL) 및 DIEA (0.046 mL)로부터 합성되었다. 조산물 (80 mg)은 흐린 노란색 고체의 형태로 100 mg (67%)의 화합물 **14E**를 수득하도록 실리카 컬럼 상에서 EtOAc 및 PE의 혼합물 (1:1)로 정제되었다.

화합물 **14**는 화합물 **2**의 경우와 동일한 방식으로 중간체 **14E** (100 mg, 0.10 mmol, 1.00 당량)로부터 합성되었다. 조산물 (80 mg)은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 **14**가 흰색 고체의 형태로 10% (10 mg)의 수율로 획득되었다.

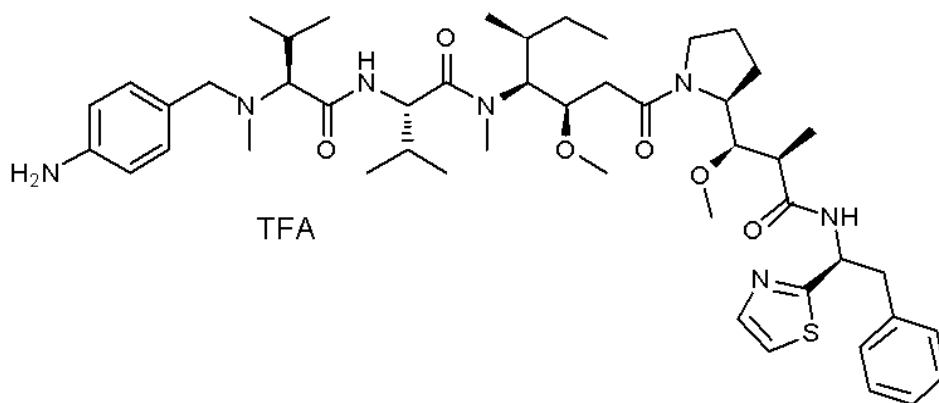
LC/MS/UV (에클립스 플러스 C8 컬럼, 3.5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; 40°C; 1.0 mL /분, 물 (0.05 % TFA)에서 40% 내지 95% MeOH 18분); ESI (C<sub>48</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S, 정확한 질량 875.5)  $m/z$ : 876.5 (MH<sup>+</sup>) 및 438.9 (M.2H<sup>+</sup>/2, 100 %), 11.35분 (95.6 %, 210 nm).

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD, ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 8.92 - 8.86 (m, 0.4H, NH 불완전한 교환); 8.70 - 8.54 (m, 0.6H, NH 불완전한 교환); 7.88 - 7.78 (m, 1H); 7.60 - 7.50 (m, 1H); 7.45 - 6.97 (m, 9H); 5.80 - 5.65 (m, 1H); 4.85 - 4.70 (m, 1H); 4.40 - 0.80 (m, 56H).

**화합물 15**

메틸 (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-아미노벤질)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3- 페닐프로파노에이트, 트리플루오로아세트산





[0910]

[0911] 화합물 20가 화합물 1의 경우와 동일한 방식으로, 아민 12C 및 해당하는 알데하이드로부터 제조되었다.

[0912] 화합물 20의 제조에 관여하는 4-니트로벤즈알데하이드가 시판되고 있었다.

[0913] 화합물 20의 합성은 니트로기를 환원하여 완성되었다. 이것은 다음과 같이 수행되었다: (2S)-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[[[(1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일]카바모일]-1-메톡시-2-메틸에틸]

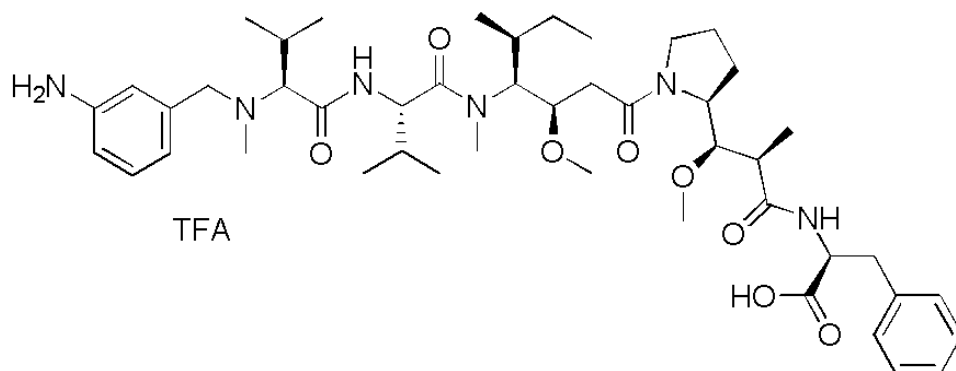
[0914] 피롤리딘-1-일]-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N,3-디메틸-2-[(2S)-3-메틸-2-[메틸[(4-니트로페닐)메틸]아미노]부탄아미도]부탄아마이드 (40 mg, 0.05 mmol, 1.0 당량)가 15 mL의 에탄올에 용해되었다. 디하이드레이트 염화주석 (II) (317 mg, 1.4 mmol, 30 당량)이 첨가되었고, 용액이 상온에서 3일 동안 교반 하에 방치되었다. 반응은 50 mL의 물로 중화되었고, 다음으로 50 mL의 EtOAc로 3회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, 무수 소듐 설페이트 위에서 건조되어 여과되었으며, 미가공 상태 (순도: 93.2%; 정량: 21.6 mg)로 화합물 20을 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[0915] 화합물은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 15가 흰색 고체의 형태로 19% (38.6 mg)에 의해 정제되어 흰색 고체들의 형태로 해당하는 TFA를 주었다.

[0916]  $^1\text{H}$  NMR: (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 7.85-7.80 (m, 1H); 7.6-7.5 (m, 1H); 7.4-7.15 (m, 5H); 7.1-7.05 (m, 2H); 6.73-6.70 (m, 2H); 5.8-5.55 (m, 1H); 5.0-4.7 (m, 2H); 4.25-4.05 (m, 1H); 4.0-0.8 (m, 54H). LC/MS/UV ESI: ( $\text{C}_{48}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$ , 정확한 질량 875.53)  $m/z$  876 ( $\text{MH}^+$ ), 439 [75%, ( $\text{M} \cdot 2\text{H}^+$ )/2]; UV: RT = 4.83분 (96.8%, 254 nm).  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 7.85-7.80 (m, 1H); 7.6-7.5 (m, 1H); 7.4-7.1 (m, 7H); 6.76-6.72 (m, 2H); 5.8-5.55 (m, 1H); 4.9-4.65 (m, 2H); 4.25-4.05 (m, 1H); 4.0-0.8 (m, 54H).

[0917] **화합물 29**

[0918] (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-아미노벤질) (메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판노산, 트리플루오로아세트산



[0919]

[0920]

화합물 **15** (100 mg, 0.10 mmol, 1.00 당량)가 물 (5 mL), ACN (5 mL) 및 피페리딘 (2.5 mL)의 혼합물에 용해되었다. 반응 혼합물은 상온에서 밤샘 동안 교반 하에 방치되었고, 다음으로 감압 하에 농축되었다. 잔류물은 제조용 HPLC (프레-HPLC-001 SHIMADZU, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 용출상: 0.05% TFA로 완충된 물 / ACN; 20% 내지 40% ACN 10분, 다음으로 40% 내지 100% ACN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되어 흰색 고체의 형태로 20 mg (20%)의 화합물 **29**를 수득하였다.

[0921]

LC/MS/UV (에클립스 플러스 C8 컬럼, 3.5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; 40°C; 1.0 mL/분, 물 (0.05% TFA)에서 40% 내지 95% MeOH 18분; ESI ( $C_{46}H_{72}N_6O_8$ , 정확한 질량 836.54)  $m/z$ : 837.5 ( $MH^+$ ) 및 419.4 ( $M \cdot 2H^+/2$ , 100 %), 10.61분 (92.5%, 210 nm).

[0922]

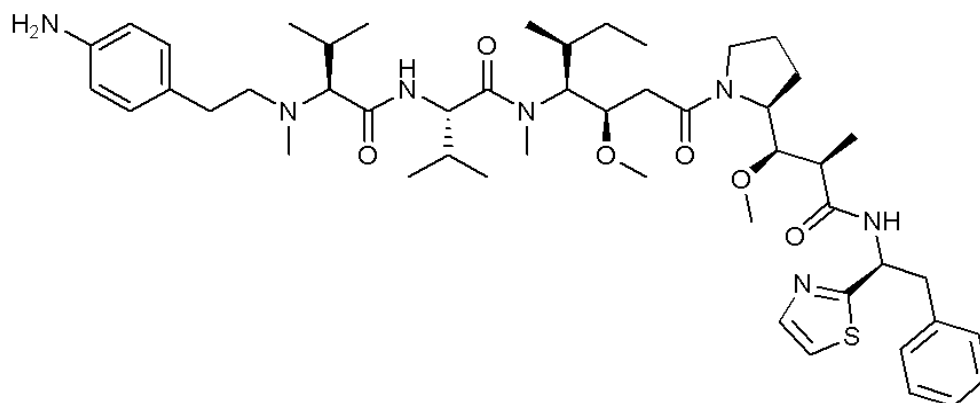
$^1H$  NMR: (400MHz,  $CD_3OD$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재) 7.38 - 7.15 (m, 6H); 7.00 - 6.99 (m, 3H); 4.85 - 4.68 (m, 2H); 4.37 - 3.38 (m, 11H); 3.31 - 2.70 (m, 8H); 2.60 - 0.82 (m, 35H).

[0923]

**화합물 61**

[0924]

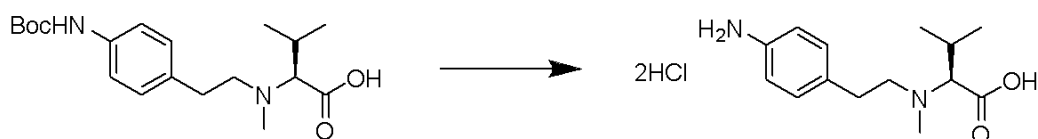
(S)-2-((S)-2-((4-아미노펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N-((3R,4S,5S)-3-메톡시-1-((S)-2-((1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-((S)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일)-N,3-디메틸부탄아마이드



[0925]

[0926]

**화합물 61A**: N-(4-아미노펜에틸)-N-메틸-L-발린 디하이드로클로라이드



[0927]

[0928]

화합물 **11D** (962 mg, 2.75 mmol)가 프로판-2-올 (5 - 6 M)에 넣은 10 mL의 HCl의 시판되는 용액에 용해되었고, 실온에서 2시간 동안 교반되었다. TLC 분석은 시작 물질의 완전한 소모를 가리켰다. 용매가 감압 하에 증발되었고, 결과로 얻은 노란색 고체는  $Et_2O$  (2 x 10 mL)로 분쇄되었다. 산물은 노란색 고체로서 화합물 **61A** (322 mg,

47%)를 공급하도록 진공 하에 건조되었다.

[0929] **화합물 61:** 카르복실산 **61A** (73 mg, 0.23 mmol, 1 당량) 및 아민 **1Y** (150 mg, 0.23 mmol, 1 당량) 이 건조 DMF (2 mL)에 용해되었다. DIEA (158  $\mu$ L, 0.90 mmol, 4 당량) 및 DECP (DEPC라고도 역시 불림) (51  $\mu$ L, 0.34 mmol, 1.5 당량)가 첨가되었고, 반응은 실온에서 4시간 동안 교반되었다. LC-MS에 의한 분석은 시작 물질의 완전한 소모를 보여주었다. 용매가 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 연한 노란색 고체로서 화합물 **61**를 공급하도록 실리카 컬럼 (DCM/MeOH) 상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제되었다 (83 mg, 40%).

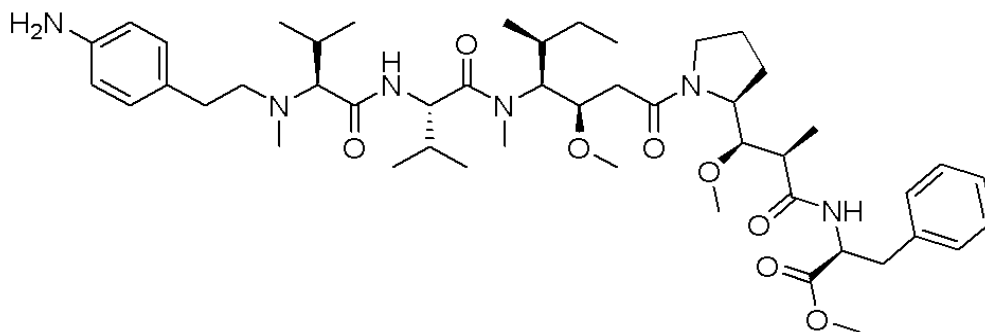
[0930]  $^1\text{H}$  NMR: (500MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재), 8.86 (d, 0.5H, NHCO); 8.65 (d, 0.5H, NHCO), 8.11-8.05 (m, 1H, NHCO), 7.80 (d, 0.5H, 티아졸), 7.78 (d, 0.5H, 티아졸), 7.65 (d, 0.5H, 티아졸), 7.63 (d, 0.5H, 티아졸), 7.32 - 7.12 (m, 5H), 6.83 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 6.45 (d,  $J=8.3$  Hz, 2H), 5.56 - 5.49 (m, 0.5 H), 5.42 - 5.35 (m, 0.5H), 4.78 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.74 - 4.46 (m, 2H), 4.01 - 0.66 (m, 57H).

[0931] HPLC (X브리지 쉘드 C18, 3.5  $\mu$ m, 4.6 x 50 mm ; 3.5 mL/분, 40°C, 물 (0.1 % TFA)에서 0 내지 95% MeCN 2.25분, 다음으로 95% MeCN 0.5분, Tr = 1.31분 (96.5%, 220 nm).

[0932]  $m/z$  (Q-TOF ESI<sup>+</sup>) 890.5558 (2%, MH<sup>+</sup>, C<sub>49</sub>H<sub>76</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S 890.5572 요구), 445.7834 (100%, (MH<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>, C<sub>49</sub>H<sub>77</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S 445.7823 요구).

[0933] **화합물 62**

[0934] 메틸 ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-아미노페닐)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-L-페닐알라니네이트



[0935]

[0936] 화합물 **62**가 화합물 **61**의 경우와 동일한 방식으로, 카르복실산 **61A** (69 mg, 0.21 mmol, 1 당량), 아민 **3D** (135 mg, 0.21 mmol, 1 당량), DIEA (75  $\mu$ L, 0.43 mmol, 2 당량) 및 DECP (49  $\mu$ L, 0.32 mmol, 1.5 당량)을 사용하여 제조되었다. 조산물은 노란색 고체로서 화합물 **62**를 공급하도록 실리카 컬럼 (DCM/MeOH)에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제되었다 (82 mg, 45%).

[0937]  $^1\text{H}$  NMR: (500MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재), 8.50 (d,  $J=8.3$ , 0.5H, NHCO); 8.27 (d,  $J=8.0$ , 0.5H, NHCO), 8.15-8.04 (m, 1H, NHCO), 7.27 - 7.13 (m, 5H), 6.86 - 6.79 (m, 2H), 6.48 - 6.42 (m, 2H), 4.78 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.74 - 4.44 (m, 3H), 4.01 - 3.72 (m, 1.5H), 3.66 (s, 1.5H, CO<sub>2</sub>Me), 3.63 (s, 1.5H, CO<sub>2</sub>Me), 3.57 - 0.65 (m, 55.5H).

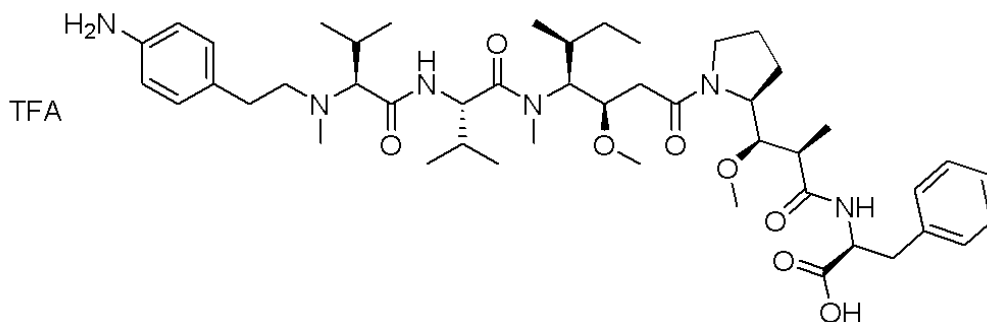
[0938] HPLC (X브리지 쉘드 C18, 3.5  $\mu$ m, 4.6 x 50 mm ; 3.5 mL/분, 40°C, 물 (0.1 % TFA)에서 0 내지 95% MeCN 2.25분, 다음으로 95% MeCN 0.5분, Tr = 1.29분 (95.3%, 220 nm).

[0939]  $m/z$  (Q-TOF ESI<sup>+</sup>) 865.5800 (2%, MH<sup>+</sup>, C<sub>48</sub>H<sub>77</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> 865.5797 요구), 433.2937 (100 %, (MH<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>, C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> 433.2935 요구).

[0940] **화합물 63**

[0941] ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-아미노페닐)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디

메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-L-페닐알라닌 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[0942]

[0943] 화합물 **62** (23 mg, 0.03 mmol)가 물 (1 ml) 및 아세트니트릴 (1 ml)의 혼합물에 용해되었다. 피페리딘 (0.75 ml)이 첨가되었고, 혼합물이 상온에서 5시간 동안 교반되었다. TLC 분석은 시작 물질의 완전한 소모를 가리켰다. 용매가 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 제조용 HPLC (SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 150 mm; 유동상: 0.1% TFA로 완충된 물 / MeCN; 20% 내지 40% MeCN 10분, 다음으로 40% 내지 100% MeCN 2분의 구배; 254 nm 및 220 nm에서의 UV 워터스 2489 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 화합물 **63**은 흰색 고체의 형태로서 획득되었다 (14 mg, 66%).

[0944]  $^1\text{H}$  NMR: (500MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  (회전이성질체들의 존재), 12.7 (s(br), 1H, CO<sub>2</sub>H), 9.58 (m(br), 1H); 9.04 - 8.89 (m, 1H), 8.41 (d, 0.6H, NHC=O), 8.15 (d, 0.4H, NHC=O), 7.27 - 7.13 (m, 5H), 7.13 - 6.99 (m(br), 2H), 6.90 - 6.64 (s(br), 2H), 4.77 - 3.40 (m, 10H), 3.34 - 2.75 (m, 20H), 2.34 - 1.94 (m, 4H), 1.90 - 0.7 (m, 25H).

[0945] HPLC (X브리지 쉘드 C18, 3.5  $\mu$ m, 4.6 x 50 mm ; 3.5 mL/분, 40°C, 물 (0.1 % TFA)에서 0 내지 95% MeCN 2.25분, 다음으로 95% MeCN 0.5분, Tr = 1.24분 (100%, 220 nm).

[0946]  $m/z$  (Q-TOF ESI<sup>+</sup>) 851.5641 (6%, MH<sup>+</sup>, C<sub>47</sub>H<sub>75</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> 851.5641 요구), 426.2854 (100%, (MH<sub>2</sub>)<sup>2+</sup>, C<sub>47</sub>H<sub>76</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub> 426.2857 요구).

[0947] **실시예 15: 약물들의 항증식 활성**

[0948] **방법:**

[0949] **세포 배양**

[0950] A549 (비소세포 폐암 - ATCC CCL-185) 및 MDA-MB-231 (유방 샘암종 - ATCC HTB-26) 세포들이 5% 우태아 혈청 (FCS)를 가진 MEM (Minimum Essential Medium Eagle) 및 10% FCS를 가진 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM)로 각각 배양되었다. MCF7 (유방 관상 암종 - ATCC HTB-22) 및 SN-12C (신장 암종 - ATCC) 세포들은 10% FCS를 포함하는 RPMI1640 배지 (MCF-7 세포들을 위해 페놀 레드 없음)에서 유지되었다. 모든 배지들은 편지존 (1.25  $\mu$ g/mL) 및 페니실린-스트렙토마이신 (100 U / 100  $\mu$ g/mL)이 보충되었다. 세포들은 표준 조건들 하에, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 대기 습도에서 배양기로 배양되었다.

[0951] **4가지의 종양성 세포주들에서 항증식 활성**

[0952] 선택된 약물들은 4가지의 세포주들의 포괄적인 패널에서 ATPlite 증식 검정법 (퍼킨 엘머사, 프랑스 빌레본 수르 이베트)를 사용하여 그들의 항증식 활성에 대하여 조사되었다. 세포들이 0일째 72시간의 약물 처리 기간 전 체를 통하여 지수적 세포 성장기로 유지되는 세포들을 보장하는 농도로 96 웰 플레이트들에 접종되었다 (A549의 경우 10<sup>3</sup>개 세포들/웰, MCF7, MDA-MB-231 및 SN12C의 경우 2 x 10<sup>3</sup>개). 24시간 배양 이후에, 모든 세포들이 테스트된 화합물들의 일련의 희석들 (1% DMSO에 넣은 11  $\mu$ L의 10x 용액 - 6개 웰들/조건)로 처리되었다. 팁들 위에 화합물들의 부착을 피하기 위하여, 팁들은 두 가지 연속적 희석들 간에 교환되었다. 다음으로 세포들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 두었다. 4일째, 세포 생존도가 생존가능 세포들에 의해 방출된 ATP를 정량하여 평가되었다. 생존가능 세포들의 수는 용매 처리된 세포들의 수와 비교로 분석되었다. EC<sub>50</sub> 수치들이 그래프패드 소프트웨어

어 (그래프패드 소프트웨어사, 미국 CA)에 의해 제공된 알고리즘으로 수행되는 곡선 적정 분석 (S자형 용량 반응을 가진 비선형 회귀 모델, 다양한 경사 기울기 계수)으로 결정되었다.

[0953] 결과들:

[0954] 다양한 약물들:

[0955] 다양한 약물들이 상기-기술된 방법에 따라 MDA-MB-231 세포주에 미치는 그들의 항증식 활성을 결정하도록 테스트되었다. 측정된 활성들은  $EC_{50} < 0.1 \mu M$ 의 수치들을 주었다.

[0956] 상기 예시된 약물들 중에서 선택된 소수의 다음의 실시예들이 그들의 전적으로 현저한 항증식 특성들을 설명하고 있다: 실시예 12:  $EC_{50} = 5.80 \times 10^{-10} M$ ; 실시예 13:  $EC_{50} = 7.95 \times 10^{-8} M$ ; 실시예 15:  $EC_{50} = 1.70 \times 10^{-10} M$ ; 실시예 27:  $EC_{50} = 1.20 \times 10^{-10} M$ .

[0957] 다양한 세포주들:

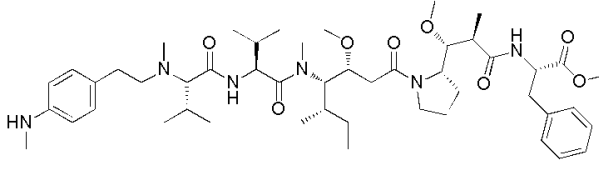
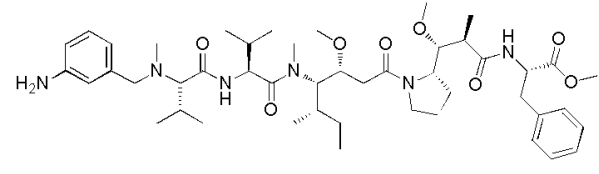
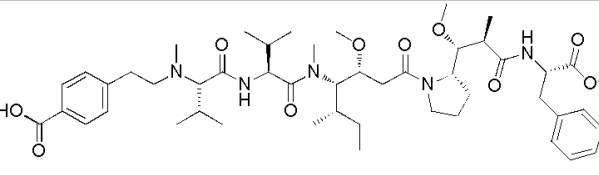
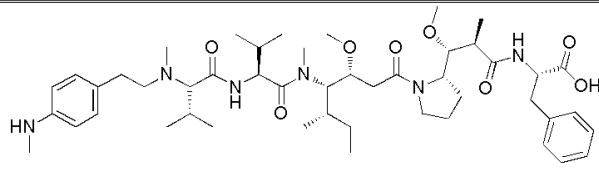
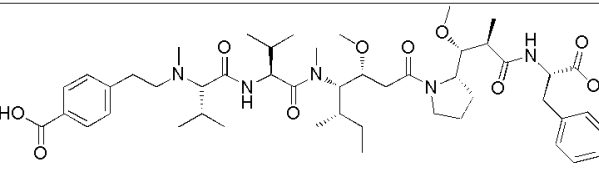
[0958] 화합물 15가 상기-기술된 방법에 따라 서로 다른 세포주들 (A549, MDA-MB-231, MCF-7, SN12C)에서 테스트되었다. 측정된 활성들은 모든 테스트된 세포주들에서  $EC_{50} < 0.1 \mu M$ 의 수치들을 주었다.

$EC_{50}$ (M)	A549	MDA-MB-231	MCF-7	SN12C
화합물 15	$1.45 \times 10^{-10}$	$1.70 \times 10^{-10}$	$7.15 \times 10^{-10}$	$2.18 \times 10^{-10}$

[0959]

[0960] 비교 실시예들:

[0961] 페닐 고리에서 치환 (아미노 대비 카르복시)이 하기 비교 실시예들에서 연구되었고, 아미노 치환기를 포함하는 본 발명에 따른 약물들의 개선된 항증식 활성을 보여준다.

N°	구조	EC <sub>50</sub> (M)	
		A549	MDA-MB-231
12		1.48x10 <sup>-10</sup>	5.80x10 <sup>-10</sup>
15		1.45x10 <sup>-10</sup>	1.70x10 <sup>-10</sup>
비교 실시예 1		3.76x10 <sup>-9</sup>	2.29x10 <sup>-9</sup>
13		2.71x10 <sup>-8</sup>	7.95x10 <sup>-8</sup>
비교 실시예 2		4.03x10 <sup>-7</sup>	9.75x10 <sup>-7</sup>

[0962]

[0963]

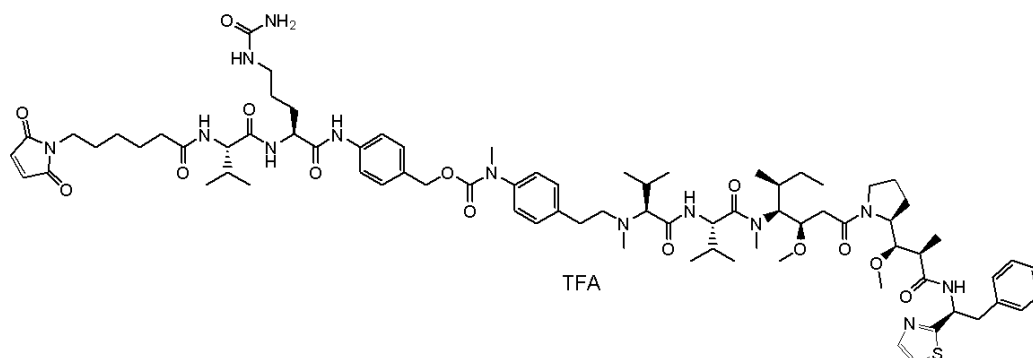
실시예 16: 약물-링커 분체의 합성

[0964]

화합물 E-11

[0965]

4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-세크-부틸)-7,10-디이소프로필-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-(((*S*)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,11-디메틸-6,9-디옥소-2-옥사-5,8,11-트리아자트리데칸-13-일)페닐)(메틸)카바메이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트

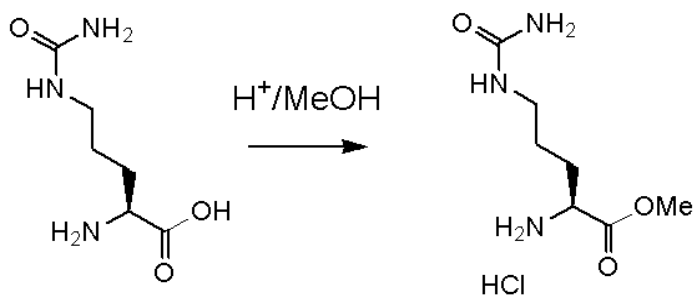


[0966]

[0967]

화합물 E-11-1: 메틸 (*S*)-2-아미노-5-우레이도펜타노에이트 하이드로클로라이드

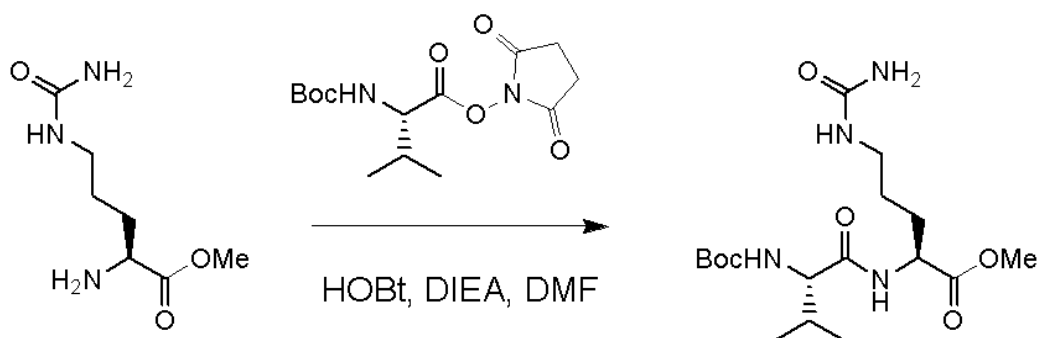




[0968]

[0969] 아세트릴 클로라이드 (10 mL)가 0℃에서 MeOH (120 mL)에 교반하면서 한 방울씩 첨가되었다. 20분 이후에, L-시트룰린 (10 g, 57 mmol, 1.00 당량)이 첨가되었고, 혼합물은 환류로 밤샘 동안 가열되었다. 용매가 감압 하에 증발되었고, 흰색 고체로서 15 g (116%)의 화합물 **E-11-1**를 수득하였다. 산물은 추가 건조 없이 다음 단계에 사용되었다.

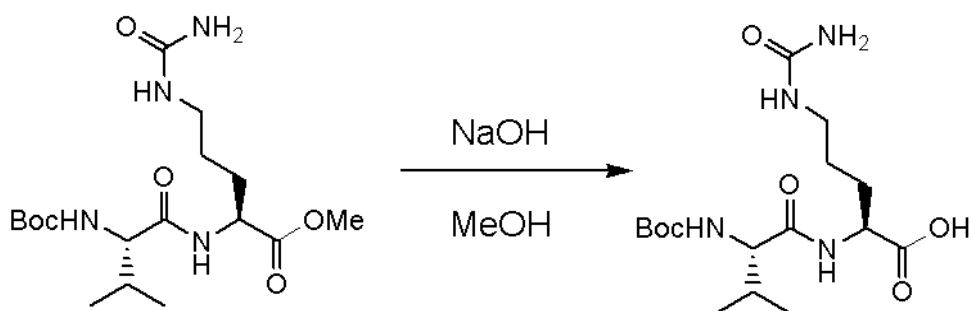
[0970] **화합물 E-11-2**: 메틸 (S)-2-((S)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜타노에이트



[0971]

[0972] 화합물 **E-11-1** (13 g, 57.6 mmol, 1.1 당량)가 불활성 대기에서 0℃에 DMF (140 mL)에 용해되었다. DIEA (30 mL, 173 mmol, 3.0 당량), 하이드록시벤조트리아졸 (HOBt - 10.59 g, 69.1 mmol, 1.2 당량) 및 Boc-L-발린 하이드록시숙시니미드 에스테르 (Boc-Val-OSu - 18.1 g, 57.6 mmol, 1.0 당량)가 첨가되었다. 반응 혼합물은 상온에서 밤샘 동안 교반되었고, 다음으로 용매가 감압 하에 증발되었다. 잔류물은 물 (100 mL)에 용해되었고, DCM (150 mL)으로 2회 추출되었다. 유기상들은 조합되었고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조되었으며 감압 하에서 농축되었다. 잔류물은 실리카겔 (DCM/MeOH) 상에서 흰색 고체로서 18.8 g (84%)의 화합물 **E-11-2**를 수득하도록 정제되었다.

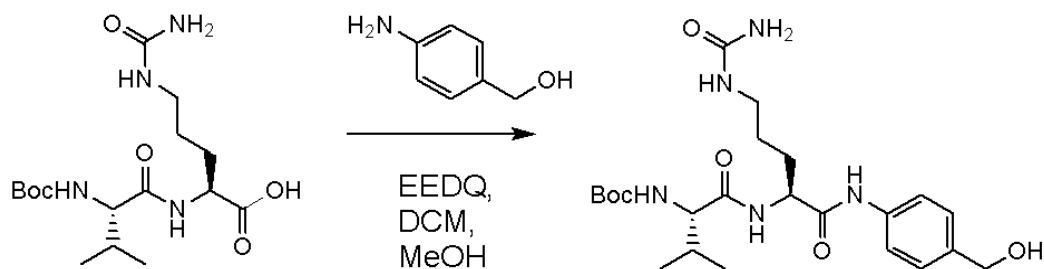
[0973] **화합물 E-11-3**: (S)-2-((S)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸 부탄아미도)-5-우레이도펜타노산



[0974]

[0975] 화합물 **E-11-2** (18.8 g, 48.4 mmol, 1 당량)가 0℃에서 MeOH (200 mL)에 용해되었다. NaOH 1 M (72 mL, 72 mmol, 1.5 당량)의 용액이 첨가되었고, 혼합물이 실온에서 2시간 동안 교반되었다. MeOH가 감압 하에 제거되었고, 남은 수용성 용액은 HCl 1 M로 산성화되었다. 수용성 상은 증발되어 건조되었고, 잔류물은 실리카겔 (DCM/MeOH) 상에서 흰색 고체로서 18 g (99%)의 화합물 **E-11-3**를 수득하도록 정제되었다.

[0976] **화합물 E-11-4**: *tert*-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((4-(하이드록시메틸)페닐) 아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트



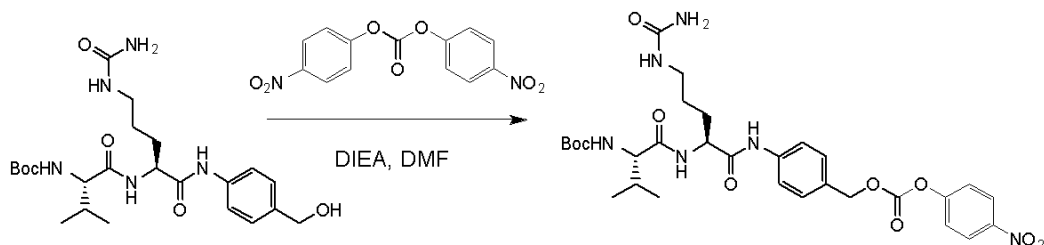
[0977]

[0978]

화합물 **E-11-3** (5g, 13.4 mmol, 1 당량)가 건조 DCM (65 ml) 및 건조 MeOH (35 ml)의 혼합물에 용해되었다. (4-아미노페닐)메탄올 (1.81 g, 14.7 mmol, 1.1 당량) 및 *N*-에톡시카르보닐-2-에톡시-1,2-디하이드로퀴놀린 (EEDQ - 6.60 g, 26.7 mmol, 2 당량)이 첨가되었고, 혼합물이 암소에서 밤샘 동안 교반되었다. 용매들은 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 실리카겔 (DCM/MeOH) 상에서 회백색 고체로서 5.2 g (73%)의 화합물 **E-11-4**를 수득하도록 정제되었다.

[0979]

**화합물 E-11-5:** *tert*-부틸 ((*S*)-3-메틸-1-(((*S*)-1-((4-((4-니트로페노кси)카르보닐)옥시)메틸)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-1-옥소부탄-2-일)카바메이트



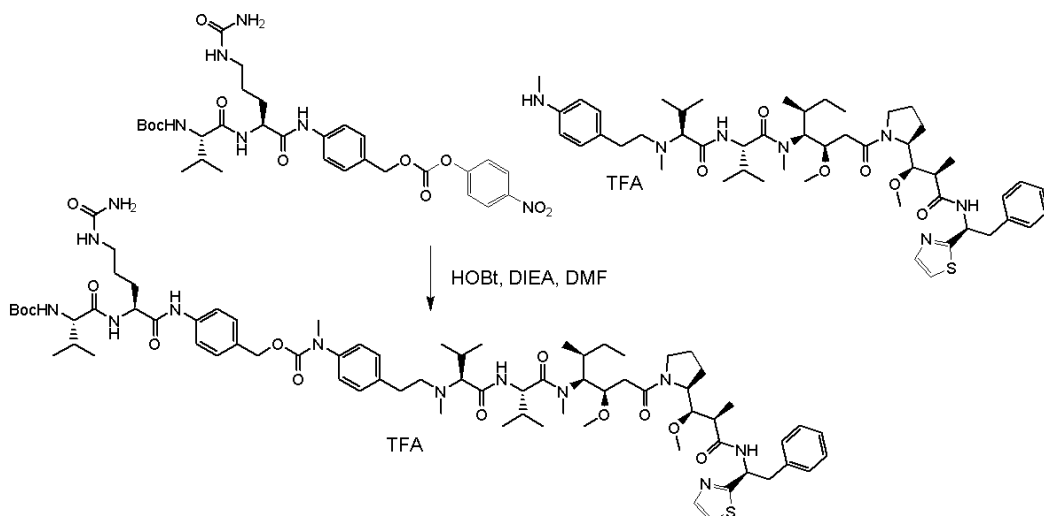
[0980]

[0981]

화합물 **E-11-4** (1.1 g, 2.29 mmol, 1 당량)가 불활성 대기에서 상온으로 건조 DMF (5 ml)에 용해되었다. 비스 (4-니트로페닐) 카보네이트 (1.40 g, 4.59 mmol, 2 당량)가 첨가되었고, DIEA (600  $\mu$ L, 3.44 mmol, 1.5 당량)가 이어졌으며, 결과로 얻은 노란색 용액은 밤샘 동안 교반되었다. DMF는 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 실리카겔 (DCM/MeOH) 상에서 회백색 고체로서 1.27 g (84%)의 화합물 **E-11-5**를 수득하도록 정제되었다.

[0982]

**화합물 E-11-6:** 4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질 (4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-*세크*-부틸)-7,10-디이소프로필-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-((*S*)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,11-디메틸-6,9-디옥소-2-옥사-5,8,11-트리아자트리데칸-13-일)페닐)(메틸)카바메이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



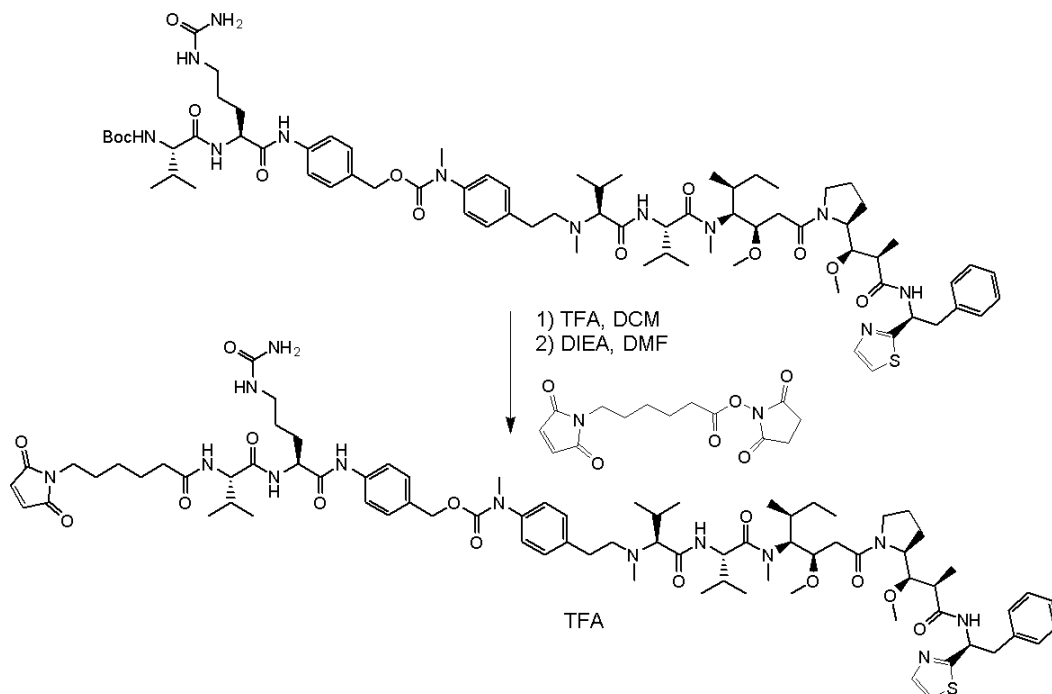
[0983]

[0984]

카보네이트 **E-11-5** (114 mg, 0.177 mmol, 1.2 당량) 및 아닐린 **11F** (150 mg, 0.147 mmol, 1 당량)이 건조 DMF (4 mL)에 용해되었다. HOBt (38 mg, 0.295 mmol, 2 당량) 및 DIEA (54  $\mu$ L, 0.295 mmol, 2 당량)가 첨가되었고, 혼합물이 실온에서 한 주 동안 교반되었다. DMF가 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 실리카 상에서 DCM로 용출되

면서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 산물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nM에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 재정제되었다. 선별된 분획들이 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **E-11-6**를 공급하도록 동결건조되었다 (89 mg, 39 %).

[0985] **화합물 E-11:**



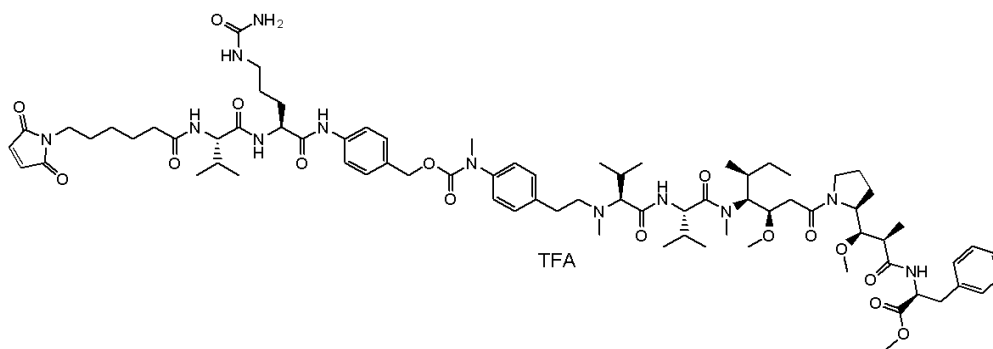
[0986]

[0987] 화합물 **E-11-6** (21 mg, 0.014 mmol, 1.0 당량)이 DCM (0.25 mL)에 용해되었고, TFA (40  $\mu$ L)가 첨가되었다. 용액은 실온에서 2시간 교반되었고, 이후에 LC-MS 분석은 시작 물질의 완전한 소모를 가리켰다. 혼합물은 TFA를 중화하기 위하여, DMF (0.5 mL)와 다음으로 DIEA (100  $\mu$ L)를 동시에 첨가하면서 바로 냉각되었다 (액체 질소의 수조). 다음으로 냉각 수조가 제거되었고, 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노에이트 (4 mg, 0.012 mmol, 1 당량)가 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 48시간 교반되었고, 산물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nM에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **E-11**를 공급하도록 동결건조되었다 (11 mg, 54%).

[0988] m/z (Q-TOF MS ESI+) 1524.8282 (2%,  $MNa^+$ ,  $C_{79}H_{115}N_{13}NaO_{14}S$  1524.8299), 751.9283 (100%,  $(MH_2)^{2+}$ ,  $C_{79}H_{117}N_{13}O_{14}S$  751.9276 요구).

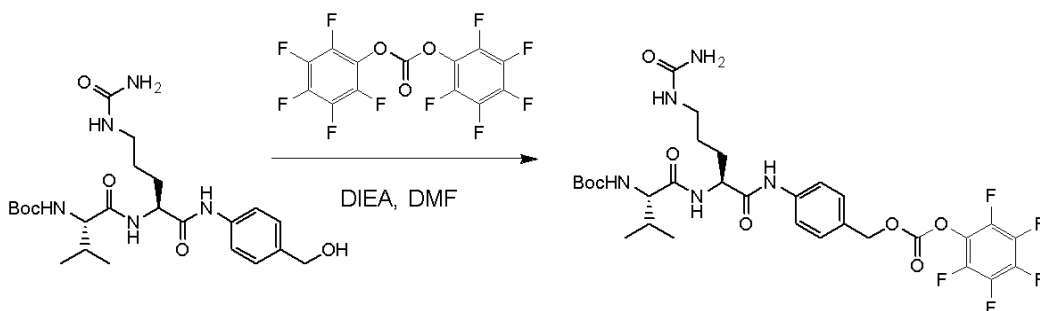
[0989] **화합물 E-12**

[0990] 메틸 ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)(메틸)아미노)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-L-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[0991]

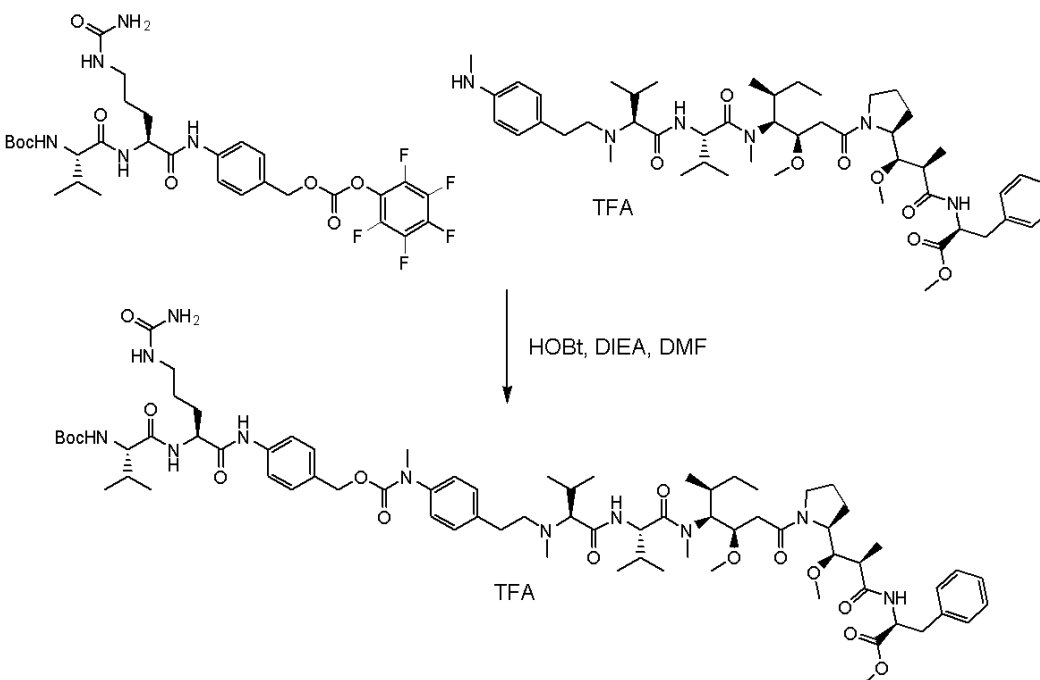
[0992] **화합물 E-12-1:** *터르--부틸* ((*S*)-3-메틸-1-옥소-1-(((*S*)-1-옥소-1-((4-(((페플루오로페닐)카르보닐)옥시)메틸)페닐)아미노)-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)부탄-2-일)카바메이트부틸



[0993]

[0994] 화합물 **E-11-4** (670 mg, 1.26 mmol, 1 당량)이 불활성 대기에서 0℃에 건조 DMF (6 ml)에 용해되었다. 비스(페플루오로페닐) 카보네이트 (991 mg, 2.51 mmol, 2 당량)가 첨가되었고, DIEA (329  $\mu$ L, 1.89 mmol, 1.5 당량)가 이어졌으며, 결과로 얻은 무색 용액이 실온에서 30분 동안 교반되었다. DMF가 감압 하에 증발되었고, 잔류물이 실리카겔 (DCM/MeOH) 상에서 회백색 고체로서 836 mg (96%)의 화합물 **E-12-1**를 수득하도록 정제되었다.

[0995] **화합물 E-12-2:** 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*터르*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)(메틸)아미노)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



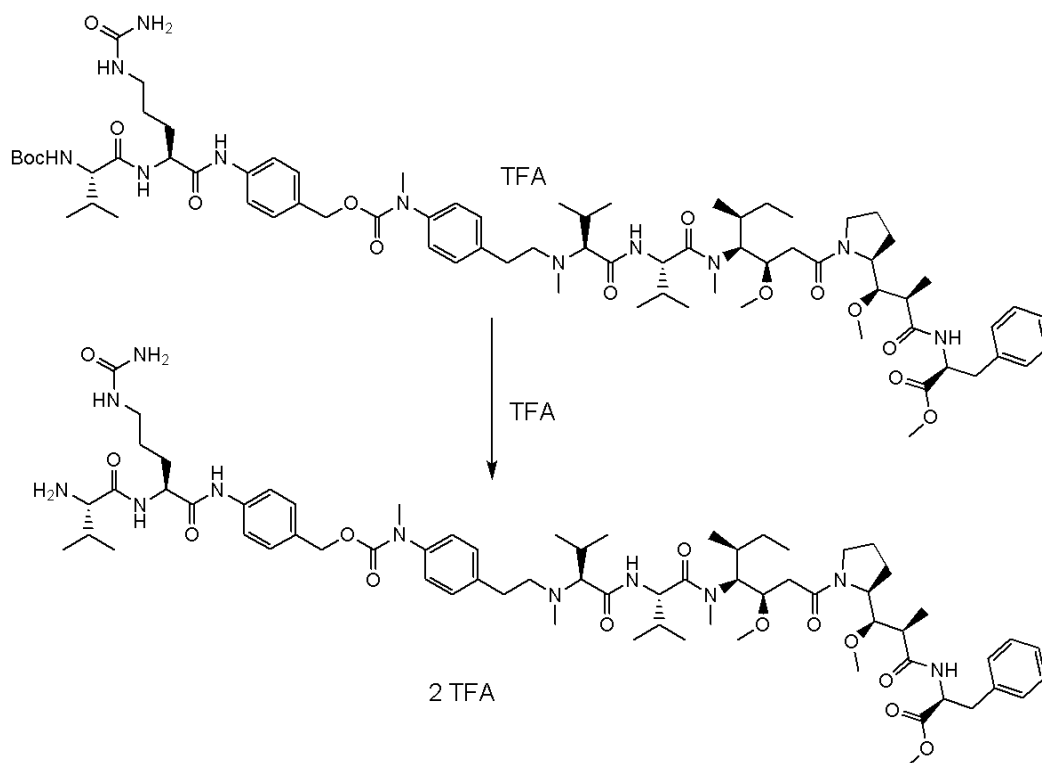
[0996]

[0997] 아닐린 **12** (165 mg, 0.189 mmol, 1.0 당량)이 불활성 대기에서 0℃에 DMF (5 mL)에 용해되었다. 카보네이트 **E-**

**12-1** (194 mg, 0.282 mmol, 1.5 당량), HOBt (51 mg, 0.375 mmol, 2 당량) 및 DIEA (66  $\mu$ L, 0.375 mmol, 2 당량)가 첨가되었고, 혼합물이 실온에서 8시간 동안 교반되었다. 용매가 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **E12-7**를 공급하도록 동결건조되었다 (247 mg, 77%).

[0998]

**화합물 E-12-3:** 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시) 카르보닐)(메틸)아미노)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 비스(2,2,2-트리플루오로아세트레이트)

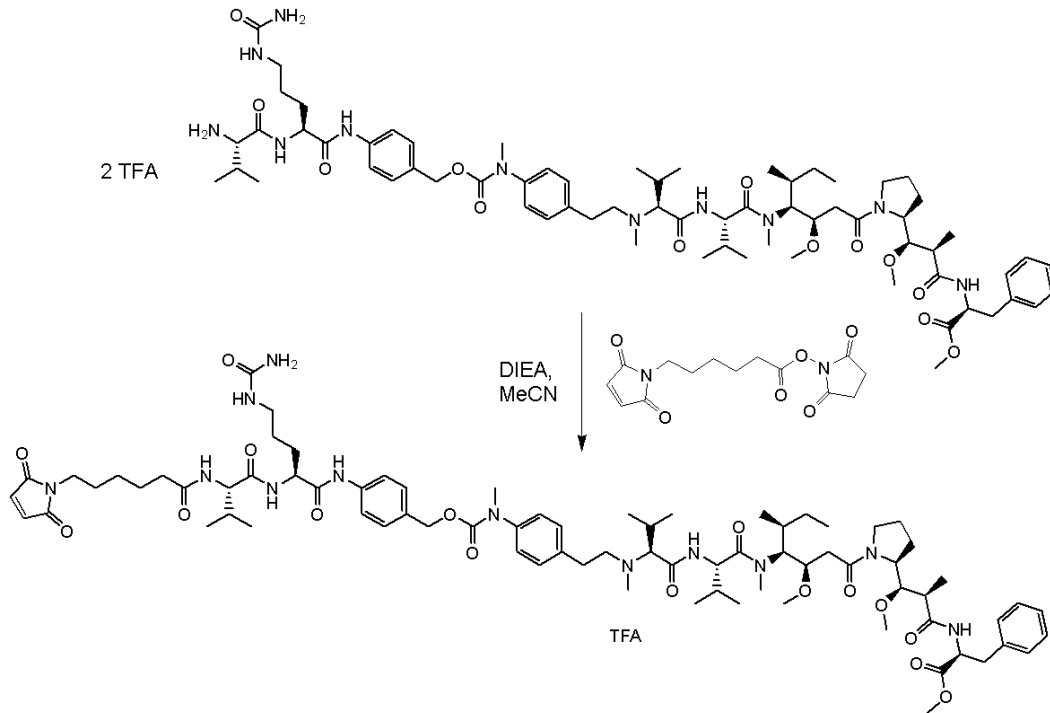


[0999]

[1000]

화합물 **E-12-2** (5.6 mg, 4.04  $\mu$ mol, 1.0 당량)가 TFA (100  $\mu$ L)에 용해되었다. 5분 이후에, 2 mL의 물이 첨가되었고, 혼합물이 희백색 고체로서 화합물 **E-12-3**를 수득하도록 동결건조되었다 (5.6 mg, 98%).

[1001] **화합물 E-12:**



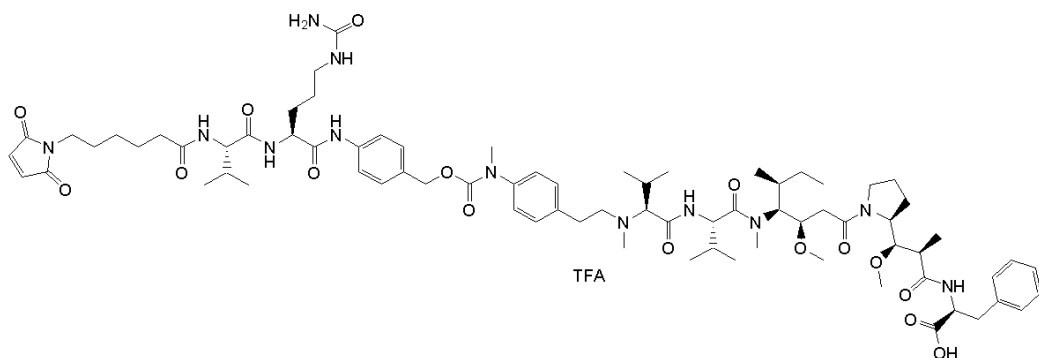
[1002]

[1003] 화합물 **E-12-3** (5.6 mg, 4  $\mu\text{mol}$ , 1.0 당량)이 아세트니트릴 (0.5 mL)에 용해되었고, DIEA (5  $\mu\text{L}$ , 7 당량)가 첨가되었고, 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노에이트 (2.5 mg, 8  $\mu\text{mol}$ , 2 당량)가 이어졌다. 혼합물은 실온에서 6시간 동안 교반되었다. LC-MS에 의해 반응을 조절한 이후에, 200  $\mu\text{L}$ 의 물이 첨가되었고, 결과로 얻은 용액은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu\text{m}$ , 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **E-12**를 공급하도록 동결건조되었다 (4.6 mg, 70 %).

[1004]  $m/z$  (Q-TOF MS ESI+) 739.4389 (100%,  $(\text{MH}_2)^{2+}$ ,  $\text{C}_{78}\text{H}_{118}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$  739.4389 요구).

[1005] **화합물 E-13**

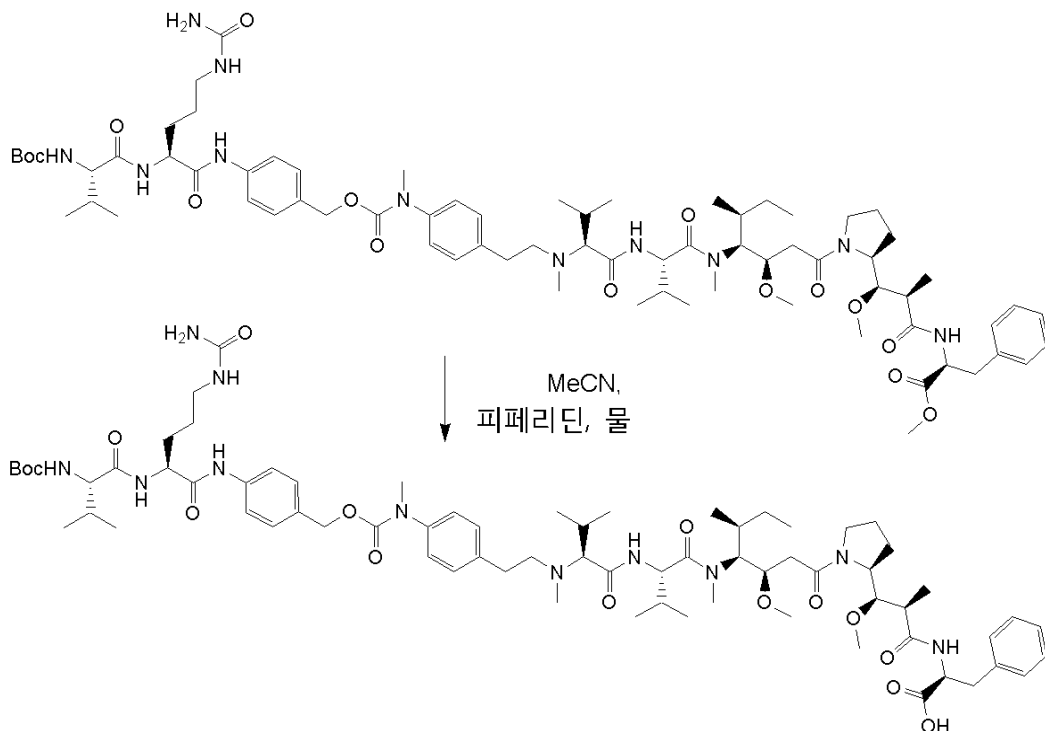
[1006] ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥사나미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)(메틸)아미노)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[1007]

[1008] **화합물 E-13-1:** ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*터프*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)(메틸)아미노)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트

일)-L-페닐알라닌



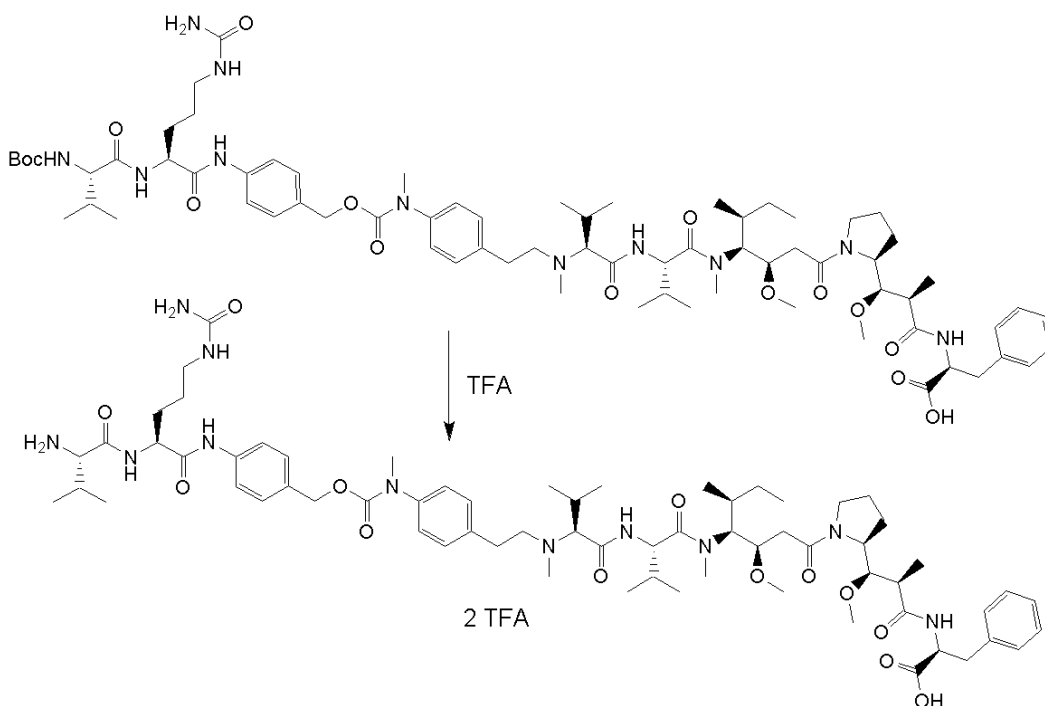
[1009]

[1010]

화합물 **E-12-2** (185 mg, 0.123 mmol, 1.0 당량)이 실온에서 물 (5 mL) 및 아세트니트릴 (5 mL)에 용해되었다. 피페리딘 (3.67 mL, 300 당량)가 첨가되었고, 혼합물이 실온에서 6시간 동안 교반되었다. 용매들이 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 Et<sub>2</sub>O (60 mL)로 분쇄되었다. 고체는 Et<sub>2</sub>O (20 mL)로 두 번 세척되었고, 회백색 고체로서 화합물 **E-13-1**를 수득하도록 진공 하에 건조되었다 (175 mg, 95%).

[1011]

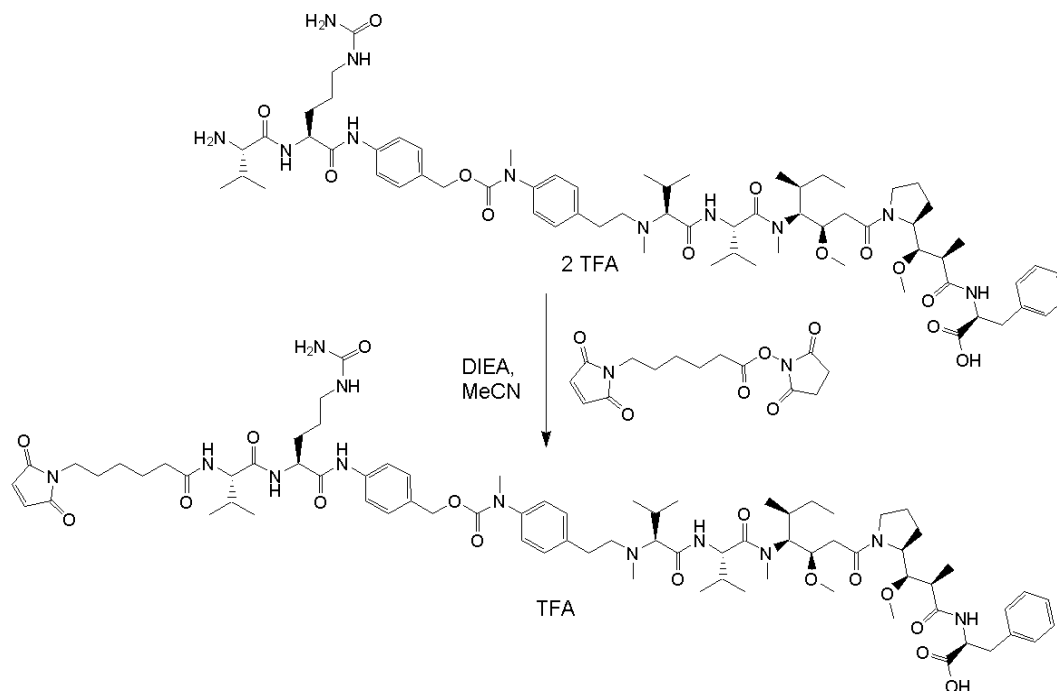
**화합물 E-13-2:** ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)(메틸)아미노)펜테일)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌 비스(2,2,2-트리플루오로아세트레이트)



[1012]

[1013] 화합물 **E-13-1** (175 mg, 0.128 mmol, 1.0 당량)이 TFA (200  $\mu$ L)에 용해되었다. 5분 이후에, 물 (1 mL) 및 아세토니트릴 (1 mL)이 첨가되었고, 용액이 희백색 고체로서 화합물 **E-13-2**를 수득하도록 밤샘 동안 동결건조되었다 (180 mg, 87%).

[1014] **화합물 E-13:** ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)(메틸)아미노)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌, 2,2,2-트리플루오로아세트레이트



[1015]

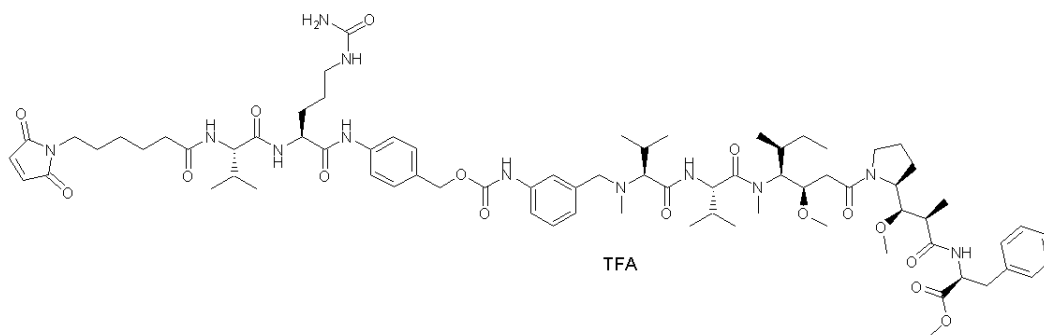
[1016] 화합물 **E-13-2** (80 mg, 0.058 mmol, 1.0 당량)이 아세토니트릴 (1.5 mL) 및 DMF (0.4 mL)에 용해되었다. DIEA (50  $\mu$ L, 0.289 mmol, 5 당량)가 첨가되었고, 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥사노에이트 (36 mg, 0.116 mmol, 2 당량)가 이어졌다. 혼합물은 실온에서 3시간 동안 교반되었다. LC-MS에 의해 반응을 조절한 이후에, 용매가 감압 하에 증발되었고, 잔류물이 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들이 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **E-13**를 공급하도록 동결되었다 (32 mg, 35 %).

[1017]  $m/z$  (Q-TOF MS ESI<sup>-</sup>) 1461.8336 (100%, ( $M-H$ )<sup>-</sup>,  $C_{77}H_{113}N_{12}O_{16}$  1461.8403 요구).  $m/z$  (Q-TOF MS ESI<sup>+</sup>) 1463.8565 (2%,  $MH^+$ ,  $C_{77}H_{115}N_{12}O_{16}$  1463.8549 요구), 732.4317 (100%, ( $MH_2$ )<sup>2+</sup>,  $C_{77}H_{116}N_{12}O_{16}$  732.4311 요구).

[1018] **화합물 E-15**

[1019] 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((3-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)아미노)벤질)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌에이트 2,2,2-트리플루오로아세트레이트

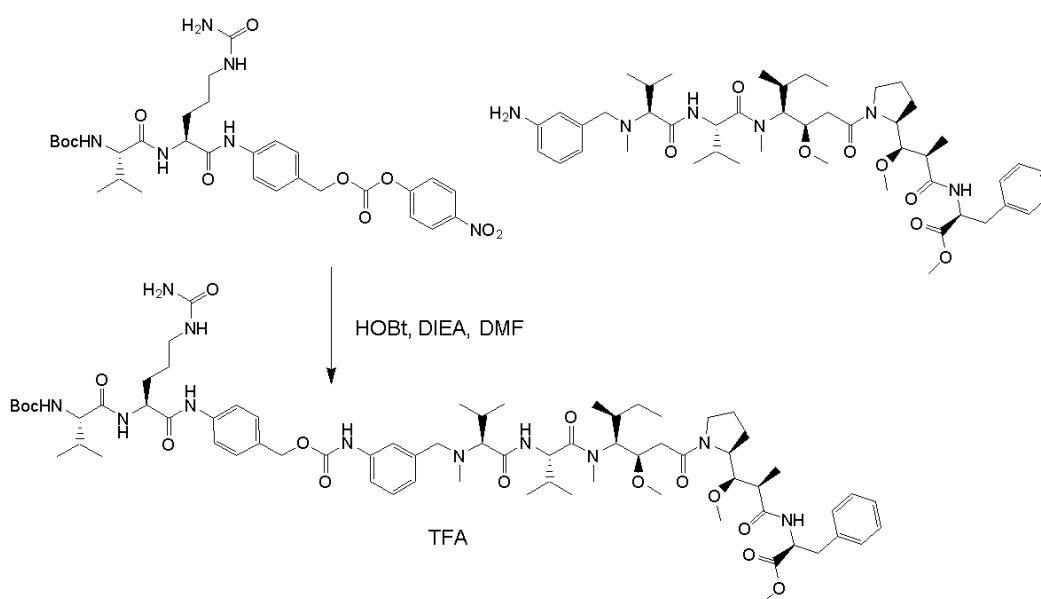




[1020]

[1021]

**화합물 E-15-1:** 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((3-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시)카르보닐)아미노)벤질)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



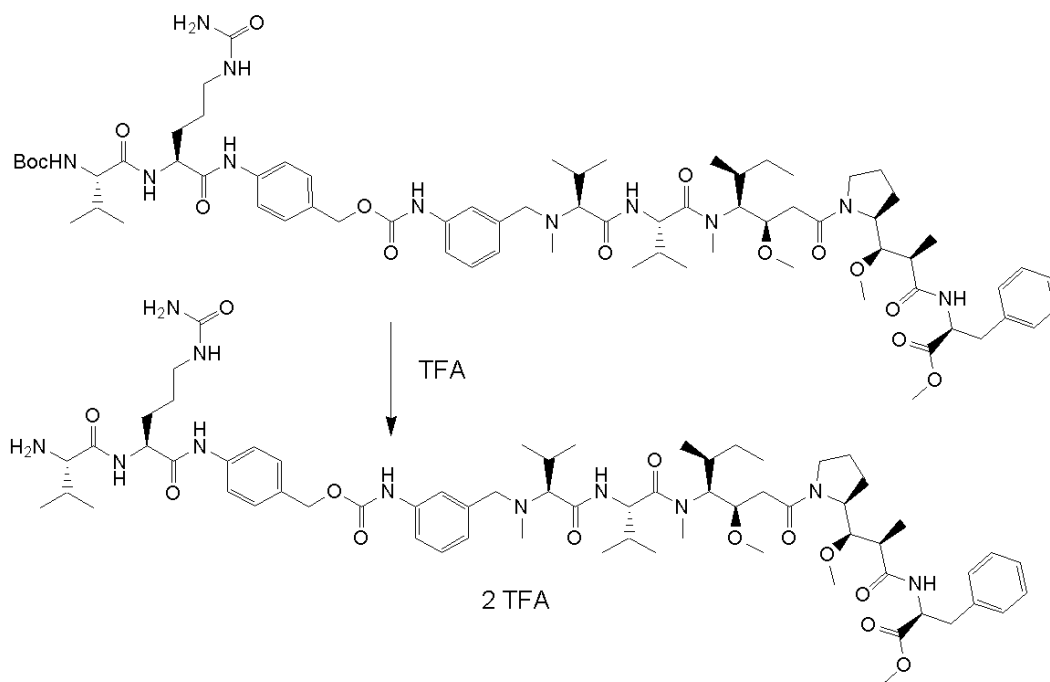
[1022]

[1023]

화합물 E-15-1이 화합물 E-11-6의 경우와 동일한 방법에 따라 DMF (2 mL)에서 카보네이트 E-11-5 (28 mg, 0.044 mmol, 1 당량), 아닐린 15 (42 mg, 0.044 mmol, 1 당량), HOBt (3 mg, 0.022 mmol, 0.5 당량) 및 DIEA (15  $\mu$ L, 0.087 mmol, 2 당량)를 사용하여 제조되었다. 화합물 E-15-1이 흰색 고체로서 분리되었다 (8.2 mg, 13%).

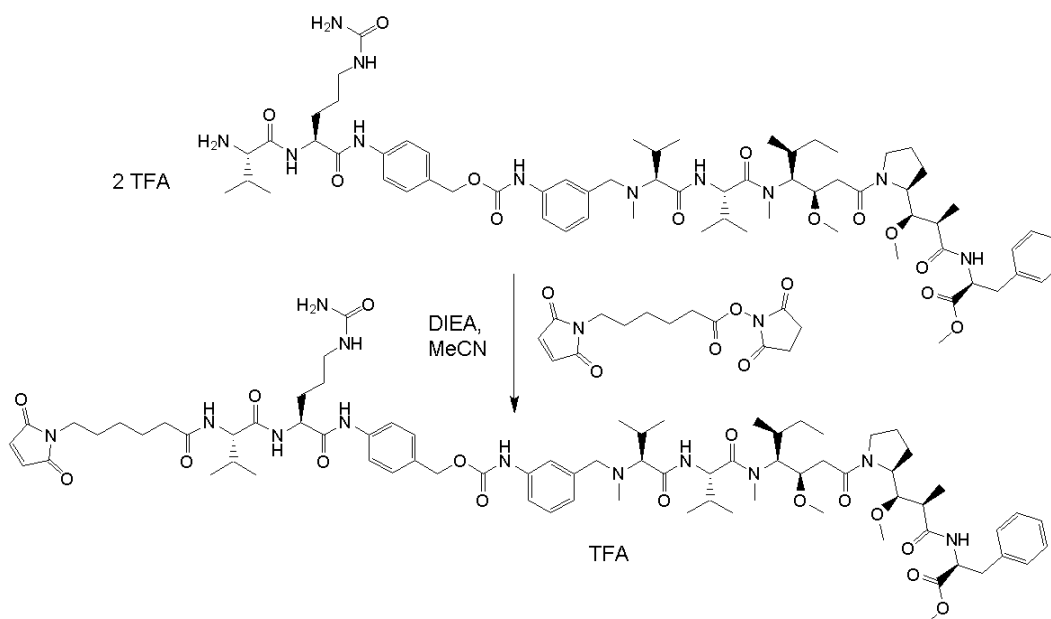
[1024]

**화합물 E-15-2:** 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((3-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)벤질)옥시) 카르보닐)아미노)벤질)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 비스(2,2,2-트리플루오로아세테이트)



화합물 **E-15-1** (8.2 mg, 5.58  $\mu\text{mol}$ , 1.0 당량)가 TFA (200  $\mu\text{L}$ )에 용해되었다. 5분 이후에, 물 (1 mL)이 첨가되었고, 용액은 흰색 고체로서 화합물 **E-15-8**를 수득하도록 동결건조되었다 (7.6 mg, 99%)

#### 화합물 E-15:



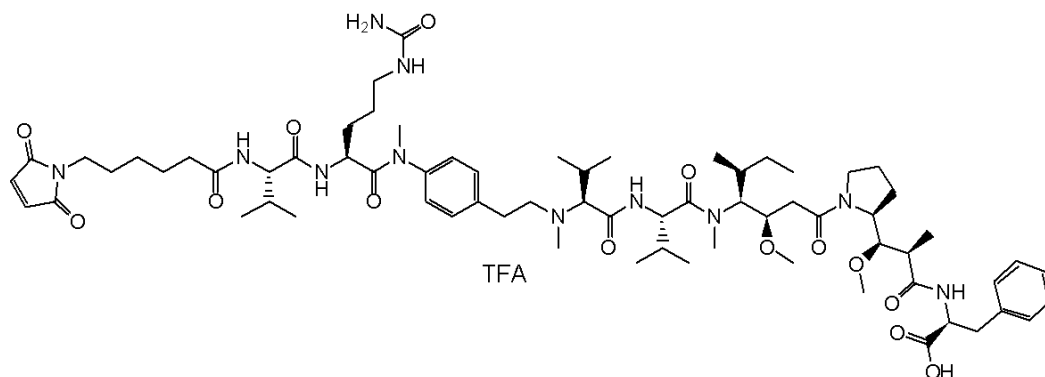
화합물 **E-15**가 화합물 **E-12**의 경우 동일한 방법에 따라, 아세트니트릴 (0.5 mL)에서 아민 **E-15-2** (7.6 mg, 5.55  $\mu\text{mol}$ , 1 당량), 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노에이트 (2 mg, 6.65  $\mu\text{mol}$ , 1.2 당량) 및 DIEA (5  $\mu\text{L}$ , 0.028 mmol, 5 당량)를 사용하여 제조되었다. 화합물 **E-15**은 흰색 고체로서 분리되었다 (4.2 mg, 48%).

$m/z$  (Q-TOF MS ESI+) 1471.8169 (2%,  $\text{MNa}^+$ ,  $\text{C}_{76}\text{H}_{112}\text{N}_{12}\text{NaO}_{16}$  1471.8211 요구), 725.4223 (100%,  $(\text{MH}_2)^{2+}$ ,  $\text{C}_{76}\text{H}_{114}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$  725.4232 요구), 483.9482 (10%,  $(\text{MH}_3)^{3+}$ ,  $\text{C}_{76}\text{H}_{115}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$  483.9513 요구).

#### 화합물 F-13

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-

1-일)헥산아미도)-3-메틸부탄아미도)-*N*-메틸-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[1033]

[1034] **화합물 F-13-1:** 벤질 *N*-(4-((*tert*-부톡시카르보닐)(메틸)아미노)펜에틸)-*N*-메틸-*L*-발리네이트

[1035]

[1036] 화합물 **11C** (250 mg, 0.567 mmol, 1 당량)이 THF (10 mL)에 용해되었고, NaH (미네랄 오일에서 60%, 68 mg, 1.702 mmol, 3 당량)의 첨가가 이어졌다. 혼합물은 요오드메탄 (106  $\mu$ L, 1.702 mmol, 3 당량)을 첨가하기 이전에 5분 동안 교반되었다. 반응은 물로 정지시키고, EtOAc (100 mL) 및 물 (50 mL) 사이를 분리하기 이전에 실온에서 2시간 동안 교반되었다. 유기상은  $MgSO_4$  위에서 건조되었고, 노란색 오일로서 화합물 **F-13-1**을 수득하도록 증발되어 건조되었고 (250 mg, 97%), 이것은 추가 정제 없이 사용되었다.

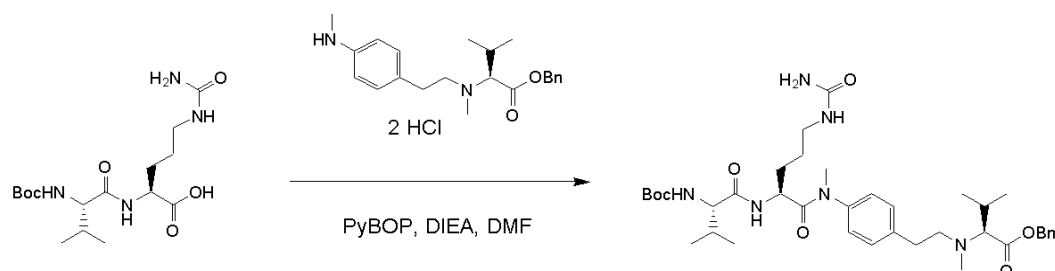
[1037] **화합물 F-13-2:** 벤질 *N*-메틸-*N*-(4-(메틸아미노)펜에틸)-*L*-발리네이트

[1038]

[1039] Boc-보호된 아닐린 **F-13-1** (250 mg, 0.550 mmol, 1 당량)이 MeOH (5 mL)에 첨가되었고,  $i$ -PrOH (5 - 6 M)에 넣은 1 mL의 시판되는 HCl의 용액의 첨가가 이어졌다. 용액은 감압 하에 증발되어 건조되기 이전에 실온에서 2시간 동안 교반되었다. 결과로 얻은 노란색 오일은  $Et_2O$ 로 분쇄되었고, 노란색 고체로서 화합물 **F-13-2**가 수득되었다 (202 mg, 94%).

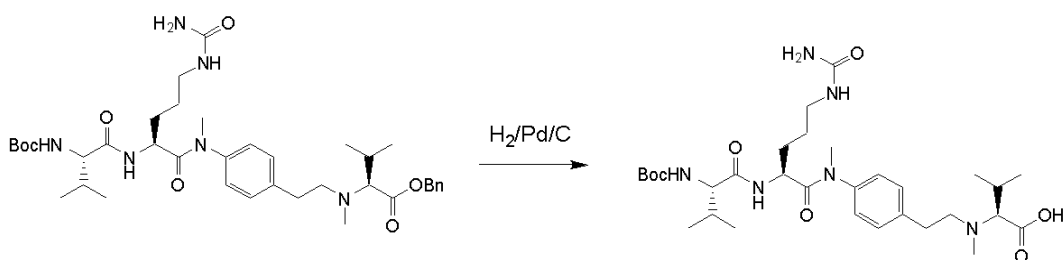
[1040] **화합물 F-13-3:** 벤질 *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*-메틸-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)-*N*-메틸-*L*-발리네이트

[1041]



[1042] 산 **E-11-3** (190 mg, 0.508 mmol, 1.5 당량)이 건조 DMF (1 mL)에 용해되었고, DIEA (118  $\mu$ L, 0.677 mmol, 2 당량), 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP - 264 mg, 0.508 mmol, 1.5 당량) 및 아닐린 **F-13-2** (120 mg, 0.339 mmol, 1 당량)의 첨가가 이어졌다. 혼합물은 실온에서 밤샘 동안 교반되었고, 용매들은 감압 하에 증발되었다. 잔류물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **F-13-3**를 공급하도록 동결건조되었다 (140 mg, 45%).

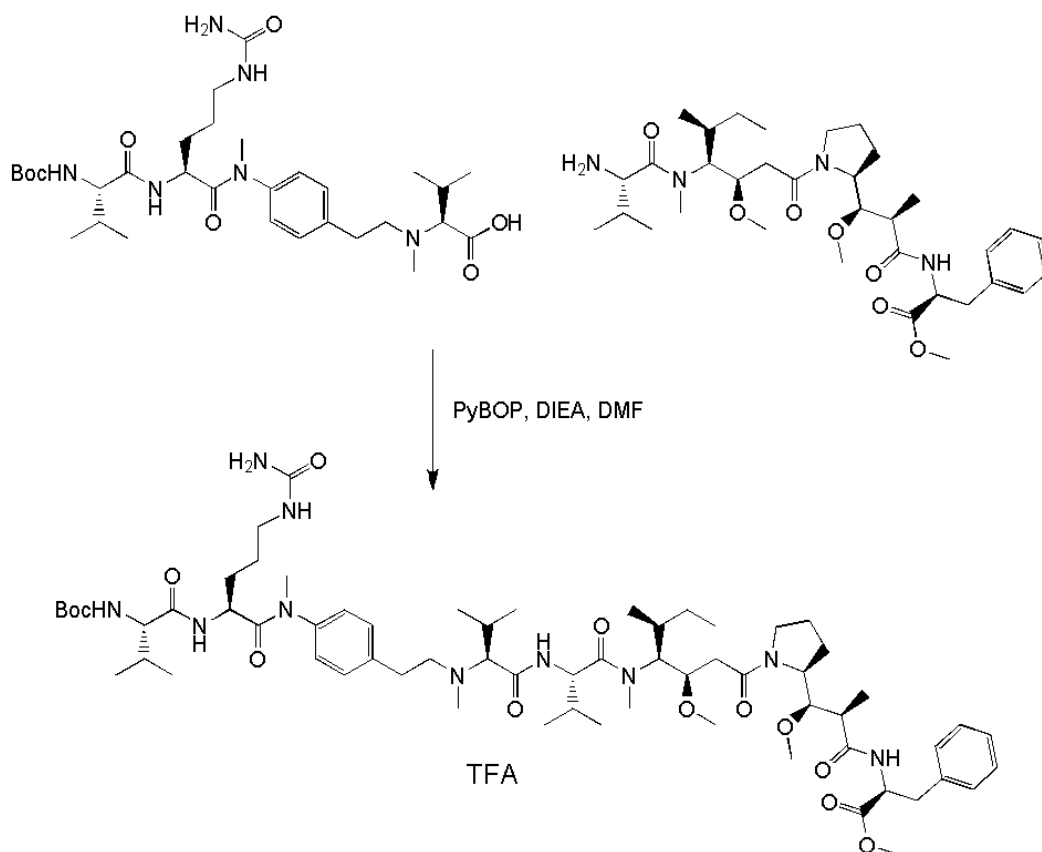
[1043] **화합물 F-13-4**: *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*-메틸-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)-*N*-메틸-*L*-발린



[1044]

[1045] 화합물 **F-13-3** (116 mg, 0.163 mmol, 1 당량)이 Pd/C 10% (30 mg)의 존재 시 MeOH (5 mL)에 용해되었고 산은 및 대기압에서 2시간 동안 수소화되었다. 반응 배지가 여과되었고, 베이지색 고체로서 110 mg (99%)의 화합물 **F-13-4**를 수득하도록 감압 하에 농축되었다.

[1046] **화합물 F-13-5**: 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*-메틸-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



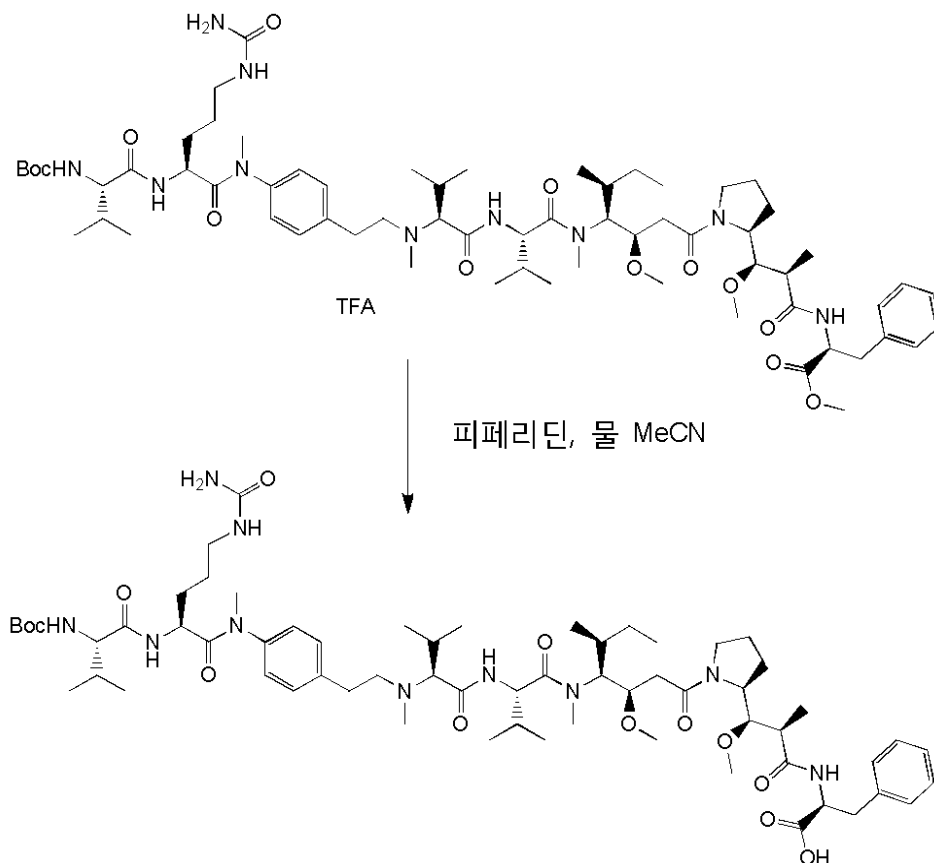
[1047]

[1048] 아민 **3D** (89 mg, 0.140 mmol, 1 당량) 및 산 **F-13-4** (145 mg, 0.210 mmol, 1.5 당량)가 건조 DMF (4 mL)에 용

해되었고, PyBOP (109 mg, 0.210 mmol, 1.5 당량) 및 DIEA (73  $\mu$ L, 0.420 mmol, 3 당량)가 첨가되었다. 혼합물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 용매가 증발되었다. 잔류물은 EtOAc 및 물 사이에서 분리되었고, 유기상은  $MgSO_4$  위에서 건조되었으며, 여과되어 감압 하에 증발되었다. 조산물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **F-13-5**를 공급하도록 동결건조되었다 (140 mg, 73%).

[1049]

**화합물 F-13-6:** ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(*E*)-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*-메틸-5-우레이도펜탄아미도) 페네틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌 2,2,2-트리플루오로아세트레이트

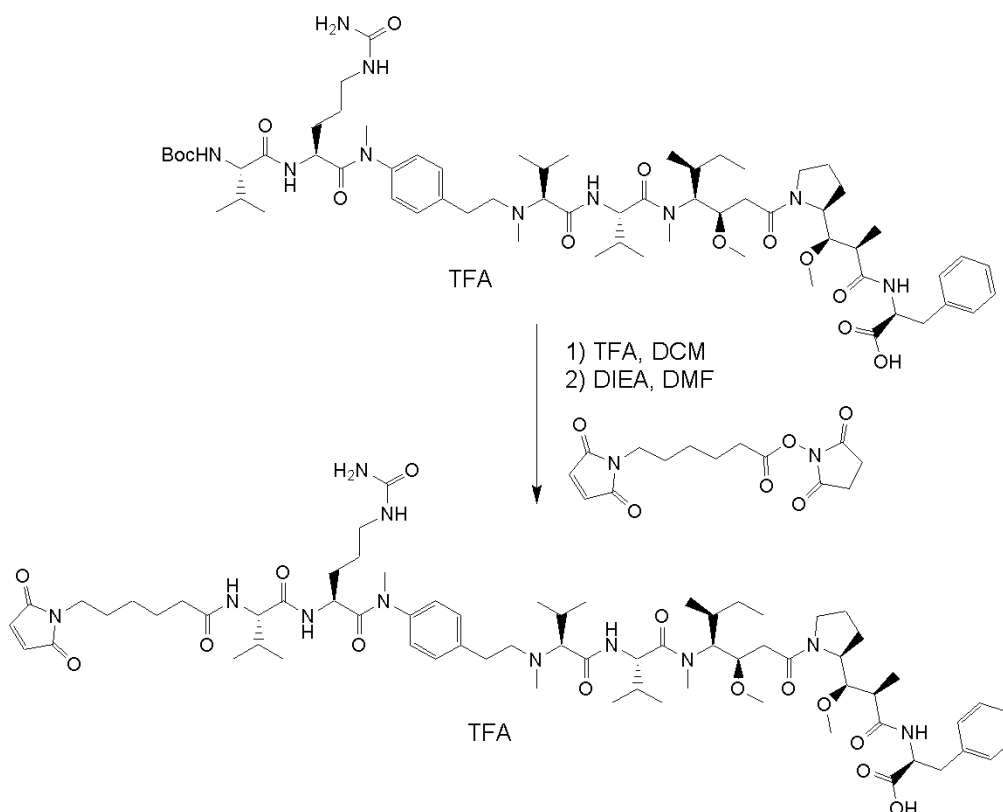


[1050]

[1051]

화합물 **F-13-5** (140 mg, 0.104 mmol, 1 당량)가 물 (4 mL), 아세트니트릴 (4 mL) 및 피페리딘 (2 mL)의 혼합물에 용해되었고, 실온에서 4시간 동안 교반되었다. 용매가 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **F-13-6**를 공급하도록 동결건조되었다 (115 mg, 83 %).

[1052] 화합물 F-13:



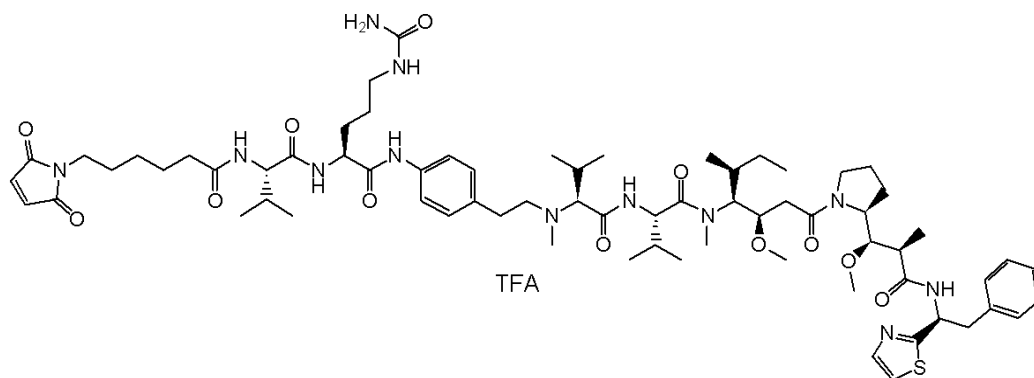
[1053]

[1054] 화합물 **F-13**이 화합물 **E-11**의 경우와 동일한 방법에 따라 DCM (0.5 mL) 및 TFA (100 L, 30 당량)에 넣은 Boc-보호된 아민 **F-13-6** (55 mg, 0.041 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 제조되었고, DMF (1 mL)로의 희석, (DIEA (320  $\mu$ L, 45 당량)으로 반응 정지, 다음으로 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노에이트 (15 mg, 0.049 mmol, 1.2 당량)과의 반응이 이어졌다. 제조용 HPLC에 의한 정제 및 동결건조 이후에, 화합물 **F-13**가 흰색 고체로서 획득되었다 (14 mg, 24%).

[1055]  $m/z$  (Q-TOF MS ESI+) 1314.8067 (2%,  $MH^+$ ,  $C_{69}H_{108}N_{11}O_{14}$  1314.8072 요구), 657.9067 (100%,  $(MH_2)^{2+}$ ,  $C_{69}H_{109}N_{11}O_{14}$  657.9072 요구).

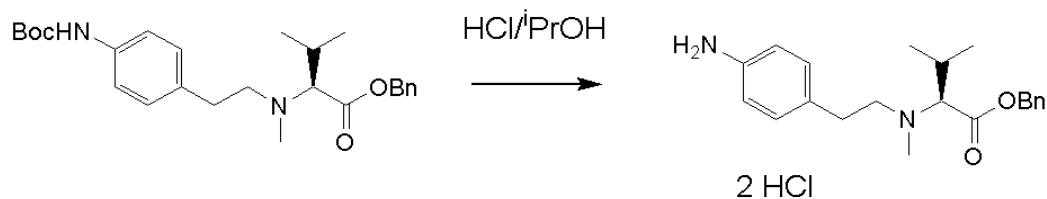
[1056] 화합물 F-61

[1057] *N*-((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-세크-부틸)-7,10-디이소프로필-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-(((*S*)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,11-디메틸-6,9-디옥소-2-옥사-5,8,11-트리아자트리데칸-13-일)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥산아마이드 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[1058]

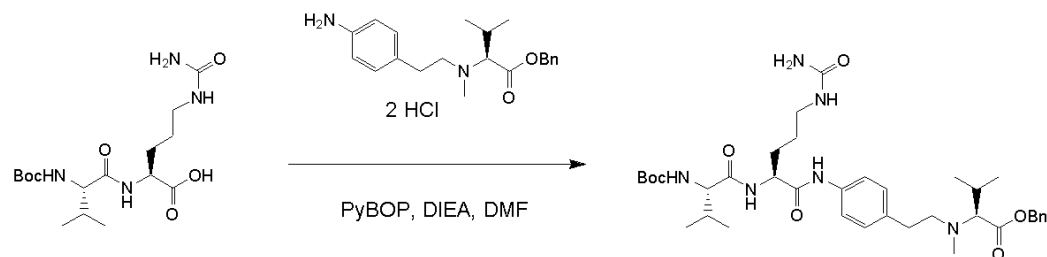
[1059] **화합물 F-61-1:** 벤질 *N*-(4-아미노펜에틸)-*N*-메틸-*L*-발리네이트 디하이드로클로라이드



[1060]

[1061] 화합물 **11C** (1.0 g, 2.27 mmol, 1 당량)가 *i*PrOH (5 - 6 M)에 넣은 8 mL의 시판되는 HCl 용액에 용해되었다. 혼합물은 감압 하에 증발되어 건조되기 이전에 실온에서 2시간 동안 교반되었다. 잔류물은 Et<sub>2</sub>O (30 mL)로 분쇄되었고, 흰색 고체로서 화합물 **F-61-1**를 수득하도록 감압 하에 건조되었다 (916 mg, 98%).

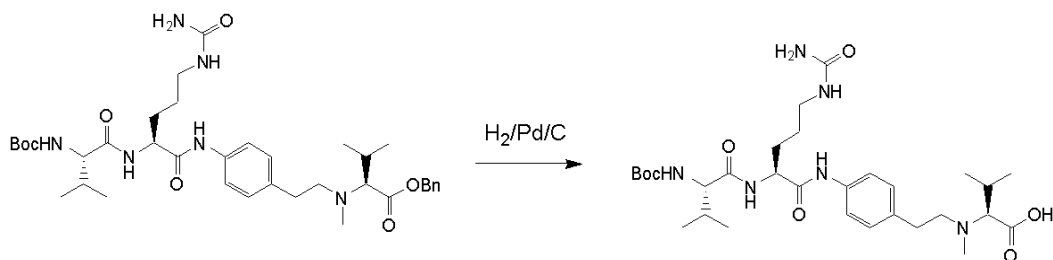
[1062] **화합물 F-61-2:** 벤질 *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)-*N*-메틸-*L*-발리네이트



[1063]

[1064] 산 **E-11-3** (769 mg, 2.05 mmol, 1.5 당량)이 건조 DMF (2.5 mL)에 용해되었고, DIEA (957 uL, 5.48 mmol, 4 당량) 및 PyBOP (1.07 g, 2.05 mmol, 1.5 당량)의 첨가가 이어졌다. 아닐린 **F-61-1** (566 mg, 1.369 mmol, 1 당량)이 첨가되었고, 혼합물은 실온에서 밤샘 동안 교반되었다. 용매들이 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 실리카겔 (DCM/MeOH) 상에서 흰색 고체로서 969 mg (102%)의 화합물 **F-61-2**를 수득하도록 정제되었다.

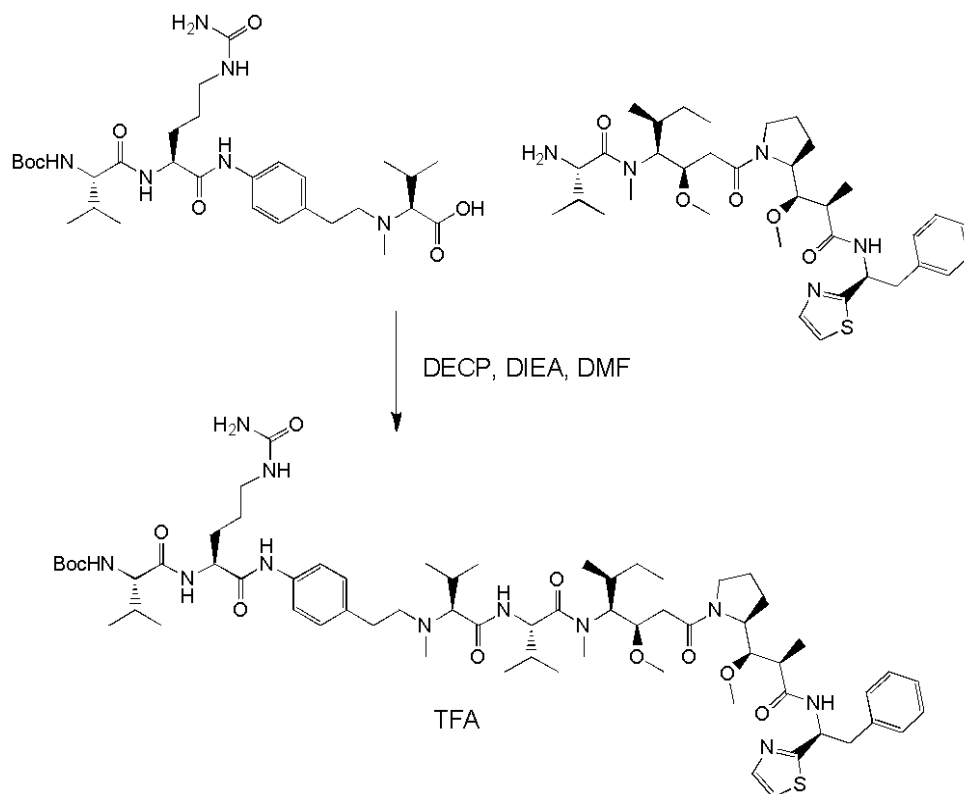
[1065] **화합물 F-61-3:** *N*-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)-*N*-메틸-*L*-발린



[1066]

[1067] 화합물 **F-61-2** (969 mg, 1.28 mmol, 1 당량)가 Pd/C 10% (270 mg)의 존재 시 MeOH (20 mL)에 용해되었고, 상온 및 대기압에서 3시간 동안 수소화되었다. 반응 배지가 여과되었고, 감압 하에 농축되었으며, 잔류물은 실리카겔 (DCM/MeOH/AcOH) 상에서 흰색 고체로서 520 mg (67%)의 화합물 **F-61-3**를 수득하도록 정제되었다.

[1068] **화합물 F-61-4:** *tert*-부틸 ((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-((3*R*,4*S*,7*S*,10*S*)-4-((*S*)-*세크*-부틸)-7,10-디이소프로필-3-(2-((*S*)-2-((1*R*,2*R*)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-(((*S*)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,11-디메틸-6,9-디옥소-2-옥사-5,8,11-트리아자트리데칸-13-일)페닐)아미노)-1-옥소-5-우레이도펜탄-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트 2,2,2-트리플루오로아세트레이트



[1069]

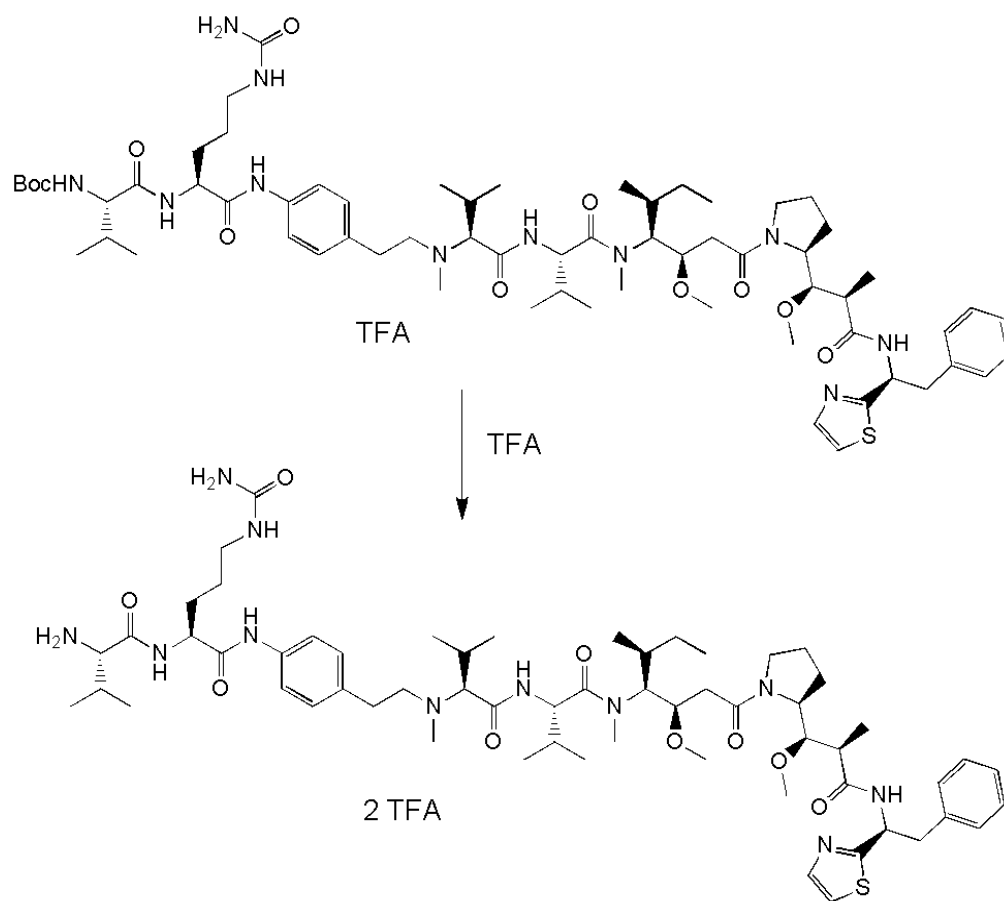
[1070]

산 **F-61-3** (67.5 mg, 0.111 mmol, 1.5 당량)이 건조 DMF (2 mL)에 용해되었고, DECP (17  $\mu$ L, 0.111 mmol, 1.5 당량) 및 DIEA (39  $\mu$ L, 0.223 mmol, 3 당량)가 첨가되었다. 실온에서 15분 동안 교반한 이후에, 아민 **1Y** (50 mg, 0.074 mmol, 1 당량)가 첨가되었고, 용액이 밤샘 동안 교반되었다. 용매가 감압 하에 증발되었고, 잔류물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, . 흰색 고체로서 화합물 **F61-4**를 공급하도록 동결건조되었다 (28 mg, 28%).

[1071]

**화합물 F-61-5:** (S)-2-((S)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-N-(4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-세크-부틸)-7,10-디이소프로필-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-((S)-2-페닐-1-(티아졸-2-일)에틸)아미노)프로필)피롤리딘-1-일)-2-옥소에틸)-5,11-디메틸-6,9-디옥소-2-옥사-5,8,11-트리아자트리데칸-13-일)페닐)-5-우레이도펜타마이드 비스 (2,2,2-트리플루오로아세테이트)



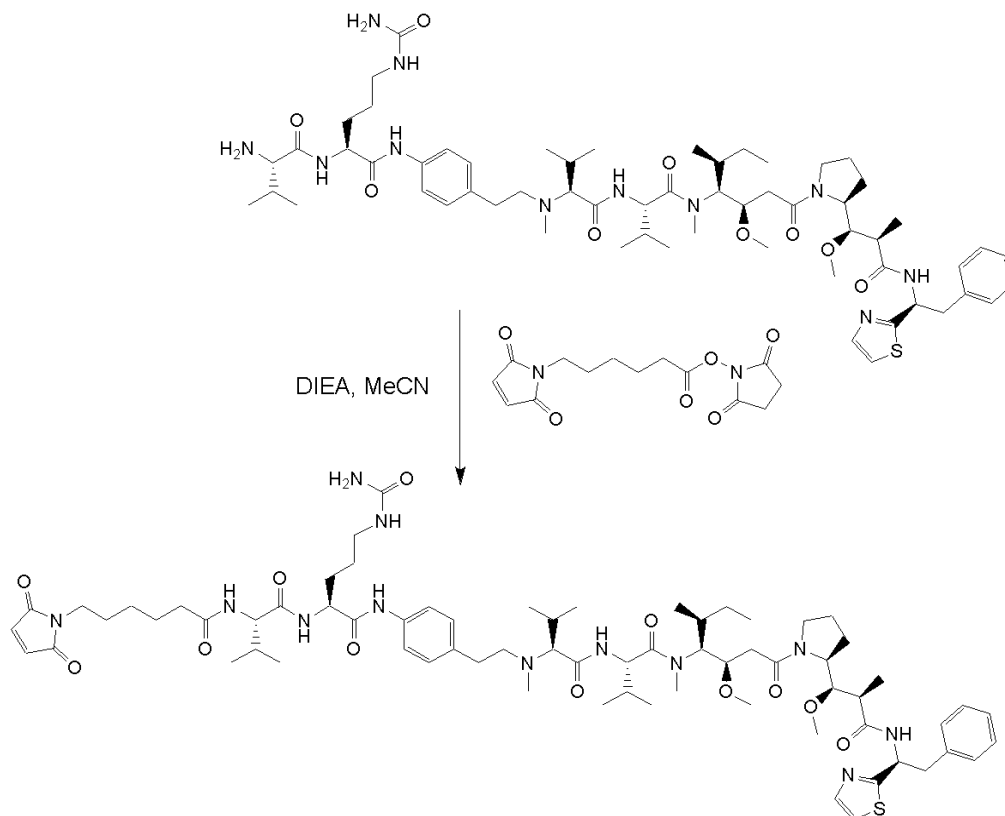


[1072]

[1073]

화합물 **F-61-4** (28 mg, 0.021 mmol, 1.0 당량)가 TFA (200  $\mu$ L)에 용해되었다. 5분 이후에, 물 (2 mL) 및 아세트니트릴 (0.5 mL)이 첨가되었고, 용액은 밤샘 동안 동결건조되어 무색 오일로써 화합물 **F-61-5**를 수득하였다 (38 mg, 134%).

[1074] 화합물 F-61:



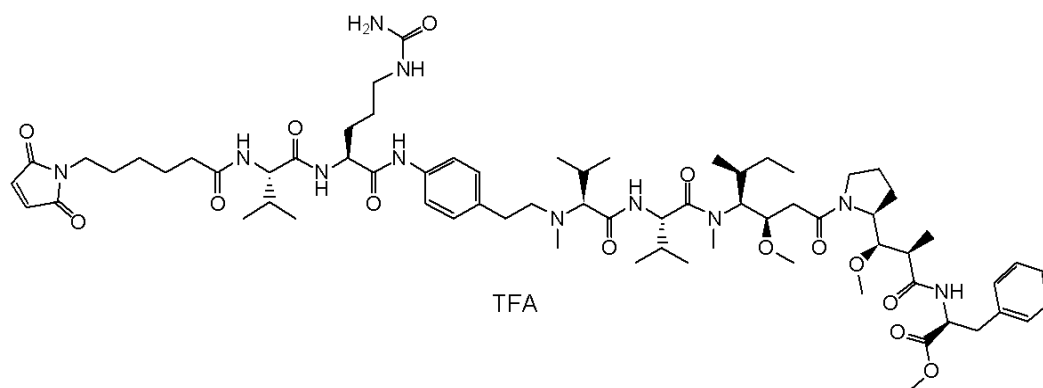
[1075]

[1076] 화합물 **F-61-5** (28.3 mg, 0.020 mmol, 1 당량)가 아세트ونی트릴 (0.5 mL)에 용해되었고, 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥사노에이트 (9 mg, 0.029  $\mu$ mol, 1.4 당량) 및 DIEA (25  $\mu$ L, 0.143 mmol, 7 당량)가 이어졌다. 혼합물은 4.5시간 동안 교반되었고, 이후에 HPLC 분석이 시작 물질의 존재가 있지만, 숙시니미드의 완전한 소모를 보여주었다. 따라서 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥사노에이트가 첨가되었고 (3 mg, 0.01  $\mu$ mol, 0.5 당량), 반응이 1.5시간 동안 교반되었다. HPLC 분석이 시작 물질의 완전한 소모를 보여주었다. 용매가 증발되어 건조되었고, 잔류물은 EtOAc/Et<sub>2</sub>O의 혼합물 (80/20)로 2회 분쇄되었고, 회백색으로서 화합물 **F-61**를 수득하였다 (19.4 mg, 70%).

[1077]  $m/z$  (Q-TOF MS ESI<sup>+</sup>) 1361.7725 (2%,  $MNa^+$ ,  $C_{70}H_{106}N_{12}NaO_{12}S$  1361.7666 요구), 670.3961 (100%,  $(MH_2)^{2+}$ ,  $C_{70}H_{108}N_{12}O_{12}S$  670.3960 요구).

[1078] 화합물 F-62:

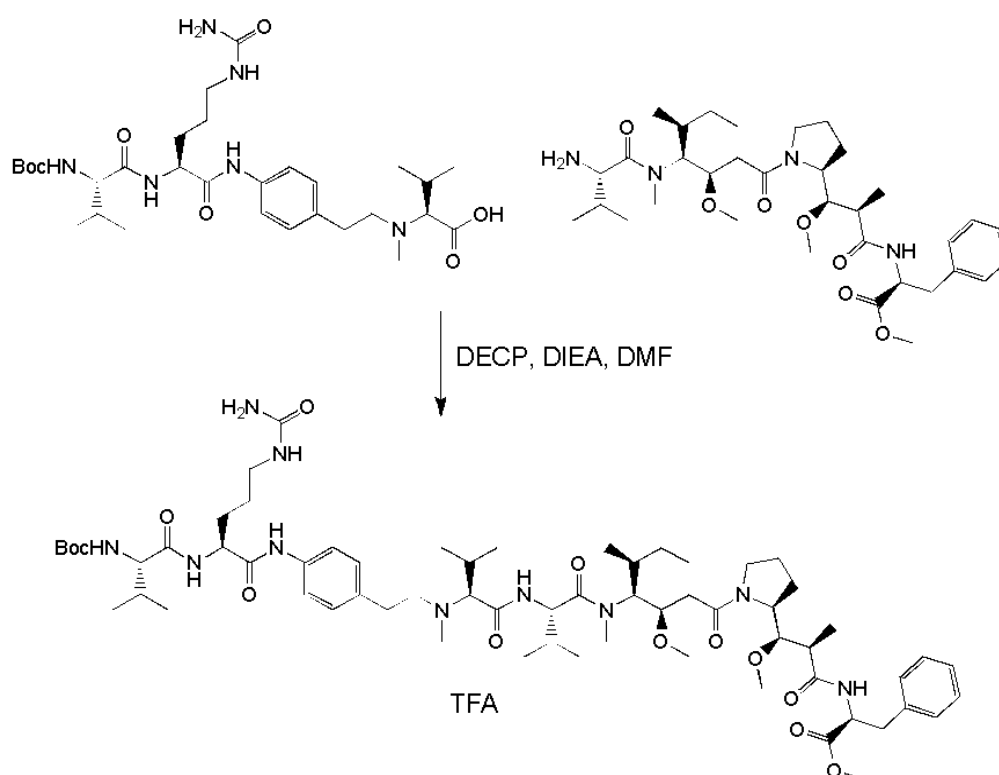
[1079] 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥사나미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세트레이트



[1080]

[1081]

**화합물 F-62-1:** 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



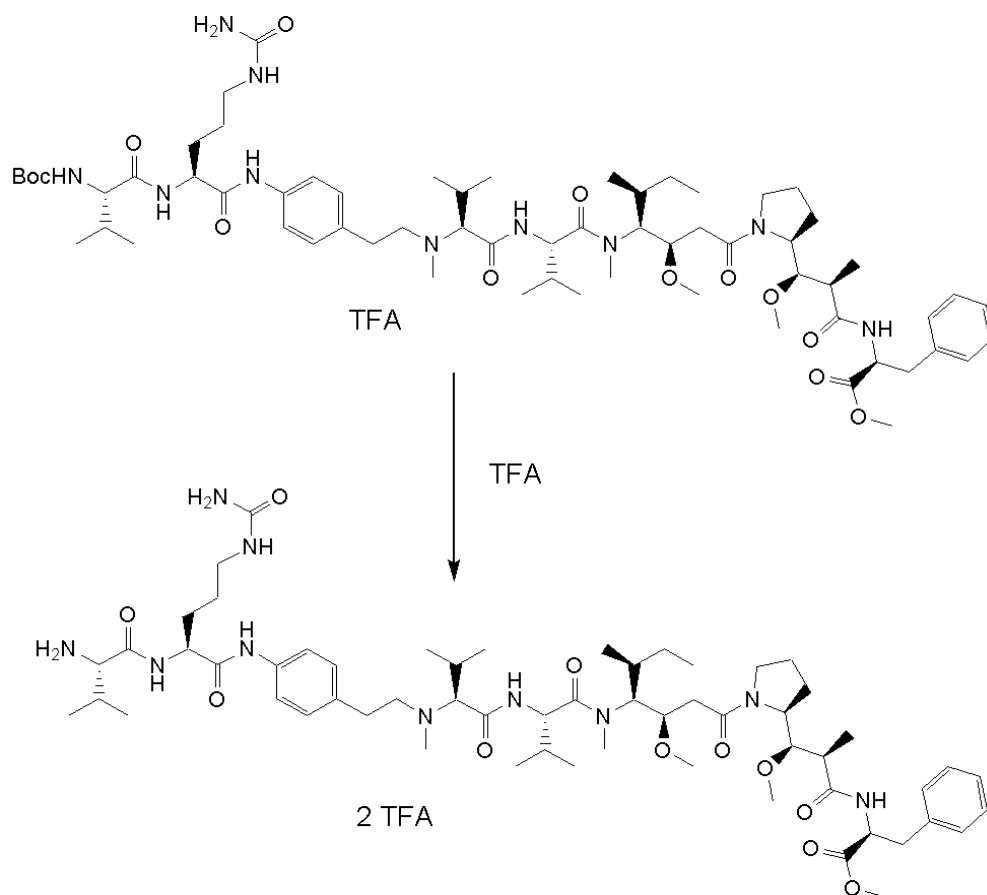
[1082]

[1083]

화합물 **F-62-1**가 화합물 **F-61-4**와 유사한 방식으로 아민 **3D** (100 mg, 0.158 mmol, 0.9 당량), 산 **F-61-3** (108 mg, 0.178 mmol, 1 당량), DECP (41  $\mu$ L, 0.267 mmol, 1.5 당량) 및 DIEA (93  $\mu$ L, 0.534 mmol, 3 당량)으로부터 DMF (2 mL)에서 제조되었다. 제조용 HPLC에 의한 정제 이후에, 화합물 **F-62-1**가 흰색 고체로서 획득되었다 (93 mg, 39%).

[1084]

**화합물 F-62-2:** 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 비스(2,2,2-트리플루오로아세테이트)

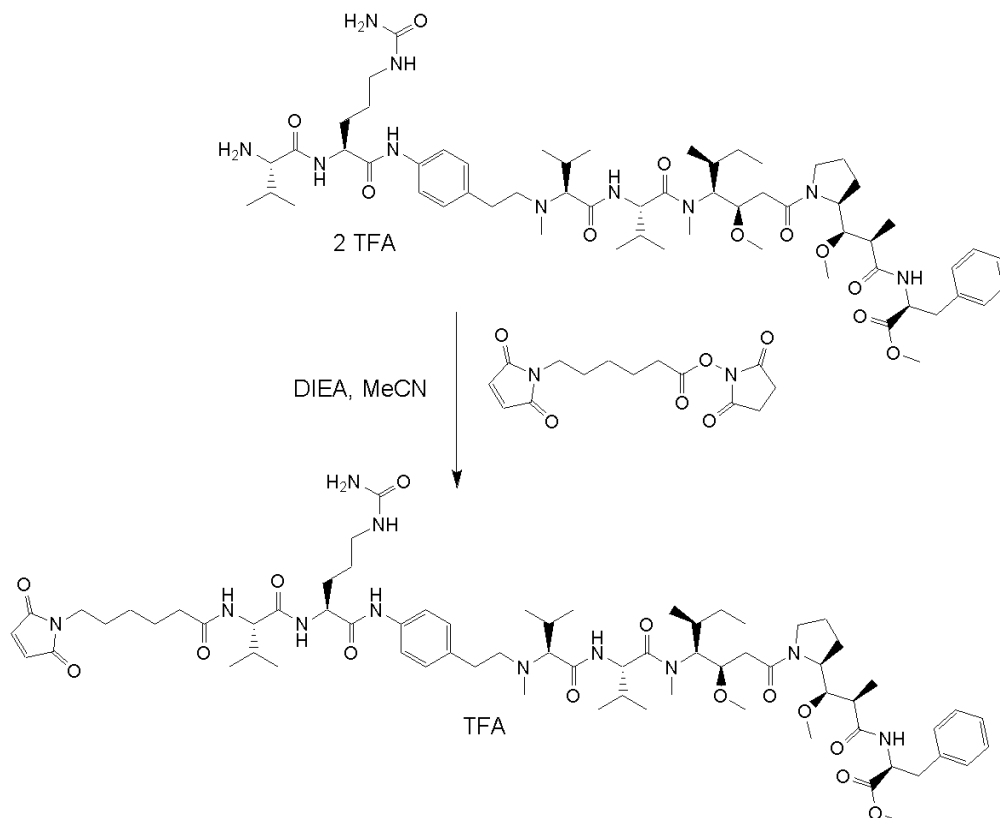


[1085]

[1086]

화합물 **F-62-1** (35 mg, 0.026 mmol, 1.0 당량)가 TFA (200  $\mu$ L)에 용해되었다. 10분 이후에, 물 (2 mL) 및 아세트ونی트릴 (0.5 mL)이 첨가되었고, 용액은 흰색 고체로서 화합물 **F-62-2**를 수득하도록 밤샘 동안 동결건조되었다 (34 mg, 105%).

[1087] **화합물 F-62:**



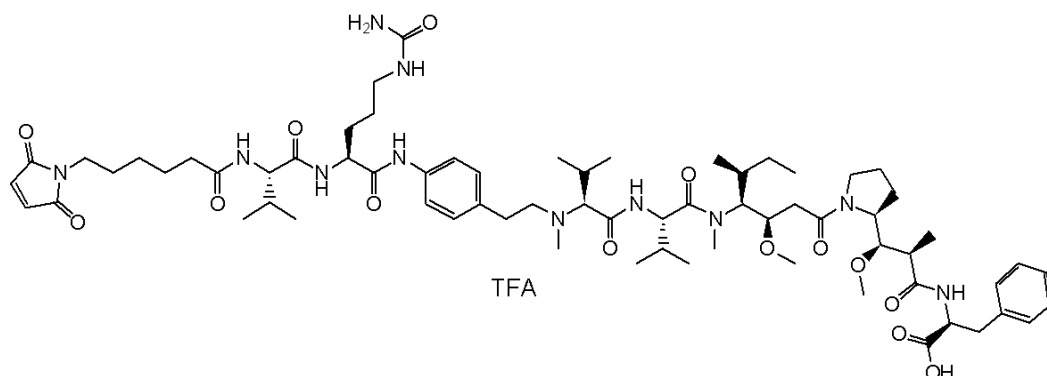
[1088]

[1089] 아민 **F-62-2** (34 mg, 5.55  $\mu\text{mol}$ , 1 당량)가 아세토니트릴 (3 mL)에 용해되었다. DIEA (5  $\mu\text{L}$ , 0.028 mmol, 5 당량) 및 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사노에이트 (2 mg, 6.65  $\mu\text{mol}$ , 1.2 당량)가 첨가되었다. HPLC 분석이 시작 물질의 완전한 소모를 보여주었다. 용매가 증발되어 거건조되었고, 잔류물은 EtOAc/Et<sub>2</sub>O의 혼합물 (80/20)로 분쇄되었다. 조산물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu\text{m}$ , 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **F-62**를 공급하도록 동결건조되었다 (5.5 mg, 13%).

[1090]  $m/z$  (Q-TOF MS ESI+) 1336.7859 (2%,  $\text{MNa}^+$ ,  $\text{C}_{69}\text{H}_{107}\text{N}_{11}\text{NaO}_{14}$  1336.7891 요구), 657.9073 (100%,  $(\text{MH}_2)^{2+}$ ,  $\text{C}_{69}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{14}$  657.9072 요구).

[1091] **화합물 F-63:**

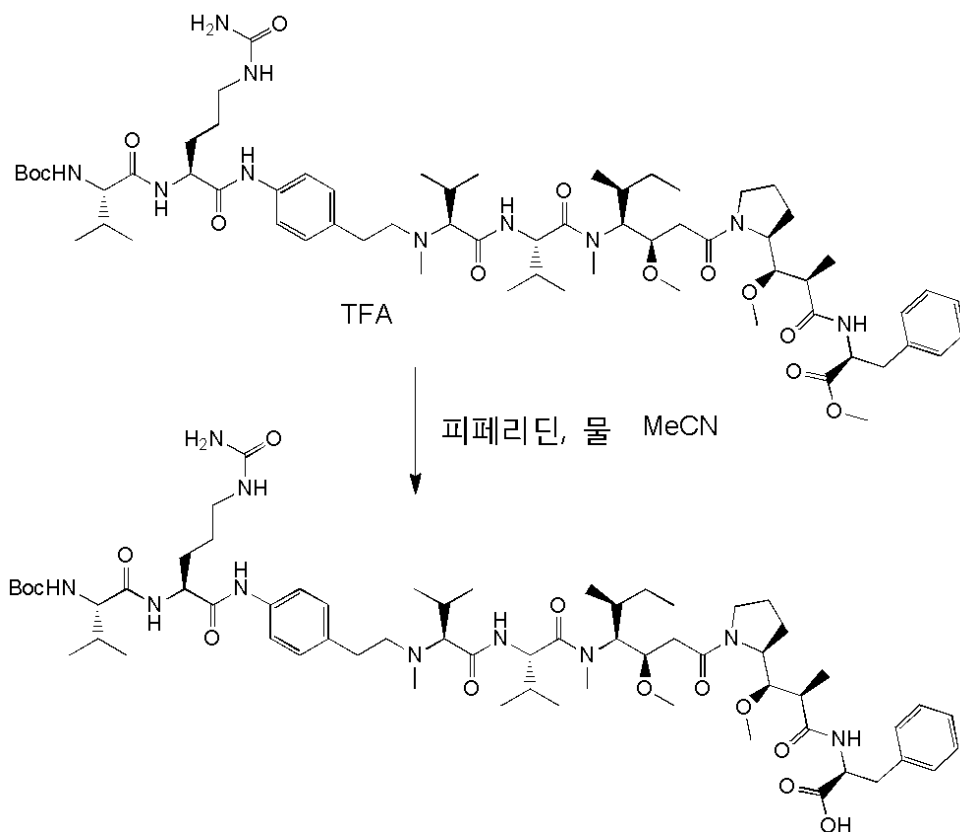
[1092] ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)헥사아미도)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-N,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-L-페닐알라닌 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[1093]

[1094]

**화합물 F-63-1:** ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-부톡시카르보닐)아미노)-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸) (메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌



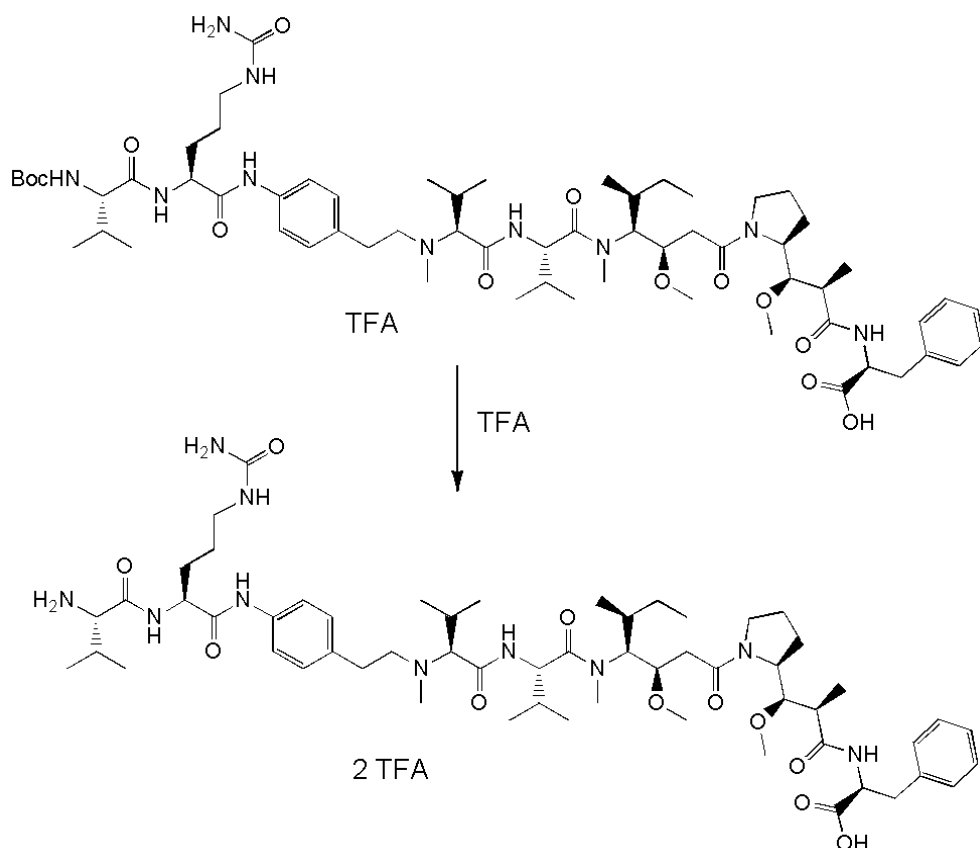
[1095]

[1096]

화합물 **F-62-1** (157 mg, 0.118 mmol, 1 당량)이 물 (4.5 mL), 아세트니트릴 (4.5 mL) 및 피페리딘 (3.5 mL)의 혼합물에 용해되었고, 실온에서 5시간 동안 교반되었다. 용매가 감압 하에서 증발되었고, 잔류물은 Et<sub>2</sub>O (60 mL)로 분쇄되었다. 고체는 여과에 의해 수집되었고, Et<sub>2</sub>O (10 mL)로 두 번 세척되어 희백색 고체로서 화합물 **F-63-1**을 수득하였다 (153 mg, 100%).

[1097]

**화합물 F-63-2:** ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-아미노-3-메틸부탄아미도)-5-우레이도펜탄아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일) 피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌 비스 2,2,2-트리플루오로아세트레이트



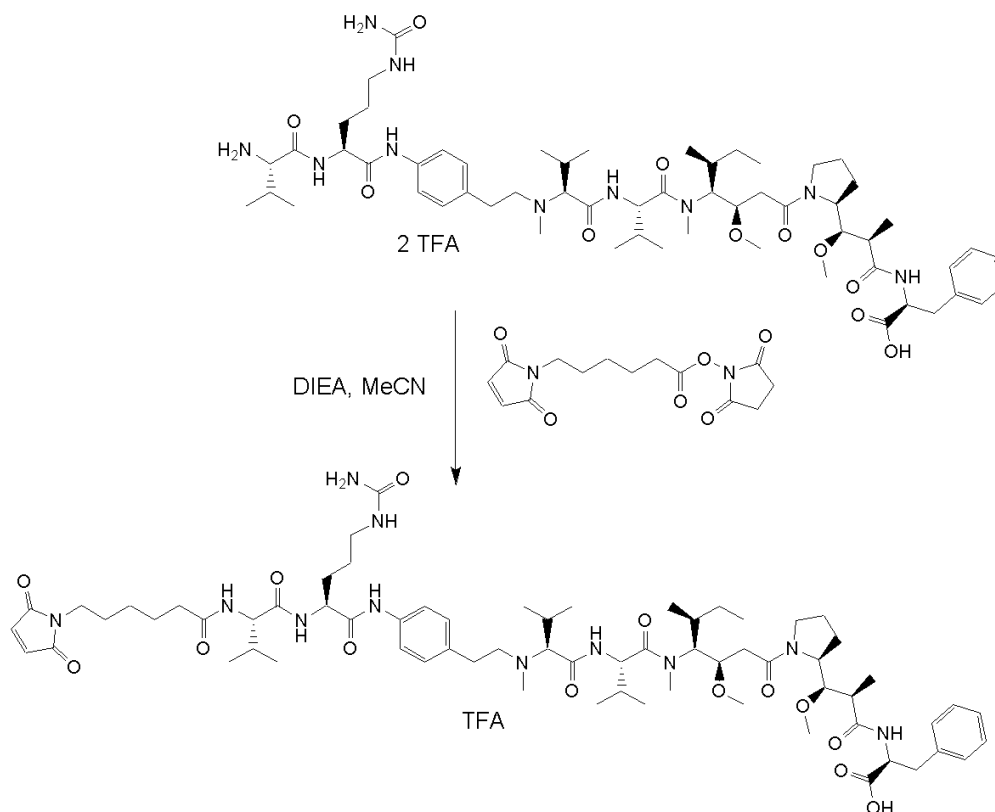
[1098]

[1099]

화합물 **F-63-1** (153 mg, 0.127 mmol, 1.0 당량)이 TFA (200  $\mu$ L)에 용해되었다. 10분 이후에, 물 (2 mL) 및 아세토니트릴 (0.5 mL)이 첨가되었고, 용액은 밤샘 동결건조되어 흰색 고체로서 화합물 **F-63-2**이 수득되었다 (34 mg, 105%).

[1100]

**화합물 F-63:**



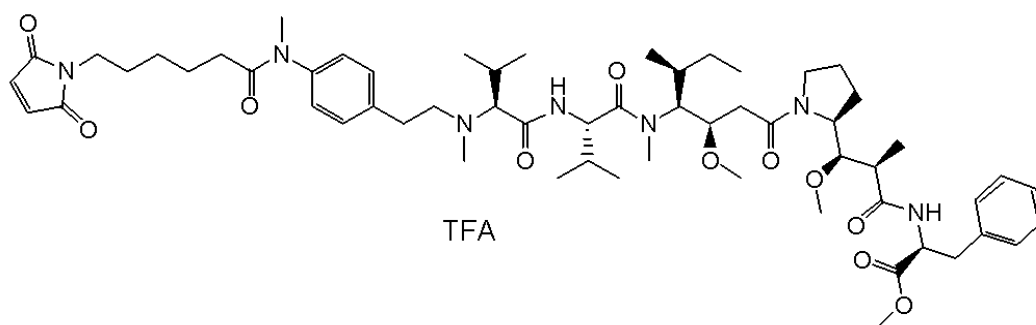
[1101]

[1102] 아민 **F-63-2** (100 mg, 0.082 mmol, 1 당량)이 아세트니트릴 (2 mL) 및 DMF (0.5 mL)의 혼합물에 용해되었고, 2,5-디옥소피롤리딘-1-일 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥사노에이트 (45 mg, 0.147 mmol, 1.8 당량) 및 DIEA (71  $\mu$ L, 0.409 mmol, 5 당량)가 첨가되었다. 실온에서 4.5시간 동안 교반한 이후에, 용매가 감압 하에 증발되었다. 조산물은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nM에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 이후에 흰색 고체로서 화합물 **F-63**를 수득하도록 동결건조되었다 (42 mg, 36%).

[1103] m/z (Q-TOF MS ESI+) 1300.7901 (2%,  $MH^+$ ,  $C_{68}H_{106}N_{11}O_{14}$  1300.7915 요구), 650.8990 (100%,  $(MH_2)^{2+}$ ,  $C_{68}H_{107}N_{11}O_{14}$  650.8994 요구).

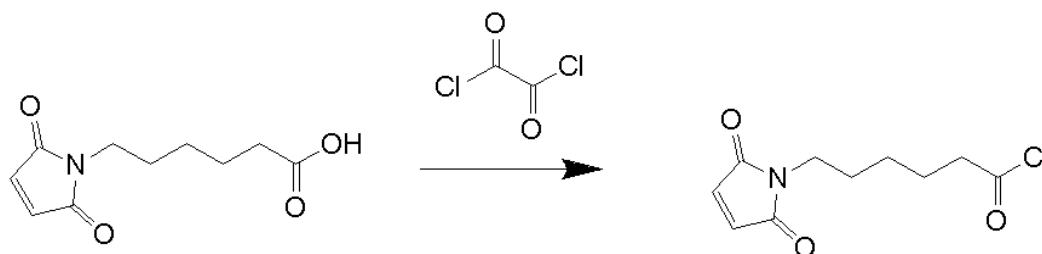
[1104] **화합물 G-12**

[1105] 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)-*N*-메틸헥산아미도)펜에틸)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[1106]

[1107] **화합물 G-12-1**: 벤질 *N*-(4-아미노펜에틸)-*N*-메틸-*L*-발리네이트 디하이드로클로라이드

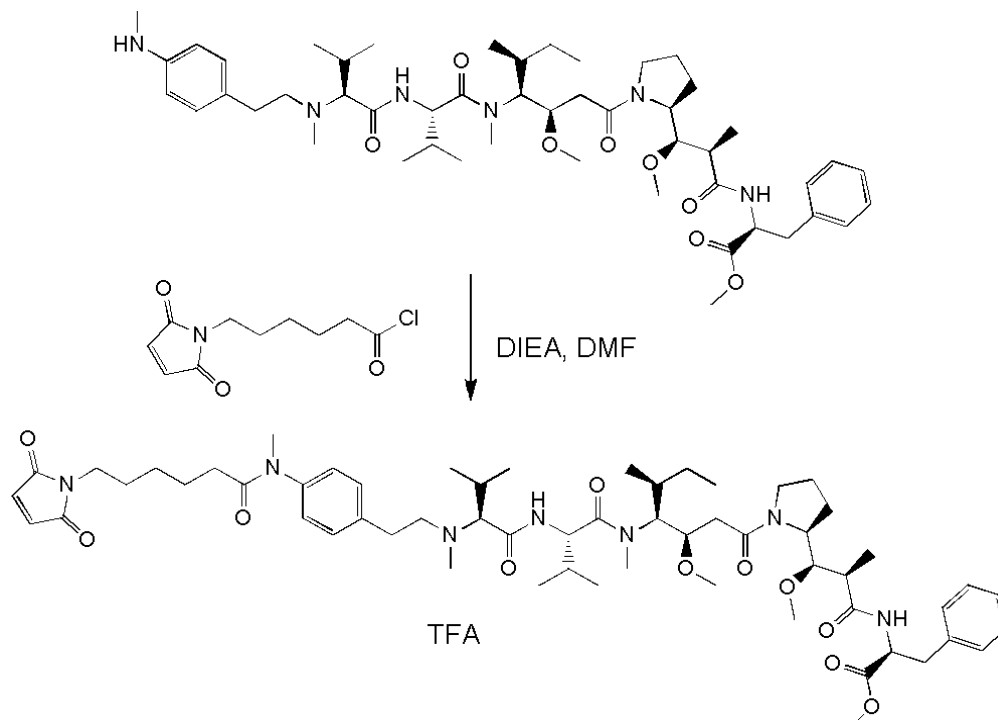


[1108]

[1109] 옥사릴 클로라이드 (3 mL)에 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥사노산 (200 mg, 0.947 mmol, 1 당량)가 용해되었다. 용액은 감압 하에 증발되어 건조되기 이전에 실온에서 5시간 동안 교반되었다. 화합물 **G-12-1**은 베이지색 고체로서 획득되었고 (217 mg, 100%), 정제 없이 다음 단계에 사용되었다.



[1110] **화합물 G-12:**



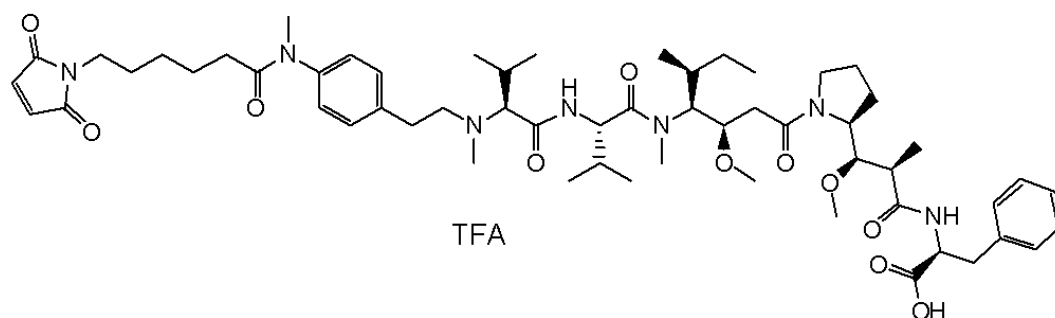
[1111]

[1112] 아닐린 **12** (40 mg, 0.045 mmol, 1 당량)가 0℃에서 건조 DCM (1 mL)에 용해되었고, DIEA (8  $\mu$ L, 0.045 mmol, 1 당량)가 첨가되었다. 30분 동안 교반한 이후에, 건조 DCM (1 mL)에 넣은 화합물 **G-12-1** (10 mg, 0.45 mmol, 1 당량)의 용액이 도입되었고, 반응이 0℃에서 1시간 동안 교반되었다. 혼합물은 DCM (25 mL)로 희석되었고, 물 (20 mL)로 두 번, 염수 (10 mL)로 한 번 세척되었다. 유기상은  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조되어 여과되었고, 열은 갈색 고체로서 조산물을 수득하도록 감압 하에서 증발되었다 (54 mg). 이것은 실리카겔 (DCM/MeOH) 상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제되었고, 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)가 이어졌다. 분리된 산물은 흰색 고체를 수득하도록 동결건조되었다 (23 mg), 이는 제조용 HPLC에 의해 재정제되었으며, 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **G-12**를 공급하도록 동결건조되었다 (9 mg, 16%).

[1113]  $m/z$  (Q-TOF MS ESI+) 1094.6543 (20%,  $\text{MNa}^+$ ,  $\text{C}_{59}\text{H}_{89}\text{N}_7\text{NaO}_{11}$  1094.6512 요구), 1072.6722 (16%,  $\text{MH}^+$ ,  $\text{C}_{59}\text{H}_{90}\text{N}_7\text{O}_{11}$  1072.6693 요구), 536.8358 (100%,  $(\text{MH}_2)^{2+}$ ,  $\text{C}_{59}\text{H}_{91}\text{N}_7\text{O}_{11}$  536.8383 요구).

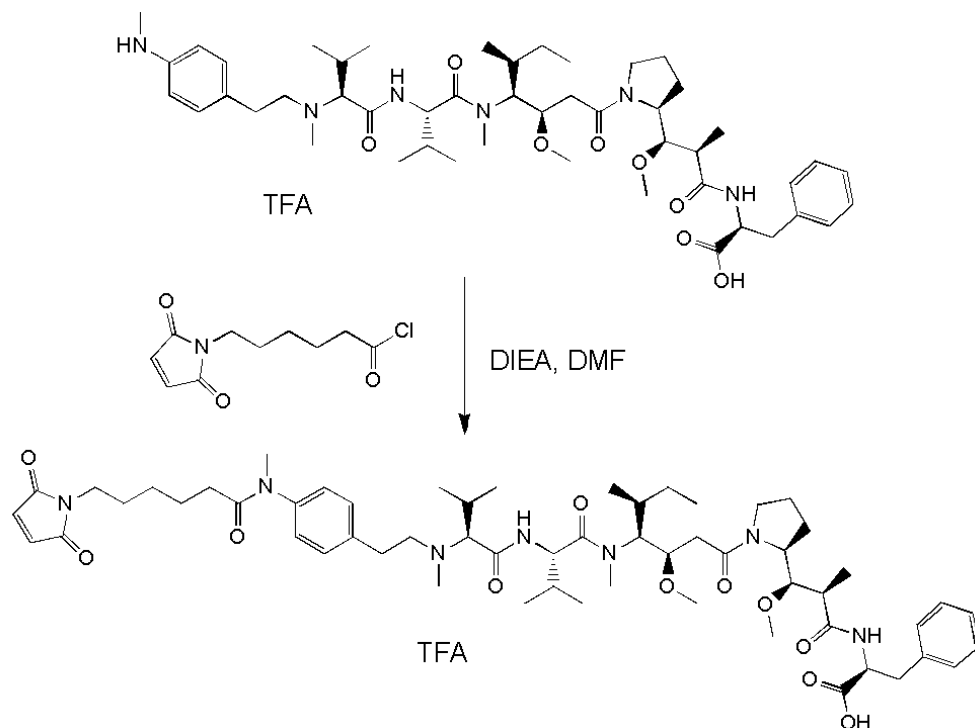
[1114] **화합물 G-13**

[1115] ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((4-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)-*N*-메틸헥산아미도)펜테일)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라닌 2,2,2-트리플루오로아세트레이트



[1116]

[1117] **화합물 G-13:**



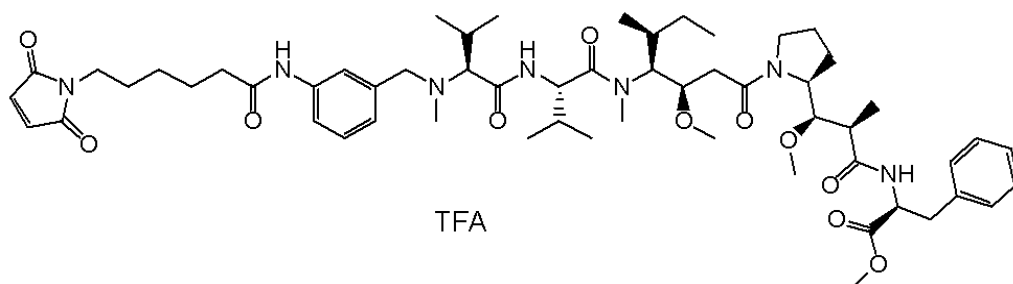
[1118]

[1119] 아닐린 **13** (15 mg, 0.015 mmol, 1 당량)이 0℃에서 건조 DCM (1.5 mL)에 용해되었고, DIEA (8  $\mu$ L, 0.046 mmol, 3 당량)이 첨가되었다. 건조 DCM (0.5 mL)에 넣은 화합물 **G-12-1** (3.5 mg, 0.046 mmol, 1 당량)의 용액이 도입되었고, 반응은 0℃에서 1.5시간 동안 교반되었다. 용매가 감압 하에서 증발되었고, 조산물은 제조용 HPLC (위터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 위터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **G-13**를 공급하도록 동결건조되었다 (11.4 mg, 62 %).

[1120] m/z (Q-TOF MS ESI+) 1058.6510 (30%,  $MH^+$ ,  $C_{58}H_{88}N_7O_{11}$  1058.6536 요구), 529.8285 (100%,  $(MH_2)^{2+}$ ,  $C_{58}H_{89}N_7O_{11}$  529.8305 요구).

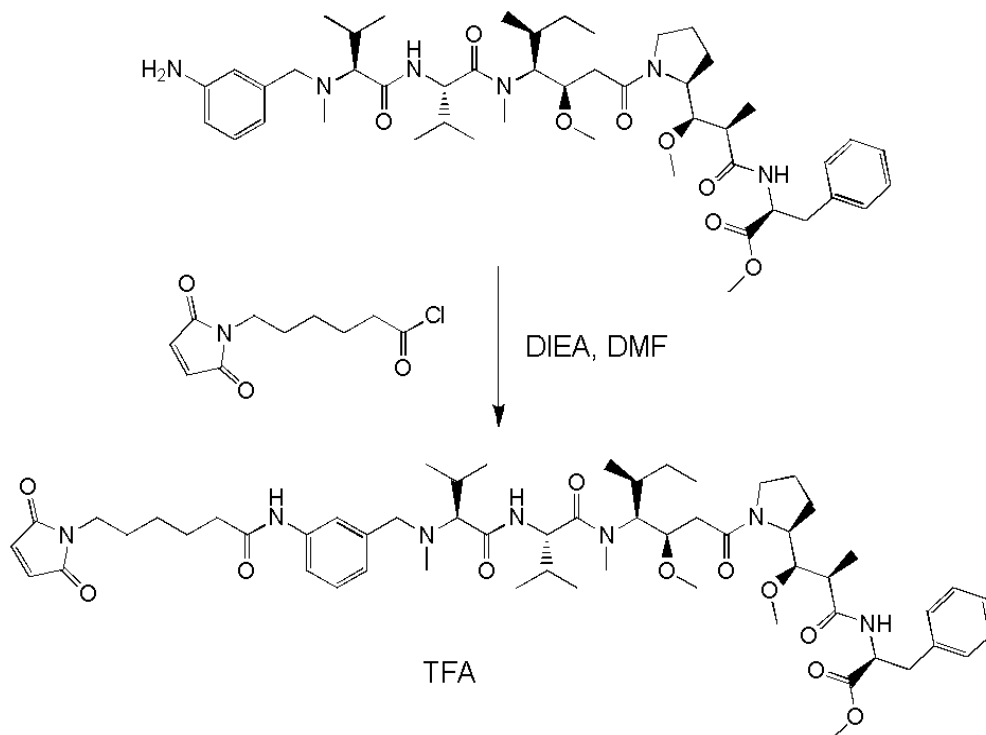
[1121] **화합물 G-15**

[1122] 메틸 ((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((3-(6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1*H*-피롤-1-일)헥산아미도)벤질)(메틸)아미노)-3-메틸부탄아미도)-*N*,3-디메틸부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로파노일)-*L*-페닐알라니네이트 2,2,2-트리플루오로아세테이트



[1123]

[1124] **화합물 G-15:**



[1125]

[1126] 아닐린 **15** (40 mg, 0.047 mmol, 1 당량)이 0℃에서 건조 DCM (2 mL)에 용해되었고, DIEA (10  $\mu$ L, 0.056 mmol, 1.2 당량)가 첨가되었다. 건조 DCM (1 mL)에 넣은 화합물 **G-12-1** (108 mg, 0.47 mmol, 10 당량)의 용액이 도입되었고, 반응은 0℃에서 1.5시간 동안 교반되었다. 혼합물은 DCM (10 mL)로 희석되었고, 물 (5 mL)로 두 번 세척되었다. 유기상은  $MgSO_4$  위에서 건조되어 여과되었고, 베이저색 고체로서 조산물을 수득하도록 감압 하에 증발되었다. 이것은 제조용 HPLC (워터스 600E, SunFire 프랩 C18 OBD 컬럼, 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm; 용출상: 0.1% TFA로 완충된 물/MeCN; 5% 내지 100% MeCN의 구배 15분; 220 nm에서의 워터스 2487 UV 검출기)에 의해 정제되었다. 선별된 분획들은 조합되었고, 흰색 고체로서 화합물 **G15**를 수득하도록 동결건조되었다 (27 mg, 50%).

[1127]  $m/z$  (Q-TOF MS ESI+) 1066.6517 (2%,  $MNa^+$ ,  $C_{57}H_{85}N_7NaO_{11}$  1066.6199 요구), 522.8224 (100%,  $(MH_2)^{2+}$ ,  $C_{57}H_{87}N_7O_{11}$  522.8226 요구).

[1128] **실시예 17: ADC 합성, 정제 및 특성화**

[1129] 하기 기술된 절차가 키메라 및 인간화 IgG1형태들에 적용된다. IgG2, IgG4 등과 같은 기타 다른 형태들의 경우, 당업자라면 일반 지식을 사용하여 절차를 적응시킬 수 있을 것으로 이해되어야 한다.

[1130] 항체들 (1 내지 5 mg/mL)은 150 mM NaCl 및 2 mM EDTA를 포함하는 10 M 보레이트 완충액에서 트리스(2-카르복시에틸)포스파인 염산 (TCEP)으로 37℃에서 2시간 동안 부분적으로 환원되었다. 전형적으로 TCEP의 2.5 내지 3 몰 당량들이 약 4의 약물-대비-항체 비율들 (DAR)를 표적하도록 사용되었다. 부분적인 항체 환원은 SDS-PAGE 분석에 의해 비환원 조건들 하에서 검증되었다. 방출된 사슬간 시스테인 잔기들과 링커-약물 커플링 이전에, 환원 혼합물이 실온으로 냉각되도록 허용되었다. 다음으로 항체 농도가 150 mM NaCl 및 2 mM EDTA를 포함하는 10 M 보레이트 완충액 pH 8.4로 1 mg/mL로 조정되었고, 약물 대비 항체의 5 몰 과다가 디메틸 설폭사이드 (DMSO)에 넣은 10% 용액으로부터 첨가되었다. 최종 DMSO 농도는 커플링 동안 수용성 용액에서 약물의 용해도를 유지하도록 10%로 조정되었다. 반응은 실온에서 1시간 동안 수행되었다. 약물 과다가 약물의 몰 당 1.5 몰수의 N-아세틸 시스테인의 첨가 및 실온에서 1시간 동안 배양에 의해 정지되었다. 4℃에서 밤샘 동안 150 mM NaCl을 포함하는 25 mM His 완충액 pH 6.5를 사용한 투석 이후에, 항체-약물-결합체들이 시판되는 크로마토그래피 및 초여과 유닛들을 기초로 하는 당해 기술분야의 당업자에게 숙지된 방법들을 사용하여 정제되었다. 먼저, 미결합된 약물 및 ADC 응집체들이 S200 (GE 라이프 사이언스사) 또는 TSK G3000 SW (토소사) 컬럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 제거되었다. 다음으로 정제된 ADC 단량체들이 30 또는 50 KDa MWC0 상의 초여과에 의해 또

는 단백질 A 상의 친화 크로마토그래피에 의해 2 내지 3 mg/mL로 농축되었다. 정제된 ADC들이 0.2  $\mu$ m 필터 상에서 무균의 여과 이후에 4°C에서 보관된다. 그들은 약물 결합을 검증하도록 환원 및 비환원 조건들 하에서 SDS-PAGE에 의해 그리고 단량체 및 응집된 형태들의 함량을 결정하도록 분석적 S200 또는 TSK G3000 SWXL 컬럼들에 의해 추가로 분석되었다. 단백질 농도들은 표준으로서 IgG를 가진 비신초닌산 (BCA) 검정법을 사용하여 결정되었다. DAR은 HIC 및 LC-MS에 의해 각각의 정제된 ADC의 경우에 추정되었다. 전형적으로, 응집된 형태들의 함량은 5% 이하이었고, DAR은 3.5 및 5 사이 범위에 포함되었다.

## 실시예 8: 서로 다른 약물들과 결합된 IGF-1R 항체들의 세포독성 평가

### 18.1 MCF-7 세포들에서 키메라 항체들의 평가

5가지의 IGF-1R 항체들이 리소솜들 내로 신속하게 내재화되고 산성 환경 내에서 더 낮은 결합 능력을 가지는 것으로 확인되었다. 해당 관점에서, 이들 Ab들은 ADC들로서 사용될 특성들 모두를 가졌다. 따라서, 5가지의 키메라 IGF-1R 항체들이 서로 다른 화합물들 (G-13; E-13 및 F-63)과 결합되었다. 이들 ADC들의 약물 항체 비율은 약 4이었다. 비특이적 세포독성을 평가하기 위하여, 부적절한 키메라 항체 c9G4도 역시 이들 화합물들과 동일한 DAR에서 결합되었다. MCF-7 세포들이 각각의 ADC들의 증가하는 농도들로 완전 배양 배지에 37°C에서 6일 동안 배양되었다. 세포 생존도는 발광 세포 생존도 검정법 (CellTiter-Glo, 프로메가사)를 사용하여 평가되었다. 발광 신호는 미스라스 플레이트 리더 (베르톨드 테크놀로지사)를 사용하여 해석되었다. E-13, G-13 또는 F-63와 결합된 부적절한 키메라 항체 c9G4는 MCF-7 세포들에 미치는 없거나 온화한 세포독성 활성을 보여주었다 (도 21). 정반대로, 항-IGF-1R 항체들을 E-13, G-13 또는 F-63 중 어느 하나와 결합시킨 이후에 획득된 나머지 ADC들 모두의 첨가는 MCF-7 세포 생존도를 극적으로 감소시켰다.

### 18.2 정상 세포들에서 키메라 항체들의 평가

IGF-1R의 발현 수준들이 일차 정상 세포들 (PromoCell GmbH)에서 c208F2를 사용하여 평가되었다. 해당 목적을 위해, 세포들 ( $0.5 \times 10^6$  개 세포들/mL)이 FACS 완충액 (PBS, 0.1% BSA, 0.01%  $\text{NaN}_3$ )에서 10  $\mu$ g/mL의 c208F2 항체와 4°C에서 20분 동안 배양되었다. 다음으로 그들이 3번 세척되었고, 알렉사 488와 결합된 적절한 이차 항체와 암소에서 4°C로 추가 20분 동안 배양되었고, 이후에 FACS 완충액에서 3번 세척되었다. 항-IGF-1R 항체의 결합이 생존가능 세포들에서 바로 수행되었고, 이는 (죽은 세포들을 염색하는) 프로피디움 요오드를 사용하여 확인되었다. 발현 수준 ( $B_{\text{최대}}$ )은 MCF-7 세포들에서의 IGF-1R 발현과 비교하여 (실시예 2, 표 8 참조) 정상 세포 (표 14)에서는 낮았다.

표 14

정상 세포	$B_{\text{최대}}$
인간 대동맥 내피세포 (HAoEC)	21
인간 호흡기 미세혈관 내피세포 (HPMEC)	33
인간 기관지 평활근 세포 (HBSMC)	26
인간 신장 표피세포 (HREpC)	110
인간 요로상피 세포 (HUC)	181

ADC c208F2-G-13의 세포독성이 정상 세포에서 평가되었다. 세포들이 증가하는 농도들의 c208F2-G-13과 완전 배양 배지로 37°C에서 6일 동안 배양되었다. 세포 생존도는 발광 세포 생존도 검정법 (CellTiter-Glo, 프로메가사)를 사용하여 평가되었다. 발광 신호는 미스라스 플레이트 리더 (베르톨드 테크놀로지사)를 사용하여 해석되었다. 주요한 세포 세포독성이 HBSMC, HPMEC, HAoEC 및 HREpC에서는 전혀 관찰되지 않았다 (도 25). 소수의 세포 세포독성은 HUC에서 c208F2-G-13의 높은 농도에서만 측정되었다.

### 18.3 hz208F2의 인간화 변이체들의 평가

[1140] 16가지의 208F2의 인간화 변이체들이 화합물 G13과 결합되었다. 이들 ADC들의 약물 함체 비율은 약 4이었다. 비특이적 세포독성을 평가하기 위하여, 부적절한 키메라 항체 c9G4도 역시 이들 화합물들과 동일한 DAR에서 결합되었다. 키메라 항체 c208F2도 역시 G-13과 결합되었다. MCF-7 세포들이 각각의 ADC들의 증가하는 농도들로 완전 배양 배지에 37℃에서 6일 동안 배양되었다. 세포 생존도는 발광 세포 생존도 측정법 (CellTiter-Glo, 프로메가사)를 사용하여 평가되었다. 발광 신호는 미스라스 플레이트 리더 (베르톨트 테크놀로지사)를 사용하여 해석되었다. G-13과 결합된 부적절한 키메라 항체 c9G4는 MCF-7 세포들에 미치는 없거나 온화한 세포독성 활성을 보여주었다 (도 26). 정반대로, 항-IGF-1R 항체들을 G-13과 결합시킨 이후에 획득된 나머지 ADC들 모두의 첨가는 MCF-7 세포 생존도를 극적으로 감소시켰다. 세포 세포독성을 유도하는 16가지 인간화 변이체들의 능력은 표 15에 나타내고 도 26에서 한 가지 인간화 변이체로 도시된 바와 같이, 키메라 형태 c208F2-G-13으로 측정된 능력과 적어도 동등하고 심지어 더 좋다.

표 15

		EC50
키메라 mAb	c208F2-G-13	9.0E-11
인간화 변이체들	H208F2 (H026/L024)-G-13	1.1E-10
	h208F2 (H037/L018)-G-13	3.7E-11
	h208F2 (H047/L018)-G-13	4.4E-11
	h208F2 (H049/L018)-G-13	6.6E-11
	h208F2 (H051/L018)-G-13	3.6E-11
	h208F2 (H052/L018)-G-13	3.4E-11
	h208F2 (H057/L018)-G-13	5.2E-11
	h208F2 (H068/L018)-G-13	6.2E-11
	h208F2 (H070/L018)-G-13	5.7E-11
	h208F2 (H071/L018)-G-13	8.5E-11
	h208F2 (H076/L018)-G-13	5.3E-11
	h208F2 (H077/L018)-G-13	3.0E-11
	h208F2 (H037/L021)-G-13	3.9E-11
	h208F2 (H049/L021)-G-13	5.2E-11
	h208F2 (H052/L021)-G-13	3.7E-11
	h208F2 (H076/L021)-G-13	4.5E-11

[1141]

[1142] 실시예 19: MCF-이종이식 모델에서 E-13, G-13 또는 F-63 화합물들 중 어느 하나와 결합된 c208F2 항체의 생체내 활성

[1143] E-13, G-13 또는 F-63 화합물들과 결합된 c208F2 항체의 시험관내 효능이 생체내에서 해석될 수 있는지를 검증하기 위하여, 그들이 MCF-7 이종이식 모델에서 테스트되었다.

[1144] 모든 동물 절차들은 과학적 목적들에 사용되는 동물들의 보호에 관한 2010/63/UE 지침의 가이드라인들에 따라 수행되었다. 프로토콜은 피에르 파브르 연구소의 동물 윤리 위원회에 의해 승인되었다. 5백만 개의 MCF-7 세포들이 7주령 스위스/누드 마우스들 내로 피하로 주사되었다. 세포 주입 이전에, 에스트로겐 펠릿들 (아메리카의 이노베이트 리서치사)이 MCF-7 종양들의 생체내 성장에 필요한 에스트로겐들을 방출시키기 위하여 마우스들의 옆구리로 이식되었다.

- [1145] MCF-7 세포 이식 이후 20일째, 종양들이 120 내지 150 mm<sup>3</sup>의 평균 크기에 도달했을 때, 동물들은 종양 크기 및 관점에 따라 5마리 마우스들의 그룹으로 나누었다. 서로 다른 처리들이 복강내 주사들에 의해 접종되었다. 동물들의 건강 상태가 매일 감시되었다. 종양 부피가 전자 측정기로 연구 종결 시까지 매주 두 번 측정되었다. 종양 부피는 다음 공식으로 계산된다:  $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$ . 독성은 동물들의 무게에 따라 매주 3번 측정되었다. 통계학적 분석들이 만-휘트니 테스트를 사용하여 각각의 측정에서 수행되었다. 모든 화합물들은 복강내로 (i.p.) 주사되었다. 본 실시예에서는, 약 DAR 4에서 E-13, G-13 또는 F-63 화합물들 중 어느 하나와 결합된 c208F2 mAb의 항-종양 활성이 D20 및 D27일째 7 mg/kg 용량의 2회 주사들 이후에 측정되었다 (도 22a, 22b 및 22c). 동일하게, 캡처리-약물 분체들 E-13, F-13 및 F-63가 DAR 4로 7 mg/kg의 c208F2-E-13, c208F2-F-13 및 c208F2-F-63에 해당하는 것과 동등한 용량으로 주입되었다.
- [1146] c208-E-13 (도 22a), c208F2-G-13 (도 22b) 또는 c208F2-F-63 (도 22c) 중 어느 하나의 주입은 유의하게 억제하였고, 심지어 완전한 종양 성장 퇴행을 유도하였다 (대비 해당하는 캡처리-약물,  $p < 0.05$ ). c208-E-13, c208F2-G-13 및 c208F2-F-63 간의 통계학적 활성 차이는 전혀 주목될 수 없었다. 캡처리된 약물들은 MCF-7 종양 성장에 미치는 효과를 전혀 가지지 않았다. (대비 대조군,  $p > 0.05$ ).
- [1147] 두 번째 세트의 실험들이 이전에 기술된 바와 같이 MCF-7 이종이식 모델들에서 E-13 또는 G-13 둘 중 하나와 결합된 c208F2로 그리고 E-13 또는 G-13 둘 중 하나와 결합된 부적절한 항체 c9G4로 수행되었다. 마우스들이 복강내로 7 mg/kg의 각각의 ADC들을 사용하여 D20 및 D27일째 주사되었다 (도 23a 및 23b).
- [1148] c9G4-E-13 및 c9G4-F-13 둘 다의 주사는 MCF-7 이종이식 종양들의 성장에 온화하게 및 일시적으로 영향을 주었다. 그러나 이러한 두 번째 실험은 D43일이 이들 ADC들의 높은 항-종양 활성을 보여주기 때문에 c208-E-13 또는 c208F2-G-13 둘 중 하나의 주입들이 완전한 종양 퇴행을 유도하였던 점을 검증하였다.
- [1149] **실시예 20: 3+ MCF-이종이식 모델에서 E-13 화합물과 결합된 hz208F2 항체의 생체내 활성**
- [1150] G-13 화합물과 결합된 인간화 형태들의 208F2 항체가 생체내에서 MCF-7 이종이식 모델에서 평가되었다.
- [1151] 모든 동물 절차들은 과학적 목적들에 사용되는 동물들의 보호에 관한 2010/63/UE 지침의 가이드라인들에 따라 수행되었다. 프로토콜은 피에르 파브르 연구소의 동물 윤리 위원회에 의해 승인되었다. 5백만 개의 MCF-7 세포들이 7주령 스위스/누드 마우스들 내로 피하로 주사되었다. 세포 주입 이전에, 에스트로겐 펠렛들 (아메리카의 이노베이트 리서치사)이 MCF-7 종양들의 생체내 성장에 필요한 에스트로젠들을 방출시키기 위하여 마우스들의 옆구리로 이식되었다.
- [1152] MCF-7 세포 이식 이후 20일째, 종양들이 120 내지 150 mm<sup>3</sup>의 평균 크기에 도달했을 때, 동물들은 종양 크기 및 관점에 따라 6마리 마우스들의 그룹으로 나누었다. 서로 다른 처리들이 4번 주사 프로토콜로서 4일마다 한 번 주사 (Q4d4): 복강내 주사들에 의해 접종되었다. 동물들의 건강 상태가 매일 감시되었다. 종양 부피가 전자 측정기로 연구 종결 시까지 매주 두 번 측정되었다. 종양 부피는 다음 공식으로 계산된다:  $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$ . 독성은 동물들의 무게에 따라 매주 3번 측정되었다. 통계학적 분석들이 만-휘트니 테스트를 사용하여 각각의 측정에서 수행되었다. 모든 화합물들은 복강내로 (i.p.) 주사되었다. 본 실시예에서는, G-13과 결합된 c208F2 mAb의 항-종양 활성이 G-13과 역시 결합된 서로 다른 인간화 형태들과 비교되었다 (도 27). 테스트된 인간화 형태들은 하기 표 6에 기술되었다.

표 16

인간화 형태	해당 VH/VL	hz 형태 다른 명칭	해당 ADC
208F2_085hz0107 (G1)	H057/L018	n/a	hz208F2 (H057/L018)-G-13
208F2_085hz0119 (G1)	H070/L018	n/a	hz208F2 (H070/L018)-G-13
208F2_085hz0126 (G1)	H077/L018	hz208F2-4	hz208F2 (H077/L018)-G-13
hz208F2 (VH3VL3)	H26/L024	n/a	hz208F2 (H026/L024)-G-13

[1153]

- [1154] c208-G-13 또는 208F2 인간화 형태들 둘 중 하나의 주입은 유의하게 억제하였고, 심지어 완전한 종양 성장 퇴행을 유도하였다 (대비 해당하는 대조군,  $p < 0.05$ ). c208F2-G-13 및 테스트된 인간화 형태들 간의 통계학적 활성 차이는 전혀 관찰되지 않았다.

[1155] 두 번째 세트의 실험들이 이전에 기술된 바와 같이 MCF-7 이종이식 모델들에서 G-13과 결합된 c208F2 또는 h208F2-4 둘 중 하나로 수행되었다 (도 28a 및 28b). 마우스들이 복강내로 3 mg/kg의 각각의 ADC들로 4일마다 4번 주사들 (Q4d4) 또는 단지 한 번을 위해 주사되었다.

[1156] 동일한 강한 항-종양 활성이 MCF-7 이종이식 모델에서 4번 주사 또는 단지 한 번 주사되었을 때 관찰되었다.

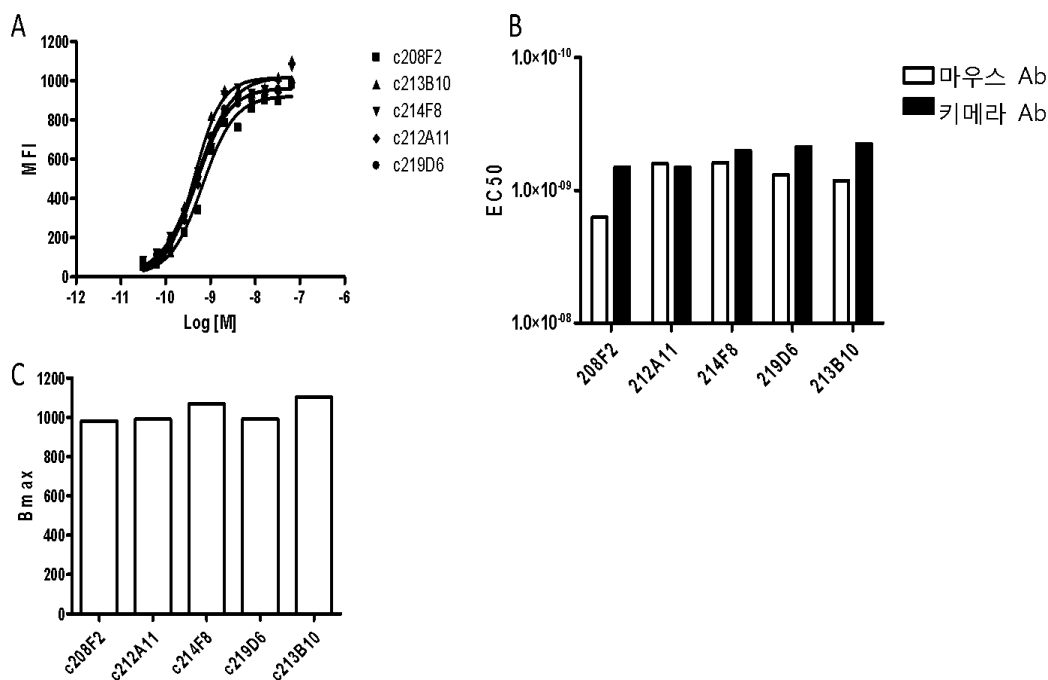
[1157] **실시예 21: 2+ CaOV-3 이종이식 모델에서 G-13 또는 E-13 화합물과 결합된 208F2 항체의 생체내 활성**

[1158] 항-종양성 활성이 2+ 발현 종양, 난소 암종 세포주인 CaOV-3 이종이식 모델에서 연구되었다. 해당 제안을 위해, 마우스들이  $7 \times 10^6$  개 세포들로 D0일째 피하로 주사되었다. 종양들이 대략  $120 \text{ mm}^3$ 에 도달했을 때 (종양세포 주사 이후 19일째), 동물들은 비슷한 종양 크기를 가진 5마리 마우스들의 5가지 그룹들로 나뉘었고, E-13 또는 G-13 둘 중 하나와 결합된 c208F2로 그리고 E-13 또는 G-13 둘 중 하나와 결합된 부적절한 항체 c9G4로 피하로 처리되었다. 마우스들은 6번 주사들의 주기: 4일 마다 한 번 주사를 위해, 3 mg/kg의 각각의 ADC들을 사용하여 피하로 주사되었다. 마우스들은 이종이식 성장 속도의 관찰을 위해 추적되었다. 종양 부피는 다음의 공식으로 계산되었다:  $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{너비} \times \text{높이}$ .

[1159] 온화하게 및 일시적으로 성장 지연을 유도하였던 c9G4-E-14와 비교하여, c9G4-G-14의 주입은 CaOV-3 이종이식 종양들의 성장에 영향을 주지 않았다. 한편으로, c208F2-E-13 또는 c208F2-G-13 둘 중 하나의 주입들은 5일째 각각 95% 및 77%의 종양 성장 억제를 유도하였다.

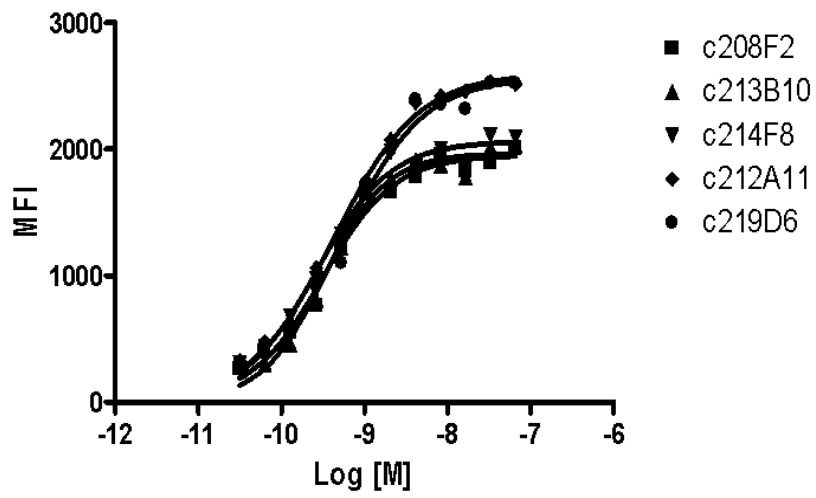
## 도면

### 도면1

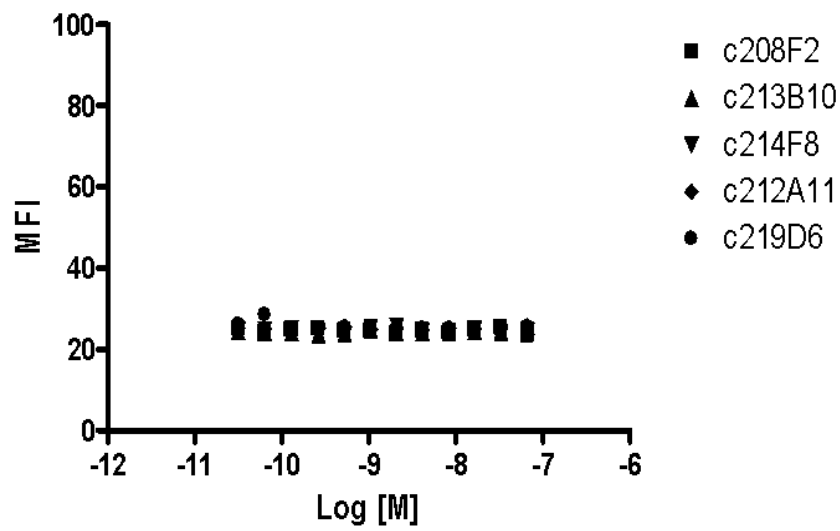




도면2a

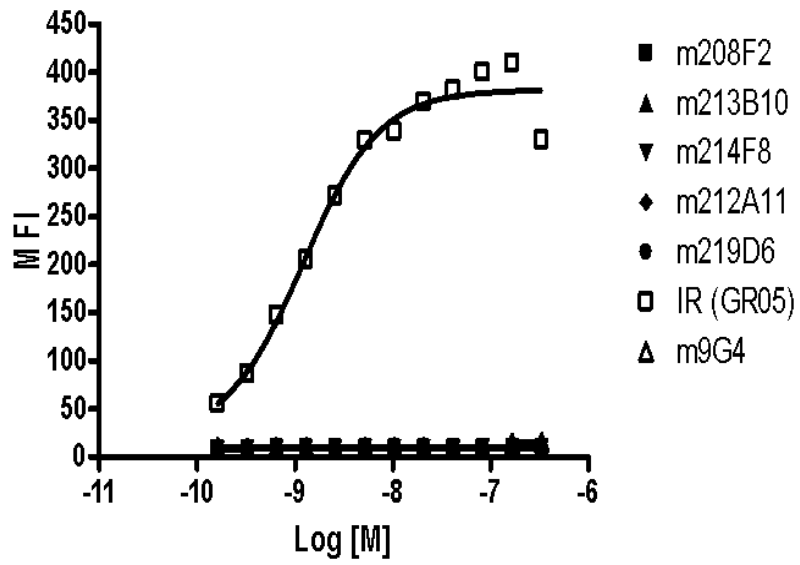


도면2b

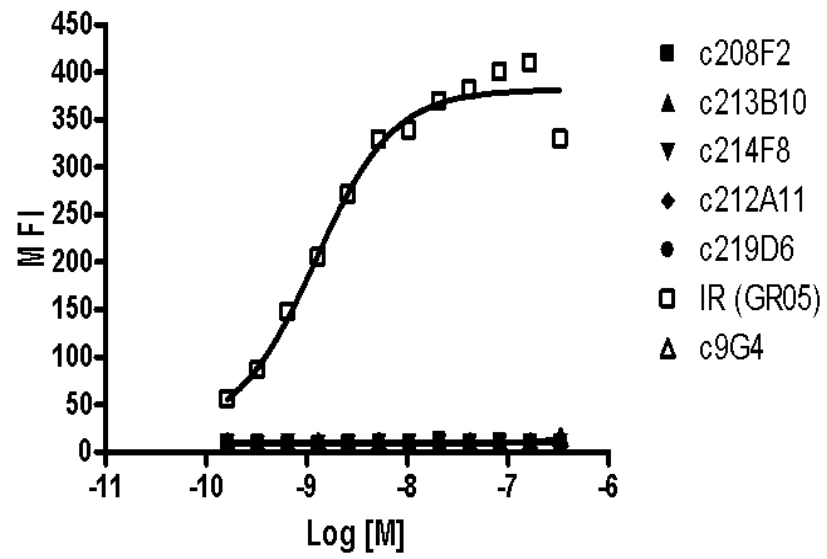




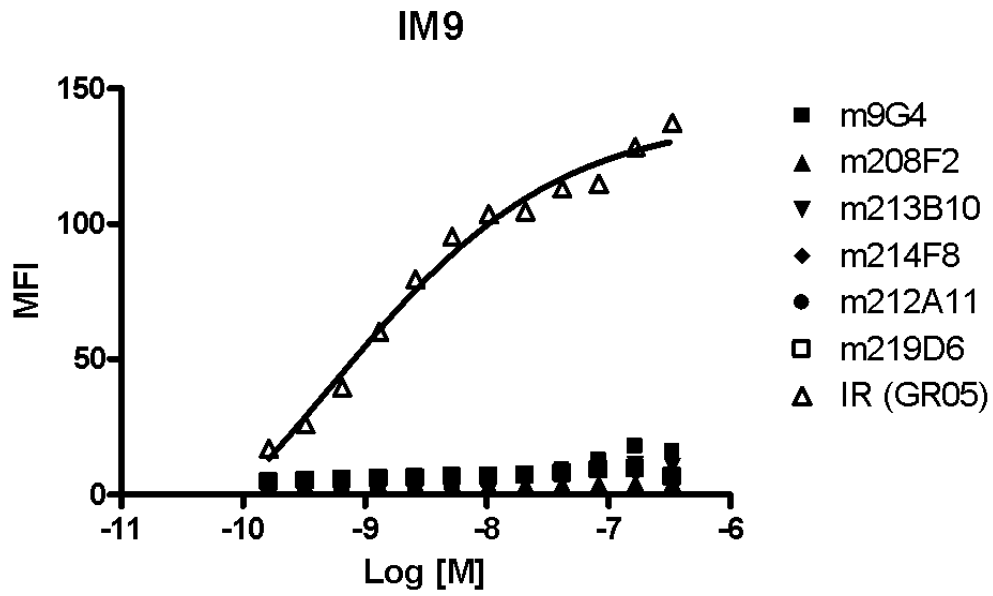
도면3a



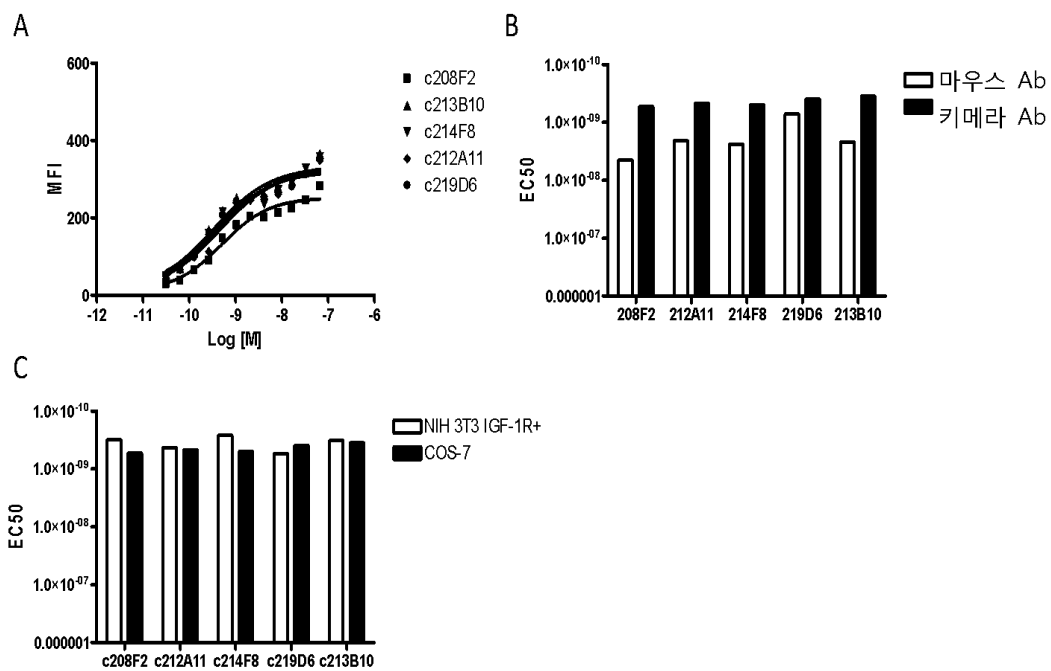
도면3b



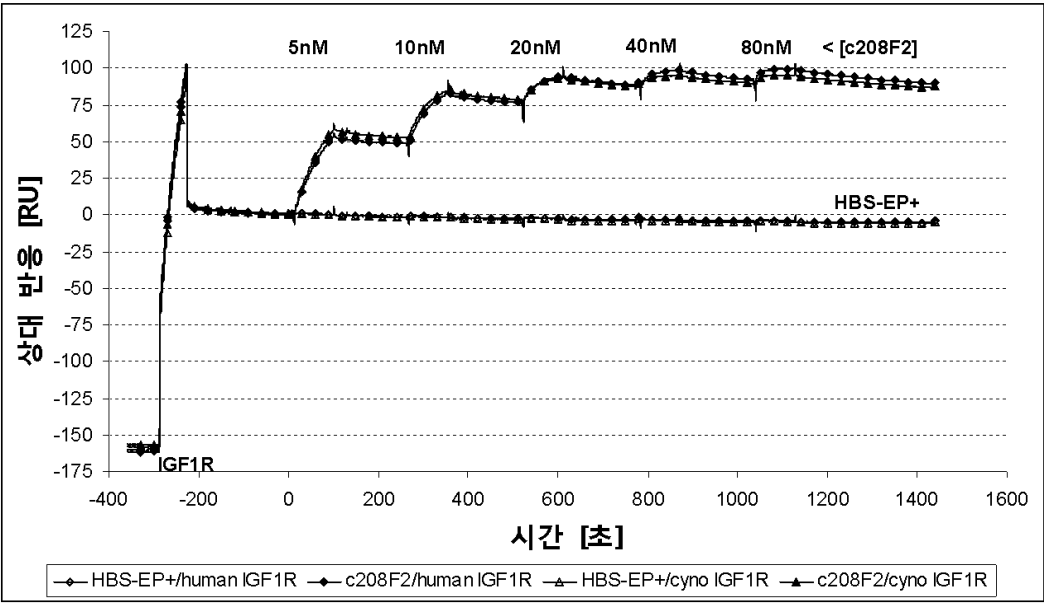
도면4



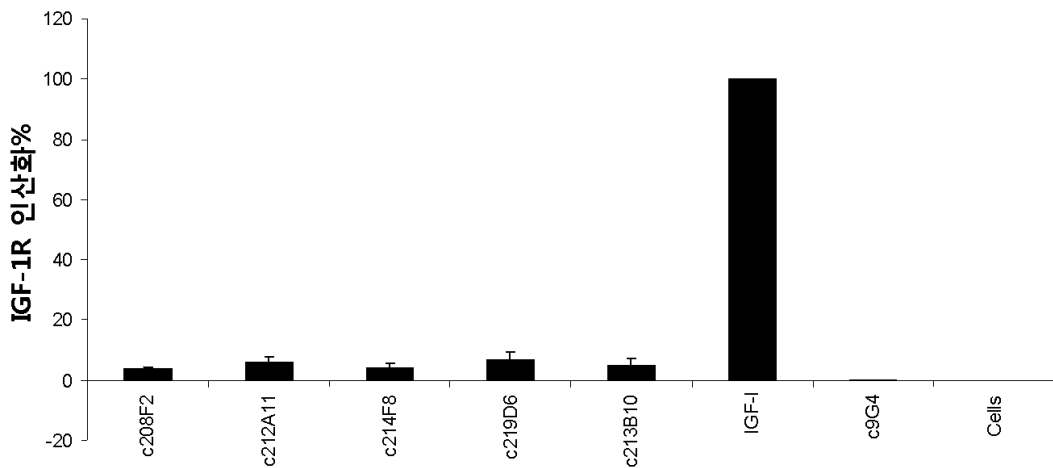
도면5



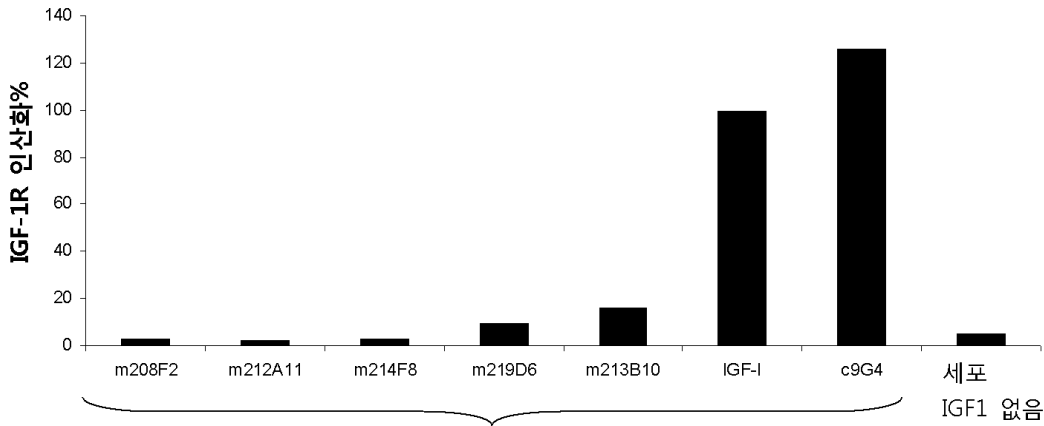
도면6



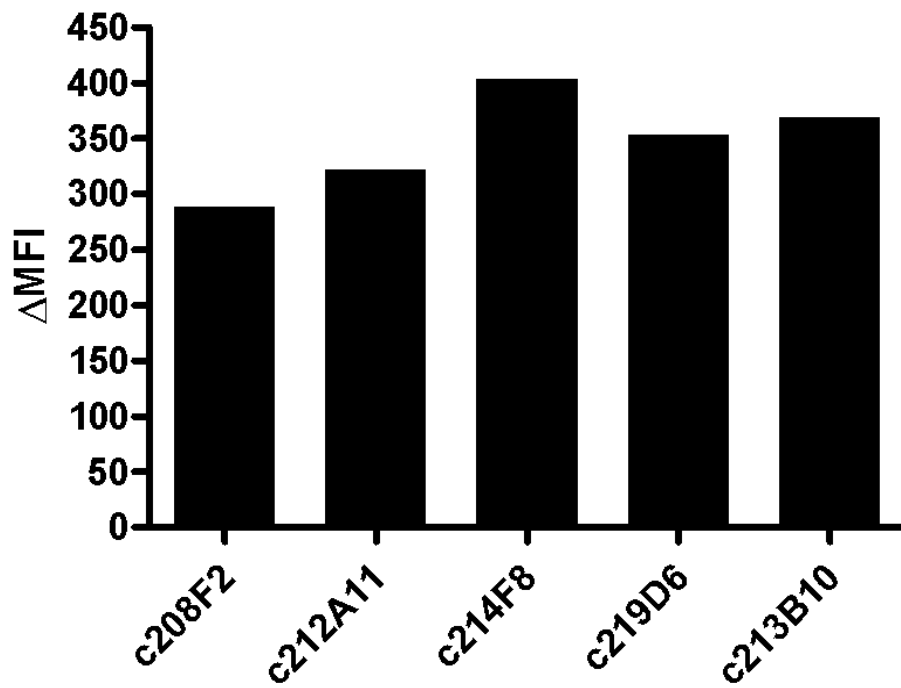
도면7



도면8

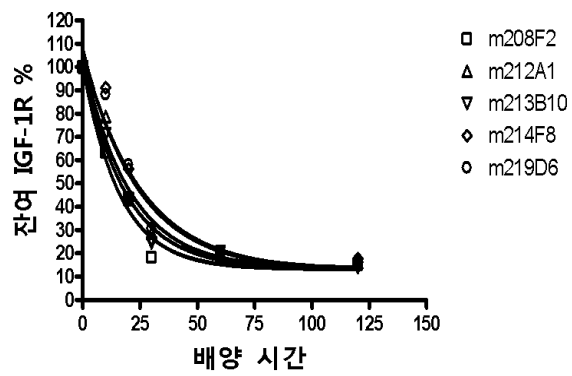


도면9



도면10

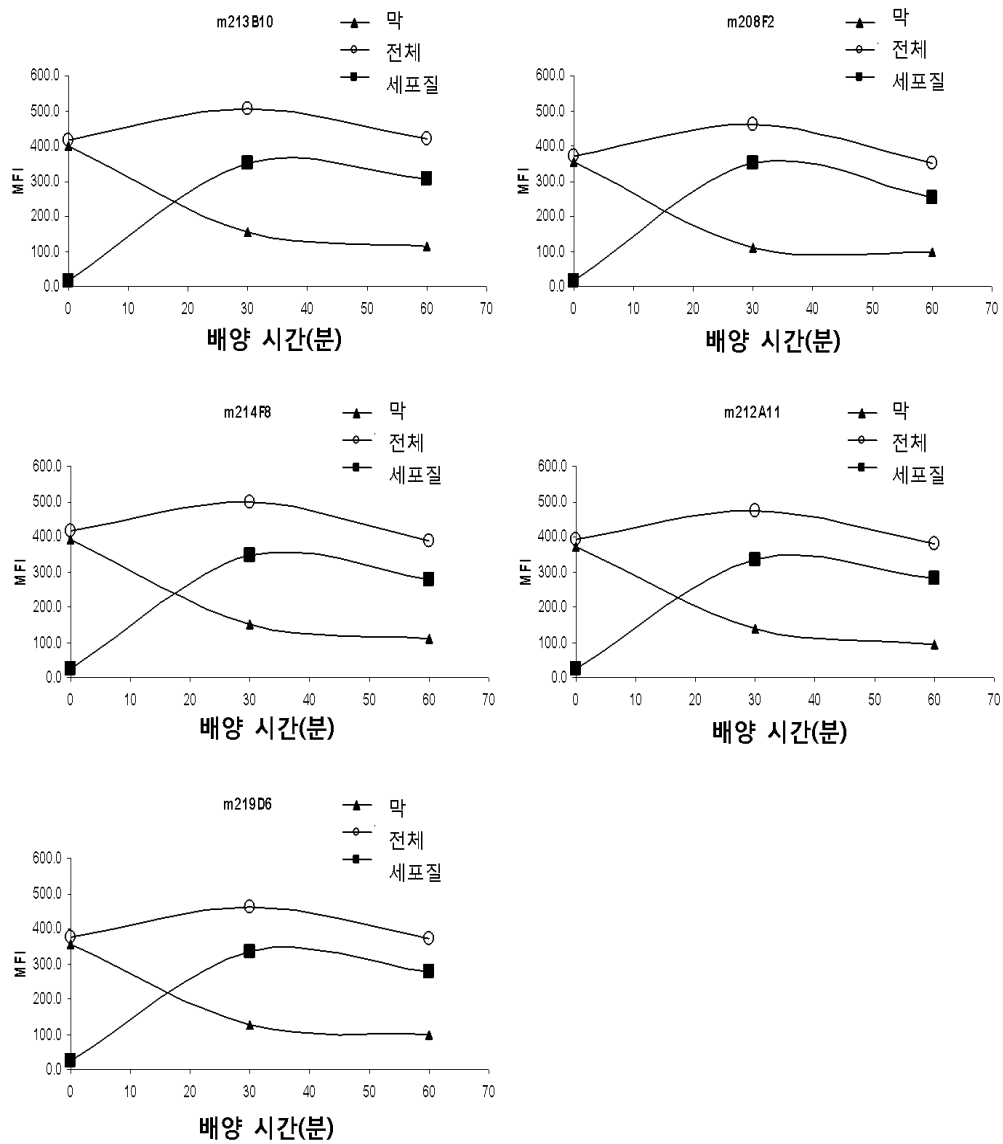
A



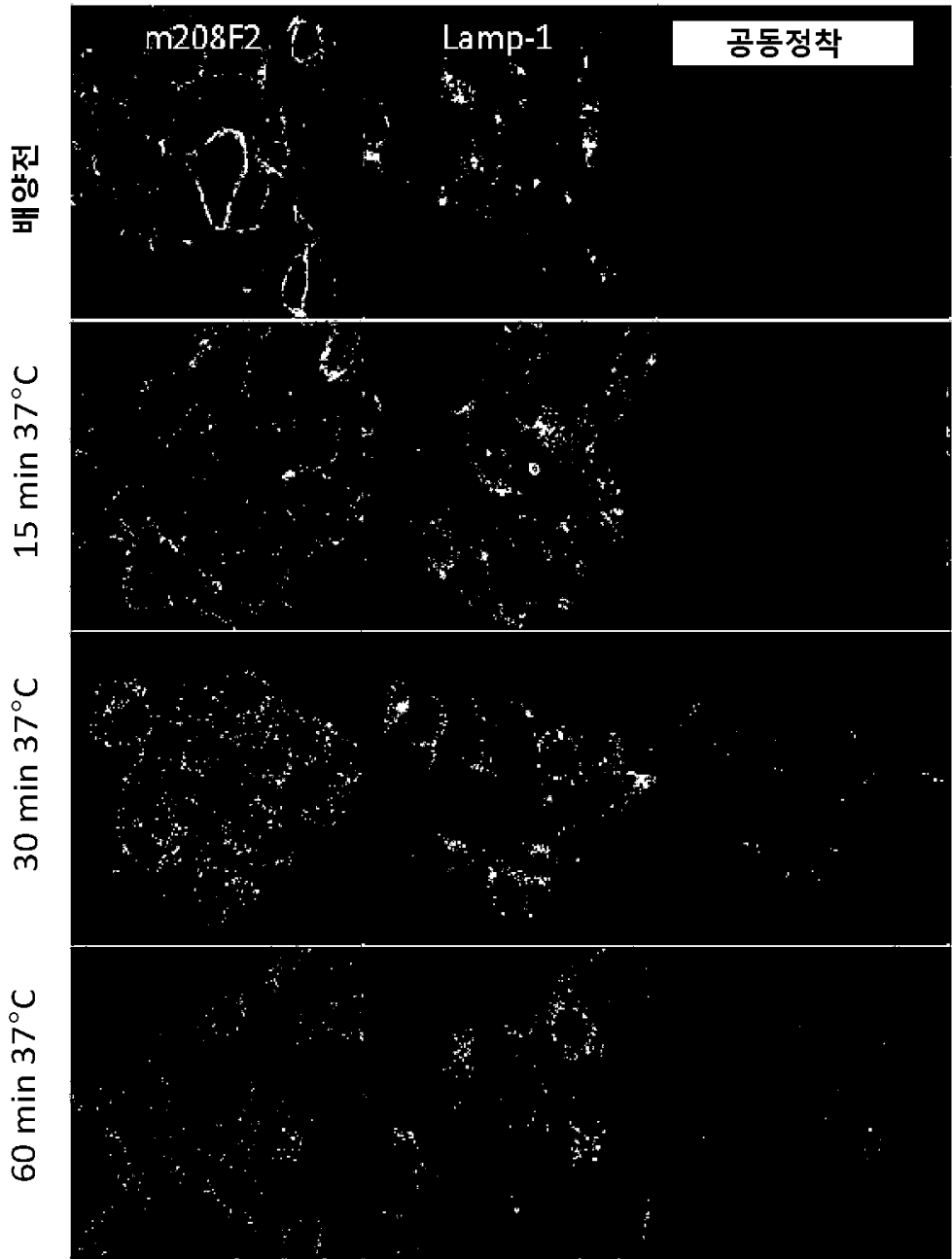
B

Abs	반감기 (t1/2)
m208F2	11.11
m212A11	14.3
m214F8	16.81
m219D6	17.85
m213B10	12.83

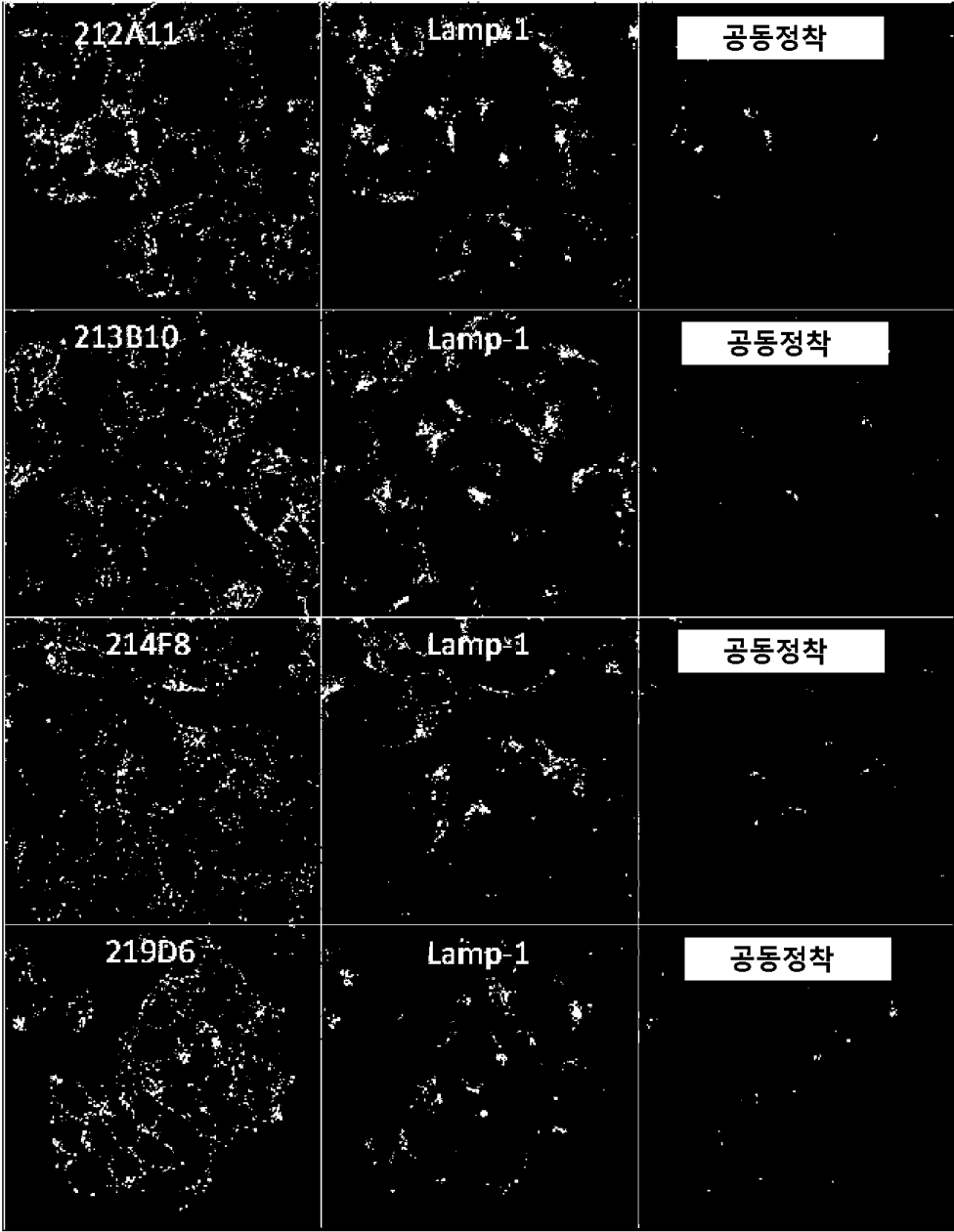
도면11



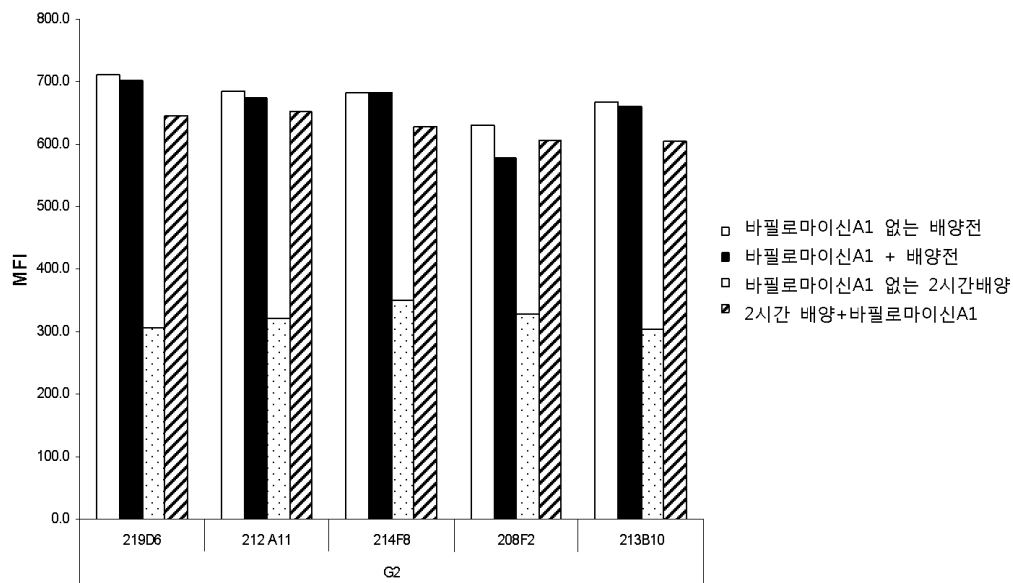
도면12a



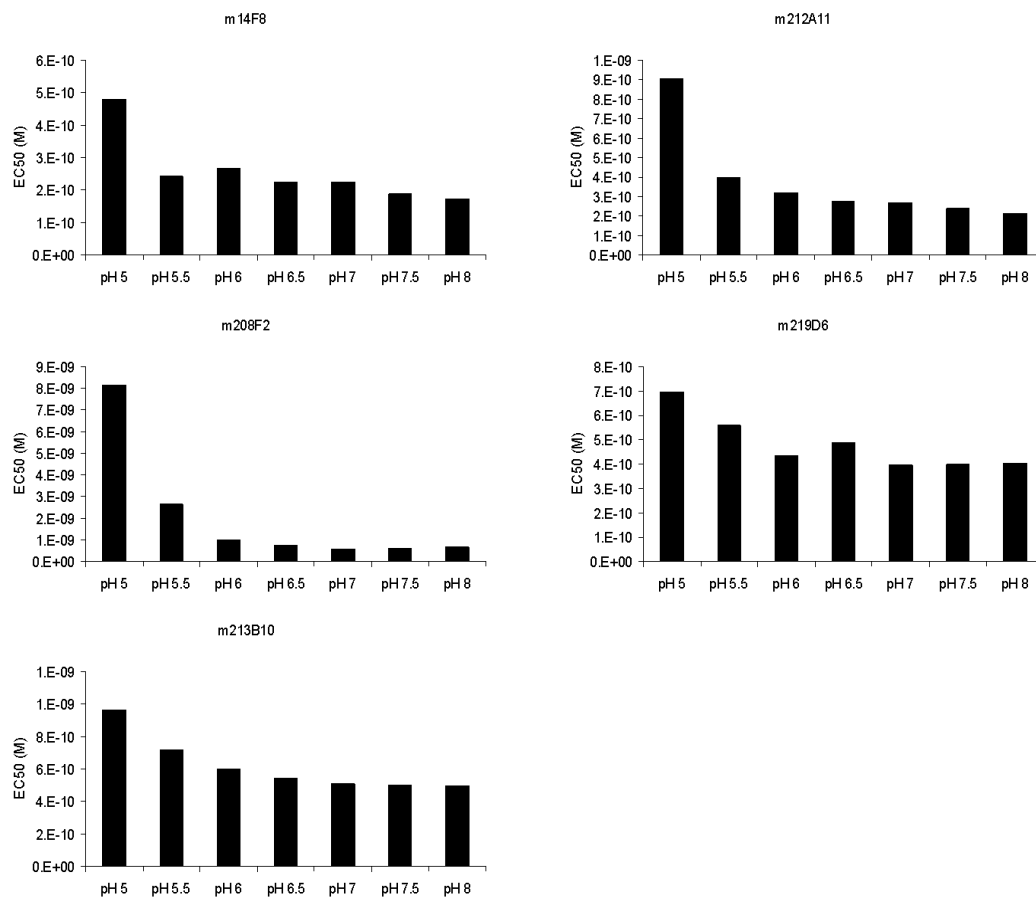
도면12b



도면13

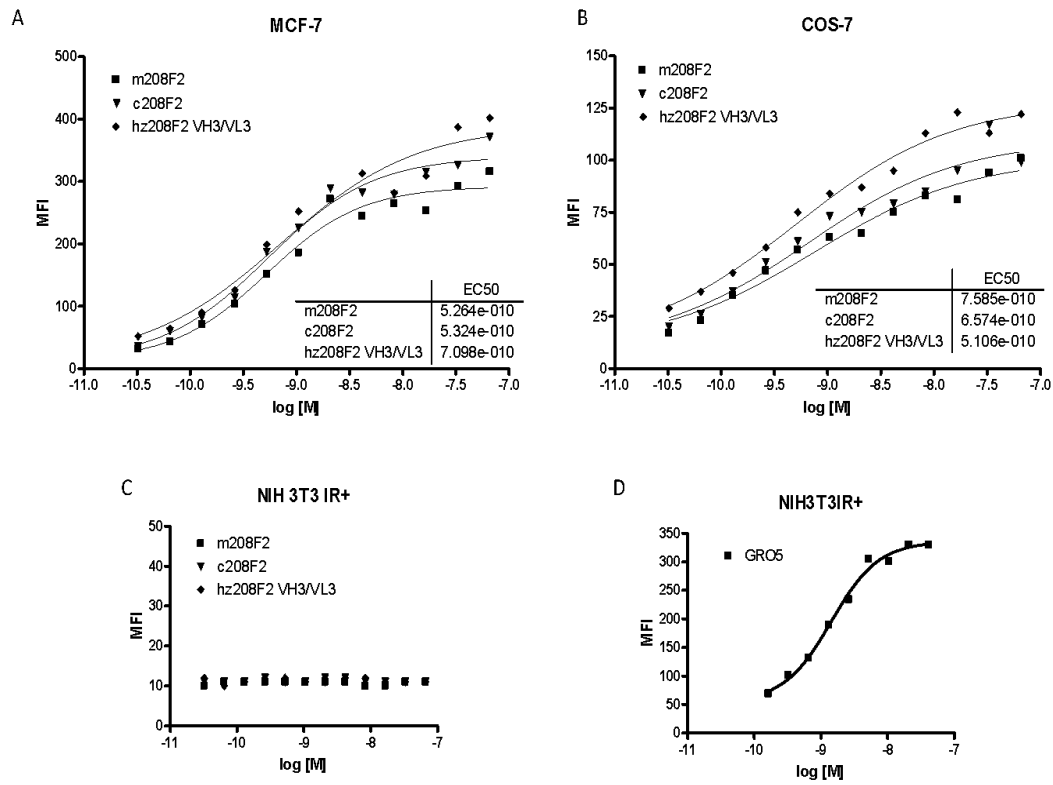


도면14

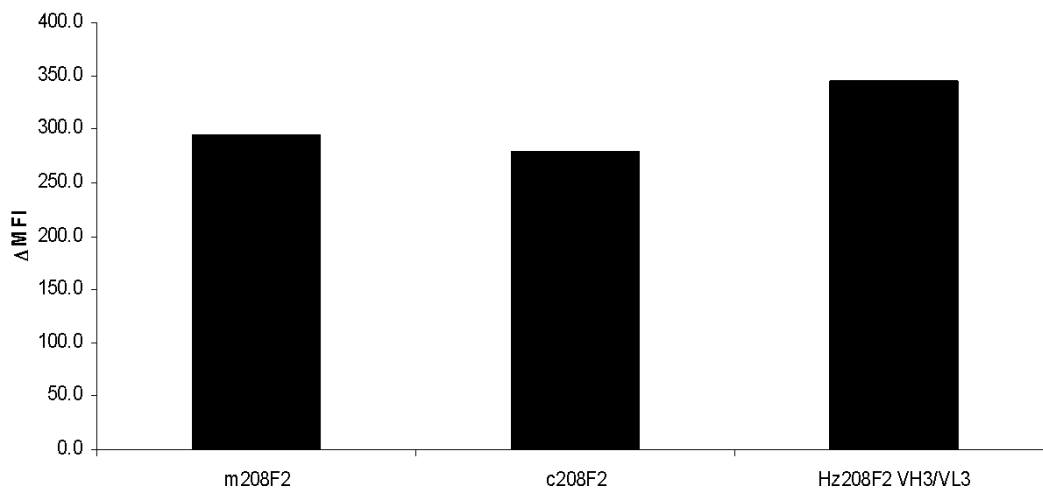




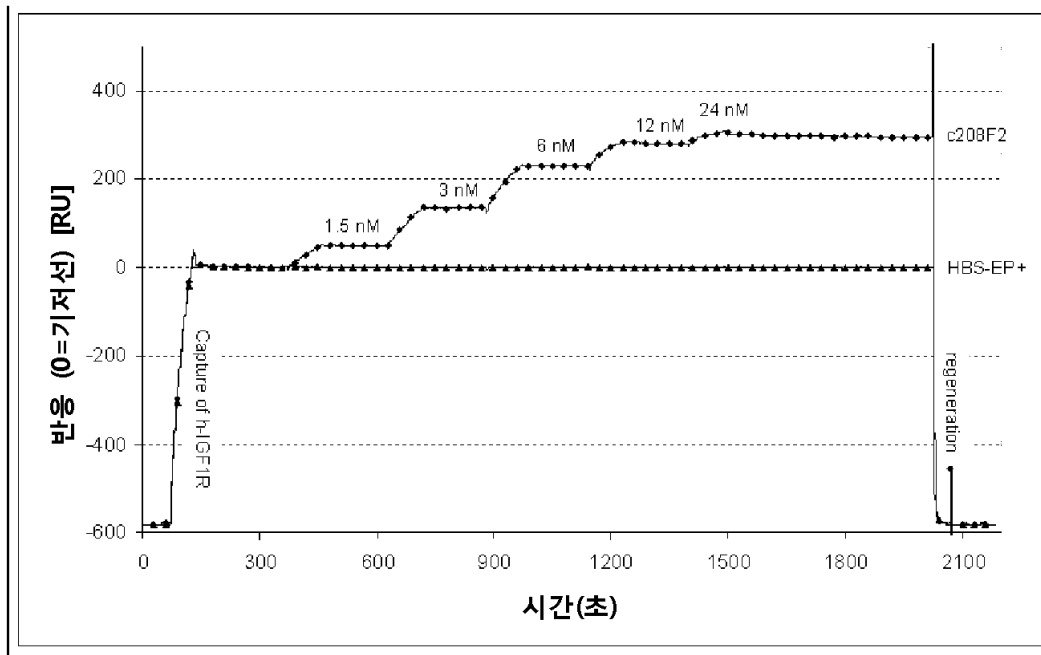
도면15



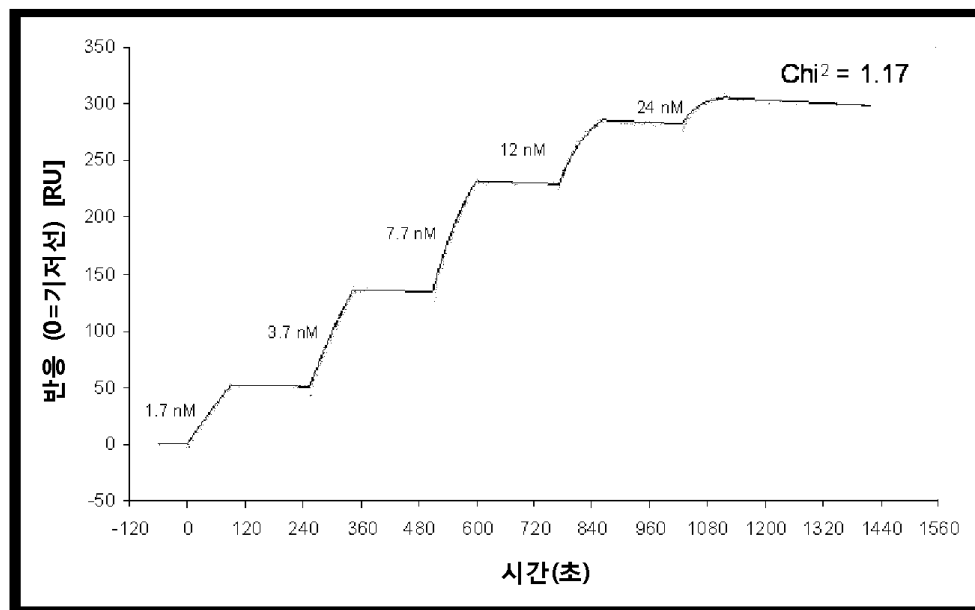
도면16



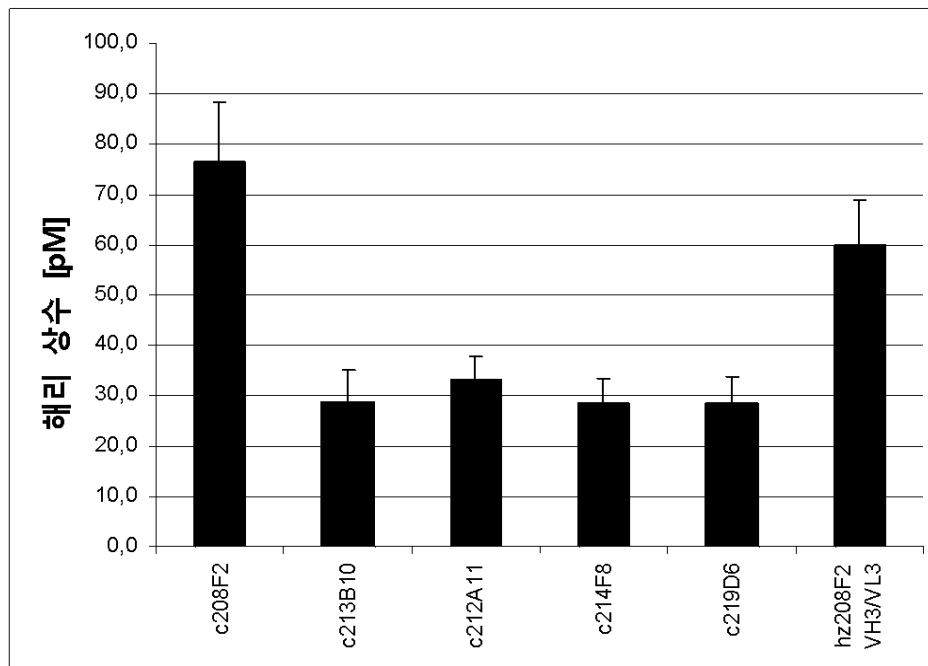
도면17



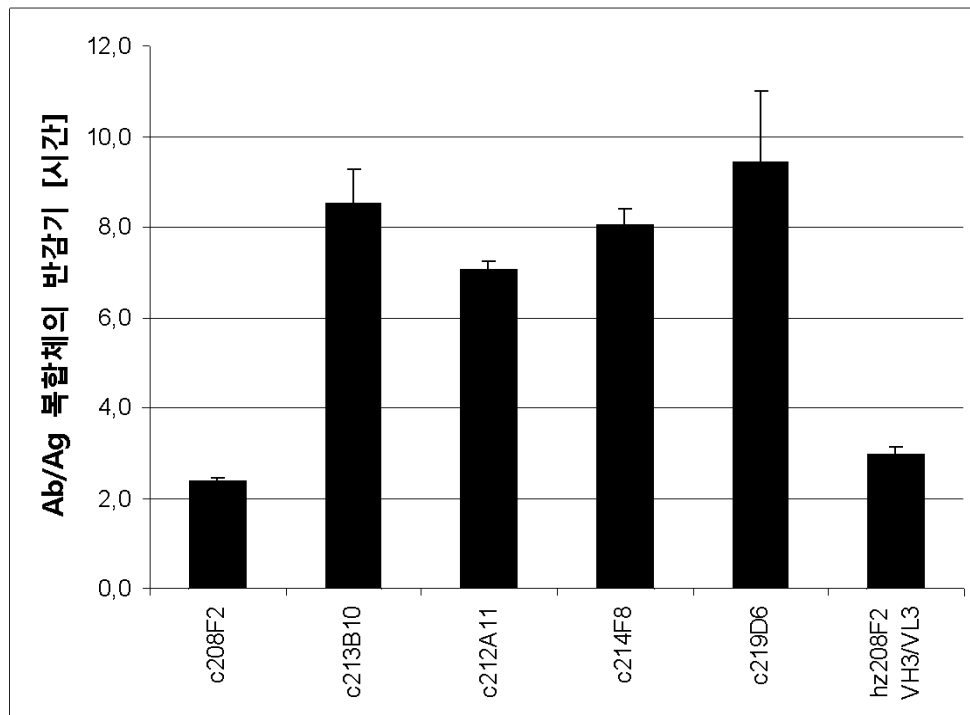
도면18



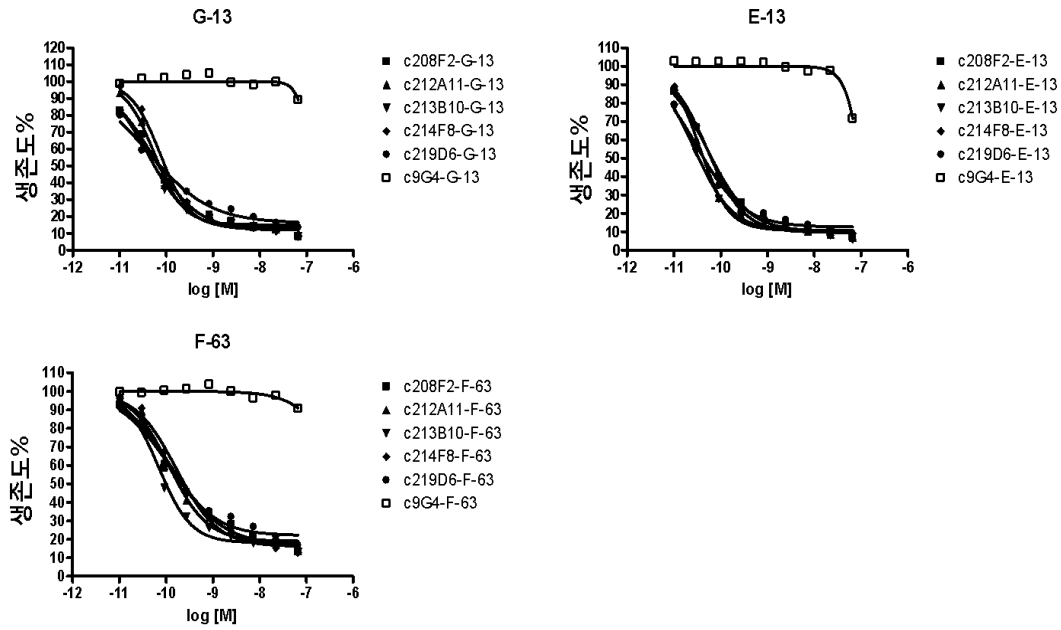
도면19



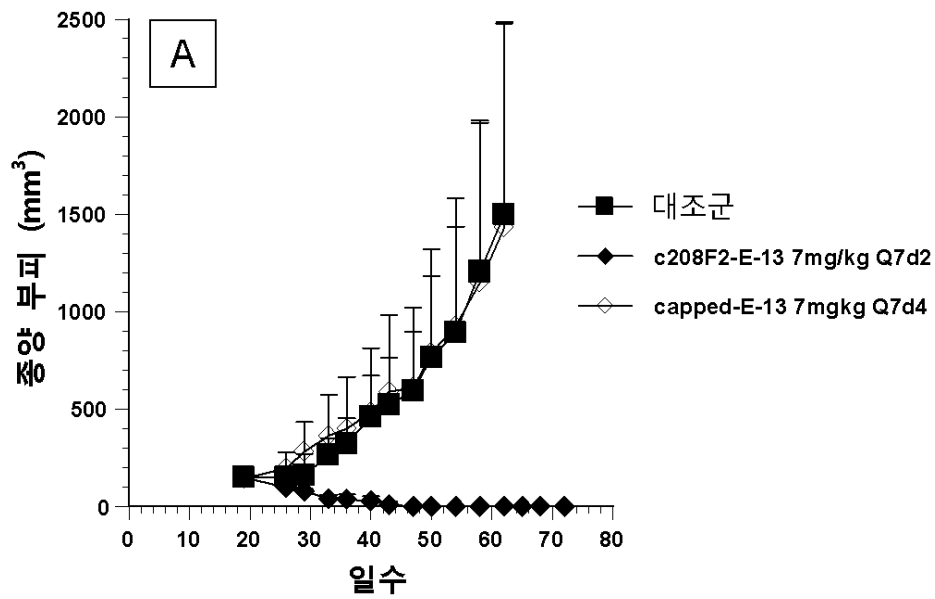
도면20



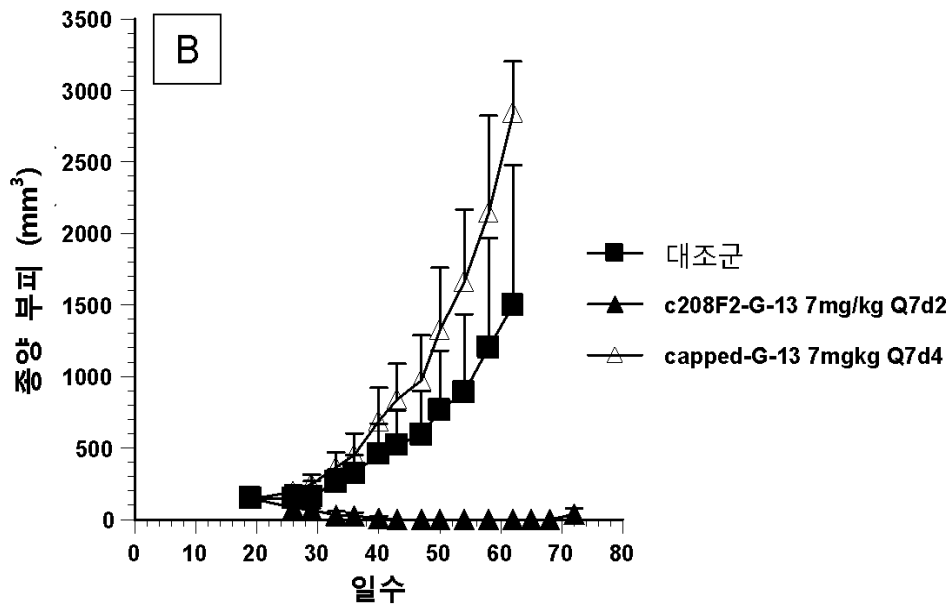
도면21



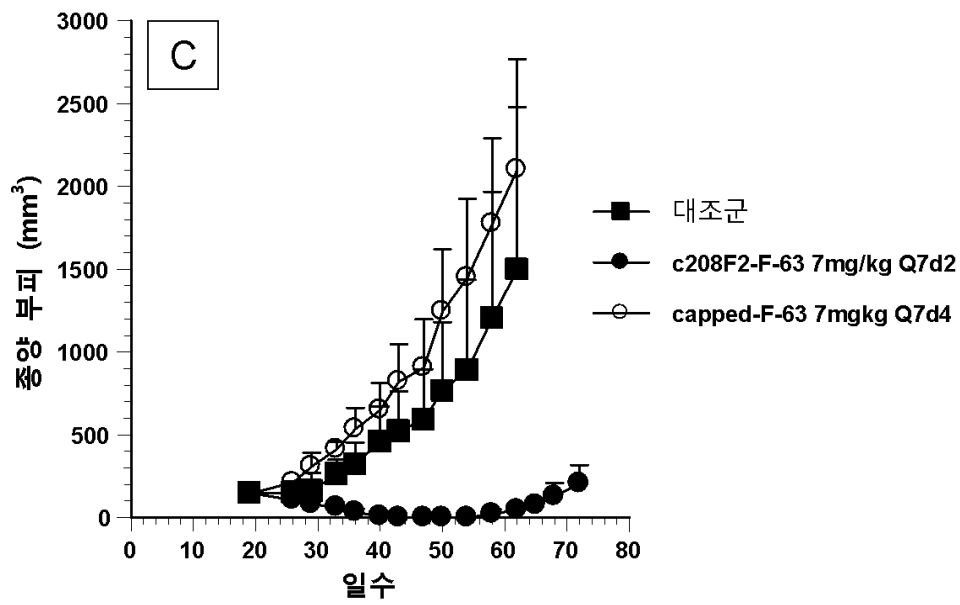
도면22a



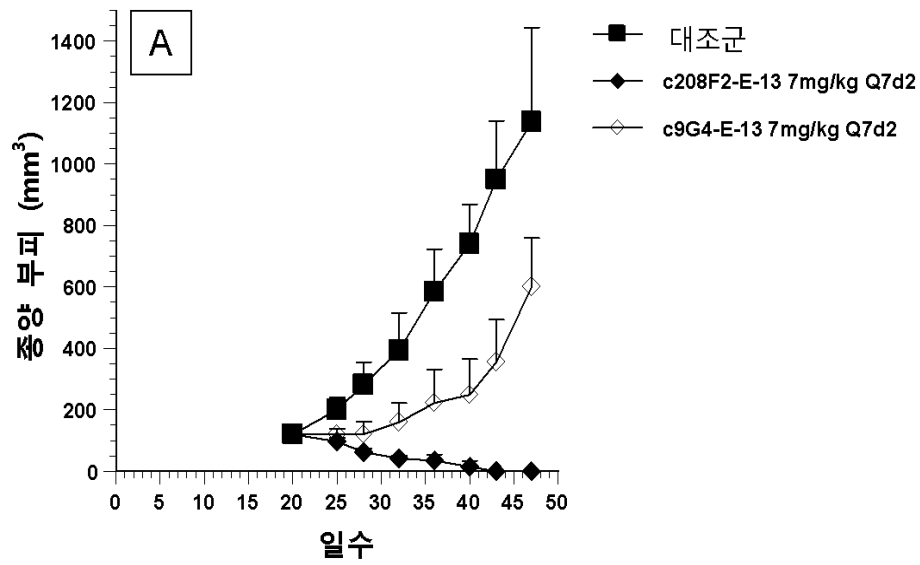
도면22b



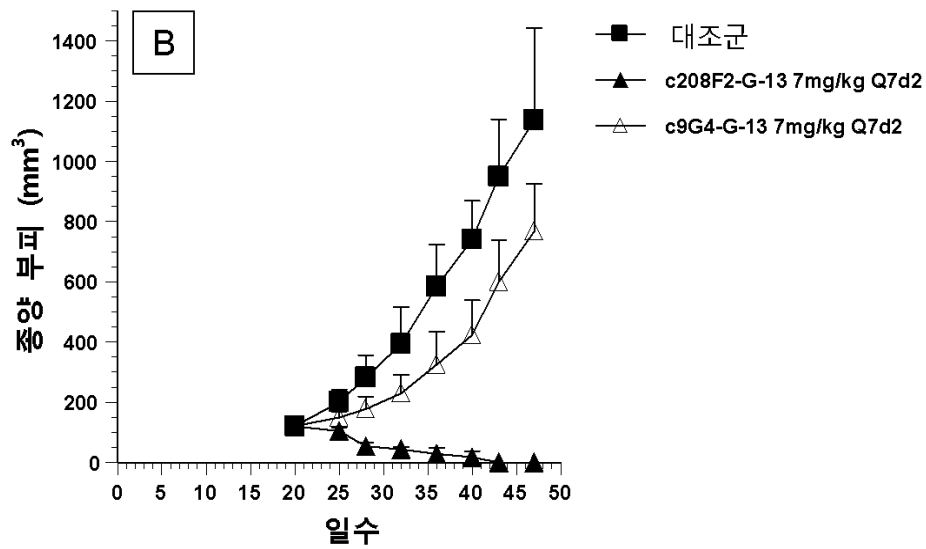
도면22c



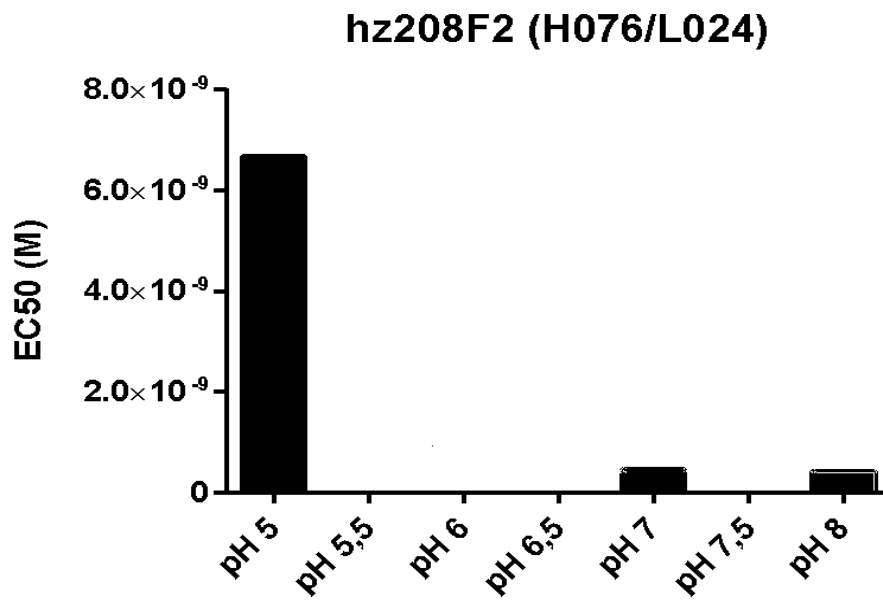
도면23a



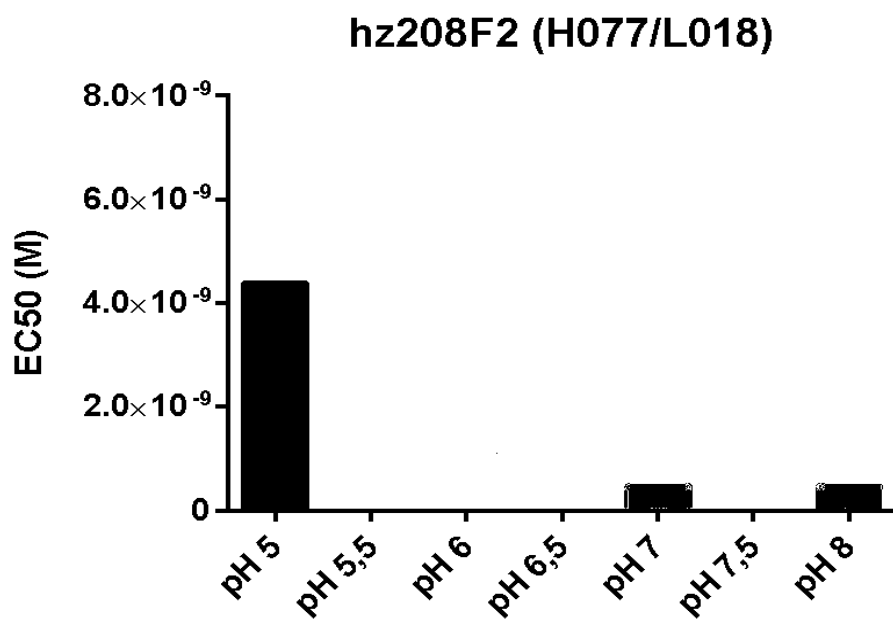
도면23b



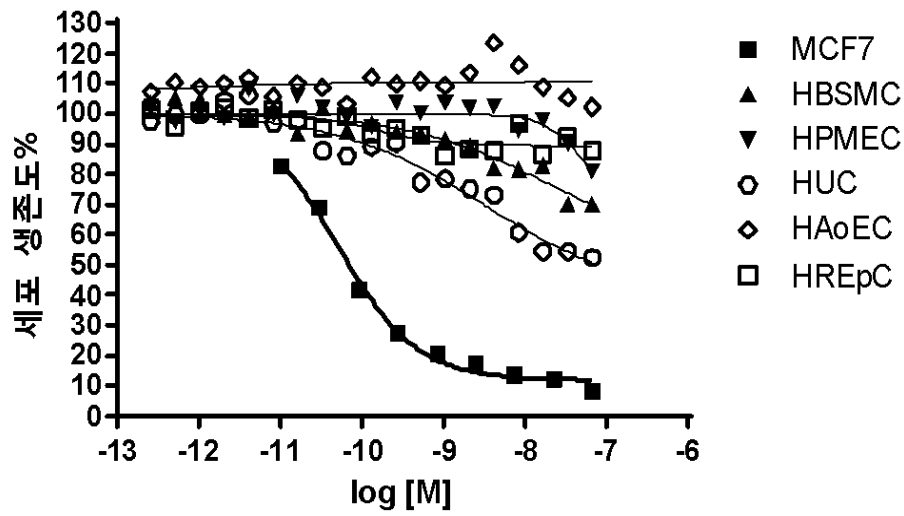
도면24a



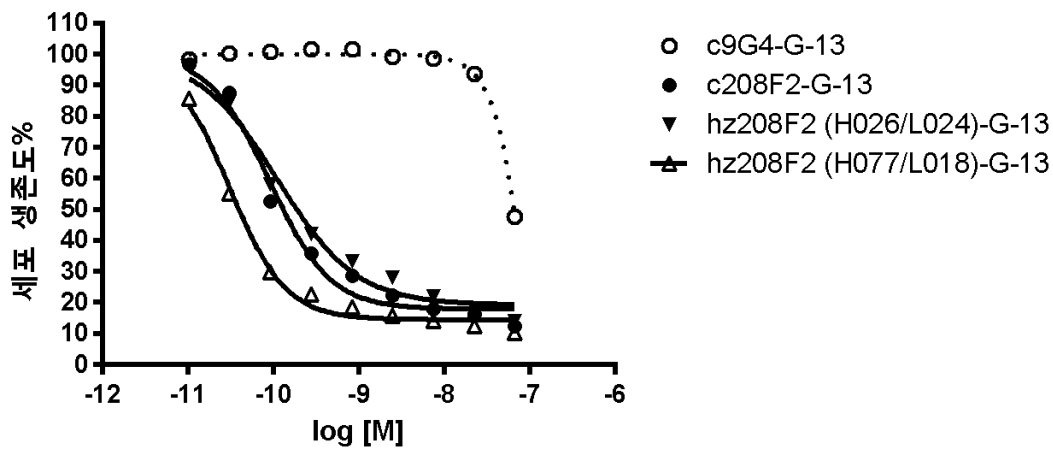
도면24b



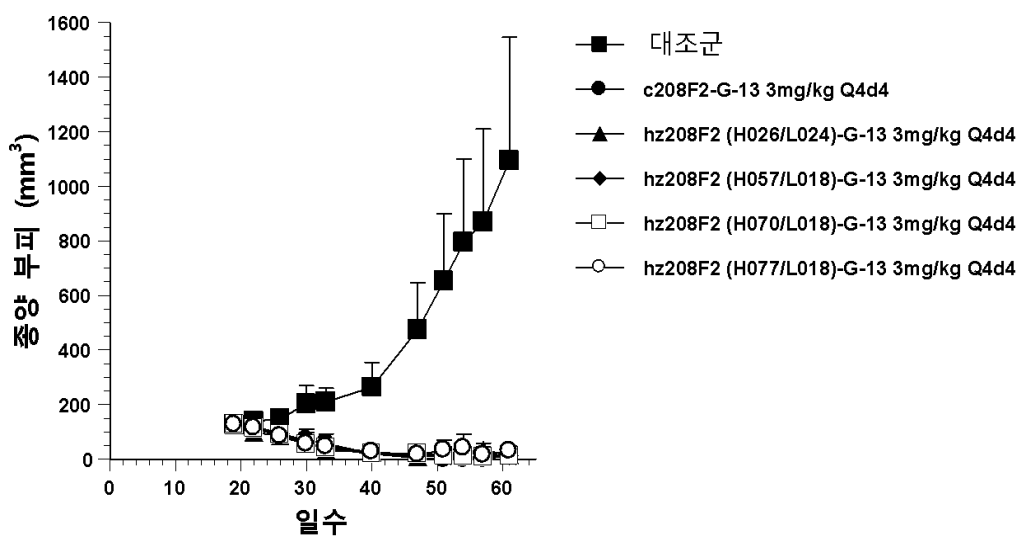
도면25



도면26

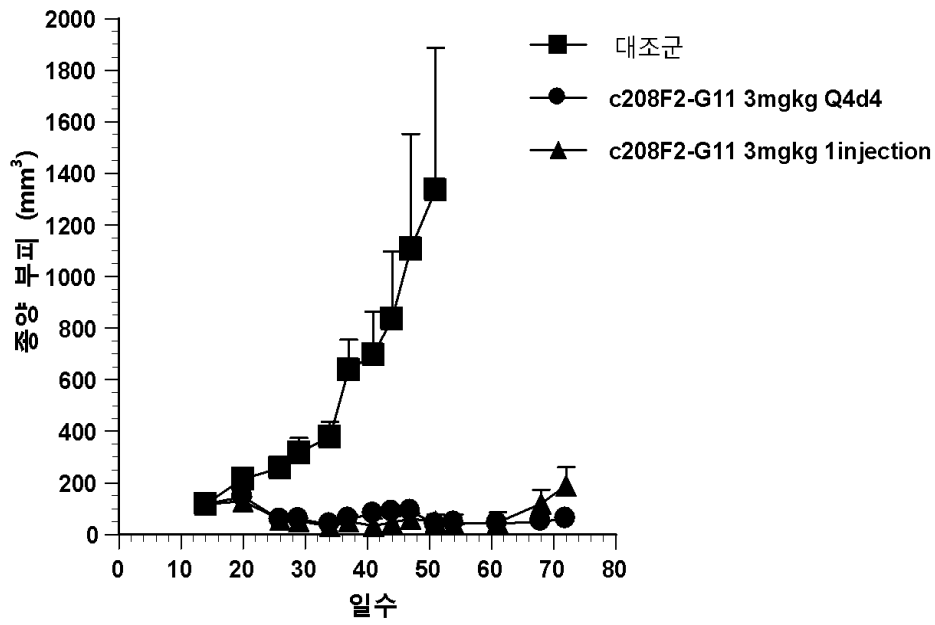


도면27

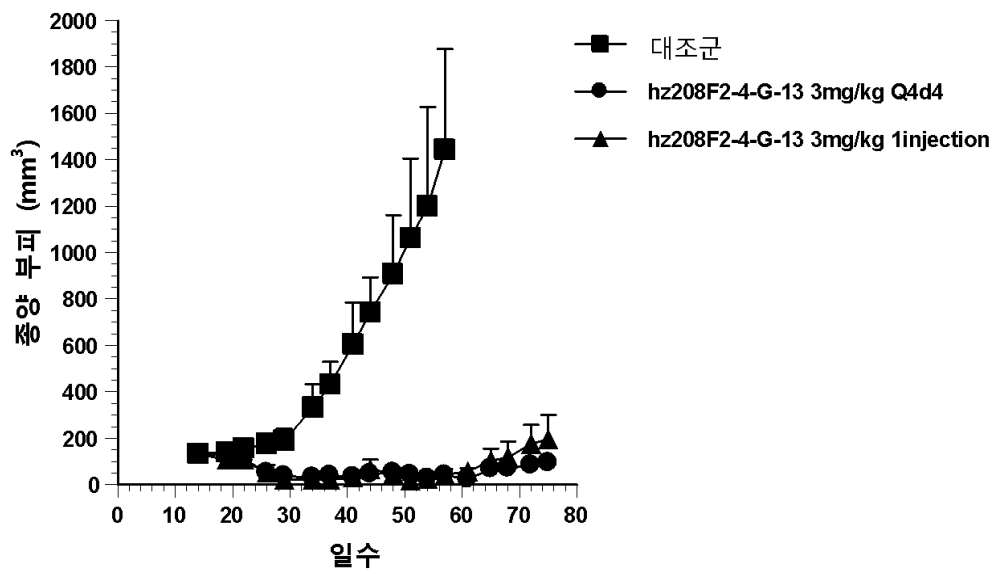




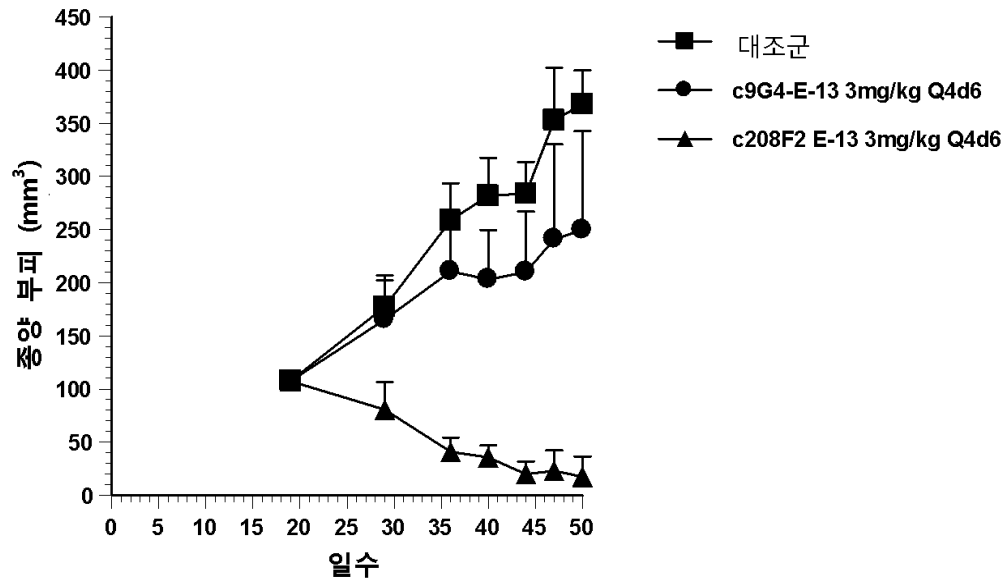
도면28a



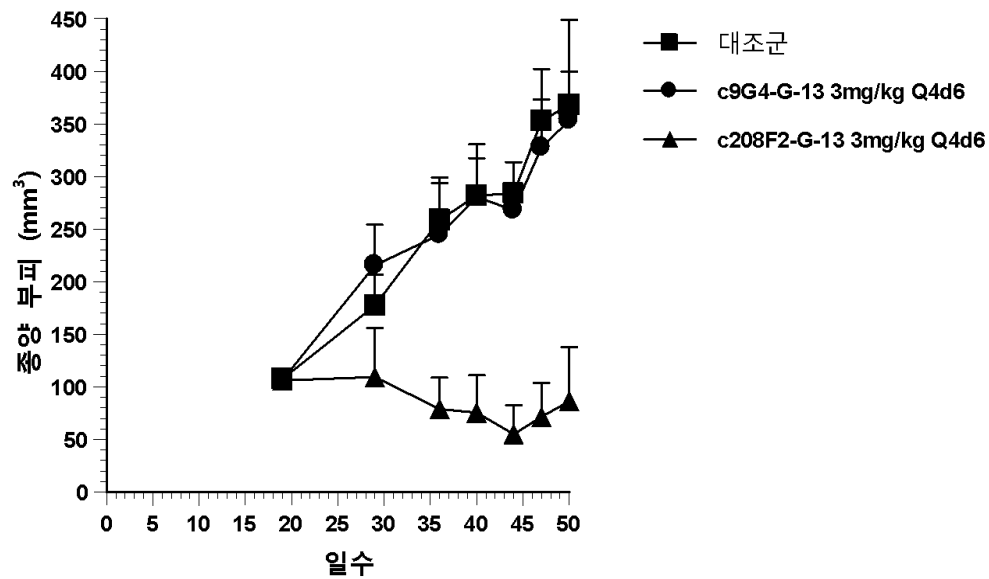
도면28b



도면29a



도면29b



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> IGF-1R ANTIBODY-DRUG-CONJUGATE AND ITS USE FOR THE TREATMENT OF  
CANCER

<130> D33593

<140> PCT/EP2015/059045

<141> 2015-04-27

<150> EP14305620.8  
 <151> 2014-04-25  
 <160> 81  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> Consensus CDR -H1  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Thr may be replaced by Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)  
 <223> Tyr may be replaced by Phe  
 <400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Consensus CDR-H2

<400> 2

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr

1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Consensus CDR-H3

<400> 3

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Consensus CDR-L1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Ser may be replaced by Asn

<400> 4

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Consensus CDR-L2

<400> 5

Tyr Thr Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Consensus CDR-L3

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Thr may be replaced by Ala

<400> 6

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial  
 <220><223> CDR-H1  
 <400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr  
 1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CDR-H1

<400> 8

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Phe  
 1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CDR-L1

<400> 9

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CDR-L1

<400> 10

Gln Asp Ile Asn Lys Tyr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CDR-L3

<400> 11

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> CDR-L3

<400> 12

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c208F2, heavy chain, VH

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c212A11, heavy chain, VH

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

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

65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c214F8, heavy chain, VH

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30  
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60  
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c219D6, heavy chain, VH

<400> 16

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

50 55 60  
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln



100 105 110  
 Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c213B10, heavy chain, VH

<400> 17

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

50 55 60  
 Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c208F2, light chain, VL

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

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

                  50                    55                    60  
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

                  100                    105  
 <210> 19  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> c212A11, light chain, VL

<400> 19  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
                   20                    25                    30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60

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

100 105

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c214F8, light chain, VL

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c219D6, light chain, VL

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45  
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c213B10, light chain, VL

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln  
65 70 75 80  
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr

85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 23

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c208F2, heavy chain, full length

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225                      230                      235                      240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
                          245                      250                      255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
                          260                      265                      270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
                          275                      280                      285  
  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
                          290                      295                      300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305                      310                      315                      320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
                          325                      330                      335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
                          340                      345                      350  
  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
                          355                      360                      365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
                          370                      375                      380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
                          405                      410                      415  
  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
                          420                      425                      430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
                          435                      440                      445  
 Gly

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c212A11, heavy chain, full length

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210                      215                      220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225                      230                      235                      240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
                     245                      250                      255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
                     260                      265                      270  
  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
                     275                      280                      285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
                     290                      295                      300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305                      310                      315                      320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
                     325                      330                      335  
  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
                     340                      345                      350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
                     355                      360                      365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
                     370                      375                      380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385                      390                      395                      400  
  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
                     405                      410                      415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
                     420                      425                      430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
                     435                      440                      445  
 Gly

<210> 25



<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c214F8, heavy chain, full length

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 26

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c219D6, heavy chain, full length

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195	200	205	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
405	410	415	
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
420	425	430	
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
435	440	445	

Gly

<210> 27

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c213B10, heavy chain, full length

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 28

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c208F2, light chain, full length

<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190  
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c212A11, light chain, full length

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser



[illegible]

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                      150                      155                      160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                          165                      170                      175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
                          180                      185                      190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
                          195                      200                      205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> c219D6, light chain, full length

<400> 31

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                          50                      55                      60  
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
                          85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                          100                      105                      110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
                          115                      120                      125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 32  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> artificial  
<220><223> c213B10, light chain, full length  
<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var.1) heavy chain, VH

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var. 3), VH

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var. 1), VL

<400> 35

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

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var.3), VL

<400> 36

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 37

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var. 1), heavy chain, full length

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430



Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly

<210> 38

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var.3), heavy chain full length

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
		240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var. 1), light chain, full length

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145                      150                      155                      160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                                  165                      170                      175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
                                  180                      185                      190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
                                  195                      200                      205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                                  210  
 <210> 40  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220  
 ><223> hz208F2 (var.3), light chain, full length  
 <400> 40  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
                                  20                      25                      30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                                  35                      40                      45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                                  50                      55                      60  
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
                                  85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                                  100                      105                      110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
                                  115                      120                      125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var.2) heavy chain, VH

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Met may be replaced by Val

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Ile may be replaced by Met

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Tyr may be replaced by His

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Lys may be replaced by Arg

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Leu may be replaced by Met

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (50)..(50)  
 <223> Trp may be replaced by Ile  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (59)..(59)  
 <223> Lys may be replaced by Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (61)..(61)  
 <223> Asn may be replaced by Ala  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
  
 <222> (62)..(62)  
 <223> Glu may be replaced by Gln  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (70)..(70)  
 <223> Leu may be replaced by Met  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(72)  
 <223> Ala may be replaced by Arg  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (74)..(74)  
 <223> Lys may be replaced by Thr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (76)..(76)  
 <223> Ser may be replaced by Thr  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (77)..(77)  
 <223> Asn may be replaced by Ser  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (79)..(79)  
  
 <223> Ala may be replaced by Val  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (82)..(82)  
 <223> Phe may be replaced by Glu  
 <220><221> MISC\_FEATURE

<222> (95)..(95)

<223> Phe may be replaced by Tyr

<400> 41

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 (var. 2), light chain, VL

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Ser may be replaced by Thr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> Arg may be replaced by Ser

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> His may be replaced by Gln

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (65)..(65)

<223> Arg may be replaced by Ser

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (71)..(71)

<223> Tyr may be replaced by Phe

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (72)..(72)

<223> Ser may be replaced by Thr

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (77)..(77)

<223> Asn may be replaced by Ser

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (87)..(87)

<223> Phe may be replaced by Tyr

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 43

<211> 329



<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Constant domain (VH) IgG1

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210                      215                      220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225                      230                      235                      240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                          245                      250                      255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                          260                      265                      270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
  
                          275                      280                      285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
                          290                      295                      300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305                      310                      315                      320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 44

<211> 326

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Constant domain (VH) IgG4 (S228P)

<400> 44

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65                      70                      75                      80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85	90	95	
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
115	120	125	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
130	135	140	
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
165	170	175	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
180	185	190	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
195	200	205	
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
210	215	220	
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
245	250	255	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
275	280	285	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
290	295	300	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
325			

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Domain kappa (VL)

<400> 45

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 46

<211> 98

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Human germline IGHV1-46\*01

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg

<210> 47

<211> 95

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Human germline IGKV1-39\*01

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
85 90 95

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Human germline IGHJ4\*01

<400> 48

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

<210> 49

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Human germline IGKJ4\*01

<400> 49

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 50

<211> 1367

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IGF-1R (human)

<400> 50

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu

1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile

20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg

35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile

50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val

65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu

85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe

100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile

115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
 130 135 140  
 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190  
 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205  
 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220  
 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255  
 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala  
 275 280 285  
 Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met  
 290 295 300  
 Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr  
 305 310 315 320  
 Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys  
 325 330 335  
 Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly  
 340 345 350  
 Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn  
 355 360 365  
 Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val

370                      375                      380  
 Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly  
                     405                      410                      415  
 Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp  
  
                     420                      425                      430  
 Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe  
                     435                      440                      445  
 Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu  
                     450                      455                      460  
 Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg  
 465                      470                      475                      480  
 Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr  
  
                     485                      490                      495  
 Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr  
                     500                      505                      510  
 Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys  
                     515                      520                      525  
 Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys  
                     530                      535                      540  
 Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys  
  
 545                      550                      555                      560  
 Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln  
                     565                      570                      575  
 Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp  
                     580                      585                      590  
 His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala  
                     595                      600                      605  
 Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser  
  
 610                      615                      620



Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn  
 625                      630                      635                      640  
 Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr  
                     645                      650                      655  
 Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys  
                     660                      665                      670  
 Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys  
  
                     675                      680                      685  
 Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys  
                     690                      695                      700  
 Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys  
 705                      710                      715                      720  
 Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu  
                     725                      730                      735  
 Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser  
  
                     740                      745                      750  
 Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro  
                     755                      760                      765  
 Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn  
                     770                      775                      780  
 Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg  
 785                      790                      795                      800  
 Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser  
  
                     805                      810                      815  
 Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp  
                     820                      825                      830  
 Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile  
                     835                      840                      845  
 Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met  
                     850                      855                      860  
 Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val

865                      870                      875                      880  
 Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu  
                          885                      890                      895  
 Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly  
                          900                      905                      910  
 Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr  
                          915                      920                      925  
 Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val  
  
                          930                      935                      940  
 Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg  
 945                      950                      955                      960  
 Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val  
                          965                      970                      975  
 Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp  
                          980                      985                      990  
 Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly  
  
                          995                      1000                      1005  
 Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys  
                          1010                      1015                      1020  
 Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala  
                          1025                      1030                      1035  
 Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val  
                          1040                      1045                      1050  
 Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val  
  
                          1055                      1060                      1065  
 Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr  
                          1070                      1075                      1080  
 Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met  
                          1085                      1090                      1095  
 Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile  
                          1100                      1105                      1110

Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala

1115

1120

1125

Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val

1130

1135

1140

Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg

1145

1150

1155

Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu

1160

1165

1170

Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val

1175

1180

1185

Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp

1190

1195

1200

Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn

1205

1210

1215

Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys

1220

1225

1230

Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys

1235

1240

1245

Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile

1250

1255

1260

Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser

1265

1270

1275

Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu

1280

1285

1290

Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser

1295

1300

1305

Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His

1310

1315

1320

Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala

1325

1330

1335

Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg

1340                      1345                      1350  
 Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys  
  
 1355                      1360                      1365  
 <210> 51  
 <211> 932  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220><223> IGF-1R ECD (human)  
 <400> 51  
 Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
 1                      5                      10                      15  
 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
                     20                      25                      30  
 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
                     35                      40                      45  
  
 Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile  
                     50                      55                      60  
 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val  
 65                      70                      75                      80  
 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
                     85                      90                      95  
 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
                     100                      105                      110  
  
 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
                     115                      120                      125  
 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
                     130                      135                      140  
 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
                     165                      170                      175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190  
 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205  
 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220  
 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser  
 225 230 235 240  
  
 Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255  
 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu  
 260 265 270  
 Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala  
 275 280 285  
 Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met  
 290 295 300  
  
 Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr  
 305 310 315 320  
 Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys  
 325 330 335  
 Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly  
 340 345 350  
 Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn  
 355 360 365  
  
 Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val  
 370 375 380  
 Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser  
 385 390 395 400  
 Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly  
 405 410 415  
 Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp

				420				425				430			
Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe
435				440				445							
Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu
450				455				460							
Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg
465				470				475				480			
Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr
485				490				495							
Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr
500				505				510							
Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys
515				520				525							
Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys
530				535				540							
Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys
545				550				555				560			
Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln
565				570				575							
Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp
580				585				590							
His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala
595				600				605							
Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser
610				615				620							
Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn
625				630				635				640			
Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly	Tyr
645				650				655							
Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Lys
660				665				670							

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys  
 675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys  
 690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys  
 705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu  
 725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser  
 740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro  
 755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn  
 770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg  
 785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser  
 805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp  
 820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile  
 835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met  
 850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val  
 865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu  
 885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly  
 900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr

915                      920                      925

Gly Tyr Glu Asn

930

<210> 52

<211> 512

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> IGF-1R ECD Nterminal (human)

<400> 52

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu

1                      5                      10                      15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile

20                      25                      30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg

35                      40                      45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile

50                      55                      60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val

65                      70                      75                      80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu

85                      90                      95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe

100                      105                      110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile

115                      120                      125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu

130                      135                      140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile

145                      150                      155                      160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys

165                      170                      175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys



180	185	190
Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr		
195	200	205
Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys		
210	215	220
Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser		
225	230	235
Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr		
245	250	255
Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu		
260	265	270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala		
275	280	285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met		
290	295	300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr		
305	310	315
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys		
325	330	335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly		
340	345	350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn		
355	360	365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val		
370	375	380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser		
385	390	395
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly		
405	410	415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp		
420	425	430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe  
435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu  
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg  
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr  
485 490 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr  
500 505 510

<210> 53

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> tetrapeptide (linker)

<400> 53

Gly Phe Leu Gly

1

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> tetrapeptide (linker)

<400> 54

Ala Leu Ala Leu

1

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> tetrapeptide (linker)

<400> 55

Pro Val Gly Val Val

1 5

<210> 56

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H037, VH

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 light chain L018, VL

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60  
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 58

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H037 full length

<400> 58

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
160		
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
240		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
320		
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 59

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 light chain L018 full length

<400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 light chain L021, VL

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 61

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 light chain L021 full length

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175



Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190  
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205  
Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H047, VH

<400> 62

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

50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 63

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H047 full length

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225                      230                      235                      240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245                      250                      255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275                      280                      285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290                      295                      300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305                      310                      315                      320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325                      330                      335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340                      345                      350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355                      360                      365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370                      375                      380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385                      390                      395                      400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405                      410                      415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420                      425                      430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435                      440                      445

Gly

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H049, VH

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 65

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H049 full length

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300  
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320  
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335  
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350  
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365  
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380  
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400  
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415  
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430  
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445  
Gly

<210> 66

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H051, VH

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45  
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 67

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H051 full length

<400

> 67

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365



Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 68

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H052, VH

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H052 full length

<400> 69

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430  
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445  
Gly

<210> 70

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H057, VH

<400> 70

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30  
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45  
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95  
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 71

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H057 full length

<400> 71

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H068, VH

<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 73

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H068 full length

<400> 73

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                     100                      105                      110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
  
                     115                      120                      125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
                     130                      135                      140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145                      150                      155                      160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
                     165                      170                      175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
  
                     180                      185                      190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
                     195                      200                      205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
                     210                      215                      220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225                      230                      235                      240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
  
                     245                      250                      255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
                     260                      265                      270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
                     275                      280                      285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
                     290                      295                      300



Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 74

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H070, VH

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 75

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H070 full length

<400> 75

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125	
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130	135	140	
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
165	170	175	
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
180	185	190	
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195	200	205	
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445  
 Gly

<210> 76

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H071, VH

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 77

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H071 full length

<400> 77

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145

150

155

160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165

170

175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180

185

190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 78

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H076, VH

<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 79

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H076 full length

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
	20	25	30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255



Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 80

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H077, VH

<400> 80

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
                     20                      25                      30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                     35                      40                      45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
                     50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
                     85                      90                      95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
                     100                      105                      110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115                      120

<210> 81

<211> 449

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hz208F2 heavy chain H077 full length

<400> 81

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
                     20                      25                      30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                     35                      40                      45  
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
                     50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65                      70                      75                      80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335  
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350  
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365  
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380  
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400  
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415  
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430  
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445  
Gly