



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0019100
(43) 공개일자 2025년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
C07K 5/093 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/00 (2013.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2024-7043476
(22) 출원일자(국제) 2023년06월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월30일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/020712
(87) 국제공개번호 WO 2023/234416
국제공개일자 2023년12월07일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-090443 2022년06월02일 일본(JP)
JP-P-2022-141780 2022년09월06일 일본(JP)

(71) 출원인
아지노모토 가부시키키가이샤
일본국 도쿄도 주오구 교바시 1조메15만1고
(72) 발명자
마츠다 유타카
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤
후지 도모히로
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

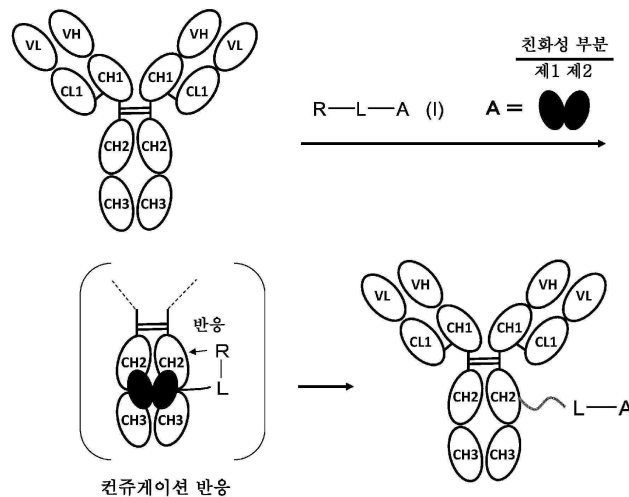
전체 청구항 수 : 총 146 항

(54) 발명의 명칭 **친화성 물질, 화합물, 항체 및 그것들의 염**

(57) 요약

본 발명은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위)에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 화학 수식할 수 있는 기술에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은, (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 반응성을 포함하는 화합물 또는 그 염에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/6889 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 5/0819 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/524 (2013.01)

(72) 발명자

이토 겐이치로

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤

다카하시 가즈토시

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤

마츠다 요시히코

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤

야마구치 히로키

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤

츠요시 나오키

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤

나가노 하야토

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤

다카스기 리카

일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키키가이샤

명세서

청구범위

청구항 1

(A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 반응성기를 포함하는, 화합물 또는 그 염.

청구항 2

제1항에 있어서, 정상 영역이 Fc 영역인, 화합물 또는 그 염.

청구항 3

제1항에 있어서, 정상 영역이 CH2 도메인인, 화합물 또는 그 염.

청구항 4

제1항에 있어서, 정상 영역이 인간 정상 영역인, 화합물 또는 그 염.

청구항 5

제1항에 있어서, 항체가 IgG인, 화합물 또는 그 염.

청구항 6

제1항에 있어서, 제1 및 제2 친화성 부분이 다른 친화성 부분인, 화합물 또는 그 염.

청구항 7

제1항에 있어서, 친화성 물질이, 하기 식 (A):



[식 중,

AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고,

AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,

L_A 는, 링커를 나타낸다.]로 표시되는, 화합물 또는 그 염.

청구항 8

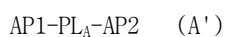
제7항에 있어서, 친화성 물질이, (i) (i-1) 특성의 반응성기를 1개만 포함하고, 또한 (i-2) 상기 특성의 반응성기를 통하여, 항체에 대한 반응성기에 연결되어 있는, 화합물 또는 그 염.

청구항 9

제1항에 있어서, 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 펩타이드를 포함하는 친화성 폴리펩타이드인, 화합물 또는 그 염.

청구항 10

제9항에 있어서, 친화성 폴리펩타이드가, 하기 식 (A'):



[식 중,

AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 N말단 측에 존재

하는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고;

AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 C말단 측에 존재하는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,

PL_A는, 펩타이드 링커를 나타낸다.]로 표시되는, 화합물 또는 그 염.

청구항 11

제10항에 있어서, 친화성 폴리펩타이드가, (i) (i-1) 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 1개만 포함하고, 또한 (ii-2) 상기 아미노기를 통하여, 항체에 대한 반응성기에 연결되어 있거나, 또는 (ii) 제1 친화성 펩타이드 중의 N말단 아미노기를 통하여, 항체에 대한 반응성기에 연결되어 있는, 화합물 또는 그 염.

청구항 12

제11항에 있어서, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기가, 라이신 잔기인, 화합물 또는 그 염.

청구항 13

제10항에 있어서, 친화성 폴리펩타이드가, Gln-Glu-Thr(QET)로 이루어지는 트리펩타이드를 N말단에 더 포함하는, 화합물 또는 그 염.

청구항 14

제10항에 있어서, 펩타이드 링커가, 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어지는 길이를 갖는, 화합물 또는 그 염.

청구항 15

제1항에 있어서, 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 한쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한

제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 다른 쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드인, 화합물 또는 그 염.

청구항 16

제15항에 있어서, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드가, 하기 (1) 내지 (4):

(1) RGNCA_YHKGQIIWCTYH(서열번호 38)의 아미노산 서열(Fc3K)을 포함하는 친화성 펩타이드;

(2) RGNCA_YHKGQIIWCTYH(서열번호 38)의 아미노산 서열에 있어서, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;

(3) FNKQCQR_YFEALHDPNLN_{EE}QRNARIRSIREEC(서열번호 39)의 아미노산 서열(Z34CK)을 포함하는 친화성 펩타이드; 및

(4) FNKQCQR_YFEALHDPNLN_{EE}QRNARIRSIREEC(서열번호 39)의 아미노산 서열에 있어서, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드

중 어느 하나이고(여기서, 상기 아미노산 서열에 포함되는 2개의 시스테인 잔기는, 디설파이드 결합에 의해 가교되어 있어도 좋다), 및/또는

항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드가, 하기 (5) 내지 (10):

(5) FNMQCQR_YFEALHDPNLN_{EE}QRNARIRSIREEC(서열번호 40)의 아미노산 서열(Z34CM)을 포함하는 친화성 펩타이드;

(6) FNMQCQR_YFEALHDPNLN_{EE}QRNARIRSIREEC(서열번호 40)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개

또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;

(7) FNREQQNAFYELHLPLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 41)의 아미노산 서열(ProAR)을 포함하는 친화성 펩타이드;

(8) FNREQQNAFYELHLPLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 41)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;

(9) RGNCAYHRGQIIWCTYH(서열번호 78)의 아미노산 서열을 포함하는 친화성 펩타이드; 및

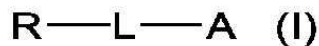
(10) RGNCAYHRGQIIWCTYH(서열번호 78)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드

중 어느 하나인(여기서, 상기 아미노산 서열에 포함되는 2개의 시스테인 잔기는, 디설파이드 결합에 의해 가교되어 있어도 좋은), 화합물 또는 그 염.

청구항 17

제1항에 있어서, 화합물이, 하기 식 (I):

[화1]-



[식 중,

R은, 상기 반응성기를 나타내고,

L은, 링커를 나타내고,

A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, 화합물 또는 그 염.

청구항 18

제1항에 있어서, 화합물 또는 그 염이, (i) 상기 친화성 물질과 (ii) 상기 반응성기 사이에 (iii) 절단성 부분을 더 포함하는, 화합물 또는 그 염.

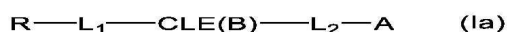
청구항 19

제18항에 있어서, 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, 화합물 또는 그 염.

청구항 20

제19항에 있어서, 화합물이, 하기 식 (Ia):

[화2]



[식 중,

R은, 상기 반응성기를 나타내고,

L₁은, 제1 링커를 나타내고,

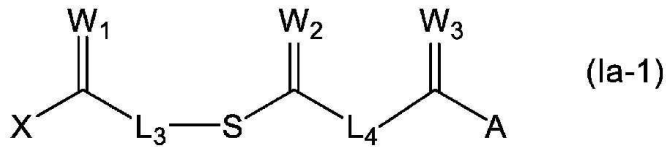
L₂는, 제2 링커를 나타내고,

CLE(B)는, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고, A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, 화합물 또는 그 염.

청구항 21

제19항에 있어서, 화합물이, 하기 식 (Ia-1):

[화3]



[식 중,

X는, 탈리기를 나타내고,

W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L₃은, 제3 링커를 나타내고,

L₄는, 제4 링커를 나타내고,

S는, 황 원자를 나타내고,

A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, 화합물 또는 그 염.

청구항 22

제21항에 있어서, 탈리기가 이하로부터 선택되는, 화합물 또는 그 염:

- (a) R_A-S(여기서, R_A는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, S는, 황 원자를 나타낸다.);
- (b) R_A-O(여기서, R_A는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, O는, 산소 원자를 나타낸다.);
- (c) R_A-(R_B-)N(여기서, R_A 및 R_B는, 각각 독립적으로, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, N은 질소 원자를 나타낸다.); 또는
- (d) 할로겐 원자.

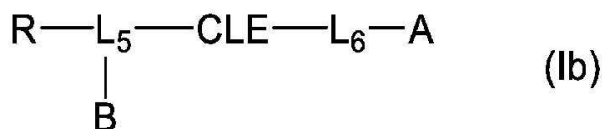
청구항 23

제1항에 있어서, 화합물 또는 그 염이, (ii) 상기 반응성기와 (iii) 절단성 부분 사이에 (iv) 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, 화합물 또는 그 염.

청구항 24

제23항에 있어서, 화합물이, 하기 식 (Ib):

[화4]

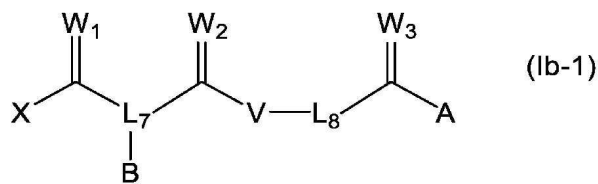


[식 중,
R은, 상기 반응성기를 나타내고,
L₅는, 제5 링커를 나타내고,
L₆은, 제6 링커를 나타내고,
B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
CLE는, 절단성 부분을 나타내고,
A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, 화합물 또는 그 염.

청구항 25

제23항에 있어서, 화합물이, 하기 식 (Ib-1):

[화5]



[식 중,
X는, 탈리기를 나타내고,
W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
L₇은, 제7 링커를 나타내고,
L₈은, 제8 링커를 나타내고,
B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
V는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, 화합물 또는 그 염.

청구항 26

제23항에 있어서, 생체 직교성 관능기가, 아지드 잔기, 알킨 잔기, 테트라진 잔기, 알켄 잔기, 티올 잔기, 말레이미드 잔기, 티올 잔기, 푸란 잔기, 또는 할로카르보닐 잔기인, 화합물 또는 그 염.

청구항 27

제1항 내지 제26 항 중 어느 한 항에 기재된 화합물 또는 그 염을 포함하는, 항체 유도체화용 시약.

청구항 28

항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 29

제28항에 있어서, (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 상기 친화성 물질을 포함하고, 또한 (c) 상기 친화성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 30

제29항에 있어서, 친화성 물질이, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

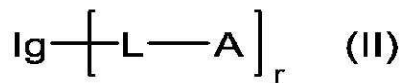
청구항 31

제30항에 있어서, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 32

제28항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (II):

[화6]



[식 중,

Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

L은, 링커를 나타내고,

A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,

상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 33

제28항에 있어서, 상기 항체 또는 그 염이, (i') 상기 친화성 물질과 (ii') 상기 항체 사이에 (iii') 절단성 부분을 더 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

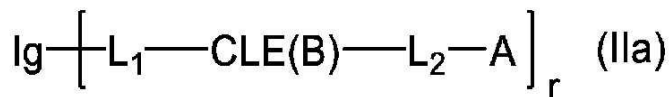
청구항 34

제33항에 있어서, 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 35

제34항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIa):

[화7]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L₁은, 제1 링커를 나타내고,

L₂는, 제2 링커를 나타내고,

CLE(B)는, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

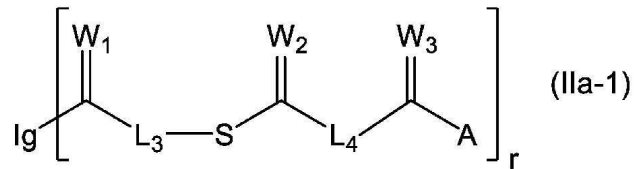
A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,

상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 36

제34항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIa-1):

[화8]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L₃은, 제3 링커를 나타내고,

L₄는, 제4 링커를 나타내고,

S는, 황 원자를 나타내고,

A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,

상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

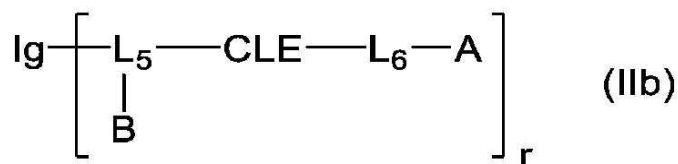
청구항 37

제33항에 있어서, 항체 또는 그 염이, (ii') 상기 항체와 (iii') 절단성 부분 사이에 (iv') 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 38

제37항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIb):

[화9]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L₅는, 제5 링커를 나타내고,

L₆은, 제6 링커를 나타내고,

B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

CLE는, 절단성 부분을 나타내고,

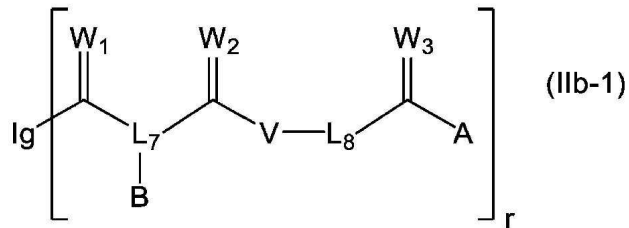
A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,

상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r 은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 39

제37항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIb-1):

[화10]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_1 , W_2 및 W_3 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_7 은, 제7 링커를 나타내고,

L_8 은, 제8 링커를 나타내고,

B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

V는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,

상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r 은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 40

제28항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 41

제40항에 있어서, 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 친화성 부분을 포함하는 추가의 친화성 물질이고, 상기 추가의 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 추가의 친화성 물질이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 44

(A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체와 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 친화성 물질을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염의 제조 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 화합물 또는 그 염이, (i) 상기 친화성 물질과 (ii) 상기 반응성기 사이에 (iii) 절단성 부분을 더 포함하는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, 방법.

청구항 47

제44항에 있어서, 화합물 또는 그 염이, (ii) 상기 반응성기와 (iii) 절단성 부분 사이에 (iv) 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, 방법.

청구항 48

제44항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이, 제29항 내지 제43항 중 어느 한 항에 기재된 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염인, 방법.

청구항 49

(a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하고, 또한 (c) 생체 직교성 관능기가 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 50

제49항에 있어서, 생체 직교성 관능기가, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 항체 유도체 또는 그 염.

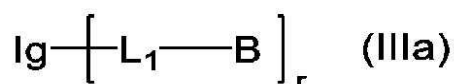
청구항 51

제50항에 있어서, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 52

제49항에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIa):

[화11]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L₁은, 제1 링커를 나타내고,

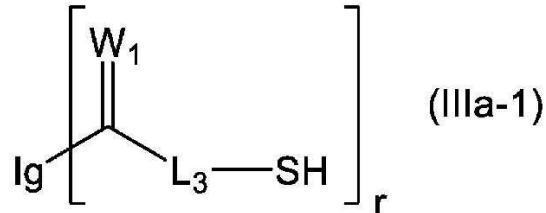
B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 53

제49항에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIa-1):

[화12]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W₁은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L₃은, 제3 링커를 나타내고,

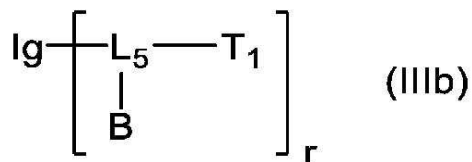
SH는, 티올기를 나타내고,

생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 54

제49항에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIb):

[화13]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L₅는, 제5 링커를 나타내고,

B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

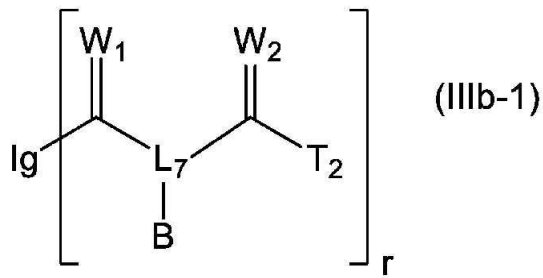
T₁은, 1가의 기를 나타내고,

생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 55

제49항에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIb-1):

[화14]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W₁, 및 W₂는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L₇은, 제7 링커를 나타내고,

B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

T₂는, 1가의 기를 나타내고,

생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 56

제49항에 있어서, 항체 유도체가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 57

제56항에 있어서, 추가의 수식 부분이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 60

(a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 기능성 물질을 포함하고, 또한 (c) 기능성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 61

제60항에 있어서, 기능성 물질이, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

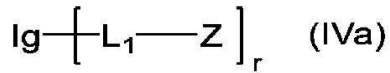
청구항 62

제61항에 있어서, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 Ig 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 63

제60항에 있어서, 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVa):

[화15]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L₁은, 제1 링커를 나타내고,

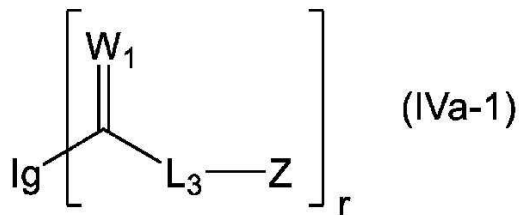
Z는, 기능성 물질을 나타내고,

기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 64

제60항에 있어서, 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVa-1):

[화16]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W₁은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L₃은, 제3 링커를 나타내고,

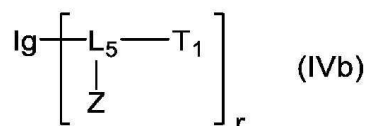
Z는, 기능성 물질을 나타내고,

기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 65

제60항에 있어서, 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVb):

[화17]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L₅는, 제5 링커를 나타내고,

Z는, 기능성 물질을 나타내고,

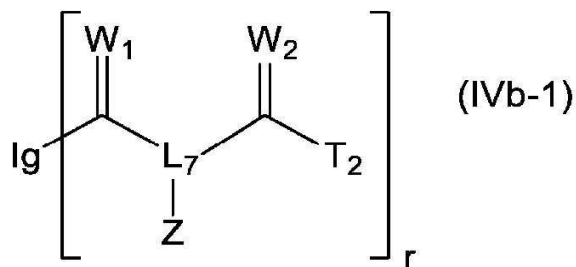
T₁은, 1가의 기를 나타내고,

기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 66

제60항에 있어서, 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVb-1):

[화18]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W₁, 및 W₂는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L₇은, 제7 링커를 나타내고,

Z는, 기능성 물질을 나타내고,

T₂는, 1가의 기를 나타내고,

기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 67

제60항에 있어서, 기능성 물질이, 약물, 표지 물질, 친화성 물질, 수송용 물질, 또는 안정화제인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 68

제67항에 있어서, 친화성 물질이, 전장 항체 또는 그 프래그먼트인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 69

제60항에 있어서, 컨쥬게이트가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 70

제69항에 있어서, 추가의 수식 부분이, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 73

(A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 항체 사이에 절단성 부분을 더 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염의 제조 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 항체 측에 생성할 수 있는 절단성 부분이고,

친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염인, 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 제49항 내지 제53항, 제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 기재된 항체 유도체 또는 그 염인, 방법.

청구항 76

제73항에 있어서, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염이, 상기 항체와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하고,

친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염인, 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 제49항 내지 제51항, 제54항 내지 제59항 중 어느 한 항에 기재된 항체 유도체 또는 그 염인, 방법.

청구항 78

하기 (1) 및 (2)를 포함하는 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

(1) 제74항에 기재된 방법에 의해, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조하는 것: 및

(2) 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

청구항 79

제78항에 있어서, 컨쥬게이트 또는 그 염이, 제60항 내지 제64항 중 어느 한 항에 기재된 컨쥬게이트 또는 그 염인, 방법.

청구항 80

하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

(1) 제76항에 기재된 방법에 의해, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조하는 것: 및

(2) 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

청구항 81

제78항에 있어서, 컨쥬게이트 또는 그 염이, 제60항 내지 제62항, 제65항 및 제66항 중 어느 한 항에 기재된 컨쥬게이트 또는 그 염인, 방법.

청구항 82

항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법으로서,

생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하고,

생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하고, 또한 (c) 생체 직교성 관능기가 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이고,

항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염이, (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 기능성 물질을 포함하고, 또한 (c) 기능성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염인, 방법.

청구항 83

제80항에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 제49항 내지 제59항 중 어느 한 항에 기재된 항체 유도체 또는 그 염인, 방법.

청구항 84

제80항에 있어서, 컨쥬게이트 또는 그 염이, 제60항 내지 제72항 중 어느 한 항에 기재된 컨쥬게이트 또는 그 염인, 방법.

청구항 85

항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 86

제85항에 있어서, 친화성 물질이, 하기 식 (A):

AP1-L_A-AP2 (A)

[식 중,

AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고,

AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,

L_A는, 링커를 나타낸다.]로 표시되는, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 87

제85항에 있어서, 친화성 물질이, 특정의 반응성기를 1개만 포함하는, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 88

제85항에 있어서, 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성

펩타이드를 포함하는 친화성 폴리펩타이드인, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 89

제88항에 있어서, 친화성 폴리펩타이드가, 하기 식 (A'):

AP1-PL_A-AP2 (A')

[식 중,

AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 N말단 측에 존재하는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고;

AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 C말단 측에 존재하는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,

PL_A는, 펩타이드 링커를 나타낸다.]로 표시되는, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 90

제88항에 있어서, 친화성 폴리펩타이드가, (i) 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 1개만 포함하거나, 또는 (ii) 미보호의 N말단 아미노기를 포함하는, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 91

제90항에 있어서, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 인, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 92

제88항에 있어서, 친화성 폴리펩타이드가, Gln-Glu-Thr(QET)로 이루어지는 트리펩타이드를 N말단에 더 포함하는, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 93

제89항에 있어서, 펩타이드 링커가, 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어지는 길이를 갖는, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 94

제85항에 있어서, 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 한쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한

제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 다른 쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드인, 친화성 물질 또는 그 염.

청구항 95

항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 펩타이드를 포함하는 친화성 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 96

제95항에 기재된 폴리뉴클레오타이드 및 그것에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 97

제95항에 기재된 폴리뉴클레오타이드 및 그것에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 단위를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 98

항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 제1 친화성 물질

을 포함하는 제1 수식 부분, 및 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 및 제4 친화성 부분을 포함하는 제2 친화성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함하는, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 99

제98항에 있어서, (a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 상기 제1 및 제2 수식 부분을 포함하고,

(c) 상기 제1 수식 부분이 상기 면역글로불린 단위 중의 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한

(d) 상기 제2 수식 부분이 상기 면역글로불린 단위 중의 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 100

제99항에 있어서, 상기 제1 수식 부분이, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한 상기 제2 수식 부분이, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

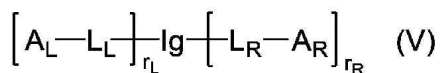
청구항 101

제100항에 있어서, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치, 및 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 및 317위치, 및 그것들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 위치인, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 102

제98항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (V):

[화19]



[식 중,

Ig는, 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_L 및 L_R 은, 각각 독립적으로, 링커를 나타내고,

A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 103

제98항에 있어서, 상기 항체 또는 그 염이, (i') 상기 제1 친화성 물질과 (ii') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii') 제1 절단성 부분을 더 포함하고, 및/또는 (i'') 상기 제2 친화성 물질과 (ii'') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii'') 제2 절단성 부분을 더 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

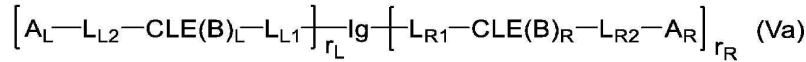
청구항 104

제103항에 있어서, 상기 제1 및 제2 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 105

제98항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Va):

[화20]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{L1} 및 L_{R1} 은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

L_{L2} 및 L_{R2} 는, 각각 독립적으로, 제2 링커를 나타내고,

$CLE(B)_L$ 및 $CLE(B)_R$ 은, 각각 독립적으로, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

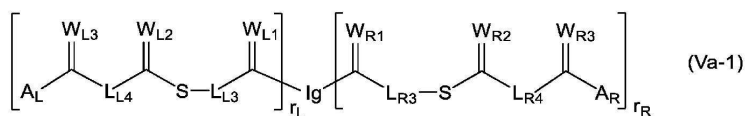
A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 106

제98항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Va-1):

[화21]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} , W_{L2} 및 W_{L3} , 및 W_{R1} , W_{R2} 및 W_{R3} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{L3} 및 L_{R3} 은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

L_{L4} 및 L_{R4} 는, 각각 독립적으로, 제4 링커를 나타내고,

S는, 황 원자를 나타내고,

A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상

기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

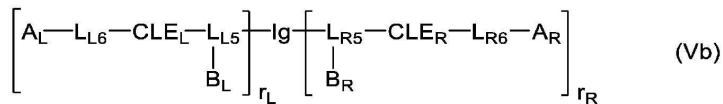
청구항 107

제103항에 있어서, 상기 항체 또는 그 염이, (ii') 상기 면역글로불린 단위와 (iii') 상기 제1 절단성 부분 사이에 (iv') 제1 생체 직교성 관능기를 더 포함하고, 및/또는 (ii'') 상기 면역글로불린 단위와 (iii'') 상기 제2 절단성 부분 사이에 (iv'') 제2 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 108

제107항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vb):

[화22]



[식 중,

Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{L5} 및 L_{R5} 는, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

L_{L6} 및 L_{R6} 은, 각각 독립적으로, 제6 링커를 나타내고,

B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

B_R 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

CLE_L 및 CLE_R 은, 각각 독립적으로, 절단성 부분을 나타내고,

A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

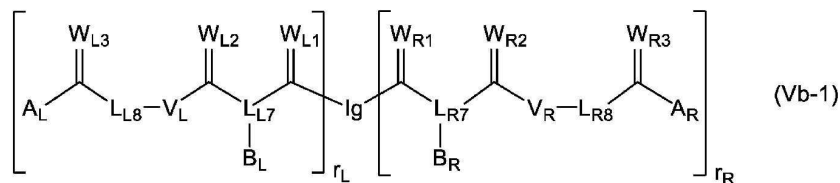
A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 109

제108항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vb-1):

[화23]



[식 중,

Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} , W_{L2} 및 W_{L3} , 및 W_{R1} , W_{R2} 및 W_{R3} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{L7} 및 L_{R7} 은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

L_{L8} 및 L_{R8} 은, 각각 독립적으로, 제8 링커를 나타내고,

B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

B_R 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

V_L 및 V_R 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 110

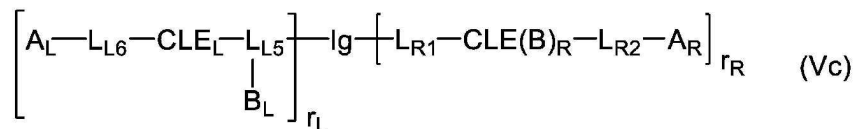
제103항에 있어서, 상기 항체 또는 그 염이, (i') 상기 제1 친화성 물질과 (ii') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii) 제1 절단성 부분을 더 포함하고, 또한 (ii'') 상기 면역글로불린 단위와 (iii'') 제2 절단성 부분 사이에 (iv'') 제1 생체 직교성 관능기를 더 포함하고,

상기 제1 절단성 부분이, 절단에 의해 제2 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 111

제100항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vc):

[화24]



[식 중,

Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{R1} 은, 제1 링커를 나타내고,

L_{R2} 는, 제2 링커를 나타내고,

L_{L5} 는, 제5 링커를 나타내고,

L_{L6} 은, 제6 링커를 나타내고,

B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

CLE_L 은, 제1 절단성 부분을 나타내고,

$CLE(B)_R$ 은, 절단에 의해 제2 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 제2 절단성 부분을 나타내고,

A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

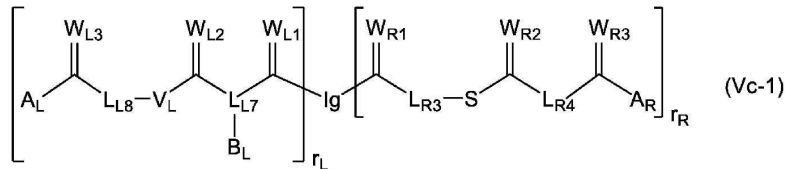
A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 112

제111항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vc-1):

[화25]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1}, W_{L2} 및 W_{L3}, 및 W_{R1}, W_{R2} 및 W_{R3}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{R3}은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

L_{R4}는, 각각 독립적으로, 제4 링커를 나타내고,

L_{L7}은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

L_{L8}은, 각각 독립적으로, 제8 링커를 나타내고,

B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

V_L은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 113

제98항에 있어서, 친화성 물질 수식 항체가, 추가의 수식 부분을 더 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 114

제113항에 있어서, 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제5 친화성 부분을 포함하는 추가의 친화성 물질이고, 상기 추가의 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 추가의 친화성 물질이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도

입되어 있는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

청구항 117

이하를 포함하는, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염의 제조 방법:

(1) (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 제1 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 제1 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체와 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

(2) 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 친화성 물질을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 및 제4 친화성 부분을 포함하는 제2 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 제2 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염과 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것.

청구항 118

제117항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이, 제86항 내지 제100항 중 어느 한 항에 기재된 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염인, 방법.

청구항 119

(a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및
(b) 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 수식 부분을 포함하고,

(c) 제1 수식 부분이 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고,

(d) 제2 수식 부분이 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한

(e) 제1 및 제2 수식 부분이 서로 다른, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기 제1 수식 부분이, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한 상기 제2 수식 부분이, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 항체 유도체 또는 그 염.

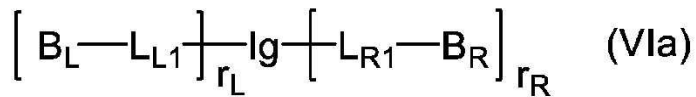
청구항 121

제120항에 있어서, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치, 및 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 및 317위치, 및 그것들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 위치인, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 122

제119항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIa):

[화26]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{L1} 및 L_{R1} 은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

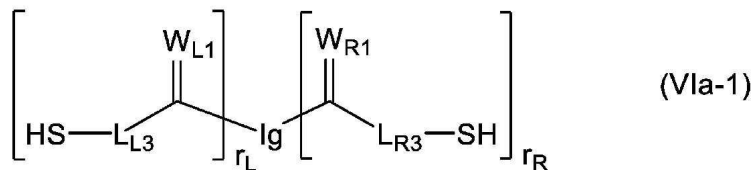
B_R 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 123

제122항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIa-1):

[화27]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} 및 W_{R1} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{L3} 및 L_{R3} 은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

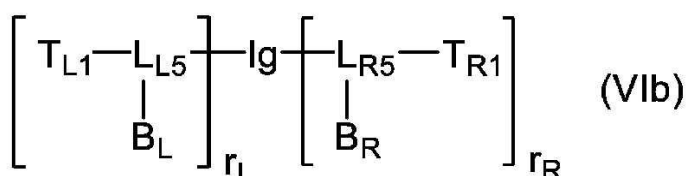
SH는, 생체 직교성 관능기인 티올기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 124

제119항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIb):

[화28]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{L5} 및 L_{R5}는, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

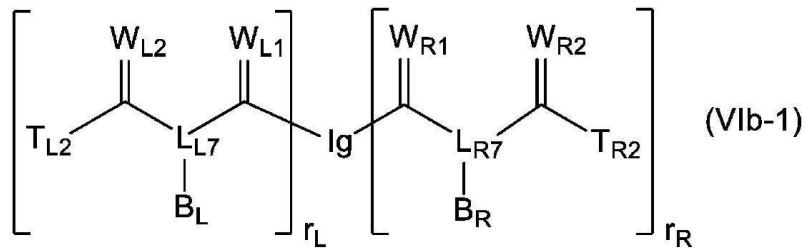
T_{L1} 및 T_{R1}은, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 125

제124항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIb-1):

[화29]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} 및 W_{L2}, 및 W_{R1} 및 W_{R2}는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{L7} 및 L_{R7}은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

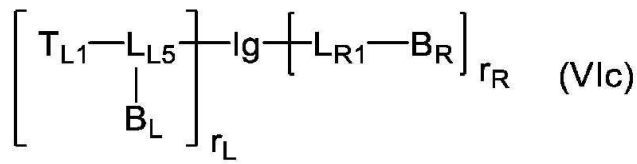
T_{L2} 및 T_{R2}는, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 126

제119항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIc):

[화30]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{R1}은, 제1 링커를 나타내고,

L_{L5}는, 제5 링커를 나타내고,

B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

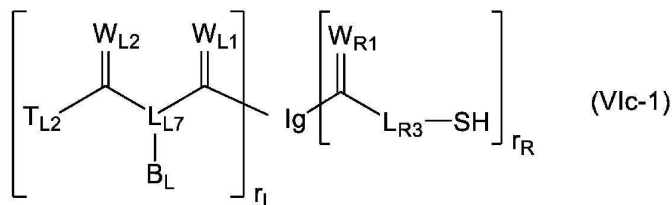
T_{L1}은, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 127

제126항에 있어서, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIc-1):

[화31]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} 및 W_{L2}, 및 W_{R1}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{R3}은, 제3 링커를 나타내고,

L_{L7}은, 제7 링커를 나타내고,

B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

SH는, 제2 생체 직교성 관능기인 티올기를 나타내고,

T_{L2}는, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 128

제119항에 있어서, 항체 유도체가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 129

제128항에 있어서, 추가의 수식 부분이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 131

제130항에 있어서, 상기 2개의 중쇄의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가 EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 항체 유도체 또는 그 염.

청구항 132

- (a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및
- (b) 제1 기능성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 기능성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함하고,
- (c) 제1 수식 부분이 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고,
- (d) 제2 수식 부분이 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한
- (e) 제1 및 제2 수식 부분이 서로 다른, 항체 및 제1 및 제2 수식 부분의 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 133

제132항에 있어서, 상기 제1 수식 부분이, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한 상기 제2 수식 부분이, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

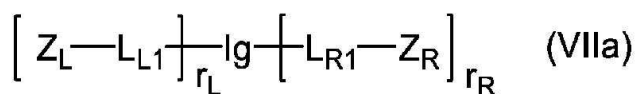
청구항 134

제133항에 있어서, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치, 및 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 및 317위치, 및 그것들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 위치인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 135

제132항에 있어서, 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIa):

[화32]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{L1} 및 L_{R1} 은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

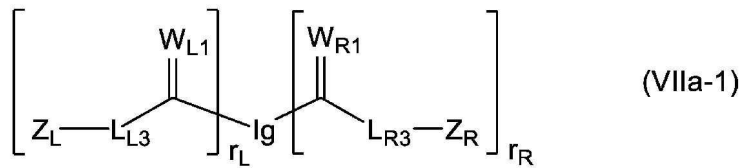
Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIa-1):

[화33]



[식 중,

Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} 및 W_{R1} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{L3} 및 L_{R3} 은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

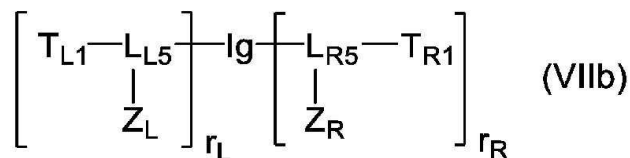
Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 137

제132항에 있어서, 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIb):

[화34]



[식 중,

Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{L5} 및 L_{R5} 은, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

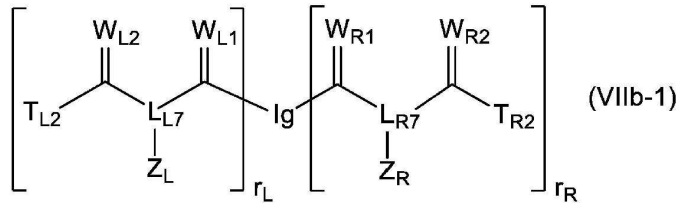
T_{L1} 및 T_{R1} 은, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 138

제137항에 있어서, 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIb-1):

[화35]



[식 중,

Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} 및 W_{L2} , 및 W_{R1} 및 W_{R2} 는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{L7} 및 L_{R7} 은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

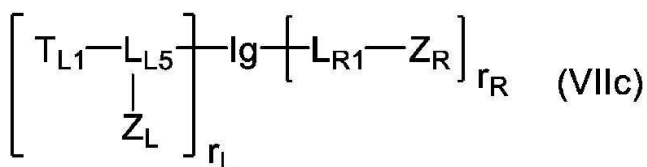
T_{L2} 및 T_{R2} 는, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 139

제132항에 있어서, 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIc):

[화36]



[식 중,

Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{R1} 은, 제1 링커를 나타내고,

L_{L5} 는, 제5 링커를 나타내고,

Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

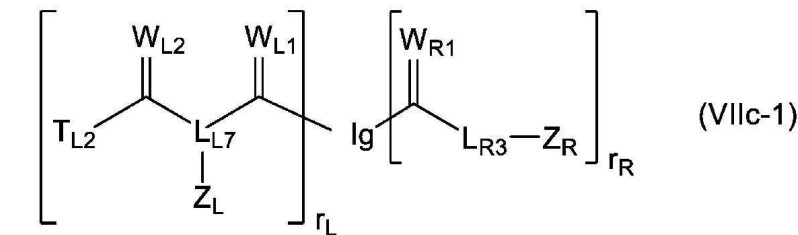
T_{L1} 은, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 140

제139항에 있어서, 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIc-1):

[화37]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} 및 W_{L2} , 및 W_{R1} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{R3} 은, 제3 링커를 나타내고,

L_{L7} 은, 제7 링커를 나타내고,

Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

T_{L2} 는, 1가의 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 141

제132항에 있어서, 제1 및 제2 기능성 물질이, 각각 독립적으로, 약물, 표지 물질, 친화성 물질, 수송용 물질 또는 안정화제인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 142

제141항에 있어서, 제1 및 제2 기능성 물질 중 한쪽이, 전장 항체 또는 그 프래그먼트이거나, 또는 제1 및 제2 기능성 물질 중 쌍방이 각각 독립적으로, 전장 항체 또는 그 프래그먼트인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 143

제132항에 있어서, 컨쥬게이트가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 144

제143항에 있어서, 추가의 수식 부분이, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 기능성 물질을 포

함하는 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, 컨쥬게이트 또는 그 염.

청구항 146

제145항에 있어서, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, 컨쥬게이트 또는 그 염.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 친화성 물질 및 그 염, 및 친화성 물질을 포함하는 화합물, 항체 및 그것들의 염에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근, 항체 약물 복합체(Antibody Drug Conjugate : ADC)의 연구 개발이 활발히 행하여지고 있다. ADC는 그 이름대로, 항체에 약물(예, 항암제)을 컨쥬게이션한 약제이며, 암세포 등에 대하여 직접적인 살세포 활성을 갖는다. 대표적인 ADC로는 Immugene사와 Roche사가 공동 개발한 T-DM1(상품명: 카도사이라(등록상표))이 있다.

[0003] T-DM1을 비롯한 ADC는, 개발 당초부터 그 불균일성이 문제가 되고 있다. 예를 들면, 항체 중에 70 내지 80 정도 있는 라이신 잔기에 대하여, 저분자 약물을 랜덤으로 반응시키고 있기 때문에, 약물 항체비(Drug Antibody Ratio: DAR)나 컨쥬게이션 위치가 일정하지 않다. 통상 이러한 랜덤 컨쥬게이션법이 되면 DAR이 0 내지 8의 범위가 되어, 약물의 결합수(結合數)가 다른 복수의 항체 약제가 발생하는 것을 알 수 있다. 최근 ADC의 약물의 결합수 및 결합 위치를 변화시키면, 체내 동태나 약물의 방출 속도, 효과가 변화하는 것이 보고되어 있다. 이러한 점으로부터 차세대형 ADC에서는 컨쥬게이션하는 약물의 개수와 위치를 제어하는 것이 요구되고 있다. 개수 및 위치가 일정하면, 예상대로의 efficacy, 컨쥬게이션 약제의 변화(variation), 로트 차 소위 레귤레이션의 문제가 해결되는 것으로 생각되고 있다.

[0004] 항체의 위치 선택적 수식법은 전 세계에서 연구되고 있지만, 그 대부분은 유전자 공학적 수법 또는 효소를 이용한 수식법이다. 유전자 공학적 수식법에 관해서는, 위치 선택성, 개수 선택성은 제어할 수 있지만, 항체 자체의 발현 효율이 저하(ADC를 조제할 때의 총 수율이 저하)하는 등의 문제가 지적되고 있다. 또한, 항체 발현계의 구축 등에 오랜 세월을 필요로 하는 것이 문제가 되고 있다.

[0005] 최근, 화학 합성적 수법에 의해 항체의 위치 선택적인 수식을 가능하게 하는 C-CAP(Chemical Conjugation by Affinity Peptide)법이 개발되었다(특허문헌 1). 본 방법은 친화성 펩타이드(Affinity Peptide)에 대해 NHS 활성화 에스테르 및 약물이 연결된 펩타이드 시약을 항체와 반응시킴으로써, 항체의 위치 선택적 수식에 성공하고 있다. 그러나, 본 방법에 의해 제작되는 ADC는, 항체와 약물이 펩타이드 부분을 포함하는 링커를 통하여 결합하고 있다. 펩타이드 부분은, 잠재적인 면역 원성을 갖고, 혈중에서 가수 분해되기 쉽다. 따라서, 본 방법에 의해 제작되는 ADC는, 링커 중에 펩타이드 부분을 포함하는 점에서 개선의 여지가 있다.

[0006] 상기 C-CAP법의 개량 방법으로서, 친화성 펩타이드를 포함하는 소정의 화합물을 이용하는 화학 합성적 수법에 의해, 펩타이드 부분을 링커로서 포함하지 않는, 기능성 물질(예, 약물)을 위치 선택적으로 갖는 항체를 조제할 수 있는 기술이 보고되고 있다(특허문헌 2 내지 5). 또한, 특허문헌 6에는, 친화성 펩타이드를 포함하는 화합물의 제작에 있어서, N말단에 글루타민-글루타민산-트레오닌(QET)을 포함하는 친화성 펩타이드를 이용함으로써, 친화성 펩타이드를 대량 및 간편하게 제조하는 기술이 개시되어 있다. 펩타이드 부분을 포함하는 링커의 사용을 피하는 것은 임상 응용에 있어서 바람직한 것이다. 이들 기술에서는, 약물로 위치 선택적으로 수식될 수 있는 항체 중의 아미노산 잔기의 위치로서 CH2 및 CH3 도메인 중의 각종 아미노산 잔기(예를 들어, 라이신 잔기, 티로신 잔기, 세린 잔기 및 트레오닌 잔기)에 대응하는 복수의 위치가 제안되어 있다. 그러나, 항체를 기능성 물질로 위치 선택적으로 수식하고, 또한 항체와 기능성 물질의 결합 비율을 원하는 범위로 조절하는 것은 만드

시 용이하지는 않다. 특히, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄를 포함하는 면역글로불린 단위)에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 특이적으로 수식하도록 제어하는 것은 용이하지 않다.

[0007] 그런데, 특허문헌 6에는, (i) 각종 수용체(예, 섬유아세포 증식 인자 수용체(FGFR), 간세포 증식 인자 수용체(HGFR/c-Met), 에리트로포에틴 수용체, 트롬보포에틴 수용체) 등의 단백질에 대한 제1 및 제2 생리 활성 펩타이드 부위, 및 펩타이드 링커를 포함하는 펩타이드 분자가, 단백질에 비공유 결합적으로 결합함으로써, 단백질의 활성을 조절할 수 있는 것, 및 (ii) 펩타이드 링커로서는, 프롤린(P), 알라닌(A), 및 세린(S)의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하는 소정 길이의 펩타이드 링커를 사용할 수 있는 것이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) : 국제공개 제2016/186206호
(특허문헌 0002) : 국제공개 제2018/199337호
(특허문헌 0003) : 국제공개 제2019/240287호
(특허문헌 0004) : 국제공개 제2019/240288호
(특허문헌 0005) : 국제공개 제2020/090979호
(특허문헌 0006) : 국제공개 제2021/112249호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은, 항체의 구성 단위(환언하면, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위)에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 화학 수식할 수 있는 기술을 개발하기 위한 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 항체의 구성 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 화학 수식하면서, 위치선택적으로 수식된 항체를 개발하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은, 예의 검토한 결과, (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상(定常) 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염의 사용에 의해, 항체의 구성 단위 중의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 화학적으로 수식할 수 있는 것을 발견하였다.

[0012] 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질(A)을 통하여 항체의 구성 단위에서의 2개의 중쇄에 회합할 수 있고, 다음으로, 항체에 대한 반응성기(R)를 통하여, 항체의 구성 단위에서의 한쪽의 중쇄 중의 특정한 아미노산 잔기의 측쇄와 특이적으로 반응하여, 항체의 구성 단위에서의 2개의 중쇄 중 1개만이 수식된 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성할 수 있다(도 1). 이론에 따라 본 발명이 구속되는 것을 바라지 않지만, 본 발명의 화합물 또는 그 염에 의한 항체의 구성 단위에서의 한쪽의 중쇄만의 수식 메카니즘은 다음과 같다. 본 발명의 화합물 또는 그 염에 포함되는 친화성 물질(항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함한다)은, 항체의 구성단위에서의 2개의 중쇄의 정상 영역에 안정적으로 회합할 수 있기 때문에, 본 발명의 화합물 또는 그 염에 포함되는 반응성기는, 한쪽의 중쇄만을 수식할 수 있다(도 1). 이때, 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역(미수식의 중쇄의 정상 영역)은 친화성 부분이 회합하고 있어 입체장애가 발생하고 있기 때문에, 다른 분자(본 발명의 화합물 또는 그 염)는, 그것에 포함되는 친화성 물질을 통하여 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역과 회합할 수 없다. 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 친화성 물질에 포함되는 2개의 친화성 부분을 통하여 2개의 중쇄의 정상 영역에 회합할 수 있고, 그러므로, 항체의 구성 단위에 안정적으로 회합할 수 있기 때문에, 다른 분자에 의한 항체의 구성 단위로의 회합을 고도로 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역의 수식을 고도로 억제할 수 있기 때문에, 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역만을 수식할 수 있다(도 1).

- [0013] 특허문헌 1 내지 5는, 친화성 물질, 및 항체에 대한 반응성기를 포함하는 화합물의 사용에 의해, 항체를 기능성 물질로 위치 선택적으로 수식할 수 있는 것을 개시하고 있지만, (1) 항체의 구성 단위에서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 화학 수식할 수 있는 기술을 개발한다는 과제, 및 (2) 친화성 물질로서, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 물질을 이용하는 것(특히, 당해 친화성 물질, 및 항체에 대한 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염의 사용에 의해, 항체의 구성 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 화학 수식한다고 하는 기술 사상)을 기재도 시사도 하고 있지 않다.
- [0014] 특허문헌 6은, 상기와 같은 단백질에 대한 제1 및 제2 생리활성 펩타이드 부위, 및 소정의 펩타이드 링커를 포함하는 펩타이드 분자가 단백질에 대하여 비공유 결합적으로 결합함으로써, 단백질의 활성을 조절할 수 있는 것을 개시하고 있지만, (1) 항체의 구성 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 화학 수식할 수 있는 기술을 개발한다는 과제, 및 (2) 친화성 물질로서, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 물질을 이용하는 것(특히, 당해 친화성 물질, 및 항체에 대한 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염의 사용에 의해, 항체의 구성 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 화학 수식한다는 기술사상)을 기재도 시사도 하고 있지 않다.
- [0015] 본 발명자들은 또한, 본 발명의 화합물 또는 그 염의 사용에 의해, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위)에 있어서의 한쪽의 중쇄만이 화학 수식된 항체를 생성하는데 성공하였다. 이러한 항체는, (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 수식 단위(예, 상기 친화성 물질, 생체 직교성 관능기, 또는 기능성 물질)을 포함하고, 또한 (c) 상기 수식 단위가 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는 특징을 갖는다.
- [0016] 즉, 본 발명은 다음과 같다.
- [0017] [1] (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 반응성기를 포함하는, 화합물 또는 그 염.
- [0018] [2] 정상 영역이 Fc 영역인, [1]의 화합물 또는 그 염.
- [0019] [3] 정상 영역이 CH2 도메인인, [1] 또는 [2]의 화합물 또는 그 염.
- [0020] [4] 정상 영역이 인간 정상 영역인, [1] 내지 [3] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0021] [5] 항체가 IgG인, [1] 내지 [4] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0022] [6] 제1 및 제2 친화성 부분이 다른 친화성 부분인, [1] 내지 [5] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0023] [7] 친화성 물질이, 하기 식 (A):
- [0024] AP1-L_A-AP2 (A)
- [0025] [식 중,
- [0026] AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고,
- [0027] AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,
- [0028] L_A는, 링커를 나타낸다.]로 표시되는, [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0029] [8] 친화성 물질이, (i) (i-1) 특성의 반응성기를 1개만 포함하고, 또한 (i-2) 상기 특성의 반응성기를 통하여, 항체에 대한 반응성기에 연결되어 있는, [1] 내지 [7] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0030] [9] 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 펩타이드를 포함하는 친화성 폴리펩타이드인, [1] 내지 [8] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0031] [10] 친화성 폴리펩타이드가, 하기 식 (A'):
- [0032] AP1-PL_A-AP2 (A')
- [0033] [식 중,
- [0034] AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 N말단 측에 존재하는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고,

- [0035] AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 C말단 측에 존재하는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,
- [0036] PL_A는, 펩타이드 링커를 나타낸다.]로 표시되는, [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0037] [11] 친화성 폴리펩타이드가, (i)(i-1)아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 1개만 포함하고, 또한 (ii-2)상기 아미노기를 통하여, 항체에 대한 반응성기에 연결되어 있거나, 또는 (ii) 제1 친화성 펩타이드 중의 N말단 아미노기를 통하여, 항체에 대한 반응성기에 연결되어 있는, [1] 내지 [10] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0038] [12] 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기가, 라이신 잔기인, [11]의 화합물 또는 그 염.
- [0039] [13] 친화성 폴리펩타이드가, Gln-Glu-Thr(QET)로 이루어지는 트리펩타이드를 N말단에 더 포함하는, [1] 내지 [12] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0040] [14] 펩타이드 링커가, 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어지는 길이를 갖는, [10]의 화합물 또는 그 염.
- [0041] [15] 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 한쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한
- [0042] 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 다른 쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드인, [1] 내지 [14] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0043] [16] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드가, 하기 (1) 내지 (4):
- [0044] (1) RGNCAVHKGQIIWCTYH(서열번호 38)의 아미노산 서열(Fc3K)을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0045] (2) RGNCAVHKGQIIWCTYH(서열번호 38)의 아미노산 서열에 있어서, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;
- [0046] (3) FNKQCQRRFYALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 39)의 아미노산 서열(Z34CK)을 포함하는 친화성 펩타이드; 및
- [0047] (4) FNKQCQRRFYALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 39)의 아미노산 서열에 있어서, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드);
- [0048] 중 어느 하나이고 (여기서, 상기 아미노산 서열에 포함되는 2개의 시스테인 잔기는, 디설파이드 결합에 의해 가교되어 있어도 좋다) 및/또는
- [0049] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드가, 하기 (5) 내지 (10):
- [0050] (5) FNMQCQRRFYALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 40)의 아미노산 서열(Z34CM)을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0051] (6) FNMQCQRRFYALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 40)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;
- [0052] (7) FNREQQNAFYELHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 41)의 아미노산 서열(ProAR)을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0053] (8) FNREQQNAFYELHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 41)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;
- [0054] (9) RGNCAVHRGQIIWCTYH(서열번호 78)의 아미노산 서열을 포함하는 친화성 펩타이드; 및
- [0055] (10) RGNCAVHRGQIIWCTYH(서열번호 78)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노

산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;

중 어느 하나인(여기서, 상기 아미노산 서열에 포함되는 2개의 시스테인 잔기는, 디설파이드 결합에 의해 가교되어 있어도 좋다), [15]의 화합물 또는 그 염.

[17] 화합물이, 하기 식 (I):

[화 1]



[식 중,

R은, 상기 반응성기를 나타내고,

L은, 링커를 나타내고,

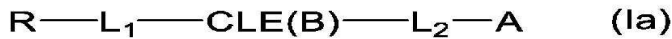
A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, [1] 내지 [16] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.

[18] 화합물 또는 그 염이, (i) 상기 친화성 물질과 (ii) 상기 반응성기 사이에 (iii) 절단성 부분을 더 포함하는, [1] 내지 [17] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.

[19] 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, [18]의 화합물 또는 그 염.

[20] 화합물이, 하기 식 (Ia):

[화 2]



[식 중,

R은, 상기 반응성기를 나타내고,

L₁은, 제1 링커를 나타내고,

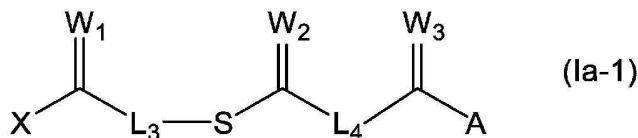
L₂는, 제2 링커를 나타내고,

CLE(B)는, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, [19]의 화합물 또는 그 염.

[21] 화합물이, 하기 식 (Ia-1):

[화 3]



[식 중,

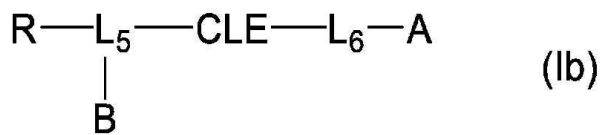
X는, 탈리기(脫離基)를 나타내고,

W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

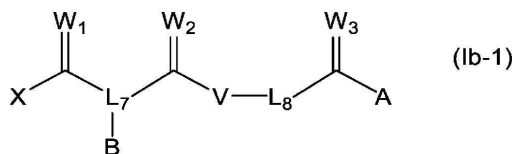
L₃은, 제3 링커를 나타내고,

L₄는, 제4 링커를 나타내고,

- [0083] S는, 황 원자를 나타내고,
- [0084] A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, [19]의 화합물 또는 그 염.
- [0085] [22] 탈리기가 이하로부터 선택되는, [21] 의 화합물 또는 그 염:
- [0086] (a) R_A-S (여기서, R_A 는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, S는, 황 원자를 나타낸다.);
- [0087] (b) R_A-O (여기서, R_A 는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, O는, 산소 원자를 나타낸다.);
- [0088] (c) $R_A-(R_B-)N$ (여기서, R_A 및 R_B 는, 각각 독립적으로, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, N은 질소 원자를 나타낸다.); 또는
- [0089] (d) 할로겐 원자.
- [0090] [23] 화합물 또는 그 염이, (ii) 상기 반응성기와 (iii) 절단성 부분 사이에 (iv) 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, [1] 내지 [17] 중 어느 하나 화합물 또는 그 염.
- [0091] [24] 화합물이, 하기 식 (Ib):
- [0092] [화 4]

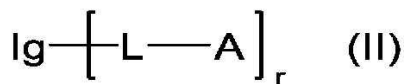


- [0093] .
- [0094] [식 중,
- [0095] R은, 상기 반응성기를 나타내고,
- [0096] L_5 는, 제5 링커를 나타내고,
- [0097] L_6 은, 제6 링커를 나타내고,
- [0098] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
- [0099] CLE는, 절단성 부분을 나타내고,
- [0100] A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, [23]의 화합물 또는 그 염.
- [0101] [25] 화합물이, 하기 식 (Ib-1):
- [0102] [화 5]

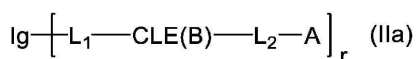


- [0103] .
- [0104] [식 중,
- [0105] X는, 탈리기를 나타내고,
- [0106] W_1 , W_2 및 W_3 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0107] L_7 은, 제7 링커를 나타내고,
- [0108] L_8 은, 제8 링커를 나타내고,

- [0109] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
- [0110] V는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0111] A는, 상기 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는, [23]의 화합물 또는 그 염.
- [0112] [26] 생체 직교성 관능기가, 아지드 잔기, 알킨 잔기, 테트라진 잔기, 알켄 잔기, 티올 잔기, 말레이미드 잔기, 티올 잔기, 푸란 잔기, 또는 할로카르보닐 잔기인, [23] 내지 [25] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염.
- [0113] [27] [1] 내지 [26] 중 어느 하나의 화합물 또는 그 염을 포함하는, 항체 유도체화용 시약.
- [0114] [28] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0115] [29] (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 상기 친화성 물질을 포함하고, 또한 (c) 상기 친화성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, [28]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0116] [30] 상기 친화성 물질이, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, [29]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0117] [31] 상기 1 이상의 위치가 EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [30]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0118] [32] 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (II):
- [0119] [화6]



- [0120] [식 중,
- [0121] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [0122] L은, 링커를 나타내고,
- [0123] A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,
- [0124] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [28] 내지 [31] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0125] [33] 상기 항체 또는 그 염이, (i') 상기 친화성 물질과 (ii') 상기 항체 사이에 (iii') 절단성 부분을 더 포함하는, [28] 내지 [32] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0126] [34] 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, [33]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0127] [35] 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIa):
- [0128] [화7]



- [0130] [식 중,
- [0131] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [0132] L₁은, 제1 링커를 지시하고,
- [0133] L₂는, 제2 링커를 지시하고,

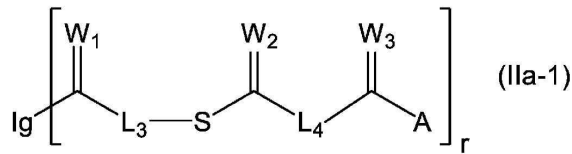
[0135] CLE(B)는, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

[0136] A는, 친화성 물질을 나타내고,

[0137] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r 은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [34]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0138] [36] 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIa-1);

[0139] [식 8]



[0140]

[0141] [식 중에는,

[0142] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0143] W_1 , W_2 및 W_3 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0144] L_3 은, 제3 링커를 나타내고,

[0145] L_4 는, 제4 링커를 나타내고,

[0146] S는, 황 원자를 나타내고,

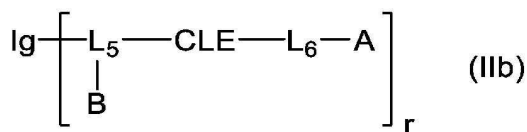
[0147] A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,

[0148] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r 은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [34]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0149] [37] 상기 항체 또는 그 염이, (ii') 상기 항체와 (iii') 절단성 부분 사이에 (iv) 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, [33]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0150] [38] 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIb):

[0151] [화 9]



[0152]

[0153] [식 중,

[0154] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0155] L_5 는, 제5 링커를 나타내고,

[0156] L_6 은, 제6 링커를 지시하고,

[0157] B는, 생체 직교성 관능기를 나타내고,

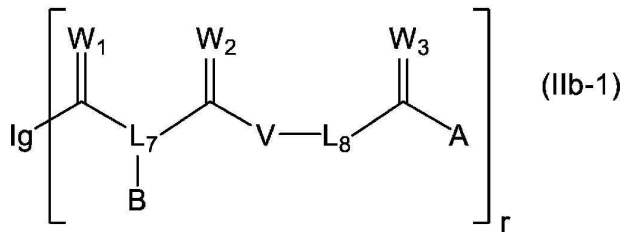
[0158] CLE는, 절단부를 나타내고,

[0159] A는, 친화성 물질을 나타내고,

[0160] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 변성률 r 은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [37]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 포함한다.

[0161] [39] 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (IIb-1):

[0162] [식 10]



[0163]

[0164] [식 중,

[0165] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0166] W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0167] L₇은, 제7 링커를 나타내고,

[0168] L₈은, 제8 링커를 나타내고,

[0169] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[0170] V는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0171] A는, 상기 친화성 물질을 나타내고,

[0172] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [37]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0173] [40] 친화성 물질 수식 항체가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, [28] 내지 [39] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0174] [41] 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 친화성 부분을 포함하는 추가의 친화성 물질이고, 상기 추가의 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, [40]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0175] [42] 상기 추가의 친화성 물질이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [41]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0176] [43] 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248 위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [42]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0177] [44] (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체와 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 친화성 물질을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염의 제조 방법.

[0178] [45] 화합물 또는 그 염이, (i) 상기 친화성 물질과 (ii) 상기 반응성기 사이에 (iii) 절단성 부분을 더 포함하는, [44]의 방법.

[0179] [46] 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, [45]의 방법.

[0180] [47] 화합물 또는 그 염이, (ii) 상기 반응성기와 (iii) 절단성 부분 사이에 (iv) 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, [44]의 방법.

[0181] [48] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이, [29] 내지 [43] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염

인, [44]의 방법.

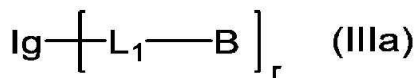
[0182] [49] (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하고, 또한 (c) 생체 직교성 관능기가 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염.

[0183] [50] 생체 직교성 관능기가, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, [49]의 항체 유도체 또는 그 염.

[0184] [51] 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [49] 또는 [50]의 항체 유도체 또는 그 염.

[0185] [52] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIa):

[0186] [화11]



[0187]

[0188] [식 중,

[0189] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

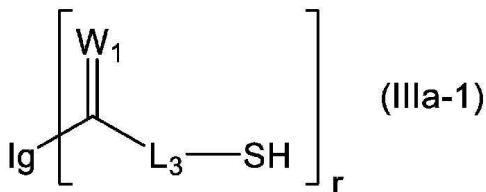
[0190] L₁은, 제1 링커를 나타내고,

[0191] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[0192] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [49] 내지 [51] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0193] [53] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIa-1):

[0194] [화12]



[0195]

[0196] [식 중,

[0197] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0198] W₁은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

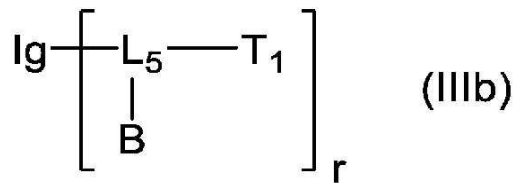
[0199] L₃은, 제3 링커를 나타내고,

[0200] SH는, 티올기를 나타내고,

[0201] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [49] 내지 [51] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0202] [54] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIb):

[0203] [화13]



[0204]

[0205] [식 중,

[0206] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0207] L₅는, 제5 링커를 나타내고,

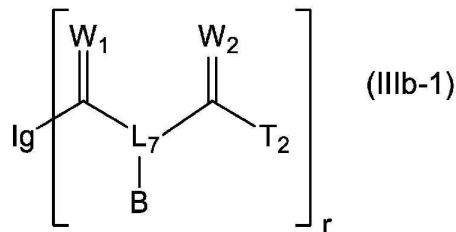
[0208] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[0209] T₁은, 1가의 기를 나타내고,

[0210] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [49] 내지 [51] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0211] [55] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (IIIb-1):

[0212] [화14]



[0213]

[0214] [식 중,

[0215] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0216] W₁, 및 W₂는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0217] L₇은, 제7 링커를 나타내고,

[0218] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[0219] T₂는, 1가의 기를 나타내고,

[0220] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [49] 내지 [51] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0221] [56] 항체 유도체가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, [49] 내지 [55] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0222] [57] 추가의 수식 부분이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, [56]의 항체 유도체 또는 그 염.

[0223] [58] 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [57]의 항체 유도체 또는 그 염.

[0224] [59] 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248 위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [58]의 항체 유도체 또는 그 염.

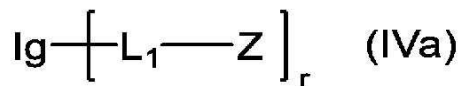
[0225] [60] (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 기능성 물질을 포함하고, 또한 (c) 기능성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0226] [61] 기능성 물질이, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, [60]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0227] [62] 상기 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [60] 또는 [61]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0228] [63] 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVa):

[0229] [화15]



[0230]

[0231] [식 중,

[0232] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

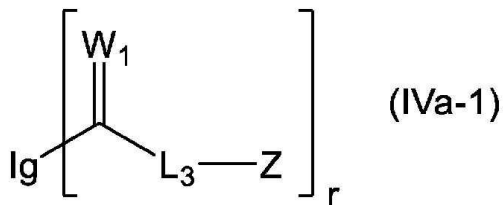
[0233] L₁은, 제1 링커를 나타내고,

[0234] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

[0235] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [60] 내지 [62] 중 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0236] [64] 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVa-1):

[0237] [화16]



[0238]

[0239] [식 중,

[0240] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0241] W₁은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

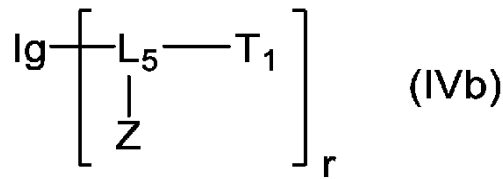
[0242] L₃은, 제3 링커를 나타내고,

[0243] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

[0244] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [60] 내지 [62] 중 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0245] [65] 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVb):

[0246] [화17]



[0247]

[0248] [식 중,

[0249] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0250] L₅는, 제5 링커를 나타내고,

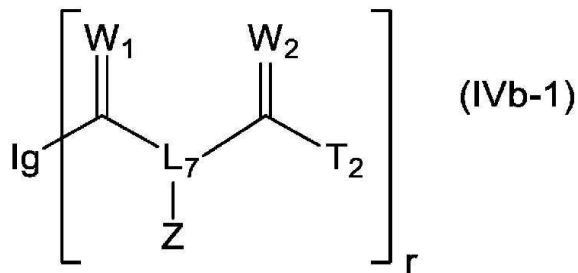
[0251] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

[0252] T₁은, 1가의 기를 나타내고,

[0253] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [60] 내지 [62] 중 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0254] [66] 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (IVb-1):

[0255] [화18]



[0256]

[0257] [식 중,

[0258] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0259] W₁, 및 W₂는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0260] L₇은, 제7 링커를 나타내고,

[0261] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

[0262] T₂는, 1가의 기를 나타내고,

[0263] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [60] 내지 [62] 중 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0264] [67] 기능성 물질이, 약물, 표지 물질, 친화성 물질, 수송용 물질, 또는 안정화제인, [60] 내지 [66] 중 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0265] [68] 친화성 물질이, 전장 항체 또는 그 프래그먼트인, [67]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0266] [69] 컨쥬게이트가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, [60] 내지 [68] 중 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0267] [70] 추가의 수식 부분이, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, [69]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0268] [71] 상기 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역

중에 도입되어 있는, [70]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

- [0269] [72] 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1개 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [71]의 컨쥬게이트 또는 그 염.
- [0270] [73] (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 항체 사이에 절단성 부분을 더 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염의 제조 방법.
- [0271] [74] 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 항체 측에 생성할 수 있는 절단성 부분이고,
- [0272] 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염인, [73]의 방법.
- [0273] [75] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 상기 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염인, [74]의 방법.
- [0274] [76] 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염이, 상기 항체와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하고,
- [0275] 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염인, [73]의 방법.
- [0276] [77] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 상기 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염인, [76]의 방법.
- [0277] [78] 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:
- [0278] (1) [74]의 방법에 의해, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조하는 것: 및
- [0279] (2) 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.
- [0280] [79] 컨쥬게이트 또는 그 염이, 상기 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염인, [78]의 방법.
- [0281] [80] 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:
- [0282] (1) [76]의 방법에 의해, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조하는 것: 및
- [0283] (2) 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.
- [0284] [81] 컨쥬게이트 또는 그 염이, 상기 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염인, [78]의 방법.
- [0285] [82] 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법으로서,
- [0286] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하고,
- [0287] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하고, 또한 (c) 생체 직교성 관능기가 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이고,
- [0288] 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염이, (a) 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 기능성 물질을 포함하고, 또한 (c) 기능성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에만 도입되어 있는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염인, 방법.
- [0289] [83] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 상기 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염인, [80]의 방법.

- [0290] [84] 컨주게이트 또는 그 염이, 상기 어느 하나의 컨주게이트 또는 그 염인, [80]의 방법.
- [0291] [85] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는, 친화성 물질 또는 그 염.
- [0292] [86] 친화성 물질이, 하기 식 (A):
- [0293] AP1-L_A-AP2 (A)
- [0294] [식 중,
- [0295] AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고,
- [0296] AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,
- [0297] L_A는, 링커를 나타낸다.]로 표시되는, [85]의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0298] [87] 친화성 물질이, 특정의 반응성기를 1개만 포함하는, [85] 또는 [86]의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0299] [88] 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 펩타이드를 포함하는 친화성 폴리펩타이드인, [85] 내지 [87] 중 어느 하나의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0300] [89] 친화성 폴리펩타이드가, 하기 식 (A'):
- [0301] AP1-PL_A-AP2 (A')
- [0302] [식 중,
- [0303] AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 N말단 측에 존재하는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고,
- [0304] AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 C말단 측에 존재하는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,
- [0305] PL_A는, 펩타이드 링커를 나타낸다.]로 표시되는, [85] 내지 [88] 중 어느 하나의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0306] [90] 친화성 폴리펩타이드가, (i) 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 1개만 포함하거나, 또는 (ii) 미보호의 N말단 아미노기를 포함하는, [85] 내지 [89] 중 어느 하나의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0307] [91] 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기가, 라이신 잔기인, [90]의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0308] [92] 친화성 폴리펩타이드가, Gln-Glu-Thr(QET)로 이루어지는 트리펩타이드를 N말단에 더 포함하는, [85] 내지 [89] 중 어느 하나의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0309] [93] 펩타이드 링커가, 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어지는 길이를 갖는, [89] 내지 [92] 중 어느 하나의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0310] [94] 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 한쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한
- [0311] 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 다른 쪽이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드인, [85] 내지 [93] 중 어느 하나의 친화성 물질 또는 그 염.
- [0312] [95] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 펩타이드를 포함하는 친화성 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- [0313] [96] [95]의 폴리뉴클레오타이드 및 그것에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 발현 벡터.
- [0314] [97] [95]의 폴리뉴클레오타이드 및 그것에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 단위를 포함하는, 숙주 세포.
- [0315] [98] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 및 제4 친화성 부분을 포함하는 제2 친화성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포

합하는, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0316] [99] (a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 상기 제1 및 제2 수식 부분을 포함하고,

[0317] (c) 상기 제1 수식 부분이 상기 면역글로불린 단위 중의 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한

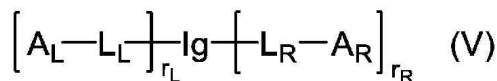
[0318] (d) 상기 제2 수식 부분이 상기 면역글로불린 단위 중의 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [98]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0319] [100] 상기 제1 수식 부분이, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한 상기 제2 수식 부분이, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [98] 또는 [99]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0320] [101] 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치, 및 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 및 317위치, 및 그것들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 위치인, [100]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0321] [102] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (V):

[0322] [화19]



[0323]

[0324] [식 중,

[0325] Ig는, 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0326] L_L 및 L_R 은, 각각 독립적으로, 링커를 나타내고,

[0327] A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

[0328] A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

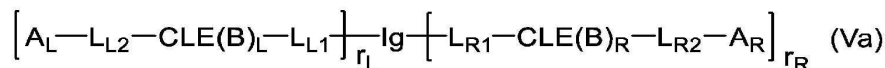
[0329] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [98] 내지 [101] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0330] [103] 상기 항체 또는 그 염이, (i') 상기 제1 친화성 물질과 (ii') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii') 제1 절단성 부분을 더 포함하고, 및/또는 (i'') 상기 제2 친화성 물질과 (ii'') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii'') 제2 절단성 부분을 더 포함하는, [98] 내지 [102] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0331] [104] 상기 제1 및 제2 절단성 부분이, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, [103]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0332] [105] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Va):

[0333] [화20]



[0334]

[0335] [식 중,

[0336] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0337] L_{L1} 및 L_{R1}은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

[0338] L_{L2} 및 L_{R2}는, 각각 독립적으로, 제2 링커를 나타내고,

[0339] CLE(B)_L 및 CLE(B)_R은, 각각 독립적으로, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

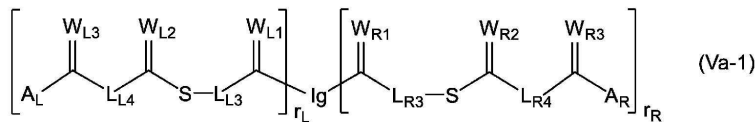
[0340] A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

[0341] A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

[0342] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [98] 내지 [104] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0343] [106] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Va-1):

[0344] [화21]



[0345]

[0346] [식 중,

[0347] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0348] W_{L1}, W_{L2} 및 W_{L3}, 및 W_{R1}, W_{R2} 및 W_{R3}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0349] L_{L3} 및 L_{R3}은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

[0350] L_{L4} 및 L_{R4}는, 각각 독립적으로, 제4 링커를 나타내고,

[0351] S는, 황 원자를 나타내고,

[0352] A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

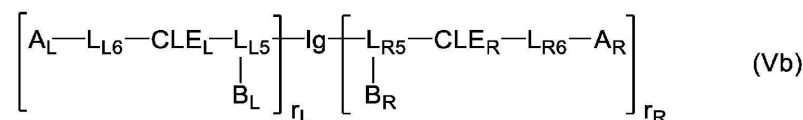
[0353] A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

[0354] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [98] 내지 [104] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[0355] [107] 상기 항체 또는 그 염이, (ii') 상기 면역글로불린 단위와 (iii') 상기 제1 절단성 부분 사이에 (iv') 제1 생체 직교성 관능기를 더 포함하고, 및/또는 (ii'') 상기 면역글로불린 단위와 (iii'') 상기 제2 절단성 부분 사이에 (iv'') 제2 생체 직교성 관능기를 더 포함하는, [98] 내지 [106] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

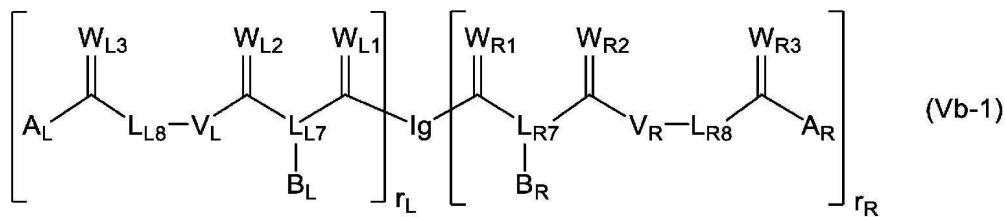
[0356] [108] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vb):

[0357] [화22]



[0358]

- [0359] [식 중,
- [0360] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [0361] L_{L5} 및 L_{R5}는, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,
- [0362] L_{L6} 및 L_{R6}은, 각각 독립적으로, 제6 링커를 나타내고,
- [0363] B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,
- [0364] B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,
- [0365] CLE_L 및 CLE_R은, 각각 독립적으로, 절단성 부분을 나타내고,
- [0366] A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,
- [0367] A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,
- [0368] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [98] 내지 [107] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0369] [109] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vb-1):
- [0370] [화23]



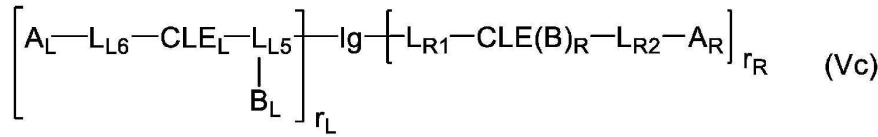
- [0371]
- [0372] [식 중,
- [0373] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [0374] W_{L1}, W_{L2} 및 W_{L3}, 및 W_{R1}, W_{R2} 및 W_{R3}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0375] L_{L7} 및 L_{R7}은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,
- [0376] L_{L8} 및 L_{R8}은, 각각 독립적으로, 제8 링커를 나타내고,
- [0377] B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,
- [0378] B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,
- [0379] V_L 및 V_R은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0380] A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,
- [0381] A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,
- [0382] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [98] 내지 [108] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0383] [110] 상기 항체 또는 그 염이, (i') 상기 제1 친화성 물질과 (ii') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii') 제1 절단성 부분을 더 포함하고, 또한 (ii'') 상기 면역글로불린 단위와 (iii'') 제2 절단성 부분 사이에 (iv'') 제

1 생체 직교성 관능기를 더 포함하고,

상기 제1 절단성 부분이, 절단에 의해 제2 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분인, [98] 내지 [109] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[111] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vc):

[화24]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{R1} 은, 제1 링커를 나타내고,

L_{R2} 는, 제2 링커를 나타내고,

L_{L5} 는, 제5 링커를 나타내고,

L_{L6} 은, 제6 링커를 나타내고,

B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

CLE_L 은, 제1 절단성 부분을 나타내고,

$CLE(B)_R$ 은, 절단에 의해 제2 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 제2 절단성 부분을 나타내고,

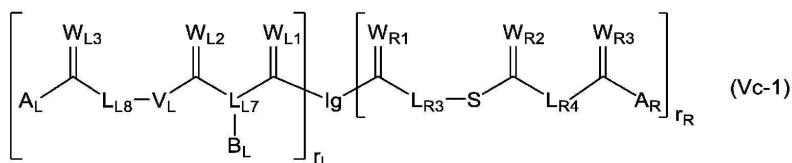
A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [98] 내지 [110] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.

[112] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체가, 하기 식 (Vc-1):

[화25]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} , W_{L2} 및 W_{L3} , 및 W_{R1} , W_{R2} 및 W_{R3} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{R3} 은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

L_{R4} 는, 각각 독립적으로, 제4 링커를 나타내고,

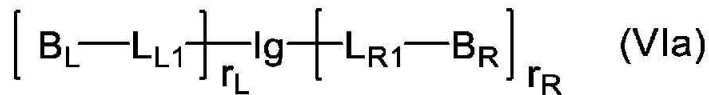
- [0408] L_{L7} 은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,
- [0409] L_{L8} 은, 각각 독립적으로, 제8 링커를 나타내고,
- [0410] B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
- [0411] V_L 은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0412] A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,
- [0413] A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,
- [0414] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [98] 내지 [111] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0415] [113] 친화성 물질 수식 항체가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, [98] 내지 [112] 중 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0416] [114] 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제5 친화성 부분을 포함하는 추가의 친화성 물질이고, 상기 추가의 친화성 물질이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, [113]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0417] [115] 상기 추가의 친화성 물질이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [114]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0418] [116] 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1개 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [115]의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염.
- [0419] [117] 이하를 포함하는, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염의 제조 방법:
- [0420] (1) (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 제1 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 제1 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체와 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및
- [0421] (2) 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 친화성 물질을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 및 제4의 친화성 부분을 포함하는 제2 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 제2 반응성기를 포함하는 화합물 또는 그 염과 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [0422] [118] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이, 상기 어느 하나의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염인, [117]의 방법.
- [0423] [119] (a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 수식 부분을 포함하고,
- [0424] (c) 제1 수식 부분이 상기 제1 중쇄의 정상 영역 중에 도입되어 있고,
- [0425] (d) 제2 수식 부분이 상기 제2 중쇄의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한
- [0426] (e) 제1 및 제2 수식 부분이 서로 다른, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염.
- [0427] [120] 상기 제1 수식 부분이, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한 상기

제2 수식 부분이, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [119]의 항체 유도체 또는 그 염.

[121] 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치, 및 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 및 317위치, 및 그것들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 위치인, [119] 또는 [120]의 항체 유도체 또는 그 염.

[122] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIa):

[화26]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_{L1} 및 L_{R1} 은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

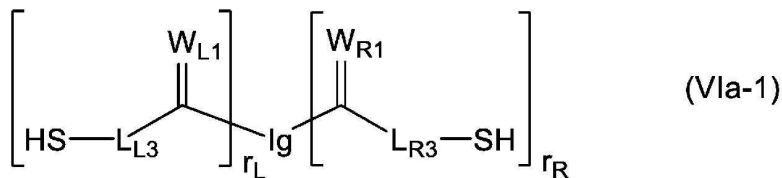
B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

B_R 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [119] 내지 [121] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[123] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIa-1):

[화27]



[식 중,

Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1} 및 W_{R1} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

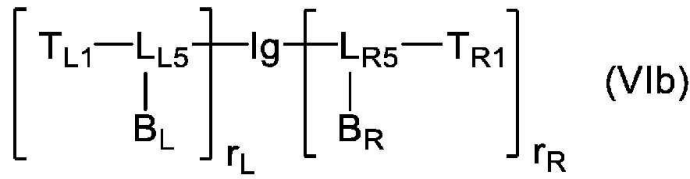
L_{L3} 및 L_{R3} 은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

SH는, 생체 직교성 관능기인 티올기를 나타내고,

제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [119] 내지 [122] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[124] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIb):

[0448] [화28]



[0449]

[0450] [식 중,

[0451] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0452] L_{L5} 및 L_{R5}는, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

[0453] B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

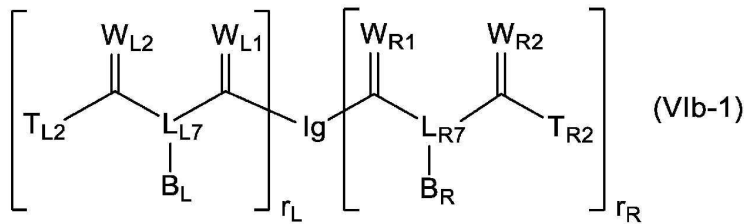
[0454] B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

[0455] T_{L1} 및 T_{R1}은, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[0456] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [119] 내지 [123] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0457] [125] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIb-1):

[0458] [화29]



[0459]

[0460] [식 중,

[0461] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0462] W_{L1} 및 W_{L2}, 및 W_{R1} 및 W_{R2}는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0463] L_{L7} 및 L_{R7}은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

[0464] B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

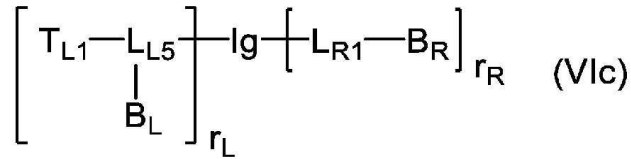
[0465] B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

[0466] T_{L2} 및 T_{R2}는, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[0467] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [119] 내지 [124] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0468] [126] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIc):

[0469] [화30]



[0470]

[0471] [식 중,

[0472] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0473] L_{R1}은, 제1 링커를 나타내고,

[0474] L_{L5}는, 제5 링커를 나타내고,

[0475] B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

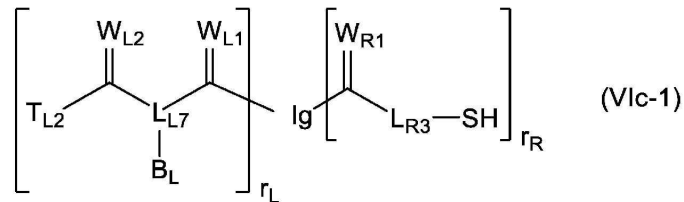
[0476] B_R은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

[0477] T_{L1}은, 1가의 기를 나타내고,

[0478] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [119] 내지 [125] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

[0479] [127] 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염이, 하기 식 (VIc-1):

[0480] [화31]



[0481]

[0482] [식 중,

[0483] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0484] W_{L1} 및 W_{L2}, 및 W_{R1}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0485] L_{R3}은, 제3 링커를 나타내고,

[0486] L_{L7}은, 제7 링커를 나타내고,

[0487] B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

[0488] SH는, 제2 생체 직교성 관능기인 티올기를 나타내고,

[0489] T_{L2}는, 1가의 기를 나타내고,

[0490] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [119] 내지 [126] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

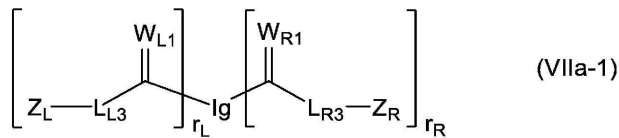
[0491] [128] 항체 유도체가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, [119] 내지 [127] 중 어느 하나의 항체 유도체 또는 그 염.

- [0492] [129] 추가의 수식 부분이, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, [128]의 항체 유도체 또는 그 염.
- [0493] [130] 상기 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [129]의 항체 유도체 또는 그 염.
- [0494] [131] 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [130]의 항체 유도체 또는 그 염.
- [0495] [132] (a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 제1 기능성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 기능성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함하고,
- [0496] (c) 제1 수식 부분이 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고,
- [0497] (d) 제2 수식 부분이 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한
- [0498] (e) 제1 및 제2 수식 부분이 서로 다른, 항체 및 제1 및 제2 수식 부분의 컨쥬게이트 또는 그 염.;1
- [0499] [133] 상기 제1 수식 부분이, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한 상기 제2 수식 부분이, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [132]의 컨쥬게이트 또는 그 염.
- [0500] [134] 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치, 및 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 및 317위치, 및 그것들의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 위치인, [132] 또는 [133]의 컨쥬게이트 또는 그 염.
- [0501] [135] 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIa):
- [0502] [화32]



- [0503] .
- [0504] [식 중,
- [0505] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [0506] L_{L1} 및 L_{R1} 은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,
- [0507] Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,
- [0508] Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,
- [0509] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [132] 내지 [134] 중 어느 하나의 컨쥬게이트 또는 그 염.
- [0510] [136] 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIa-1):

[0511] [화33]



[0512]

[0513] [식 중,

[0514] I_g는, 상기 번역글로불린 단위를 나타내고,

[0515] W_{L1} 및 W_{R1}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0516] L_{L3} 및 L_{R3}은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

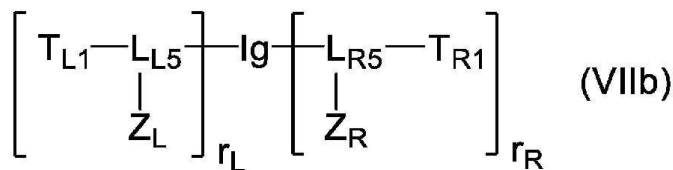
[0517] Z_L은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

[0518] Z_R은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

[0519] 제1 수식 부분에 의한 상기 번역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 번역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [132] 내지 [135]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0520] [137] 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIb):

[0521] [화34]



[0522]

[0523] [식 중,

[0524] I_g는, 상기 번역글로불린 단위를 나타내고,

[0525] L_{L5} 및 L_{R5}는, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

[0526] Z_L은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

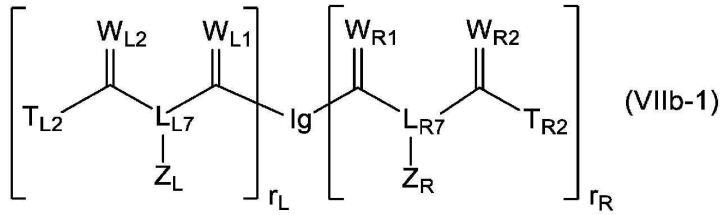
[0527] Z_R은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

[0528] T_{L1} 및 T_{R1}은, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[0529] 제1 수식 부분에 의한 상기 번역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 번역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [132] 내지 [136]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0530] [138] 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIb-1):

[0531] [화35]



[0532]

[0533] [식 중,

[0534] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0535] W_{L1} 및 W_{L2}, 및 W_{R1} 및 W_{R2}는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0536] L_{L7} 및 L_{R7}은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

[0537] Z_L은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

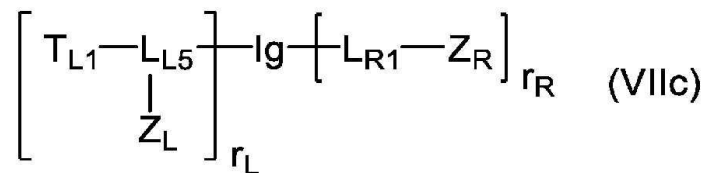
[0538] Z_R은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

[0539] T_{L2} 및 T_{R2}는, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[0540] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [132] 내지 [137]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0541] [139] 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIc):

[0542] [화36]



[0543]

[0544] [식 중,

[0545] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0546] L_{R1}은, 제1 링커를 나타내고,

[0547] L_{L5}는, 제5 링커를 나타내고,

[0548] Z_L은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

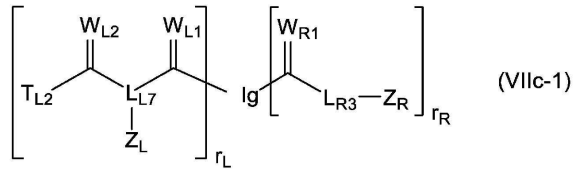
[0549] Z_R은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

[0550] T_{L1}은, 1가의 기를 나타내고,

[0551] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [132] 내지 [138]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0552] [140] 상기 컨쥬게이트 또는 그 염이, 하기 식 (VIIc-1):

[0553] [화37]



[0554]

[0555] [식 중,

[0556] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0557] W_{L1} 및 W_{L2} , 및 W_{R1} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0558] L_{R3} 은, 제3 링커를 나타내고,

[0559] L_{L7} 은, 제7 링커를 나타내고,

[0560] Z_{L} 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

[0561] Z_{R} 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

[0562] T_{L2} 는, 1가의 기를 나타내고,

[0563] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{L} , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{R} 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는, [132] 내지 [139]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0564] [141] 제1 및 제2 기능성 물질이, 각각 독립적으로, 약물, 표지 물질, 친화성 물질, 수송용 물질 또는 안정화제인, [132] 내지 [140]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0565] [142] 제1 및 제2 기능성 물질 중 한쪽이, 전장 항체 또는 그 프래그먼트이거나, 제1 및 제2 기능성 물질 중 쌍방이, 각각 독립적으로, 전장 항체 또는 그 프래그먼트인, [132] 내지 [141]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0566] [143] 컨쥬게이트가 추가의 수식 부분을 더 포함하는, [132] 내지 [142]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0567] [144] 추가의 수식 부분이, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이고, 상기 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함되는, [143]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0568] [145] 상기 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는, [144]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

[0569] [146] 상기 2개의 중쇄의 정상 영역 중의 1개 이상의 위치가, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치인, [145]의 컨쥬게이트 또는 그 염.

발명의 효과

[0570] 본 발명에 의하면, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄를 포함하는 면역글로불린 단위)에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 수식할 수 있다.

[0571] 또한, 본 발명에 의하면, 항체의 구성 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 수식하면서, 위치 선택적으로 수식된 항체를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0572] [도 1] 도 1은, 식 (I)로 표시되는 본 발명의 화합물 또는 그 염에 의한 항체의 구성 단위의 수식을 나타내는 모식도이다.

[도 2] 도 2는, 본 발명의 일 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 3] 도 3은, 본 발명의 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 4] 도 4는, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 5] 도 5는, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 6] 도 6은, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 7] 도 7은, 본 발명의 일 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 8] 도 8은, 본 발명의 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 9] 도 9는, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 10] 도 10은, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 11] 도 11은, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 12] 도 12는, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 13] 도 13은, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 14] 도 14는, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 15] 도 15는, 본 발명의 또 다른 실시형태의 개요를 나타내는 도면이다.

[도 16] 도 16은, 각 형질 전환체에 있어서의 폴리펩타이드의 발현을 나타내는 도면이다.

[도 17-1] 도 17-1은, 폴리펩타이드 QET-Z34CM-PA32-Fc3K(서열번호 1)와 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 17-2] 도 17-2는, 폴리펩타이드 QET-Z34CM-PA48-Fc3K(서열번호 2)와 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 17-3] 도 17-3은, 폴리펩타이드 QET-Fc3-PA32-Z34CM(서열번호 3)과 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 17-4] 도 17-4는, 폴리펩타이드 QET-Fc3K-PA48-Z34CM(서열번호 4)과 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 17-5] 도 17-5는, 폴리펩타이드 QET-Fc3K-PA32-ProAR(서열번호 5)과 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 17-6] 도 17-6은, 폴리펩타이드 QET-Fc3K-PA48-ProAR(서열번호 6)과 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 17-7] 도 17-7은, 폴리펩타이드 QET-ProAR-PA32-Z34CK(서열번호 7)와 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 17-8] 도 17-8은, 폴리펩타이드 QET-ProAR-PA48-Z34CK(서열번호 8)와 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성을 나타내는 센서그램을 나타내는 도면이다.

[도 18] 도 18은, 펩타이드/항체 결합비의 확인 결과를 나타내는 도면이다.

[도 19-1] 도 19-1은, LC-MS/MS에 의한 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 내의 라이신 잔기의 수식 부위를 나타내는 도면이다.

[도 19-2] 도 19-2는, CID 스펙트럼에 의한, EU 넘버링에 따른 중쇄의 246 위치 또는 248위치의 라이신 잔기의 수식을 나타내는 도면이다.

[도 19-3] 도 19-3은, BioPharma Finder에 의한, 248위치의 라이신 잔기로의 수식의 선택성을 나타내는 도면이다.

[도 20-1] 도 20-1은, EGFR과 세록시맙의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 20-2] 도 20-2는, 태아성 Fc 수용체(FcRn)와 세록시맙의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 20-3] 도 20-3은, FcRn과 세특시맵의 pH 의존적 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 21-1] 도 21-1은, EGFR과, 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 21-2] 도 21-2는, HER2와, 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 21-3] 도 21-3은, FcRn과, 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 21-4] 도 21-4는, FcRn과, 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)의 pH 의존적 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 22-1] 도 22-1은, EGFR과, 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 22-2] 도 22-2는, HER2와, 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 22-3] 도 22-3은, FcRn과, 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 22-4] 도 22-4는, FcRn과, 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4)의 pH 의존적 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 23-1] 도 23-1은, EGFR과, 삼중특이적 항체(M-2)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 23-2] 도 23-2는, HER2와, 삼중특이적 항체(M-2)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 23-3] 도 23-3은, PD-1과, 삼중특이적 항체(M-2)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 23-4] 도 23-4는, FcRn과 삼중특이적 항체(M-2)의 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 23-5] 도 23-5는, FcRn과 삼중특이적 항체(M-2)의 pH 의존적 친화성을 나타내는 센서그램이다.

[도 24-1] 도 24-1은, 유세포 분석(Flow Cytometry)에 의해 산출된 세특시맵(Cmab), 트라스투주맵(Tmab), 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4), Tribcibi Fab-세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-2)가 결합한 SKBR-3세포(HER2 양성), A-431세포(EGFR 양성)의 양성률을 나타내는 도면이다.

[도 24-2] 도 24-2는, 유세포 분석에 의한 SKBR-3 세포(HER2 양성), A-431 세포(EGFR 양성) 및 T세포(PD-1 양성)에 대한 세특시맵(Cmab)의 결합 평가를 나타내는 도면이다.

[도 24-3] 도 24-3은, 유세포 분석에 의한 SKBR-3 세포(HER2 양성) 및 A-431 세포(EGFR 양성)에 대한 트라스투주맵(Tmab)의 결합의 평가를 나타내는 도면이다.

[도 24-4] 도 24-4는, 유세포 분석에 의한 SKBR-3 세포(HER2 양성) 및 A-431 세포(EGFR 양성)에 대한 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3) 결합의 평가를 나타내는 도면이다.

[도 24-5] 도 24-5는, 유세포 분석에 의한 SKBR-3 세포(HER2 양성) 및 A-431 세포(EGFR 양성)에 대한 bi-specific 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4) 결합의 평가를 나타내는 도면이다.

[도 24-6] 도 24-6은, 유세포 분석에 의한 T세포(PD-1 양성)에 대한 펄브롤리주맵(Pb1)의 결합의 평가를 나타내는 도면이다.

[도 24-7] 도 24-7은, 유세포 분석에 의한 SKBR-3 세포(HER2 양성), A-431 세포(EGFR 양성) 및 T세포(PD-1 양성)에 대한 삼중특이적 항체(펄브롤리주맵 Fab-세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-2)의 결합 평가를 나타내는 도면이다.

[도 24-8] 도 24-8은, 유세포 분석에 의해 산출된 세특시맵(Cmab), 펄브롤리주맵(Pb1), 삼중특이적 항체(펄브롤리주맵-Fab-세특시맵-Fab)(M-2)가 결합한 T세포(PD-1 양성)의 양성률을 나타내는 도면이다.

[도 25] 도 25는, CD3-VHH-PA24H6-AzF(V-1) 발현의 SDS-PAGE를 나타내는 도면이다.

[도 26] 도 26은, CD3-VHH(V-1)의 친화성의 평가 결과를 나타내는 도면이다.

[도 27] 도 27은, CD3-VHH(V-1)의 친화성의 평가 결과를 나타내는 도면이다.

[도 28] 도 28은, 6종류의 친화성 펩타이드의 SDS-PAGE를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 일반적인 용어 정의

본 명세서에 있어서, 특정 발명 또는 사항의 설명에 사용되는 용어 및 표현은, 다른 발명 또는 사항의 설명에서도 원용할 수 있다. 따라서, 특정 발명 또는 사항의 설명에 사용되는 용어 및 표현의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 이러한 용어 및 표현에 기술된 다른 발명 또는 사항에 대해서도 동일해도 좋다.

본 발명에 있어서, 용어 「항체」는, 이하와 같다. 또한, 용어 「면역글로불린 단위」는, 이러한 항체의 기본 구성 요소인 2개의 단량체 단위에 대응하는 것이며, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 단위이다. 따라서, 면역글로불린 단위에 대하여, 그 유래, 종류(폴리클로날 또는 모노클로날, 아이소타입, 및 전장 항체 또는 항체 단편), 항원, 아미노산 잔기(예, 라이신 잔기)의 위치, 및 위치선택성 등의 용어 및 표현의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 이하에 설명하는 항체의 것과 동일하며, 표현 「항체」와 교환 가능하게 사용된다.

항체의 유래는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 포유 동물, 조류(예, 닭) 등의 동물에서 유래하는 것이라도 좋다. 바람직하게는, 면역글로불린 단위는, 포유 동물에서 유래한다. 이러한 포유 동물로서는, 예를 들어, 영장류(예, 인간, 원숭이, 침팬지), 설치류(예, 생쥐, 쥐, 모르모트, 햄스터, 토끼), 어원 동물(예, 개, 고양이), 가축(예, 소, 돼지, 염소), 사육 동물(예, 말, 양)을 들 수 있고, 바람직하게는 영장류 또는 설치류이고, 보다 바람직하게는 인간이다.

항체의 종류는, 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체라도 좋다. 항체는 또한, 2개의 항체(예, IgG, IgD, IgE), 또는 4가 이상의 항체(예, IgA 항체, IgM 항체)라도 좋다. 바람직하게는, 항체는, 모노클로날 항체이다. 모노클로날 항체로서는, 예를 들어, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 소정의 당쇄가 부가된 항체(예, N형 당쇄 결합 컨센서스 서열 등의 당쇄 결합 컨센서스 서열을 갖도록 개변된 항체), 2중 특이적 항체, Fc 영역 단백질, Fc 융합 단백질, 및 디설피드 결합 환원항체를 들 수 있다. 모노클로날 항체의 아이소타입으로서는, 예를 들어, IgG(예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, IgE, 및 IgY를 들 수 있다. 본 발명에서는, 모노클로날 항체로서, 전장 항체, 또는 가변 영역 및 CH1 도메인 및 CH2 도메인을 포함하는 항체 단편을 이용할 수 있지만, 전장 항체가 바람직하다. 항체는, 바람직하게는 인간 IgG 모노클로날 항체이고, 보다 바람직하게는 인간 IgG 전장 모노클로날 항체이다.

항체의 항원으로서, 임의의 항원을 사용할 수 있다. 예를 들어, 이러한 항원으로서, 단백질 [올리고펩타이드, 폴리펩타이드를 포함한다. 당 등의 생체 분자에서 수식된 단백질(예, 당 단백질)이라도 좋다], 당쇄, 핵산, 저분자 화합물을 들 수 있다. 바람직하게는, 항체는, 단백질을 항원으로 하는 항체라도 좋다. 단백질로서는, 예를 들어, 세포막 수용체, 세포막 수용체 이외의 세포막 단백질(예, 세포외 기질 단백질), 리간드, 가용성 수용체를 들 수 있다.

보다 구체적으로, 항체의 항원인 단백질은, 질환 표적 단백질이라도 좋다. 질환 표적 단백질로서는, 예를 들어, 이하를 들 수 있다.

(1) 암 영역

PD-L1, GD2, PDGFR α(혈소판 유래 성장 인자 수용체), CD22, HER2, 포스포티딜세린(PS), EpCAM, 피브로넥틴, PD-1, VEGFR-2, CD33, HGF, gpNMB, CD27, DEC-205, 엽산 수용체, CD37, CD19, Trop2, CEACAM5, S1P, HER3, IGF-1R, DLL4, TNT-1/B, CPAAs, PSMA, CD20, CD105(엔도글린), ICAM-1, CD30, CD16A, CD38, MUC1, EGFR, KIR2DL1,2, NKG2A, 테나신-C(tenascin-C), IGF(인슐린 유사 성장 인자(Insulin-like growth factor)), CTLA-4, 메소텔린(mesothelin), CD138, c-Met, Ang2, VEGF-A, CD79b, ENPD3, 엽산 수용체 α, TEM-1, GM2, 글리피칸 3, 마크로파지 억제 인자(macrophage inhibitory factor), CD74, Notch1, Notch2, Notch3, CD37, TLR-2, CD3, CSF-1R, FGFR2b, HLA-DR, GM-CSF, EphA3, B7-H3, CD123, gpA33, Frizzled7 수용체, DLL4, VEGF, RSP0, LIV-1, SLITRK6, Nectin-4, CD70, CD40, CD19, SEMA4D(CD100), CD25, MET, 조직 인자(Tissue Factor), IL-8, EGFR, cMet, KIR3DL2, Bst1(CD157), P-카드헤린, CEA, GITR, TAM(종양 관련 마크로파지(tumor associated macrophage)), CEA, DLL4, Ang2, CD73, FGFR2, CXCR4, LAG-3, GITR, Fucosyl GM1, IGF-1, 안지오펜이오티

2(Angiopoietin 2), CSF-1R, FGFR3, OX40, BCMA, ErbB3, CD137(4-1BB), PTK7, EFNA4, FAP, DR5, CEA, Ly6E, CA6, CEACAM5, LAMP1, 조직 인자, EPHA2, DR5, B7-H3, FGFR4, FGFR2, α 2-P1, A33, GDF15, CAIX, CD166, ROR1, GTR, BCMA, TBA, LAG-3, EphA2, TIM-3, CD-200, EGFRvIII, CD16A, CD32B, PIGF, Ax1, MICA/B, 톰센-프리덴라이히(Thomsen-Friedenreich), CD39, CD37, CD73, CLEC12A, Lgr3, 트랜스페린 수용체, TGF β , IL-17, 5T4, RTK, 면역 억제 단백질(Immune Suppressor Protein), NaPi2b, 루이스 혈액형 B항원, A34, Lysil-Oxidase, DLK-1, TROP-2, α 9인테그린, TAG-72(CA72-4), CD70

[0582] (2) 자기 면역 질환 · 염증성 질환

[0583] IL-17, IL-6R, IL-17R, INF- α , IL-5R, IL-13, IL-23, IL-6, ActRIIB, β 7-인테그린(β 7-Integrin), IL-4 α R, HAS, 에오타신-1(Eotaxin-1), CD3, CD19, TNF- α , IL-15, CD3 ϵ , 피브로넥틴(Fibronectin), IL-1 β , IL-1 α , IL-17, TSLP(흉선 기질 림프포이에틴(Thymic Stromal Lymphopoietin)), LAMP(알파4 베타 7 인테그린), IL-23, GM-CSFR, TSLP, CD28, CD40, TLR-3, BAFF-R, MAdCAM, IL-31R, IL-33, CD74, CD32B, CD79B, IgE(면역글로불린 E), IL-17A, IL-17F, C5, FcRn, CD28, TLR4, MCAM, B7RP1, CXCR1,2 리간드(Ligands), IL-21, Cadherin-11, CX3CL1, CCL20, IL-36R, IL-10R, CD86, TNF- α , IL-7R, Kv1.3, α 9인테그린, LIFHT

[0584] (3) 뇌신경 질환

[0585] CGRP, CD20, β 아밀로이드, β 아밀로이드 프로토펙틴, 칼시토닌 유전자 관련 펩타이드 수용체(Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor), LINGO(Ig 도메인 컨테이너1(Ig Domain Containing1)), α 시누클레인, 세포외 타우(tau), CD52, 인슐린 수용체, 타우 단백질, TDP-43, SOD1, TauC3, JC 바이러스

[0586] (4) 감염증

[0587] 클로스트리디움 디피실리 독소 B(Clostridium Difficile toxin B), 사이토메갈로바이러스, RS바이러스, LPS, 황색포도상구균 알파독소(S.Aureus Alpha-toxin), M2e 단백질, Psl, PcrV, 황색포도상구균 독소(S.Aureus toxin), 인플루엔자 A, 알지네이트(Alginate), 황색 포도구균, PD-L1, 인플루엔자 B, 아시네토박터, F-단백질, Env, CD3, 병원성 대장균, 클레브시엘라, 폐렴구균

[0588] (5) 유전성 · 희소 질환

[0589] 아밀로이드 AL, SEMA4D(CD100), 인슐린 수용체, ANGPTL3, IL4, IL13, FGF23, 부신 피질 자극 호르몬, 트랜스타이레틴, 헌팅틴

[0590] (6) 안질환

[0591] 인자 D, IGF-1R, PGDFR, Ang2, VEGF-A, CD-105(엔도글린(Endoglin)), IGF-1R, β 아밀로이드

[0592] (7) 뼈 · 정형외과 영역

[0593] 스크레로스틴(Sclerostin), 미오스타틴(Myostatin), Dickkopf-1, GDF8, RANKL, HAS, 시글렉-15(Siglec-15)

[0594] (8) 혈액 질환

[0595] vWF, 인자 IXa, 인자 X, IFN γ , C5, BMP-6, 페로포틴(Ferroportin), TFPI

[0596] (9) 기타 질환

[0597] BAFF(B 세포 활성화 인자(B cell activating factor)), IL-1 β , PCSK9, NGF, CD45, TLR-2, GLP-1, TNFR1, C5, CD40, LPA, 프로락틴 수용체, VEGFR-1, CB1, 엔도글린, PTH1R, CXCL1, CXCL8, IL-1 β , AT2-R, IAPP

[0598] 모노클로날 항체의 구체예로서는, 특정의 키메라 항체(예, 리톡시맙, 바실릭시맙, 인플릭시맙, 세톡시맙, 실톡시맙, 디누톡시맙, 오르타톡사시맙), 특정의 인간화 항체(예, 다클리주맙, 팔리비주맙, 트라스투주맙, 알렘투주맙, 오말리주맙, 에팔리주맙, 베바시주맙, 나탈리주맙(IgG4), 토실리주맙, 에쿨리주맙(IgG2), 모가물리주맙, 페르투주맙, 오비투주맙, 베돌리주맙, 캄브롤리주맙(IgG4), 메폴리주맙, 엘로투주맙, 다라투무맙, 익세키주맙(IgG4), 레슬리주맙(IgG4), 아테졸리주맙), 특정의 인간 항체(예, 아달리우맙(IgG1), 파니투무맙, 골리우맙, 우스테키누맙, 카나키누맙, 오파투무맙, 데노수맙(IgG2), 이필리우맙, 벨리우맙, 락시바쿠맙, 라무시우맙, 니볼루맙, 듀필루맙(IgG4), 세쿠키누맙, 에볼로쿠맙(IgG2), 알릴로쿠맙, 네시투무맙, 브로달루맙(IgG2), 올랄라투맙)을 들 수 있다(IgG 서브 타입으로 언급하고 있지 않은 경우, IgG1임을 나타낸다).

[0599] 본 발명에서는 항체 중의 중쇄의 정상 영역에 있어서의 특정의 아미노산 잔기를 위치 선택적으로 수식할 수 있

다. 이러한 특성의 아미노산 잔기로서는, 예를 들어, 라이신 잔기, 티로신 잔기, 세린 잔기 및 트레오닌 잔기를 들 수 있다. 예를 들면, 인간 IgG1 등의 인간 IgG에서는, 중쇄 정상 영역에 존재하는 하기 아미노산 잔기가 항체 표면에 노출될 수 있으므로, 이들 아미노산 잔기를 특정의 절단성 부위의 도입에 이용할 수 있다(아미노산 잔기의 위치는 EU 넘버링에 의한; http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html을 참조).

(1) 노출 라이선스 잔기

CH2 도메인(예: 246위치, 248위치, 274위치, 288위치, 290위치, 317위치, 320위치, 322위치)

CH3 도메인 (예: 360위치, 414위치, 439위치)

(2) 노출 티로신 잔기

CH2 도메인 (예: 278위치, 296위치, 300위치)

CH3 도메인(예, 436위치)

(3) 노출 세린 잔기

CH2 도메인 (예: 254위치, 267위치, 298위치)

CH3 도메인 (예: 400위치, 415위치, 440위치)

(4) 노출 트레오닌 잔기

CH2 도메인(예, 256위치, 289위치)

CH3 도메인 (예: 335위치, 359위치)

항체 중의 아미노산 잔기의 위치, 및 중쇄의 정상 영역의 위치(예, CH2 도메인)에 대해서는 EU 넘버링에 따른다 (http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html을 참조). 예를 들어, 인간 IgG를 대상으로 하는 경우, 246위치의 라이신 잔기는, 인간 IgG CH2 영역의 16번째 아미노산 잔기에 상당하고, 248위치의 라이신 잔기는, 인간 IgG CH2 영역의 18번째 아미노산 잔기에 상당하고, 288위치의 라이신 잔기는, 인간 IgG CH2 영역의 58번째 아미노산 잔기에 상당하고, 290위치의 라이신 잔기는, 인간 IgG CH2 영역의 60번째 아미노산 잔기에 상당하고, 317위치의 라이신 잔기는, 인간 IgG CH2 영역의 87번째 아미노산 잔기에 상당한다. 246/248 위치의 표기는, 246 또는 248위치의 라이신 잔기가 대상임을 나타낸다. 288/290위치의 표기는, 288 또는 290위치의 라이신 잔기가 대상임을 나타낸다.

바람직하게는, 위치 선택적으로 수식되는 중쇄의 정상 영역에 있어서의 특정의 아미노산 잔기는, 라이신 잔기(예, 246/248위치, 또는 288/290위치의 라이신 잔기)를 위치 선택적으로 수식할 수 있다. 본 명세서에서, 「위치 선택적」 또는 「위치 선택성」이란, 항체에 있어서 특정의 아미노산 잔기가 특정 영역에 편재되어 있지 않음에도 불구하고, 항체 중의 특정의 아미노산 잔기와 결합 가능한 소정의 구조 단위가 항체의 특정 영역에 편재되는 것을 말한다. 따라서, 「위치 선택적으로 갖는», 「위치 선택적 결합», 「위치 선택성에서의 결합」 등의 위치 선택성과 관련된 표현은 1개 이상의 특정의 아미노산 잔기를 포함하는 표적 영역에 있어서의 소정의 구조 단위의 보유율 또는 결합률이, 표적 영역에 있어서의 특정한 아미노산 잔기와 동종인 복수개의 아미노산 잔기를 포함하는 비표적 영역에 있어서의 상기 구조 단위의 보유율 또는 결합률보다 유의한 수준에서 높은 것을 의미한다. 이러한 위치 선택성은 50% 이상이며, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 80% 이상, 특히 바람직하게는 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.5% 이상, 또는 100%라도 좋다. 본 발명에 따르면, 펩타이드를 함유하는 링커를 이용하지 않고, 항체 중의 중쇄에서 특정 라이신 잔기를 위치 선택적으로 수식할 수 있다. 펩타이드 부분은, 잠재적인 면역 원성을 가지며, 또한 혈중에서 가수 분해되기 쉽다. 따라서, 펩타이드 부분을 포함하는 링커 사용의 회피는, 임상 응용에 바람직한 것이다.

본 발명에서는, 중쇄의 정상 영역에 있어서의 특정의 아미노산 잔기(예, 특정의 위치의 라이신 잔기)가 위치 선택적으로 수식되어 있는 한, 다른 위치의 특정의 아미노산 잔기가 위치 선택적으로 더 수식되어 있어도 좋다. 예를 들어, 항체에서 소정 위치의 특정의 아미노산 잔기를 위치 선택적으로 수식하는 방법은, 국제공개 제 2018/199337호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2019/240287호, 및 국제공개 제2020/090979호에 기재되어 있다. 이러한 특정의 아미노산 잔기로서는, 수식하기 쉬운 측쇄(예, 아미노기, 카르복시기, 아미드기, 하이드록시기, 티올기, 인산기, 및 당기)가 포함되는 잔기(예, 아미노산 잔기, 아미노기, 카르복시기, 아미드기, 하이드록시기, 티올기, 인산기, 및 당기)를 포함한다.

트록시기, 티올기)를 갖는 아미노산 잔기(예, 라이신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민 잔기, 트레오닌 잔기, 세린 잔기, 티로신 잔기, 시스테인 잔기)를 이용할 수 있지만, 바람직하게는 아미노기를 포함하는 측쇄를 갖는 라이신 잔기, 하이드록시기를 포함하는 측쇄를 갖는 티로신 잔기, 세린 잔기 및 트레오닌 잔기, 또는 티올기를 포함하는 측쇄를 갖는 시스테인 잔기이며, 보다 바람직하게는 라이신 잔기라도 좋다(즉, 246/248위치의 라이신 잔기, 288/290위치의 라이신 잔기, 및 317위치의 라이신 잔기 중, 2개의 라이신 잔기가 위치 선택적으로 이중 수식되어 있어도 좋고, 3개의 라이신 잔기가 위치 선택적으로 삼중 수식되어 있어도 좋다).

- [0615] (할로겐 원자)
- [0616] 할로겐 원자로서는, 예를 들어, 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자, 요오드 원자를 들 수 있다.
- [0617] (1가의 기)
- [0618] 1가의 기로서는, 예를 들어, 1가의 탄화수소기, 및 1가의 복소환기를 들 수 있다.
- [0619] 1가의 기는, 1개 이상(예를 들어 1 내지 10개, 바람직하게는 1 내지 8개, 보다 바람직하게는 1 내지 6개, 보다 더 바람직하게는 1 내지 5개, 특히 바람직하게는 1 내지 3개)의 후술하는 치환기에 의해 치환되어 있어도 좋다.
- [0620] (1가의 탄화수소기, 및 그에 관련되는 용어)
- [0621] 1가의 탄화수소기로서는, 예를 들어, 1가의 채상 탄화수소기, 1가의 지환식 탄화수소기, 및 1가의 방향족 탄화수소기를 들 수 있다.
- [0622] 1가의 채상 탄화수소기란, 채상 구조만으로 구성된 탄화수소기를 의미하고, 주쇄에 환상 구조를 포함하지 않는다. 다만, 채상 구조는 직쇄상이라도 분기상이라도 좋다. 1가의 채상 탄화수소기로서는, 예를 들어, 알킬, 알케닐, 알킬닐을 들 수 있다. 알킬, 알케닐, 및 알킬닐은, 직쇄상, 또는 분기상 중 어느 것이라도 좋다.
- [0623] 알킬로서는, 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬이 바람직하고, 탄소 원자수 1 내지 6의 알킬이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 1 내지 4의 알킬이 더욱 바람직하다. 알킬이 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬로서는, 예를 들어 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, s-부틸, 이소부틸, t-부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 도데실을 들 수 있다.
- [0624] 알케닐로서는, 탄소 원자수 2 내지 12의 알케닐이 바람직하고, 탄소 원자수 2 내지 6의 알케닐이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 2 내지 4의 알케닐이 더욱 바람직하다. 알케닐이 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 탄소 원자수 2 내지 12의 알케닐로서는, 예를 들어, 비닐, 프로페닐, n-부테닐을 들 수 있다.
- [0625] 알킬닐로서는, 탄소 원자수 2 내지 12의 알킬닐이 바람직하고, 탄소 원자수 2 내지 6의 알킬닐이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 2 내지 4의 알킬닐이 더욱 바람직하다. 알킬닐이 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 탄소 원자수 2 내지 12의 알킬닐로서는, 예를 들어, 에틸닐, 프로피닐, n-부티닐을 들 수 있다.
- [0626] 1가의 채상 탄화수소기로서는, 알킬이 바람직하다.
- [0627] 1가의 지환식 탄화수소기란, 환 구조로서 지환식 탄화수소만을 포함하고, 방향족환을 포함하지 않는 탄화수소기를 의미하고, 지환식 탄화수소는 단환, 다환 중 어느 것이라도 좋다. 단, 지환식 탄화수소만으로 구성되어 있을 필요는 없고, 그 일부에 채상 구조를 포함하고 있어도 좋다. 1가의 지환식 탄화수소기로서는, 예를 들어, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알킬닐을 들 수 있고, 이것들은 단환, 다환 중 어느 것이라도 좋다.
- [0628] 사이클로알킬로서는, 탄소 원자수 3 내지 12의 사이클로알킬이 바람직하고, 탄소 원자수 3 내지 6의 사이클로알킬이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 5 내지 6의 사이클로알킬이 더욱 바람직하다. 사이클로알킬이 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 탄소 원자수 3 내지 12의 사이클로알킬로서는, 예를 들어, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실을 들 수 있다.
- [0629] 사이클로알케닐로서는, 탄소 원자수 3 내지 12의 사이클로알케닐이 바람직하고, 탄소 원자수 3 내지 6의 사이클로알케닐이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 5 내지 6의 사이클로알케닐이 더욱 바람직하다. 사이클로알케닐이 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 탄소 원자수 3 내지 12의 사이클로알케닐로서는, 예를 들어, 사이클로프로페닐, 사이클로부테닐, 사이클로펜테닐, 사이클로헥세닐을 들

수 있다.

- [0630] 사이클로알킬닐로서는, 탄소 원자수 3 내지 12의 사이클로알킬닐이 바람직하고, 탄소 원자수 3 내지 6의 사이클로알킬닐이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 5 내지 6의 사이클로알킬닐이 더욱 바람직하다. 사이클로알킬닐이 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 탄소 원자수 3 내지 12의 사이클로알킬닐로서는, 예를 들어, 사이클로프로피닐, 사이클로부티닐, 사이클로펜티닐, 사이클로헥시닐을 들 수 있다.
- [0631] 1가의 치환식 탄화수소기는 사이클로알킬이 바람직하다.
- [0632] 1가의 방향족 탄화수소기란, 방향족 구조를 포함하는 탄화수소기를 의미한다. 다만, 방향족환만으로 구성되어 있을 필요는 없고, 그 일부에 채상 구조나 치환식 탄화수소를 포함하고 있어도 좋고, 방향족환은 단환, 다환 중 어느 것이라도 좋다. 1가의 방향족 탄화수소기로서는, 탄소 원자수 6 내지 12의 아릴이 바람직하고, 탄소 원자수 6 내지 10의 아릴이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 6의 아릴이 더욱 바람직하다. 1가의 방향족 탄화수소기가 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 탄소 원자수 6 내지 12의 아릴로서는, 예를 들어, 페닐, 나프틸을 들 수 있다.
- [0633] 1가의 방향족 탄화수소기로서는, 페닐이 바람직하다.
- [0634] 이것들 중에서도, 1가의 탄화수소기로서는, 알킬, 사이클로알킬, 아릴이 바람직하다.
- [0635] (1가의 복소환기 및 그에 관련되는 용어)
- [0636] 1가의 복소환기란, 복소환식 화합물의 복소환으로부터 수소 원자 1개를 제거한 기를 말한다. 1가의 복소환기는, 1가의 방향족 복소환기, 또는 1가의 비방향족 복소환기이다. 복소환기를 구성하는 헤테로 원자로서, 산소 원자, 황 원자, 질소 원자, 인 원자, 붕소 원자 및 규소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 바람직하고, 산소 원자, 황 원자 및 질소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 보다 바람직하다.
- [0637] 1가의 방향족 복소환기로서는, 탄소 원자수 1 내지 15의 방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소 원자수 1 내지 9의 방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소 원자수 1 내지 6의 방향족 복소환기가 더욱 바람직하다. 1가의 방향족 복소환기가 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 1가의 방향족 복소환기로서는, 예를 들어, 피롤릴, 푸라닐, 티오펜릴, 피리디닐, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 피라졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 옥사졸릴, 이소옥사졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 인돌릴, 푸리닐, 안트라퀴놀릴, 카르바조닐, 플루오레닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 퀴나졸리닐, 프탈라지닐을 들 수 있다.
- [0638] 1가의 비방향족 복소환기로서는, 탄소 원자수 2 내지 15의 비방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소 원자수 2 내지 9의 비방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소 원자수 2 내지 6의 비방향족 복소환기가 더욱 바람직하다. 1가의 비방향족 복소환기가 치환기를 갖는 경우, 상기 탄소 원자수에 치환기의 탄소 원자수는 포함되지 않는다. 1가의 비방향족 복소환기로서는, 예를 들어, 옥시라닐, 아지리디닐, 아제티디닐, 옥세타닐, 티에타닐, 피롤리디닐, 디하이드로푸라닐, 테트라하이드로푸라닐, 디옥솔라닐, 테트라하이드로티오펜릴, 피롤리닐, 이미다졸리디닐, 옥사졸리디닐, 피페리디닐, 디하이드로피라닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 피페라지닐, 디하이드로옥사지닐, 테트라하이드로옥사지닐, 디하이드로피리미디닐, 및 테트라하이드로피리미디닐을 들 수 있다.
- [0639] 이것들 중에서도, 1가의 복소환기로서는, 5원 또는 6원의 복소환기가 바람직하다.
- [0640] (2가의 기)
- [0641] 2가의 기는, 2가의 직쇄 탄화수소기, 2가의 환상 탄화수소기, 2가의 복소환기, $-C(=O)-$, $-C(=S)-$, $-NR_1-$, $-C(=O)-NR_1-$, $-NR_1-C(=O)-$, $-C(=S)-NR_1-$, $-NR_1-C(=S)-$, $-O-$, $-S-$, $-(O-R_2)_n-$, 및 $-(S-R_2)_m-$ 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1개의 기, 또는 이것들의 2개 이상(예를 들어 2 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 8개, 보다 바람직하게는 2 내지 6개, 보다 더 바람직하게는 2 내지 5개, 특히 바람직하게는 2 또는 3개)의 기를 포함하는 주쇄 구조를 갖는 기이다. R_1 은, 수소 원자, 또는 후술하는 치환기를 나타낸다. R_2 는, 2가의 직쇄 탄화수소기, 2가의 환상 탄화수소기, 또는 2가의 복소환기를 나타낸다. n 및 m 은, 각각 1 내지 10의 정수이고, 바람직하게는 1 내지 8의 정수이고, 보다 바람직하게는 1 내지 6의 정수이고, 보다 더 바람직하게는 1 내지 5의 정수이고, 특히

바람직하게는 1 내지 3의 정수이다.

- [0642] 2가의 직쇄 탄화수소기는, 직쇄 알킬렌, 직쇄 알케닐렌, 또는 직쇄 알키닐렌이다.
- [0643] 직쇄 알킬렌은, 탄소 원자수 1 내지 6의 직쇄 알킬렌이고, 탄소 원자수 1 내지 4의 직쇄 알킬렌이 바람직하다. 직쇄 알킬렌으로서, 예를 들어, 메틸렌, 에틸렌, n-프로필렌, n-부틸렌, n-펜틸렌, n-헥실렌을 들 수 있다.
- [0644] 직쇄 알케닐렌은, 탄소 원자 2 내지 6의 직쇄 알케닐렌이고, 탄소 원자수 2 내지 4의 직쇄 알케닐렌이 바람직하다. 직쇄 알케닐렌으로서, 예를 들어, 에티닐렌, n-프로피닐렌, n-부테닐렌, n-펜테닐렌, n-헥세닐렌을 들 수 있다.
- [0645] 직쇄 알키닐렌은, 탄소 원자수 2 내지 6의 직쇄 알키닐렌이고, 탄소 원자수 2 내지 4의 직쇄 알키닐렌이 바람직하다. 직쇄 알키닐렌으로서, 예를 들어, 에티닐렌, n-프로피닐렌, n-부티닐렌, n-펜티닐렌, n-헥시닐렌을 들 수 있다.
- [0646] 2가의 직쇄 탄화수소기로서는, 직쇄 알킬렌이 바람직하다.
- [0647] 2가의 환상 탄화수소기는, 아릴렌, 또는 2가의 비방향족 환상 탄화수소기이다.
- [0648] 아릴렌으로서, 탄소 원자수 6 내지 14의 아릴렌이 바람직하고, 탄소 원자수 6 내지 10의 아릴렌이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 6의 아릴렌이 특히 바람직하다. 아릴렌으로서, 예를 들어, 페닐렌, 나프틸렌, 안트라세닐렌을 들 수 있다.
- [0649] 2가의 비방향족 환상 탄화수소기로서는, 탄소 원자수 3 내지 12의 단환식 또는 다환식인 2가의 비방향족 환상 탄화수소기가 바람직하고, 탄소 원자수 4 내지 10의 단환식 또는 다환식인 2가의 비방향족 탄화수소기가 보다 바람직하고, 탄소 원자수 5 내지 8의 단환식인 2가의 비방향족 환상 탄화수소기가 특히 바람직하다. 2가의 비방향족 환상 탄화수소기로서는, 예를 들어, 사이클로프로필렌, 사이클로부틸렌, 사이클로펜틸렌, 사이클로헥실렌, 사이클로헵틸렌, 사이클로옥틸렌을 들 수 있다.
- [0650] 2가의 환상 탄화수소기로서는, 아릴렌이 바람직하다.
- [0651] 2가의 복소환기는, 2가의 방향족 복소환기, 또는 2가의 비방향족 복소환기이다. 복소환을 구성하는 헤테로 원자로서, 산소 원자, 황 원자, 질소 원자, 인 원자, 붕소 원자 및 규소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 바람직하고, 산소 원자, 황 원자 및 질소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 보다 바람직하다.
- [0652] 2가의 방향족 복소환기로서는, 탄소 원자수 3 내지 15의 2가의 방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소 원자수 3 내지 9의 2가의 방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소 원자수 3 내지 6의 2가의 방향족 복소환기가 특히 바람직하다. 2가의 방향족 복소환기로서는, 예를 들어, 피롤리딘, 푸란리딘, 티오펜리딘, 피리딘리딘, 피리다진리딘, 피리미딘리딘, 피라진리딘, 트리아진리딘, 피라졸리딘, 이미다졸리딘, 티아졸리딘, 이소티아졸리딘, 옥사졸리딘, 이소옥사졸리딘, 트리아졸리딘, 테트라졸리딘, 인돌리딘, 푸린리딘, 안트라퀴논리딘, 카르바졸리딘, 플루오렌리딘, 퀴놀린리딘, 이소퀴놀린리딘, 퀴나졸리딘, 및 프탈라진리딘을 들 수 있다.
- [0653] 2가의 비방향족 복소환기로서는, 탄소 원자수 3 내지 15의 비방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소 원자수 3 내지 9의 비방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소 원자수 3 내지 6의 비방향족 복소환기가 특히 바람직하다. 2가의 비방향족 복소환기로서는, 예를 들어, 피롤리돈리딘, 피롤리돈리돈리딘, 옥실란리딘, 아지리딘리딘, 아제티딘리딘, 옥세탄리딘, 티에탄리딘, 피롤리딘리딘, 디하이드로푸란리딘, 테트라하이드로푸란리딘, 디옥솔란리딘, 테트라하이드로티오펜리딘, 피롤리딘리딘, 이미다졸리딘리딘, 옥사졸리딘리딘, 피페리딘리딘, 디하이드로피란리딘, 테트라하이드로피란리딘, 테트라하이드로티오피란리딘, 모르폴리딘리딘, 티오모르폴리딘리딘, 피페라진리딘, 디하이드로옥사진리딘, 테트라하이드로옥사진리딘, 디하이드로피리미딘리딘, 및 테트라하이드로피리미딘리딘을 들 수 있다.
- [0654] 2가의 복소환기로서는, 2가의 방향족 복소환기가 바람직하다.
- [0655] 바람직하게는, 2가의 기는, 알킬렌, 아릴렌, $-C(=O)-$, $-NR_1-$, $-C(=O)-NR_1-$, $-NR_1-C(=O)-$, $-O-$, 및 $-(O-R_2)_n-$ 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1개의 기를 포하는 주쇄 구조를 갖는 2가의 기이거나, 또는,
- [0656] 알킬렌, 아릴렌, $-C(=O)-$, $-NR_1-$, $-C(=O)-NR_1-$, $-NR_1-C(=O)-$, $-O-$, 및 $-(O-R_2)_n-$ 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 2개 이상의 기를 포함하는 주쇄 구조를 갖는 2가의 기이고,

- [0657] R_1 이, 수소 원자 또는 알킬이고,
- [0658] R_2 가, 알킬렌 또는 아릴렌이고,
- [0659] n 이, 1 내지 5의 정수(즉, 1, 2, 3, 4, 또는 5)라도 좋다.
- [0660] 알킬렌, 아릴렌, 알킬은, 상술한 것과 동일하다.
- [0661] 2가의 기에서의 주쇄 구조는, 1개 이상(예를 들어 1 내지 10개, 바람직하게는 1 내지 8개, 보다 바람직하게는 1 내지 6개, 보다 더 바람직하게는 1 내지 5개, 특히 바람직하게는 1 내지 3개)의 후술하는 치환기에 의해 치환되어 있어도 좋다.
- [0662] (치환기)
- [0663] 치환기로서는, 이하를 들 수 있다:
- [0664] (i) 할로젠 원자;
- [0665] (ii) 1가의 탄화수소기;
- [0666] (iii) 1가의 복소환기;
- [0667] (iv) 아랄킬;
- [0668] (v) R_a-O- , $R_a-C(=O)-$, $R_a-O-C(=O)-$, 또는 $R_a-C(=O)-O-$ (R_a 는, 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다.); 또는
- [0669] (vi) NR_bR_c- , $NR_bR_c-C(=O)-$, $NR_bR_c-C(=O)-O-$, 또는 $R_b-C(=O)-NR_c-(R_b$ 및 R_c 는, 동일하거나 또는 다르고, 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다.);
- [0670] (vii) 니트로기, 황산기, 설폰산기, 시아노기, 및 카르복실기.
- [0671] 상기 치환기에서의 할로젠 원자, 1가의 탄화수소기, 및 1가의 복소환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 각각, 상술한 것과 동일하다.
- [0672] 아랄킬이란, 아릴알킬을 말한다. 아릴알킬에서의 아릴 및 알킬의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 아랄킬로서는, 탄소 원자수 3 내지 15의 아랄킬이 바람직하다. 이러한 아랄킬로서는, 예를 들어, 벤조일, 페네틸, 나프틸메틸, 나프틸에틸을 들 수 있다.
- [0673] 바람직하게는, 치환기는, 이하라도 좋다:
- [0674] (i) 할로젠 원자;
- [0675] (ii) 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬, 페닐, 또는 나프틸;
- [0676] (iii) 탄소 원자수 3 내지 15의 아랄킬;
- [0677] (iv) 5원 또는 6원의 복소환;
- [0678] (v) R_a-O- , $R_a-C(=O)-$, $R_a-O-C(=O)-$, 또는 $R_a-C(=O)-O-$ (R_a 는, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬을 나타낸다.);
- [0679] (vi) NR_bR_c- , $NR_bR_c-C(=O)-$, $NR_bR_c-C(=O)-O-$, 또는 $R_b-C(=O)-NR_c-(R_b$ 및 R_c 는, 동일하거나 또는 다르고, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬을 나타낸다.); 또는
- [0680] (vii) 상기 (vii)에서 열거한 것과 같은 기.
- [0681] 보다 바람직하게는, 치환기는, 이하라도 좋다:
- [0682] (i) 할로젠 원자;
- [0683] (ii) 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬;
- [0684] (iii) R_a-O- , $R_a-C(=O)-$, $R_a-O-C(=O)-$, 또는 $R_a-C(=O)-O-$ (R_a 는, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬

을 나타낸다.);

[0685] (iv) NR_bR_c- , $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-$, $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, 또는 $\text{R}_b-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_c-(\text{R}_b$ 및 R_c 는, 동일하거나 또는 다르고, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 12의 알킬을 나타낸다.); 또는

[0686] (v) 상기 (vii)에서 열거한 것과 같은 기.

[0687] 보다 더 바람직하게는, 치환기는, 이하라도 좋다:

[0688] (i) 할로겐 원자;

[0689] (ii) 탄소 원자수 1 내지 6의 알킬;

[0690] (iii) $\text{R}_a-\text{O}-$, $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-$, $\text{R}_a-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, 또는 $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{R}_a$ 는, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 6의 알킬을 나타낸다.);

[0691] (iv) NR_bR_c- , $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-$, $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, 또는 $\text{R}_b-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_c-(\text{R}_b$ 및 R_c 는, 동일하거나 또는 다르고, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 6의 알킬을 나타낸다.); 또는

[0692] (v) 상기 (vii)에서 열거한 것과 같은 기.

[0693] 특히 바람직하게는, 치환기는, 이하라도 좋다:

[0694] (i) 할로겐 원자;

[0695] (ii) 탄소 원자수 1 내지 4의 알킬;

[0696] (iii) $\text{R}_a-\text{O}-$, $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-$, $\text{R}_a-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, 또는 $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{R}_a$ 는, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 4의 알킬을 나타낸다.);

[0697] (iv) NR_bR_c- , $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-$, $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, 또는 $\text{R}_b-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_c-(\text{R}_b$ 및 R_c 는, 동일하거나 또는 다르고, 수소 원자, 또는 탄소 원자수 1 내지 4의 알킬을 나타낸다.); 또는

[0698] (v) 상기 (vii)에서 열거한 것과 같은 기.

[0699] (생체 직교성 관능기)

[0700] 생체 직교성 관능기는, 생체 구성 성분(예, 아미노산, 단백질, 핵산, 지질, 당, 인산)과는 반응하지 않거나, 또는 생체 구성 성분(예, 아미노산, 단백질, 핵산, 지질, 당, 인산)과는 반응하지 않거나, 또는 생체 구성 성분 이외의 성분에 대하여 선택적으로 반응하는 기를 말한다. 생체 직교성 관능기는, 당해 기술분야에서 주지이다(예, Sharpless K. B. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 40, 2004(2015); Bertozzi C. R. et al., Science 291, 2357(2001); Bertozzi C. R. et al., Nature Chemical Biology 1, 13(2005)을 참조).

[0701] 본 발명에서는, 생체 직교성 관능기로서, 단백질에 대한 생체 직교성 관능기가 사용된다. 본 발명의 시약에 의해 유도체화되어야 할 항체는, 단백질이기 때문이다. 단백질에 대한 생체 직교성 관능기는, 단백질을 구성하는 천연의 20종의 아미노산 잔기의 측쇄와 반응하지 않거나, 또는 당해 측쇄에 대한 반응의 속도가 느리지만, 목적의 관능기와 반응하는 기이다. 단백질을 구성하는 천연의 20종의 아미노산은, 알라닌(A), 아스파라긴(N), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글리신(G), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프롤린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 티로신(Y), 발린(V), 아스파라긴산(D), 글루타민산(E), 아르기닌(R), 히스티딘(H), 및 라이신(L)이다. 이들 천연의 20종의 아미노산 중, 측쇄가 없는(즉, 수소 원자인) 글리신, 및 측쇄가 탄화수소기인(즉, 황 원자, 질소 원자, 및 산소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 헤테로 원자를 측쇄에 포함하지 않는) 알라닌, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 발린은, 통상의 반응에 대하여 불활성성이다. 따라서, 단백질에 대한 생체 직교성 관능기는, 통상의 반응에 대하여 불활성인 측쇄를 갖는 이들 아미노산의 측쇄에 더하여, 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘, 라이신의 측쇄에 대하여 반응하지 않거나, 또는 반응의 속도가 느리지만, 목적의 관능기와 반응하는 기이다.

[0702] 이러한 생체 직교성 관능기로서는, 예를 들어, 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알켄 잔기(바꿔 말하면, 탄소 원자 간 이중 결합을 갖는 최소 단위인 비닐렌(에테닐렌) 부분을 갖고 있으면 좋다. 이하 동일), 알킨 잔기(바꿔 말하면, 탄소 원자 간 삼중 결합을 갖는 최소 단위인 에티닐렌 부분을 갖고 있으면 좋다. 이하

동일), 할로젠 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 하이드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디설파이드 잔기, 티오 에스테르 잔기, α -할로카르보닐 잔기(예, α 위치에 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자 또는 요오드 원자를 갖는 카르보닐 잔기. 이하 동일), 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기를 들 수 있다.

[0703] 생체 직교성 관능기는, 보호되어 있어도, 보호되어 있지 않아도 좋다. 생체 직교성 관능기란, 미보호의 생체 직교성 관능기, 또는 보호된 생체 직교성 관능기를 말한다. 미보호의 생체 직교성 관능기는, 상술한 생체 직교성 관능기에 해당한다. 보호된 생체 직교성 관능기는, 보호기의 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 생성하는 기이다. 보호기의 절단은, 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건) 하에서의 특정한 처리에 의해 행할 수 있다. 이러한 특정한 처리로서는, 예를 들어, (a) 산성 물질, 염기성 물질, 환원제, 산화제, 효소로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 물질에 의한 처리, (b) 광으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 물리 화학적 자극에 의한 처리, 또는 (c) 자기 분해성의 절단성 부분을 포함하는 절단성 링커를 이용한 경우의 방치를 들 수 있다. 이러한 보호기 및 그 절단 조건은, 당해 분야에서의 기술 상식이다(예, G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 20, 571(2012); Feng P. et al., Journal of American Chemical Society. 132, 1500(2010).; Bessodes M. et al., Journal of Controlled Release, 99, 423(2004); DeSimone, J. M., Journal of American Chemical Society. 132, 17928(2010); Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187(2003); Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291(2004)). 온화한 조건에 대한 반응 조건(예, 반응 온도, 반응 시간, 반응 용액)은 후술하는 바와 같다.

[0704] 보호된 생체 직교성 관능기로서는, 예를 들어, 디설파이드 잔기, 에스테르 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 이민 잔기, 비시날디올 잔기를 들 수 있다.

[0705] 바람직하게는, 생체 직교성 관능기는, 미보호의 생체 직교성 관능기이다.

[0706] 보다 바람직하게는, 생체 직교성 관능기는 다른 생체 직교성 관능기와의 반응성(예, 반응 수준 및/또는 반응 특이성)이 우수한 특성의 생체 직교성 관능기라도 좋다. 이러한 생체 직교성 관능기로서는, 아지드 잔기, 알킨 잔기(바람직하게는, 상술한 바와 같은 치환기에 의해 치환되어 있어도 좋은, 탄소 원자간 3중 결합을 갖는 환기), 테트라진 잔기, 알켄 잔기, 티올 잔기, 말레이미드 잔기, 티올 잔기, 푸란 잔기, 및 할로카르보닐 잔기를 들 수 있다. 서로 반응 가능한 2개의 생체 직교성 관능기의 조합은, 예를 들면, 아지드 잔기와 알킨 잔기의 조합, 테트라진 잔기와 알켄 잔기의 조합, 테트라진 잔기와 알킨 잔기의 조합, 티올 잔기와 말레이미드 잔기의 조합, 푸란 잔기와 말레이미드 잔기의 조합, 티올 잔기와 할로카르보닐 잔기의 조합(치환 반응에 의해 할로겐이 티올로 치환된다), 티올 잔기와 다른 티올 잔기의 조합(디설파이드 결합의 생성)을 들 수 있다.

[0707] (기능성 물질)

[0708] 기능성 물질은, 항체에 임의의 기능을 부여하는 물질인 한 특별히 한정되지 않고, 예를 들어, 약물, 표지 물질, 친화성 물질, 수송용 물질, 안정화제를 들 수 있지만, 바람직하게는 약물, 표지 물질, 친화성 물질, 또는 수송용 물질이라도 좋다. 기능성 물질은 또한, 단일의 기능성 물질이라도 좋고, 또는 2 이상의 기능성 물질이 연결된 물질이라도 좋다.

[0709] 약물로서는, 임의의 질환에 대한 약물이라도 좋다. 이러한 질환으로서는, 예를 들어, 암(예, 폐암, 위암, 대장암, 췌장암, 신장암, 간암, 갑상선암, 전립선암, 방광암, 난소암, 자궁암, 골암, 피부암, 뇌종양, 흑색종), 자가 면역 질환·염증성 질환(예, 알레르기 질환, 관절 류머티즘, 전신성 에리테마토데스), 뇌신경 질환(예, 뇌경색, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측색 경화증), 감염증(예, 세균 감염증, 바이러스 감염증), 유전성·희소 질환(예, 유전성 구상 적혈구증, 비디스트로피 근긴장증), 안질환(예, 가령 황반변성증, 당뇨병 망막증, 망막 색소 변성증), 뼈·정형외과 영역의 질환(예, 변형성 관절증), 혈액 질환(예, 백혈병, 자반병), 기타 질환(예, 당뇨병, 고지혈증 등의 대사 이상증, 간 질환, 신장 질환, 폐 질환, 순환기계 질환, 소화기관계 질환)을 들 수 있다. 약물은, 질환의 예방 또는 치료약, 부작용의 완화약이라도 좋다.

[0710] 보다 구체적으로는, 약물은, 항암제라도 좋다. 항암제로서는, 예를 들어, 화학 요법제, 독소, 방사성 동위체 또는 그것을 포함하는 물질을 들 수 있다. 화학 요법제로서는, 예를 들어, DNA 손상제, 대사 길항약, 효소 저해제, DNA 인터칼라이트제, DNA 절단제, 토포이소머라아제 저해제, DNA 결합 저해제, 튜불린 결합 저해제, 세포상해성 뉴클레오시드, 백금 화합물을 들 수 있다. 독소로서는, 예를 들어, 세균 독소(예, 디프테리아 독소), 식물 독소(예, 리신)을 들 수 있다. 방사성 동위체로서는, 예를 들어, 수소 원자의 방사성 동위체(예, ^3H), 탄

소 원자의 방사성 동위체(예, ^{14}C), 인 원자의 방사성 동위체(예, ^{32}P), 황 원자의 방사성 동위체(예, ^{35}S), 이트륨의 방사성 동위체(예, ^{90}Y), 테크네튬의 방사성 동위체(예, $^{99\text{m}}\text{Tc}$), 인듐의 방사성 동위체(예, ^{111}In), 요오드 원자의 방사성 동위체(예, ^{123}I , ^{125}I , ^{129}I , ^{131}I), 사마륨의 방사성 동위체(예, ^{153}Sm), 레늄의 방사성 동위체(예, ^{186}Re), 아스타틴의 방사성 동위체(예, ^{211}At), 비스무트의 방사성 동위체(예, ^{212}Bi)를 들 수 있다. 더욱 구체적으로는, 약물로서, 올리스타틴(MMAE, MMAF), 메이탄신(DM1, DM4), PBD(피롤로벤조디아제핀), IGN, 캠포테신 유도체, 칼리키아마이신, 듀오카마이신, 에리볼린, 안트라사이클린, dmDNA31, 튜불라신을 들 수 있다.

[0711] 표지 물질은, 표적(예, 조직, 세포, 물질)의 검출을 가능하게 하는 물질이다. 표지 물질로서는, 예를 들어, 효소(예, 펩티다아제, 알칼리 포스파타아제, 루시페라아제, β 갈락토시다아제), 친화성 물질(예, 스트렙타비딘, 비오틴, 디곡시게닌, 압타머), 형광 물질(예, 플루오레세인, 플루오레세인이소티오시아네이트, 로다민, 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질), 발광 물질(예, 루시페린, 에쿼린, 아크리디늄에스테르, 트리스(2,2'-비피리딜)루테늄, 루미놀), 방사성 동위체(예, 상술한 것), 또는 그것을 포함한 물질을 들 수 있다.

[0712] 친화성 물질은, 표적에 대한 친화성을 갖는 물질이다. 친화성 물질로서는, 예를 들어, 항체 등의 친화성 단백질 또는 펩타이드, 압타머, 렉틴, 표적 핵산에 대한 상보체를 들 수 있다. 친화성 물질은, 바람직하게는, 친화성 단백질 또는 친화성 펩타이드이고, 보다 바람직하게는, 항체라도 좋다. 기능성 물질로서 사용되는 항체가 유래하는 동물의 종류는, 상술한 것과 같다.

[0713] 기능성 물질로서 사용되는 항체의 종류는, 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체라도 좋다. 항체는 또한, 2가의 항체(예, IgG, IgD, IgE), 또는 4가 이상의 항체(예, IgA 항체, IgM 항체)라도 좋다. 바람직하게는, 항체는, 모노클로날 항체이다. 모노클로날 항체로서는, 예를 들어, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 소정의 당쇄가 부가된 항체(예, N형 당쇄 결합 컨센서스 서열 등의 당쇄 결합 컨센서스 서열을 갖도록 개변된 항체), 2중 특이성 항체, Fc 영역 단백질, Fc 융합 단백질, 및 디설파이드 결합 환원항체를 들 수 있다. 모노클로날 항체의 아이소타입으로서, 예를 들어, IgG(예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, IgE, 및 IgY를 들 수 있다. 기능성 물질로서 사용되는 항체로서는, 예를 들어, 전장 항체 및 그 프래그먼트(프래그먼트 항체)를 들 수 있다. 프래그먼트 항체는, 원하는 항원에 대한 결합성을 유지하고 있으면 좋고, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, VHH를 들 수 있다.

[0714] 기능성 물질로서 사용되는 항체의 항원성은, 본 발명의 항체, 항체 유도체, 및 컨쥬게이트에서의 면역글로불린 단위의 항원성과 같아도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다. 또한, 기능성 물질로서 사용되는 항체의 유래는, 당해 면역글로불린 단위의 유래와 같아도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다. 따라서, 기능성 물질로서 사용되는 항체는, 상술의 모노클로날 항체의 구체예에서 언급된, 특정의 키메라 항체, 특정의 인간화 항체, 혹은 특정의 인간 항체, 또는 그것들에서 유래하는 항체라도 좋다. 기능성 물질로서 사용되는 항체는 또한, 상술한 모노클로날 항체의 구체예에서 언급된, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4, 또는 그것에서 유래하는 항체라도 좋다.

[0715] 수송용 물질은, 화합물의 수송능을 갖는 물질이다. 수송용 물질로서는, 단백질 외각(예, 멀티머) 중에 화합물을 내포할 수 있는 물질(예, 인간 페리틴 등의 페리틴, 바이러스 입자, 바이러스 유사 입자)이 바람직하다.

[0716] 안정화제는, 항체의 안정화를 가능하게 하는 물질이다. 안정화제로서는, 예를 들어, 디올류, 글리세린, 비이온 계면 활성제, 음이온 계면 활성제, 천연계 계면 활성제, 사카리드, 및 폴리올류를 들 수 있다.

[0717] 기능성 물질은 또한, 펩타이드, 단백질, 핵산, 유기 화합물, 무기 화합물, 당쇄, 지질, 고분자 폴리머, 금속(예, 금), 킬레이터라도 좋다. 펩타이드로서는, 예를 들어, 세포막 투과 펩타이드, 혈액 뇌관문 투과성 펩타이드, 펩타이드 의약품을 들 수 있다. 단백질로서는, 예를 들어, 효소, 사이토카인, 프래그먼트 항체, 렉틴, 인터페론, 혈청 알부민, 항체, 페리틴을 들 수 있다. 핵산으로서, 예를 들어, DNA, RNA, 인공 핵산을 들 수 있다. 핵산으로서 또한, 예를 들어, RNA 간섭 유도성 핵산(예, siRNA), 압타머, 안티센스를 들 수 있다. 유기 화합물로서는, 예를 들어, 단백질 분해 유도 키메라 분자, 색소, 광분해성 화합물 등의 저분자 유기 화합물을 들 수 있다. 무기 화합물로서는, 예를 들면 실리카, 탈크, 알루미늄을 들 수 있다.

[0718] (염)

[0719] 본 발명에서, 용어 「염」으로서, 예를 들어, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 무기염기와 염, 유기염기와 염, 및 아미노산과의 염을 들 수 있다. 무기산과의 염으로서, 예를 들어, 염화수소, 브롬화수소, 인산, 황산, 질산과의 염을 들 수 있다. 유기산과의 염으로서, 예를 들어, 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트

산, 젖산, 주석산, 푸마르산, 옥살산, 말레산, 구연산, 숙신산, 사과산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산과의 염을 들 수 있다. 무기염기와의 염으로서는, 예를 들어, 알칼리 금속(예, 나트륨, 칼륨), 알칼리 토류 금속(예, 칼슘, 마그네슘), 및 아연, 알루미늄 등의 다른 금속, 및 암모늄과의 염을 들 수 있다. 유기염기와의 염으로서는, 예를 들어, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 프로필렌디아민, 에틸렌디아민, 피리딘, 에탄올아민, 모노알킬에탄올아민, 디알킬에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민과의 염을 들 수 있다. 아미노산과의 염으로서는, 예를 들어, 염기성 아미노산(예, 아르기닌, 히스티딘, 라이신, 오르니틴), 및 산성 아미노산(예, 아스파라긴산, 글루타민산)과의 염을 들 수 있다. 염은, 바람직하게는, 무기산(예, 염화수소)과의 염, 또는 유기산(예, 트리플루오로아세트 산)과의 염이다.

[0720] 2. 친화성 물질 또는 그 염, 및 그것들에 관련된 발명

[0721] 2-1. 친화성 물질 또는 그 염

[0722] 본 발명은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질 또는 그 염을 제공한다.

[0723] 본 발명에서 사용되는 친화성 물질은, 항체의 구성 단위에서의 중쇄의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함한다. 항체의 구성 단위는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위이다. 따라서, 항체의 구성 단위는, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 또는 2개의 중쇄를 포함하고, 또한 2개의 경쇄를 포함하지 않는 면역글로불린 단위이다. 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체로서는, 예를 들면 2개의 항체(예, IgG, IgD, IgE), 또는 4가 이상의 항체(예, IgA 항체, IgM 항체), 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 이중특이적 항체, 및 디설파이드 결합 환원 항체를 들 수 있다. 2개의 중쇄를 포함하고, 또한 2개의 경쇄를 포함하지 않는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체로서, 예를 들어, Fc 영역 단백질, Fc 융합 단백질, 및 디설파이드 결합 환원 항체를 포함한다. Fc 영역은, 중쇄로서 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하지만, 경쇄를 포함하지 않기 때문이다.

[0724] 제1 및 제2 친화성 부분은, 동일해도, 달라도 좋다. 제1 및 제2 친화성 부분이 다른 경우, 제1 및 제2 친화성 부분은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 다른 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 물질(예, 제1 및 제2 친화성 부분 중 한쪽이 CH2 도메인에 대한 친화성을 갖고, 다른 쪽이 CH3 도메인에 대한 친화성을 갖는 친화성 물질)이라도 좋고, 항체 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 동일한 영역에 대한 친화성을 갖는 다른 친화성 부분(예, 제1 및 제2 친화성 부분 모두 CH2 도메인 또는 CH3 도메인에 대한 친화성을 갖는 친화성 물질)이라도 좋고, 항체 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 동일한 영역에 대한 친화성을 갖는 다른 친화성 부분인 것이 바람직하다. 또한, 제1 및 제2 친화성 부분으로서, 단일의 중쇄에 있어서의 정상 영역으로의 제1 및 제2 친화성 부분의 회합의 억제 등 때문에, 중쇄에 있어서의 정상 영역으로의 제1의 친화성 부분의 제1 회합 부위, 및 중쇄에 있어서의 정상 영역으로의 제2 친화성 부분의 제2 회합 부위가 입체적으로 간섭하고, 한쪽의 회합이 다른 쪽의 회합을 억제할 수 있는 관계에 존재하는 것이 바람직하다. 이러한 관계에 있으면, 항체 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위)에 있어서, 친화성 물질 및 항체에 대한 반응성을 포함하는 화합물의 2개의 분자(제1 분자 및 제2 분자)가, 단일의 항체 구성 단위(상기 면역글로불린 단위) 중에서 경쟁하고 회합하는 것을 억제할 수 있기 때문에, 한쪽의 중쇄의 정상 영역 만의 특이적 수식을 촉진할 수 있다. 제1 및 제2 친화성 부분로서는, 예를 들면, 소정의 구조 단위의 중합체 물질[예, 펩타이드(올리고펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질을 포함함), 핵산(올리고핵산 및 다당을 포함함), 당(올리고당 및 다당을 포함함)], 및 비중합체 물질(예, 저분자 화합물)을 들 수 있다. 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분으로서 사용할 수 있는 물질로서는, 펩타이드, 핵산, 당, 저분자 화합물 등의 다수의 물질이 보고되어 있다(예, 국제공개 제2007/004748호, 국제공개 제2008/054030호, 국제공개 제2013/027796호, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/090979호 등의 공개 공보; Nomura Y et al., Nucleic Acids Res., 2010 Nov; 38(21):7822-9; Miyakawa Set al., RNA., 2008 Jun; 14(6): 1154-63, 및 후술하는 과학 논문 참조). 제1 및 제2 친화성 부분은 동일한 것이 바람직하다.

[0725] 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분으로서 사용할 수 있는 물질은, 임의의 방법에 의해 얻을 수 있다. 예를 들어, 이러한 물질은 임의의 물질의 라이브러리(예를 들어, 저분자 화합물 라이브러리, 펩타이드 라이브러리, 앱 타머 라이브러리, 당 라이브러리, 파지 라이브러리, mRNA 라이브러리, cDNA 라이브러리)로부터 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 물질을 스크리닝함으로써(예, 하이 스루풋 스크리닝법, 파지 디스플레이법, SELEX법, mRNA 디스플레이법, 리보솜 디스플레이법,

cDNA 디스플레이법, 효모 디스플레이법), 얻을 수 있다. 또한, 항체의 Fc 영역이나 정상 영역 중의 특정 영역(예, CH2 도메인, CH3 도메인)에 대한 친화성을 갖는 물질을 스크리닝하는 경우, 각종 항체(예, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)의 Fc 영역의 특정 영역(예, CH1, CH2, CH3) 중에 존재하는 부분 펩타이드를 사용함으로써, 이러한 영역에 선택적으로 결합할 수 있는 물질을 효율적으로 얻을 수 있다.

[0726] 제1 및 제2 친화성 부분은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 친화성 부분은, 항체의 중쇄에 있어서의 Fc 영역에 대한 친화성을 갖고 있어도 좋다. 혹은, 제1 및 제2 친화성 부분은, 중쇄의 정상 영역으로서 CH1 도메인, CH2 도메인, 또는 CH3 도메인, 또는 그것들에 걸친 영역(예, CH1 도메인 및 CH2 도메인의 인접 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 인접 영역)에 대한 친화성을 가질 수 있다. 제1 및 제2 친화성 부분은, 동일 또는 다른 CHX 도메인(X는 1, 2 또는 3)에 대한 친화성을 갖고 있어도 좋고, 동일한 도메인에 대한 친화성을 갖는 것이 바람직하다. 여기서, 「CHX 도메인에 대한 친화성을 갖는」이란, CHX 도메인 중의 적어도 일부의 영역에 대한 친화성을 갖는 한 특별히 한정되지 않고, CHX 도메인 중의 부분 영역에 대한 친화성, 또는 CHX 도메인 및 다른 CHX 도메인에 걸친 영역(예, 인접 영역)에 대한 친화성을 갖고 있어도 좋다. 따라서, CH2 도메인에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분은, CH2 도메인 중의 부분 영역에만 대한 친화성, 또는 CH2 도메인 및 CH1 도메인 또는 CH3 도메인에 걸친 영역(예, CH1 도메인 및 CH2 도메인의 인접 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 인접 영역)에 대한 친화성을 갖고 있어도 좋다. CH2 도메인에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분은, 바람직하게는, CH2 도메인 중의 부분 영역에만 대한 친화성, 또는 CH2 도메인 및 CH3 도메인에 걸친 영역(예, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 인접 영역)에 대한 친화성을 갖고 있어도 좋고, 보다 바람직하게는, CH2 도메인 중의 부분 영역에만 대한 친화성을 갖고 있어도 좋다.

[0727] 본 발명의 친화성 물질 또는 그 염은, 제1 및 제2 친화성 부분이 직접 연결되어 있어도 좋고, 또한, 제1 친화성 물질과 제2 친화성 부분 사이에 링커가 삽입되어 있어도 좋다. 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 제1 및 제2 친화성 부분의 결합 부위가 근접해 있고, 또한 제1 친화성 물질 및 제2 친화성 부분의 크기가 충분히 큰 등의 이유에 의해, 제1 및 제2 친화성 부분 사이의 거리를 조절할 필요가 없는 경우, 제1 및 제2 친화성 부분은, 직접 연결할 수 있다. 한편, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 제1 및 제2 친화성 부분의 결합 부위가 근접해 있지 않고, 또한 제1 친화성 물질 및 제2 친화성 부분의 크기가 충분히 크지 않은 등의 이유에 의해, 제1 및 제2 친화성 부분 사이의 거리를 조절할 필요가 있는 경우, 제1 친화성 물질과 제2 친화성 부분 사이에 링커를 삽입할 수 있다. 링커로서는, 2가의 기를 사용할 수 있다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 2가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 또한, 링커로서는, 예를 들면, 펩타이드, 핵산, 당, 기타 폴리머성 물질(예, 폴리에틸렌글리콜), 2가의 탄화수소기(예, 알킬쇄) 등의 물질이 사용되어 있어도 좋다. 당업자라면, 사용되는 제1 및 제2 친화성 부분의 종류에 따라, 링커의 유무, 및 링커의 종류를 적절히 결정할 수 있다. 바람직하게는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 제1 및 제2 친화성 부분의 결합을 최적화하는 관점에서, 링커가 삽입되어 있어도 좋다.

[0728] 제1 및 제2 친화성 부분이 친화성을 갖는 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역은 상술한 바와 같은 동물(예를 들어, 포유동물, 조류)로부터 유래된 것일 수 있다. 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역은, 바람직하게는 포유동물 정상 영역, 보다 바람직하게는 영장류 정상 영역 또는 설치류 정상 영역, 보다 더욱 바람직하게는 인간 정상 영역이라도 좋다.

[0729] 제1 및 제2 친화성 부분이 친화성을 갖는 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역은, 2가 항체(예, IgG, IgD, IgE), 또는 4가 이상의 항체(예: IgA 항체, IgM 항체)의 정상 영역이라도 좋다. 이러한 정상 영역은, 바람직하게는 2가 항체(예, IgG, IgD, IgE)의 정상 영역이고, 더욱 바람직하게는 IgG의 정상 영역이다.

[0730] 바람직하게는, 제1 및 제2 친화성 부분은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드라도 좋다. 이러한 친화성 펩타이드로서는 많은 펩타이드가 보고되어 있다. 예를 들어, 이러한 친화성 펩타이드의 예는 다음과 같다:

[0731] (1) 인간 IgG 전반(즉, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4. 이하 동일)의 특정 영역(CH2 도메인)에 친화성을 갖는 다양한 IgG 결합 펩타이드(예를 들어, 국제공개 제2008/054030호, 국제공개 제2013/027796호, 국제공개 제2016/186206호 참조);

[0732] (2) 인간 IgG 전반의 특정 영역(CH2 도메인)에 친화성을 가지는 ProteinA Mimetic(PAM) peptide(예, Fassina G et al., JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 1996, VOL.6, 564-569를 참조)

- [0733] (3) 인간 IgG 전반의 특정 영역(CH2 도메인)에 친화성을 갖는 EPIHRSTLTALL(서열번호 27)(예, Ehrlich G.K et al., J.Biochem.Biophys.Methods, Methods, VOL.49, 443-454를 참조);
- [0734] (4) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 가진다(NH₂-Cys1-X1-X2-X3-X4)₂-Lys-Gly-OH(예, Ruvo M et al., ChemBioChem, 2005, VOL.6, 1242-1253을 참조);
- [0735] (5) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 FARLVSSIRY(서열번호 28), FGRLVSSIRY(서열번호 29), 및 TWKTSRISIF(서열번호 30)(예, Krook Me t al., Journal of Immunological Methods, 1998, VOL.221, 151-157을 참조);
- [0736] (6) 인간 IgG 전반의 특정 영역에 친화성을 갖는 QSYF(서열번호 31) (예, Jacobs J. M. et al., Bio. Techniques, 2003, VOL.34, 132-141을 참조);
- [0737] (7) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 HWRGWV(서열번호 32), HYFKFD(서열번호 33), 및 HFRRHL(서열번호 34)(예, Carbonell R.G. et al., Journal of Chromatography A, 2009, VOL.1216, 910-918을 참조);
- [0738] (8) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 DAAG(서열번호 35)(예, Lund L.N et al., Journal of Chromatography A, 2012, VOL.1225, 158-167을 참조);
- [0739] (9) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 Fc-I, Fc-II, 및 Fc-III (예, Warren L. Delano et al., Science, 2000, VOL.287, 1279-1283; 국제공개 제2001/045746호 참조);
- [0740] (10) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 NARKFYKG(서열번호 36), 및 NKFRGKYK(서열번호 37)(예, Biochemical Engineering Journal, 2013, VOL.79, 33-40 참조);
- [0741] (11) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 프로틴 A, 프로틴 G, 프로틴 L, 또는 프로틴 Z, 또는 그것들의 단편(예, Moks T et al., Eur J Biochem. 1986 May 2; 156(3): 637-43; Sjobring UJ et al., Biol Chem. 1991 Jan 5; 266(1): 399-405; Graille M el al., Structure. 2001 Aug; 9(8): 679-87; Nilsson B et al., Protein Eng. 1987 Feb-Mar; 1(2): 107-13);
- [0742] (12) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역 또는 CH2 도메인)에 친화성을 갖는 다양한 IgG 결합 펩타이드(예, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/090979호 참조).
- [0743] 또한, 친화성 펩타이드는, 상술한 바와 같은 스크리닝법(예, 상술한 라이브러리를 이용하는 방법, 또는 상술한 디스플레이법)에 의해 얻을 수 있다.
- [0744] 친화성 펩타이드를 구성하는 아미노산 잔기로서는, 단백질을 구성하는 통상의 20종의 천연 아미노산, 또는 비천연 아미노산의 잔기를 이용할 수 있다. 단백질을 구성하는 통상의 20종의 천연 아미노산으로서, 예를 들면, L-알라닌(A), L-아스파라긴(N), L-시스테인(C), L-글루타민(Q), L-이소류신(I), L-류신(L), L-메티오닌(M), L-페닐알라닌(F), L-프롤린(P), L-세린(S), L-트레오닌(T), L-트립토판(W), L-티로신(Y), L-발린(V), L-아스파라긴산(D), L-글루타민산(E), L-아르기닌(R), L-히스티딘(H), 또는 L-라이신(K), 및 글라이신(G)을 들 수 있다(이하, L의 표기를 생략).
- [0745] 특정의 실시형태에서는, 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 한쪽은, 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드이고, 다른 쪽은, 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드라도 좋다.
- [0746] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 가지며, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드로서는, 다수의 펩타이드가 보고되어 있다(예, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 따라서, 본 발명에서, 이러한 펩타이드를, 제1 및 제2 친화성 펩타이드 중 한쪽으로서 사용할 수 있다.
- [0747] 보다 구체적으로는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드로서 하기를 사용해도 좋다:
- [0748] (1) 국제공개 제2018/199337호의 서열번호 39 내지 72의 아미노산 서열을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0749] (2) 국제공개 제2019/240288호의 서열번호 5, 6, 37 내지 100의 아미노산 서열을 포함하는 친화성 펩타이드;

- [0750] (3) 국제공개 제2019/240287호의 서열번호 5, 8 내지 57, 68 내지 92의 아미노산 서열을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0751] (4) QET를 N말단에 갖는 친화성 펩타이드(국제공개 제2020/090979호의 서열번호 7 내지 10, 22 내지 25, 52, 53); 및
- [0752] (5) 친화성 펩타이드의 예로서 열거된 상기 (1) 내지 (12)의 친화성 펩타이드 중, 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드.
- [0753] 특정의 실시형태에서는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드로서는, 예를 들어, 하기 (1) 내지 (4)를 포함한다.
- [0754] (1) RGNCAVHKGQIIWCTYH(서열번호 38)의 아미노산 서열(Fc3K)을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0755] (2) RGNCAVHKGQIIWCTYH(서열번호 38)의 아미노산 서열에 있어서, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;
- [0756] (3) FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQNRNARIRSIREEC(서열번호 39)의 아미노산 서열(Z34CK)을 포함하는 친화성 펩타이드; 및
- [0757] (4) FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQNRNARIRSIREEC(서열번호 39)의 아미노산 서열에 있어서, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드.
- [0758] 여기서, 상기 아미노산 서열에 포함되는 2개의 시스테인 잔기는, 디설파이드 결합에 의해 가교되어 있어도 좋다.
- [0759] 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드로서는, 다수의 펩타이드가 보고되어 있다. 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 상기 친화성 펩타이드의 라이신 잔기는, 많은 경우, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 유지하기 위해서가 아니라, 다른 부분(예, 반응성기를 포함하는 부분 화합물)과 공유 결합하여 친화성 물질을 유도체화하기 위해 도입되어 있기 때문에(예, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/090979호 참조), 이러한 라이신 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환해도, 심지어 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 유지할 수 있다. 따라서, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드로서는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 친화성 펩타이드에 있어서 라이신 잔기가 다른 아미노산 잔기(바람직하게는, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외인 단백질을 구성하는 통상의 천연 아미노산 잔기)로 치환되어 있는 친화성 펩타이드로서, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 것을 사용할 수 있다.
- [0760] 보다 구체적으로, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드로서 다음을 사용해도 좋다.
- [0761] (1) 국제공개 제2018/199337호의 서열번호 20 내지 38, 73 내지 75(Xaa1이 라이신 잔기 이외인 경우), 서열번호 92;
- [0762] (2) 국제공개 제2019/240288호의 서열번호 7, 11 내지 14, 108;
- [0763] (3) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 1개의 라이신 잔기를 갖는 친화성 펩타이드의 예로서 열거된 상기 (1) 내지 (4) 중, 라이신 잔기가 다른 아미노산 잔기(바람직하게는, 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기)로 치환된 친화성 펩타이드; 및
- [0764] (4) 친화성 펩타이드의 예로서 열거된 상기 (1) 내지 (12)의 친화성 펩타이드 중, 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드.
- [0765] 특정의 실시형태에서는, 라이신 잔기를 갖지 않는 친화성 펩타이드로서는, 예를 들어, 하기 (5) 내지 (10)을 포함한다:

- [0766] (5) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 40)의 아미노산 서열(Z34CM)을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0767] (6) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 40)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;
- [0768] (7) FNREQQNAFYELHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 41)의 아미노산 서열(ProAR)을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0769] (8) FNREQQNAFYELHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 41)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드;
- [0770] (9) RGNCAYHRGQIIWCTYH(서열번호 78)의 아미노산 서열을 포함하는 친화성 펩타이드;
- [0771] (10) RGNCAYHRGQIIWCTYH(서열번호 78)의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인 잔기 이외의 1개 또는 2개의 아미노산 잔기가, 라이신 잔기 및 시스테인 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하고, 또한, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 친화성 펩타이드.
- [0772] 여기서, 상기 아미노산 서열에 포함되는 2개의 시스테인 잔기는, 디설파이드 결합에 의해 가교되어 있어도 좋다.
- [0773] 아미노 잔기의 치환은, 보존적 치환이라도 좋다. 용어 「보존적 치환」은 소정의 아미노산 잔기를 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 말한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는, 당해 분야에서 주지이다. 예를 들면, 이러한 패밀리로서는, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 아스파라긴산, 글루타민산), 비(非)하전성 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), β 위치 분기 측쇄를 갖는 아미노산(예, 트레오닌, 발린, 이소류신), 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘), 하이드록실기(예, 알코올성, 페놀성) 함유 측쇄를 갖는 아미노산(예, 세린, 트레오닌, 티로신), 및 황 함유 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 시스테인, 메티오닌)을 들 수 있다. 비하전성 극성 측쇄를 갖는 아미노산 및 비극성 측쇄를 갖는 아미노산을 포괄적으로 중성 아미노산이라고 칭할 수 있다. 바람직하게는, 아미노산의 보존적 치환은, 아스파라긴산과 글루타민산 사이의 치환, 아르기닌과 라이신과 히스티딘 사이의 치환, 트립토판과 페닐알라닌 사이의 치환, 페닐알라닌과 발린 사이에서의 치환, 류신과 이소류신과 알라닌 사이의 치환, 및 글라이신과 알라닌 사이의 치환이어도 좋다.
- [0774] 제1 및 제2 친화성 부분이 친화성 펩타이드인 경우, 본 발명의 친화성 물질 또는 그 염은, 제1 및 제2 친화성 펩타이드가 직접 연결되어 있어도, 제1 친화성 펩타이드와 제2 친화성 펩타이드 사이에 링커가 삽입되어 있어도 좋지만, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 제1 및 제2 친화성 펩타이드의 결합을 최적화하는 관점에서 링커가 삽입되어 있는 것이 바람직하다. 제1 및 제2 친화성 부분이 친화성 펩타이드인 경우, 링커로서는 펩타이드 링커가 바람직하다.
- [0775] 펩타이드 링커를 구성하는 아미노산 잔기 수는, 아미노산 잔기의 종류(예, α -아미노산, β -아미노산, γ -아미노산. 바람직하게는 α -아미노산) 등의 조건에 따라 적절히 설정할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 링커는, 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어지는 것이라도 좋다. 펩타이드 링커는, 22개 이상, 24개 이상, 26개 이상, 28개 이상, 30개 이상, 32개 이상, 34개 이상, 36개 이상, 38개 이상, 또는 40개 이상의 아미노산 잔기로 이루어지는 것이라도 좋다. 펩타이드 링커는 또한, 50개 미만, 49개 미만, 48개 미만, 47개 미만, 46개 미만, 또는 45개 미만의 아미노산 잔기로 이루어지는 것이라도 좋다.
- [0776] 펩타이드 링커를 구성하는 아미노산 잔기로서는, 상술한 천연 아미노산, 또는 비천연 아미노산의 잔기를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 펩타이드 링커를 구성하는 아미노산 잔기는, 상기 천연 아미노산의 잔기만을 포함하고 있어도 좋다. 펩타이드 링커에 적합한 아미노산 잔기로서는, 예를 들어, 알라닌, 프롤린, 세린 및 글라이신을 들 수 있지만, 이것들에 한정되지 않는다. 펩타이드 링커로서는 또한 국제공개 제2021/112249호, 및 국제공개 제2011/144756호에 개시된 것을 사용할 수 있다.
- [0777] 바람직하게는, 본 발명의 친화성 물질 또는 그 염은, 제1 및 제2 친화성 부분이 친화성 펩타이드이고, 또한 제1 친화성 펩타이드와 제2 친화성 펩타이드 사이의 링커를 포함하는 친화성 물질 또는 그 염이라도 좋다. 이러한

친화성 물질은, 하기 식 (A):

[0778] $AP1-L_A-AP2$ (A)

[0779] [식 중,

[0780] AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고;

[0781] AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,

[0782] L_A 는, 링커를 나타낸다.]로 표시될 수 있다.

[0783] 본 발명에 관련하여 제시되는 식 (A) 및 다른 식에서, -(하이픈)은 그 양측에 존재하는 2개의 단위가 공유 결합하고 있는 것을 나타낸다. 따라서, 식 (A)에서는, AP1은 L 과 공유 결합하고 있고, L 은, AP1 및 AP2 쌍방과 공유 결합하고 있고, AP2는 L 과 공유 결합하고 있다.

[0784] AP1 및 AP2로 각각 나타나는 제1 및 제2 친화성 펩타이드의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0785] L_A 로 표시되는 링커는, 2가의 기이다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 2가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 바람직하게는, 링커로서는, 예를 들면, 펩타이드, 핵산, 당, 기타 폴리머성 물질(예, 폴리에틸렌글리콜), 2가의 탄화수소기(예, 알킬쇄) 등의 물질이 사용되어도 좋다.

[0786] 보다 바람직하게는, 본 발명의 친화성 물질 또는 그 염은, 제1 및 제2 친화성 부분이 친화성 펩타이드이고, 또한, 제1 친화성 펩타이드와 제2 친화성 펩타이드 사이에 펩타이드 링커를 포함하는 친화성 폴리펩타이드 또는 그 염이라도 좋다. 이러한 친화성 폴리펩타이드는 하기 식 (A'):

[0787] $AP1-PL_A-AP2$ (A')

[0788] [식 중,

[0789] AP1은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 N말단 측에 존재하는 제1 친화성 펩타이드를 나타내고;

[0790] AP2는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖고, 또한 친화성 폴리펩타이드의 C말단 측에 존재하는 제2 친화성 펩타이드를 나타내고,

[0791] PL_A 는, 펩타이드 링커를 나타낸다.]로 표시될 수 있다.

[0792] 친화성 폴리펩타이드 등의 친화성 물질 또는 그 염은, 그것을 구성하는 아미노산 잔기로서, 상술한 천연 아미노산, 또는 비천연 아미노산의 잔기를 포함할 수 있다. 친화성 물질이 상술한 천연 아미노산의 잔기만을 포함하는 경우, 친화성 물질은, 예를 들면, 숙주 세포를 이용한 폴리펩타이드의 발현계, 무세포 합성계, 또는 유기 합성계(예, 고상 합성)에 의해 제조할 수 있다. 친화성 물질이 비천연 아미노산의 잔기를 포함하는 경우, 친화성 물질은, 예를 들어 유기 합성계(예를 들어, 고상 합성)에 의해 제조할 수 있다. 바람직하게는, 친화성 물질은 숙주 세포를 이용한 폴리펩타이드의 발현계, 또는 무세포 합성계에 의한 다량의 친화성 물질의 제조를 가능하게 하기 위해, 천연 아미노산의 잔기만을 포함하고 있어도 좋다.

[0793] 본 발명의 친화성 물질이 친화성 폴리펩타이드 등의 친화성 물질 또는 그 염인 경우, 친화성 물질의 말단에 있는 아미노기 및 카르복시기는 적절히 보호할 수 있다. N말단 아미노기의 보호기로서는, 예를 들면 알킬카르보닐기(아실기)(예, 아세틸기, 프로폭시기, tert-부톡시카르보닐기 등의 부톡시카르보닐기), 알킬옥시카르보닐기(예, 플루오레닐메톡시카르보닐기), 아릴옥시카르보닐기, 아릴알킬(아랄킬)옥시카르보닐기(예, 벤질옥시카르보닐기)를 들 수 있다. 바람직하게는, N말단 아미노기는, 알킬화, 포르밀화 또는 아세틸화되어 있어도 좋다. C말단 카르복시기의 보호기로서는, 예를 들면, 에스테르 또는 아마이드를 형성 가능한 기를 들 수 있다. 에스테르 또는 아마이드를 형성 가능한 기로서는, 예를 들면, 알킬옥시기(예, 메틸옥시, 에틸옥시, 프로필옥시, 부틸옥시, 펜틸옥시, 헥실옥시), 아릴옥시기(예, 페닐옥시, 나프틸옥시), 아랄킬옥시기(예, 벤질옥시), 아미노기를 들 수 있다.

[0794] 또한, 친화성 물질의 N-말단 아미노산이 글루타민산(E) 또는 글루타민(Q)인 경우, 그것들의 측쇄를 이용하여, N말단을 보호할 수 있다. N-말단 아미노산이 글루타민산인 경우, 보호된 N-말단 글루타민산은, 피로글루타민산

의 환상 구조를 가질 수 있다. 또한, N-말단 아미노산이 글루타민인 경우, 보호된 N-말단의 글루타민은, N-말단의 아미노기(NH_2)가 그 측쇄에 존재하는 아마이드기와 반응(피로글루타미화)함으로써, 피로글루타민산형의 환상 구조를 가질 수 있다. 따라서, N말단 아미노산은, 바람직하게는, 글루타민산 또는 글루타민이라도 좋다.

[0795] 친화성 물질이 친화성 폴리펩타이드인 경우, 친화성 폴리펩타이드는, Gln-Glu-Thr(QET)로 이루어지는 트리펩타이드를 N말단에 더 포함하고 있어도 좋다. 이 경우, 숙주 세포를 이용한 폴리펩타이드의 발현계에 의해, Q의 피로글루타미화에 의한 N말단 아미노기의 보호와 함께, 친화성 폴리펩타이드의 대량 및 간편한 분비 생산이 가능해진다(실시예, 국제공개 제2013/062029호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 이 경우, MFNNRIRTAALAGAIAIAISTAASGVAIPAFA(서열번호 42)의 아미노산 서열로 이루어지는 시그널 펩타이드(CspBss) 등의 시그널 펩타이드를 QET의 N말단 측에 부가할 수 있다(실시예, 국제공개 제2013/062029호, 국제공개 제2020/090979호를 참조).

[0796] 본 발명의 친화성 물질 또는 그 염은, 예를 들어 친화성 물질 및 항체에 대한 반응성기를 포함하는 본 발명의 화합물 또는 그 염의 합성 중간체로서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 친화성 물질 또는 그 염은, 친화성 물질에 더하여, 항체에 대한 반응성기를 포함하는 본 발명의 화합물 또는 그 염의 균일한 합성을 간편하게 실현하기 때문에, 항체에 대한 반응성기를 포함하는 부분 화합물과의 특이적인 반응을 가능하게 하는 특성의 반응성기를 1개만을 포함하도록 유도체화되어 있어도 좋다. 친화성 물질이 특성의 반응성기를 1개만 포함하는 경우, 친화성 물질, 및 항체에 대한 반응성기 양쪽을, 친화성 물질 중의 특성의 반응성기를 통하여 특이적으로 반응시킬 수 있으므로, 친화성 물질 및 항체에 대한 반응성기를 포함하는 본 발명의 화합물 또는 그 염을 균일한 화합물로서 용이하게 제조할 수 있다.

[0797] 상기와 같은 특성의 반응성기로서는, 예를 들면, 이하를 들 수 있다.

[0798] (1) 아미노기(NH_2 , NHR_3 , NR_3R_{40} R_3 및 R_4 는, 각각 독립적으로, 상술한 바와 같은 1가의 기, 바람직하게는 1가의 탄화수소기이며, 보다 바람직하게는 알킬기이며, 보다 더욱 바람직하게는 탄소 원자수 1 내지 6의 알킬기이다);

[0799] (2) 아미노기와 반응 가능한 잔기. 예를 들어, 활성화 에스테르 잔기(예, N-하이드록시숙신이미드 잔기), 비닐 설폰 잔기, 설폰일 클로라이드 잔기, 이소시아네이트 잔기, 이소티오시아네이트 잔기, 알데히드 잔기, 1,4,7,10-테트라아자사이클로데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 잔기, 2-이미노-2-메톡시에틸 잔기, 디아조늄테레프탈산 잔기;

[0800] (3) 카르복실기(COOH);

[0801] (4) 카르복실기와 반응 가능한 잔기. 예를 들어, 상술한 바와 같은 아미노기;

[0802] (5) 하이드록실기(OH)(알코올성 및 페놀성 하이드록실기를 포함함); 및

[0803] (6) 하이드록실기와 반응 가능한 잔기. 예를 들어, 디아조늄 잔기, 디아조디카르복실레이트 잔기, 2,3-디히드로-1H-피라진-6-온 잔기;

[0804] 특성의 반응성기는, 바람직하게는, (1) 내지 (4)라도 좋다. 보다 바람직하게는, 특성의 반응성기는 (1) 또는 (2)라도 좋고, 또는 (3) 또는 (4)라도 좋다. 또는 보다 바람직하게는, 특성의 반응성기는 (1) 또는 (3)이라도 좋다. 특성의 반응성기는, 보다 더욱 바람직하게는 (1)이고, 특히 바람직하게는 아미노기(NH_2)라도 좋다.

[0805] 친화성 물질 또는 그 염은, 특성의 반응성기를 포함하는 아미노산 잔기를 1개만 포함하고 있어도 좋다. 이러한 경우, 친화성 폴리펩타이드는, (a) 특성의 반응성기(예, 아미노기, 카르복실기, 하이드록실기)를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(예, 라이신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 티로신 잔기, 트레오닌 잔기, 또는 세린 잔기)를 1개만 포함하고 있어도 좋다. 친화성 폴리펩타이드가 아미노기를 측쇄에 갖는 라이신 잔기를 1개만 포함하는 경우, 친화성 폴리펩타이드의 N말단은 보호되어 있는 것이 바람직하다(C말단도 보호되어 있어도 좋다). 친화성 폴리펩타이드가 카르복실기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(예, 아스파라긴산 잔기, 또는 글루타민산 잔기)를 1개만 포함하는 경우, 친화성 폴리펩타이드의 C말단은, 보호되어 있는 것이 바람직하다(N말단도 보호되어 있어도 좋다).

[0806] 또는, 친화성 폴리펩타이드는, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(예, 라이신 잔기)를 포함하지 않고, 또한 아미노기를 N말단에 갖는 것에 의해, 특성의 반응성기로서 아미노기를 1개만 포함하는 폴리펩타이드라도 좋다. 친화성 폴리펩타이드는 또한, 카르복실기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(예, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기)를 포함하지 않고, 또한 카르복실기를 C말단에 갖는 것에 의해 특성의 반응성기로서 카르복실기를 1개만 포

합하는 폴리펩타이드라도 좋다.

- [0807] 바람직하게는, 특정의 반응성기를 하나만 포함하는 친화성 폴리펩타이드는, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하는 폴리펩타이드라도 좋다. 친화성 폴리펩타이드가, 유기 합성계(예, 고상 합성)에 의해 제조되는 경우, 단백질을 구성하는 천연 아미노산인 라이신 잔기뿐만 아니라, 아미노기를 측쇄에 갖는 다른 아미노산 잔기(예, 오르니틴)도 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는, 특정의 반응성기를 1개만 포함하는 친화성 폴리펩타이드는, 유기 합성계뿐만 아니라, 숙주 세포를 이용한 폴리펩타이드의 발현계, 및 무세포 합성계에서도 용이하게 제조할 수 있도록 하기 위해, 아미노기(NH_2)를 측쇄에 갖는 라이신 잔기를 1개만 포함하는 폴리펩타이드라도 좋다. 이 경우, 라이신 잔기는, 제1 친화성 펩타이드, 또는 제2 친화성 펩타이드, 또는 펩타이드 링커 중 어느 하나에 포함되어 있어도 좋다. 라이신 잔기는 펩타이드 링커 중에 포함되는 경우, 제1 친화성 펩타이드 또는 제2 친화성 펩타이드에 근접한 위치(예, 제1 친화성 펩타이드 또는 제2 친화성 펩타이드로부터 10개 이하, 5개 이하, 또는 1 내지 3개의 아미노산 잔기의 위치)에 포함되어 있어도 좋다. 바람직하게는, 라이신 잔기는, 제1 친화성 펩타이드 또는 제2 친화성 펩타이드 중 어느 하나에 포함되는 것이 바람직하다.
- [0808] 바람직하게는, 상기 식 (A)로 표시되는 친화성 물질 또는 그 염에 있어서의 AP1 및 AP2로 각각 표시되는 제1 및 제2 친화성 펩타이드, 및 L_A 로 표시되는 링커는, 하기 (1) 또는 (2)의 특성, 바람직하게는 (1)의 특성을 더 갖는 것이어도 좋다.
- [0809] (1) 특정의 반응성기로서 아미노기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염:
- [0810] (1-1) (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 라이신 잔기)를 1개만 포함하고, 또한 보호된 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 링커가 아미노기를 포함하지 않는 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;
- [0811] (1-2) (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 미보호의 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 또한 링커가, 아미노기를 포함하지 않는 링커인 친화성 물질 또는 그 염;
- [0812] (1-3) (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 보호된 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 라이신 잔기)를 1개만을 포함하는 친화성 펩타이드이고, 또한 링커가, 아미노기를 포함하지 않는 링커인 친화성 물질 또는 그 염;
- [0813] (1-4) (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 보호된 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 또한 링커가, 아미노기를 1개만 포함하는 링커인, 친화성 물질 또는 그 염.
- [0814] 특정의 반응성기로서 아미노기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염은, 원하지 않는 반응(예, 분자내 반응 또는 분자간 반응)을 억제하기 때문에, 아미노기와 반응 가능한 기(예, 카르복시기)를 포함하지 않는 친화성 물질 또는 그 염이라도 좋다. 따라서, 상기 (1-1) 내지 (1-4)에 있어서, 제1 친화성 펩타이드는, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것이어도 좋고, 제2 친화성 펩타이드는, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것, 및/또는 보호된 C말단을 갖는 것이어도 좋고, 링커는, 카르복시기를 포함하지 않는 링커라도 좋다.
- [0815] (2) 특정의 반응성기로서 카르복시기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염:
- [0816] (2-1) (i) 제1 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 아스파라긴산, 글루타민산 등의 산성 아미노산 잔기)를 1개만 포함하는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 또한 링커가, 카르복시기를 포함하지 않는 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;
- [0817] (2-2) (i) 제1 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 아스파라긴산, 글루타민산 등의 산성 아미노산 잔기)를 1개만 포함하고, 또한 보호된 C말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한 링커가, 카르복시기를 포함하지 않는 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;

- [0818] (2-3) (i) 제1 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 미보호의 C말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한 링커가, 카르복시기를 포함하지 않는 링커인 친화성 물질 또는 그 염;
- [0819] (2-4) (i) 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 보호된 C말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한 링커가, 카르복시기를 1개만 포함하는 링커인, 친화성 물질 또는 그 염.
- [0820] 특정의 반응성기로서 카르복시기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염은, 바람직하지 않은 반응(예를 들어, 분자내 반응 또는 분자간 반응)을 억제하기 때문에, 카르복시기와 반응 가능한 기(예: 아미노기)를 포함하지 않는 친화성 물질 또는 그 염이라도 좋다. 따라서, 상기 (2-1) 내지 (2-4)에 있어서, 제1 친화성 펩타이드는, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것 및/또는 보호된 N말단을 갖는 것이라도 좋고, 제2 친화성 펩타이드는, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것이라도 좋고, 링커는 아미노기를 포함하지 않는 링커라도 좋다.
- [0821] 바람직하게는, 상기 식 (A')로 표시되는 친화성 물질 또는 그 염에 있어서의 AP1 및 AP2로 각각 표시되는 제1 및 제2 친화성 펩타이드, 및 PL_A로 표시되는 펩타이드 링커는, 하기(1') 또는 (2')의 특성, 바람직하게는 (1')의 특성을 더 갖는 것이어도 좋다.
- [0822] (1') 특정의 반응성기로서 아미노기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염:
- [0823] (1-1') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 라이신 잔기)를 1개만 포함하고, 또한 보호된 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 아미노기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 펩타이드 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;
- [0824] (1-2') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 미보호의 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드는 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 아미노기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 펩타이드 링커인, 물질 또는 그 염;
- [0825] (1-3') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 보호된 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 라이신 잔기)를 1개만 포함하는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 아미노기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 펩타이드 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;
- [0826] (1-4') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 보호된 N말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 아미노기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 1개만 포함하는 펩타이드 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;
- [0827] 특정의 반응성기로서 아미노기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염은, 원하지 않는 반응(예, 분자내 반응 또는 분자간 반응)을 억제하기 때문에, 아미노기와 반응 가능한 기(예, 카르복시기를)를 포함하지 않는 친화성 물질 또는 그 염이라도 좋다. 따라서, 상기 (1-1') 내지 (1-4')에 있어서, 제1 친화성 펩타이드는, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것이라도 좋고, 제2 친화성 펩타이드는, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것 및/또는 보호된 C말단을 갖는 것이라도 좋고, 펩타이드 링커는, 카르복시기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 펩타이드 링커라도 좋다.
- [0828] (2') 특정의 반응성기로서 카르복시기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염:
- [0829] (2-1') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 아스파라긴산, 글루타민산 등의 산성 아미노산 잔기)를 1개만 포함하는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 카르복시기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 펩타이드 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;
- [0830] (2-2') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기(바람직하게는, 아스파라긴산, 글

루타민산 등의 산성 아미노산 잔기)를 1개만 포함하고, 또한 보호된 C말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 카르복시기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 펩타이드 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;

[0831] (2-3') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 존재하는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 미보호의 C말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 카르복시기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 펩타이드 링커인, 친화성 물질 또는 그 염;

[0832] (2-4') (i) 제1 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 친화성 펩타이드이고, (ii) 제2 친화성 펩타이드가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않고, 또한 보호된 C말단을 갖는 친화성 펩타이드이고, 또한 펩타이드 링커가, 카르복시기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 1개만 포함하는 링커인, 친화성 물질 또는 그 염.

[0833] 특정의 반응성기로서 카르복시기를 1개만 포함하는 친화성 물질 또는 그 염은, 바람직하지 않은 반응(예를 들어, 분자내 반응 또는 분자간 반응)을 억제하기 때문에, 카르복시기와 반응 가능한 기(예: 아미노기)를 포함하지 않는 친화성 물질 또는 그 염이라도 좋다. 따라서, 상기 (2-1') 내지 (2-4')에 있어서, 제1 친화성 펩타이드는, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것 및/또는 보호된 N말단을 갖는 것이라도 좋고, 제2 친화성 펩타이드는, 아미노기를 측쇄에 갖는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것이라도 좋고, 펩타이드 링커는, 아미노기를 측쇄에 포함하는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 링커라도 좋다.

[0834] 2-2. 친화성 물질 또는 그 염의 관련 발명

[0835] 본 발명의 친화성 물질 또는 그 염이, 항체의 측쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 펩타이드를 포함하는 친화성 폴리펩타이드인 경우, 이러한 친화성 폴리펩타이드는, 친화성 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 이에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 단위를 포함하는 숙주 세포를 사용하고, 또는 무세포계 등을 사용하여 조제할 수 있다. 본 발명은 또한, 이러한 폴리뉴클레오타이드 및 숙주 세포, 및 숙주 세포의 제작에 사용할 수 있는 발현 벡터를 제공한다.

[0836] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는, 본 발명의 친화성 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드이다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는, DNA 또는 RNA라도 좋지만, DNA가 바람직하다.

[0837] 본 발명의 숙주 세포는, 예를 들면, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 사용하는 방법(예, 컴피턴트(competent) 세포법, 일렉트로포레이션법), 또는 게놈 개변 기술에 의해 제작할 수 있다. 발현 벡터가 숙주 세포의 게놈 DNA와 상동 재조합(homologous recombination)을 발생시키는 통합형(integrative) 벡터인 경우, 발현 단위는 형질 전환에 의해 숙주 세포의 게놈 DNA에 통합될 수 있다. 한편, 발현 벡터가 숙주 세포의 게놈 DNA와 상동 재조합을 발생시키지 않는 비통합형 벡터인 경우, 발현 단위는 형질 전환에 의해 숙주 세포의 게놈 DNA에 통합되지 않고, 숙주 세포 내에서 발현 벡터의 상태인 채로, 게놈 DNA와 독립적으로, 존재할 수 있다. 혹은, 게놈 편집 기술(예, CRISPR/Cas 시스템, Transcription Activator-Like Effector Nucleases(TALEN))에 의하면, 발현 단위를 숙주 세포의 게놈 DNA에 통합하는 것, 및 숙주 세포가 고유하게 구비하는 발현 단위를 개변하는 것이 가능하다.

[0838] 본 발명은 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 이에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터는, 숙주 세포에서 기능하는 터미네이터, 리보솜 결합 부위, 및 약제 내성 유전자 등의 요소를 더 포함하고 있어도 좋다. 약제 내성 유전자로서는, 예를 들면 테트라사이클린, 암피실린, 카나마이신, 하이그로마이신, 포스포노스라이신 등의 약제에 대한 내성 유전자를 들 수 있다.

[0839] 발현 벡터는 또한, 숙주 세포의 게놈 DNA와의 상동 재조합을 위해 숙주 세포의 게놈과의 상동 재조합을 허용하는 영역을 더 포함하고 있어도 좋다. 예를 들어, 발현 벡터는, 그것에 포함된 발현 단위가 한 쌍의 상동 영역(예, 숙주 세포의 게놈 중의 특정 서열에 대해 상동인 호모로지 암(homology arm), 또는 loxP, 또는 FRT) 사이에 위치하도록 설계되어 있어도 좋다. 발현 단위가 도입되야할 숙주 세포의 게놈 영역(상동 영역의 표적)으로서, 특별히 한정되지 않지만, 숙주 세포에 있어서 발현량이 많은 유전자의 로커스(locus)여도 좋다.

[0840] 발현 벡터는, 플라스미드, 바이러스 벡터, 파지, 또는 인공 염색체라도 좋다. 발현 벡터는 또한, 통합형(integrative) 벡터라도 비통합형 벡터라도 좋다. 통합형 벡터는, 그 전체가 숙주 세포의 게놈에 통합되는 유형의 벡터라도 좋다. 혹은, 통합형 벡터는, 그 일부(예, 발현 단위)만이 숙주 세포의 게놈에 통합되는 유형의 벡터라도 좋다. 발현 벡터는 또한, DNA 벡터 또는 RNA 벡터(예, 레트로바이러스)라도 좋다. 발현 벡터는

또한, 범용화되어 있는 발현 벡터라도 좋다. 이러한 발현 벡터로서는, 예를 들면, pUC(예, pUC19, pUC18), pSTV, pBR(예, pBR322), pHSG(예, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398), RSF(예, RSF1010), pACYC(예, pACYC177, pACYC184), pMW(예, pMW119, pMW118, pMW219, pMW218), pQE(예, pQE30), 및 그 유도체를 들 수 있다.

[0841] 본 발명의 친화성 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 숙주 세포로서는, 예를 들어 에세리히아 콜리(*Escherichia coli*) 등의 에세리히아속 세균, 코리네박테리움속 세균[예, 코리네박테리움·글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)], 및 바실러스 속 세균[예, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)]을 비롯한 다양한 원핵 세포, 사카로미세스속 세균[사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)], 피키아속 세균[예, 피키아 스틱피티스(*Pichia stipitis*)], 아스퍼질러스속 세균[예, 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)]을 비롯한 다양한 진핵 세포를 사용할 수 있다. 혹은, 숙주로서는, 곤충 세포, 식물 세포, 동물 세포(예, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포 등의 포유 동물세포)를 사용할 수 있다. 숙주로서는, 소정의 유전자를 결손하는 주(株)를 사용해도 좋다. 숙주 세포로는, 예를 들면, 세포질 중에 발현 벡터를 보유하는 숙주 세포, 및 계놈 상에 목적 유전자가 도입된 숙주 세포를 들 수 있다.

[0842] 본 발명의 친화성 폴리펩타이드가 Gln-Glu-Thr(QET)로 이루어지는 트리펩타이드를 N말단에 포함하는 경우, 코리네형 세균을 숙주로서 사용하는 폴리펩타이드의 분비 생산 방법(국제공개 제2013/062029호)에 의해 조제할 수 있는 친화성 폴리펩타이드를 사용하는 것이 바람직하다. 이 방법은, Csp 성숙 단백질의 N말단 3잔기 Gln-Glu-Thr(QET)을 목적 폴리펩타이드의 N말단에 부가할 수 있고, 게다가 글루타민 잔기(Q)를 N말단에 포함하는 폴리펩타이드를 간편하고 다량으로 조제할 수 있으므로, 친화성 폴리펩타이드의 조제에 적합하다. 이 경우, MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPFA(서열번호 42)의 아미노산 서열로 이루어지는 시그널펩타이드(CspBss) 등의 각종 시그널펩타이드를 QET의 N말단 측에 부가할 수 있다(실시예, 국제공개 제2013/062029호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 이 방법에 사용될 수 있는 코리네형 박테리아는, 예를 들어, 코리네박테리움 속 세균(예, 코리네박테리움 글루타미쿰, 코리네박테리움·스타티오니스), 및 브레비박테리움속 세균을 들 수 있다.

[0843] 본 발명의 숙주 세포는, 소정의 배양 장치(예, 시험관, 플라스크, 자 퍼멘터(jar fermenter))를 사용하여, 예를 들면 후술하는 조성을 갖는 배지(培地)에서 배양할 수 있다. 배양 조건은 적절히 설정할 수 있다. 구체적으로는, 배양 온도는 10℃ 내지 37℃라도 좋고, pH는 6.5 내지 7.5라도 좋고, 배양 시간은 1h 내지 100h라도 좋다. 또한, 용존 산소 농도를 관리하면서 배양을 행해도 좋다. 이 경우, 배양액 중의 용존 산소 농도(DO값)를 제어의 지표로서 이용하는 경우가 있다. 대기 중의 산소 농도를 21%로 한 경우의 상대적인 용존 산소 농도 DO값이, 예를 들면 1 내지 10%를, 바람직하게는 3% 내지 8%를 하회하지 않도록, 통기·교반 조건을 제어할 수 있다. 배양은 배치 배양이라도, 또는 페드 배치(Fed-batch) 배양이라도 좋다. 페드 배치 배양의 경우는 당원(糖源)이 되는 용액이나 인산을 포함하는 용액을 배양액에 연속적으로 또는 불연속적으로 순차 첨가하여 배양을 계속할 수도 있다.

[0844] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 프로모터로서는, 통상 *E.coli*에서 이종(異種) 단백질 생산에 사용되는 프로모터를 사용할 수 있으며, 예를 들면, PhoA, PhoC, T7 프로모터, lac 프로모터, trp 프로모터, trc 프로모터, tac 프로모터, 램다파지의 PR 프로모터, PL 프로모터, T5 프로모터 등 강력한 프로모터를 들 수 있으며, PhoA, PhoC, lac이 바람직하다. 또한, 벡터로서는, 예를 들면, pUC(예, pUC19, pUC18), pSTV, pBR(예, pBR322), pHSG(예, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398), RSF(예, RSF1010), pACYC(pACYC177, pACYC184), pMW(예, pMW119, pMW118, pMW219, pMW218), pQE(예, pQE30), 및 그 유도체 등을 사용해도 좋다.

[0845] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 하류에 전사(轉寫) 종결 서열인 터미네이터를 연결해도 좋다. 이러한 터미네이터로서는, 예를 들면, T7 터미네이터, fd 파지 터미네이터, T4 터미네이터, 테트라사이클린 내성 유전자의 터미네이터, 대장균 trpA 유전자의 터미네이터를 들 수 있다.

[0846] 배지로서는, M9-카자미노산 배지, LB 배지 등, 대장균을 배양하기 위해 통상 사용하는 배지를 사용해도 좋다. 배지는, 소정의 탄소원, 질소원, 보효소(예, 염산피리독신)를 함유하고 있어도 좋다. 구체적으로는, 펩톤, 효모 엑기스, NaCl, 글루코오스, MgSO₄, 황산암모늄, 인산2수소칼륨, 황산제2철, 황산망간 등을 사용해도 좋다. 또한, 배양 조건, 생산 유도 조건은, 사용한 벡터의 마커, 프로모터, 숙주균 등의 종류에 따라 적절히 선택된다.

[0847] 본 발명의 친화성 폴리펩타이드를 회수하기 위해서는, 이하의 방법 등이 있다. 본 발명의 친화성 폴리펩타이드는, 본 발명의 형질 전환 세포를 회수한 후, 균체를 파쇄(예, 초음파처리(Sonication), 균질화(Homogenization))

혹은 용해(예, 리소자임(Lysozyme)처리)함으로써 파쇄물 및 용해물로서 얻을 수 있다. 친화성 폴리펩타이드가 세포 밖으로 분비·누출된 경우는, 배양액으로부터 원심분리나 막 여과에 의해, 친화성 폴리펩타이드를 포함하는 제균액을 취득할 수 있다. 이러한 파쇄물, 용해물 및 제균액을 추출, 침전, 여과, 컬럼 크로마토그래피 등의 수법에 제공함으로써, 본 발명의 친화성 폴리펩타이드를 얻을 수 있다.

[0848] 3. 화합물 또는 그 염

[0849] 본 발명의 화합물 또는 그 염은, (A) 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체에 대한 반응성기를 포함한다. 친화성 물질 및 그것을 구성하는 요소(예, 친화성 펩타이드 등의 친화성 부분, 및 펩타이드 링커 등의 친화성 부분 사이의 링커)의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

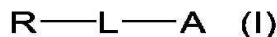
[0850] 항체에 대한 반응성기로서는, 항체(단백질)를 구성하는 아미노산 잔기 중, 반응하기 쉬운 측쇄를 갖는 아미노산 잔기에 대한 반응성기를 사용할 수 있다. 단백질을 구성하는 상술한 바와 같은 천연의 20종의 아미노산 중, 측쇄가 없는 글라이신, 및 측쇄가 탄화수소기인 알라닌, 이소류신, 류신, 페닐알라닌 및 발린은 통상의 반응에 대하여 불활성이다. 따라서, 항체에 대한 반응성기는, 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘 및 라이신으로 이루어지는 14개의 아미노산 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄에 대하여 반응 가능한 기이다. 항체의 아미노산 조성 등의 조건에 따라, 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 반응성기가 본 발명의 화합물 또는 그 염에 포함되어 있어도 좋지만, 바람직하게는, 1종의 반응성기가 본 발명의 화합물 또는 그 염에 포함되어 있어도 좋다.

[0851] 바람직하게는, 항체에 대한 반응성기는, 단백질을 구성하는 상술한 바와 같은 14종의 아미노산 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄와 반응할 수 있는 기이다. 항체에 대한 반응성기는, 보다 바람직하게는 라이신, 티로신, 트립토판 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄에 대해 특이적인 반응성기이고, 보다 더욱 바람직하게는, 라이신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄에 대해 특이적인 반응성기이고, 특히 바람직하게는 라이신 또는 티로신의 측쇄, 그 중에서도 라이신의 측쇄에 대해 특이적인 반응성기인 것이 바람직하다. 이러한 반응성기의 상세에 대해서는, 예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/090979호를 참조한다.

[0852] 라이신 잔기의 측쇄에 대해 특이적인 반응성기는, 라이신 잔기의 측쇄에 존재하는 아미노기(NH₂)와 특이적으로 반응할 수 있는 기이며, 예를 들면, 활성화 에스테르 잔기(예, N-하이드록시숙신이미드 잔기), 비닐설폰 잔기, 설포닐 클로라이드 잔기, 이소시아네이트 잔기, 이소티오시아네이트 잔기, 알데히드 잔기, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 잔기, 2-이미노-2-메톡시에틸 잔기, 디아조늄테레프탈산 잔기, α-할로젠 치환 아세타미드, α-할로젠 치환 메틸케톤을 들 수 있다. 라이신 잔기의 측쇄에 대해 특이적인 상술한 반응성기와, 라이신 잔기의 측쇄 중에 존재하는 아미노기(NH₂)의 반응에 의하면, 연결부분으로서, 예를 들면, 아미드 잔기, 우레아 잔기, 피리딘 잔기, 카바메이트 잔기, 설포아미드 잔기를 생성할 수 있다.

[0853] 특정의 실시형태에서는, 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 하기 식 (I):

[0854] [화38]



[0855]

[0856] [식 중,

[0857] R은, 항체에 대한 반응성기를 나타내고,

[0858] L은, 링커를 나타내고,

[0859] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는 것이라도 좋다. R로 표시되는 항체에 대한 반응성기, 및 A로 표시되는 친화성 물질의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0860] 링커는 2가의 기이다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 2가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다.

- [0861] 특정의 실시형태에서는, 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 친화성 물질과 항체에 대한 반응성기 사이에 절단성 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 이 경우, 상기 식 (I)로 표시되는 화합물 또는 그 염은, 절단성 부분을 포함하는 링커를 포함하고 있어도 좋다.
- [0862] 절단성 부분은, 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건) 하에서의 특정한 처리에 의해 절단 가능한 부위이다. 따라서, 절단성 부분은 온화한 조건 하에서의 특정한 절단 처리에 의해 절단 가능한 부위(아미드 결합 이외의 결합)이라고 할 수 있다. 이러한 특정 처리로서는, 예를 들면, (a) 산성 물질, 염기성 물질, 환원제, 산화제, 효소로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 물질에 의한 처리, (b) 광 등의 물리·화학적 자극에 의한 처리, 또는 (c) 자기분해성의 절단성 부분을 포함하는 절단성 링커를 사용한 경우의 방치(인큐베이션)를 들 수 있다. 이러한 절단성 링커 및 그 절단 조건은, 당해 분야에 있어서의 기술 상식이다(예를 들어, G.Leriche, L.Chisholm, A.Wagner, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 20, 571(2012); Feng P. et al., *Journal of American Chemical Society*. 132, 1500(2010).; Bessodes M. et al., *Journal of Controlled Release*, 99, 423(2004).; DeSimone, J.M., *Journal of American Chemical Society*. 132, 17928 (2010); Thomson, D.H., *Journal of Controlled Release*, 91, 187(2003); Schoenmarks, R.G., *Journal of Controlled Release*, 95, 291(2004)). 온화한 조건에 대한 반응 조건(예, 반응 온도, 반응 시간, 반응 용액)은 후술하는 바와 같다. 상기와 같은 절단성 부분으로서, 예를 들면, 디설파이드 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 알콕시알킬 잔기, 이민 잔기, 3급 알킬옥시카바메이트 잔기(예, tert-부틸옥시카바메이트 잔기), 실란 잔기, 하이드라존 함유 잔기(예, 하이드라존 잔기, 아실하이드라존 잔기, 비스아릴하이드라존 잔기), 포스포르아미데이트(Phosphoramidate) 잔기, 아코니틸 잔기, 트리틸 잔기, 아조 잔기, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기, 쿠마린 함유 잔기, 설펜 함유 잔기, 불포화 결합 함유쇄 잔기, 글리코실 잔기를 들 수 있다.
- [0863] 전자 흡인기를 갖는 방향족 환기는, 아릴, 아랄킬, 방향족 복소환기, 방향족 복소환기를 갖는 알킬로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방향족 환기를 갖는 것이 바람직하고, 아랄킬, 방향족 복소환기를 갖는 알킬이 보다 바람직하다. 전자 흡인기는, 환의 2위치에 결합하고 있는 것이 바람직하다. 보다 더욱 바람직하게는, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기는, 예를 들어, 2위치에 전자 흡인기를 갖는 아랄킬(예, 벤질)이다. 전자 흡인기로서는, 예를 들면, 할로젠 원자, 할로젠 원자로 치환된 알킬(예, 트리플루오로메틸), 보론산 잔기, 메실, 토실, 트리플레이트, 니트로, 시아노, 페닐기, 케토기(예, 아실)를 들 수 있다.
- [0864] 절단성 부분으로서의 잔기의 명칭에 관련하여 접두어, 접미어 등의 용어로서 발견되는 알킬, 아실(즉, 알킬카르보닐), 알콕시(즉, 알킬옥시), 아릴, 아랄킬 등의 기의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 것과 동일하다.
- [0865] 에스테르 잔기로서는, 예를 들면 탄소 원자 및 산소 원자로 구성되는 통상의 에스테르 잔기[예, 알킬 에스테르(예, tert-부틸옥시카르보닐 등의 3급 알킬옥시카르보닐), 아릴에스테르(예, 페나실에스테르, 2-(디페닐포스포노)벤조에이트), 글리코실에스테르 잔기, 오르토에스테르 잔기], 황 원자 및 산소 원자를 포함하는 에스테르 잔기(예, α-티오펜일에스테르 잔기, 알킬티오펜일에스테르 잔기 등의 티오펜일에스테르 잔기), 인 원자 및 산소 원자를 포함하는 에스테르 잔기(예, 포스포디에스테르 잔기, 포스포트리에스테르 잔기), 황산화 에스테르 잔기(예, N-하이드록시숙신이미드 잔기)를 들 수 있다.
- [0866] 설펜 함유 잔기로서는, 예를 들면, 설펜 잔기, 퀴놀리닐벤젠설포네이트 잔기를 들 수 있다.
- [0867] 실란 잔기는 바람직하게는 알킬, 아릴, 아랄킬, 및 알콕시로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 기를 갖는 실란 잔기이다. 이러한 실란 잔기로서는, 예를 들면, 디알킬디알콕시실란 잔기(예를 들면, 디메틸디알콕시실란, 디에틸디알콕시실란), 또는 디아릴디알콕시실란 잔기(예, 디페닐디알콕시실란)를 들 수 있다.
- [0868] 알콕시알킬(즉, 알킬옥시알킬) 잔기로서는, 상술한 바와 같은 알킬옥시 및 알킬을 조합한 기이며, 예를 들면, 메톡시메틸 잔기, 에톡시메틸 잔기, 메톡시에틸 잔기, 에톡시에틸 잔기를 들 수 있지만, 이것들에 한정되지 않는다.
- [0869] 불포화 결합 함유쇄 잔기는, 탄소 원자만으로 이루어지는 불포화 결합 부분을 포함하는 잔기[예, 탄소 원자간 이중 결합을 갖는 최소 단위인 비닐(에테닐), 또는 탄소 원자간 삼중 결합을 갖는 최소 단위인 아세틸레닐(에티닐)], 또는 탄소 원자 및 헥세로 원자(예, 질소 원자, 황 원자, 산소 원자)로 이루어지는 불포화 결합 부분(예, 알데히드, 시아노)을 포함하는 잔기이다. 불포화 결합 함유쇄 잔기로서는, 예를 들면, 비닐에테르 잔기, 시아노에틸 잔기, 에틸렌 잔기, 말론디알데히드 잔기를 들 수 있다.
- [0870] 산성 물질(구전자(求電子) 시약이라고도 칭함)로서는, 예를 들면, 염산, 황산, 질산 등의 무기 산성 물질, 및

포름산, 아세트산, 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진프로판설폰산, 3-모르폴리노프로판설폰산, 인산이수소나트륨, 구연산, 도데실황산, N-도데카노일사르코신, 트리플루오로아세트산 등의 유기산성 물질을 들 수 있다. 산성 물질에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면 알킬옥시아릴알킬 잔기, 3급 알킬옥시카바메이트 잔기, 아세탈 잔기, 실란 잔기, 이민 잔기, 비닐에테르 잔기, β -티오프로피오네이트 잔기, 트리틸 잔기, 하이드라존 잔기, 아코니틸 잔기, 오르토에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 2-(디페닐포스포노)벤조에이트 잔기를 들 수 있다.

[0871] 염기성 물질(구핵(求核) 시약이라고도 칭함)로서는, 예를 들면 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 아세트산 나트륨, 아세트산 칼륨, 아세트산 암모늄 등의 무기 염기성 물질, 및 하이드록실아민, 트리에틸아민, N,N'-디이소프로필아민 등의 유기 염기성 물질을 들 수 있다. 염기성 물질에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면 실란 잔기, 시아노에틸 잔기, 설펜 잔기, 에틸렌 잔기, 글리코실디숙시네이트 잔기, α -티오펜에스테르 잔기, 불포화 비닐설파이드 잔기, 말론디알데히드 잔기, 아실하이드라존 잔기, 알킬티오에스테르 잔기를 들 수 있다.

[0872] 환원제로서는, 예를 들면, 시스테인, 디티오프레이톨(dithiothreitol), 환원형 글루타치온, β -머캅토에탄올을 들 수 있다. 환원제에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면, 디설파이드 잔기, 알콕시알킬 잔기, 아조 잔기를 들 수 있다.

[0873] 산화제로서는, 예를 들면 과요오드산나트륨, 산화형 글루타치온을 들 수 있다. 산화제에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기를 들 수 있다.

[0874] 효소로서는, 예를 들면, 트립신, 파파인, TEV, 트롬빈, 카텝신 B, 카텝신 D, 카텝신 K, 카스파제, 프로테아제, 매트릭스 메탈로프로테아제, 리파아제, 엔도글리코시다제(Endoglycosidase), PN가제F를 들 수 있다. 효소에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면 에스테르 잔기, 포스포디에스테르 잔기, 글리코실 잔기를 들 수 있다.

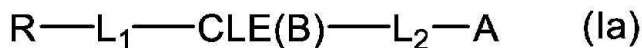
[0875] 광에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면 2-니트로벤질 잔기, 페나실 에스테르 잔기, 8-퀴놀린벤젠설포네이트 잔기, 쿠마린 잔기, 포스포트리에스테르 잔기, 비스아릴하이드라존 잔기, 비만디티오프로피온산 잔기를 들 수 있다.

[0876] 자기분해성의 절단성 부분으로서, 예를 들면, 활성화 에스테르 잔기(예, N-하이드록시숙신이미드 잔기)를 들 수 있다.

[0877] 본 발명의 화합물 또는 그 염이 절단성 부분을 포함하는 경우, 절단성 부분은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 것이라도 좋다. 이러한 절단성 부분으로서, 예를 들어, 디설파이드 잔기, 에스테르 잔기(통상의 에스테르 잔기, 및 티오에스테르 잔기와 같은 상술한 다른 에스테르 잔기를 포함함), 아세탈 잔기(통상의 에스테르 잔기, 및 티오아세탈 잔기와 같은 다른 아세탈 잔기를 포함함), 케탈 잔기, 이민 잔기, 비시날디올 잔기를 포함한다.

[0878] 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 포함하는 경우, 하기 식 (Ia):

[0879] [화39]



[0880]

[0881] [식 중,

[0882] R은, 항체에 대한 반응성기를 나타내고,

[0883] L_1 은, 제1 링커를 나타내고,

[0884] L_2 는, 제2 링커를 나타내고,

[0885] CLE(B)는, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

[0886] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는 것이라도 좋다. R로 표시되는 항체에 대한 반응성기, A로 표시되는 친화성 물질, 및 CLE(B)로 표시되는, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

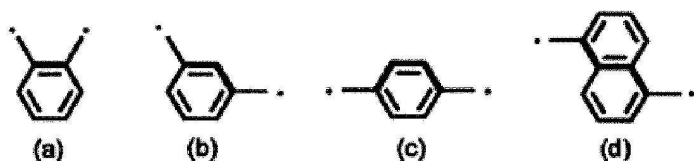
[0887] L₁로 표시되는 제1 링커, 및 L₂로 표시되는 제2 링커는, 동일 또는 다른 2가의 기라도 좋다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 2가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다.

[0888] 특정의 실시형태에서는, 제1 링커 및 제2 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자 수의 합계는, 2 내지 10개라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 3개 이상, 또는 4개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 9개 이하, 8개 이하, 또는 7개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로는, 이러한 원자수의 합계는, 3 내지 9개, 4 내지 8개, 또는 4 내지 7개라도 좋다.

[0889] 제1 링커 및 제2 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자수는, 각각, 1 내지 9개라도 좋다. 이러한 원자수는, 2개 이상, 또는 3개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수는, 8개 이하, 7개 이하, 또는 6개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로, 이러한 원자수는, 2 내지 8개, 3 내지 7개, 또는 3 내지 6개라도 좋다.

[0890] 제1 링커 및 제2 링커에 있어서의 주쇄는, 쇄상 구조, 또는 환상 구조, 또는 그것들의 조합을 포함하는 구조로 구성된다. 주쇄가 환상 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조인 경우, 주쇄의 원자수는, 쇄상 구조 중의 원자수를 세는 것에 의해 결정할 수 있다. 한편, 주쇄가 환상 구조를 포함하는 구조인 경우, 환상 구조를 구성하는 소정의 원자수를, 주쇄의 원자수로서 세는 것에 의해 결정할 수 있다. 구체적으로는, 환상 구조에 있어서의 주쇄의 원자수는, 환상 구조 중의 2개의 결합손을 연락하는 최단 경로의 원자수를 세는 것에 의해 결정할 수 있다(예를 들면, 이하 (a) 내지 (d)의 굵은 글씨 경로 참조). 주쇄가 쇄상 구조와 환상 구조의 조합을 포함하는 구조인 경우, 주쇄의 원자수는, 환상 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조 중의 원자수를, 환상 구조 중의 2개의 결합손을 연락 최단 경로의 원자수와 합산함으로써 결정할 수 있다. 주쇄의 원자 수를 세는 방법은, 다른 링커에 대해서도 동일하다.

[0891] [화40]



[0892]

[0893] ·는 결합손이다.

[0894] (a)의 경우, 최단 경로는 굵은 글씨 경로이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환상 구조 중의 원자수는, 2이다.

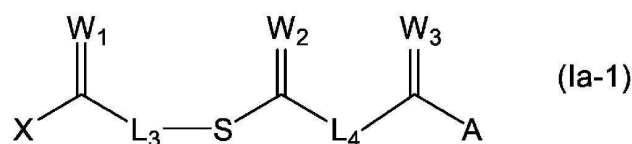
[0895] (b)의 경우, 최단 경로는 굵은 글씨 경로이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환상 구조 중의 원자수는, 3이다.

[0896] (c)의 경우, 어느 경로도 최단 경로(등거리)이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환상 구조 중의 원자수는, 4이다.

[0897] (d)의 경우, 축합 부위의 경로가 최단 경로이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환상 구조 중의 원자수는, 4이다.

[0898] 특정의 실시형태에서는, 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 하기 식 (Ia-1):

[0899] [화41]



[0900]

[0901] [식 중,

[0902] X는, 탈리기를 나타내고,

- [0903] W_1 , W_2 및 W_3 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0904] L_3 은, 제3 링커를 나타내고,
- [0905] L_4 는, 제4 링커를 나타내고,
- [0906] S는, 황 원자를 나타내고,
- [0907] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는 화합물 또는 그 염이라도 좋다. A로 표시되는 친화성 물질의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.
- [0908] X에 의해 표시되는 탈리기는, X에 인접하는 $C=W_1$ 중의 탄소 원자와 아미노기 사이의 반응에 의해 탈리 가능하기이다. 당업자라면, 이러한 탈리기를 적절히 설정할 수 있다. 이러한 탈리기로서는, 예를 들어, 다음을 들 수 있다:
- [0909] (a) R_A-S (여기서, R_A 는 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, S는, 황 원자를 나타낸다.
- [0910] (b) R_A-O (여기서, R_A 는 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, O는, 산소 원자를 나타낸다.
- [0911] (c) $R_A-(R_B-)N$ (여기서, R_A 및 R_B 는, 각각 독립적으로, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, N은, 질소 원자를 나타낸다); 또는
- [0912] (d) 할로젠 원자.
- [0913] 바람직하게는, X에 의해 표시되는 탈리기는, 하기여도 좋다:
- [0914] (a) R_A-S (여기서, R_A 는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, S는, 황 원자를 나타낸다.);
- [0915] (b) R_A-O (여기서, R_A 는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, O는, 산소 원자를 나타낸다.); 또는
- [0916] (c) $R_A-(R_B-)N$ (여기서, R_A 및 R_B 는, 각각 독립적으로, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, N은, 질소 원자를 나타낸다.).
- [0917] 보다 바람직하게는, X에 의해 표시되는 탈리기는, 하기여도 좋다:
- [0918] (a) R_A-S (여기서, R_A 는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, S는, 황 원자를 나타낸다.); 또는
- [0919] (b) R_A-O (여기서, R_A 는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, O는, 산소 원자를 나타낸다.).
- [0920] 보다 더욱 바람직하게는, X에 의해 표시되는 탈리기는, 하기여도 좋다:
- [0921] (a) R_A-S (여기서, R_A 는, 수소 원자, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 탄화수소기, 또는 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 복소환기를 나타내고, S는, 황 원자를 나타낸다.).
- [0922] 특히 바람직하게는, X에 의해 표시되는 탈리기는, 하기여도 좋다:
- [0923] (a') R_A-S (여기서, R_A 는, 치환기를 갖고 있어도 좋은 1가의 방향족 탄화수소기(예, 페닐)를 나타내고, S는, 황 원자를 나타낸다.).
- [0924] W_1 , W_2 및 W_3 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타낸다. 바람직하게는, W_1 , W_2 및 W_3 은, 산소 원자라도 좋다.

[0925] L_3 으로 표시되는 제3 링커, 및 L_4 로 표시되는 제4 링커는, 동일 또는 다른 2가의 기라도 좋다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 2가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다.

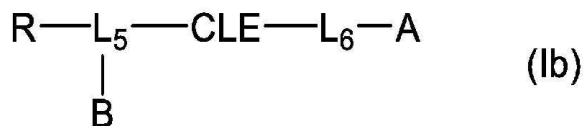
[0926] 특정의 실시형태에서는, 제3 링커 및 제4 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자수의 합계는, 2 내지 10개라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 3개 이상, 또는 4개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 9개 이하, 8개 이하, 또는 7개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로는, 이러한 원자수의 합계는, 3 내지 9개, 4 내지 8개, 또는 4 내지 7개라도 좋다.

[0927] 제3 링커 및 제4 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자수는, 각각, 1 내지 9개라도 좋다. 이러한 원자수는, 2개 이상, 또는 3개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수는, 8개 이하, 7개 이하, 또는 6개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로, 이러한 원자수는, 2 내지 8개, 3 내지 7개, 또는 3 내지 6개라도 좋다.

[0928] 본 발명의 화합물 또는 그 염은 또한, 절단성 부분을 포함하는 경우, 항체에 대한 반응성기와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하고 있어도 좋다. 생체 직교성 관능기는, 상술한 바와 같다. 바람직하게는, 생체 직교성 관능기는, 아지드 잔기, 알킨 잔기(바람직하게는, 상술한 바와 같은 치환기에 의해 치환되어 있어도 좋은 탄소 원자간 3중 결합을 갖는 환기), 테트라진 잔기, 알켄 잔기, 티올 잔기, 말레이미드 잔기, 티올 잔기, 푸란 잔기, 및 할로카르보닐 잔기를 들 수 있다.

[0929] 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 항체에 대한 반응성기와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하는 경우, 하기 식 (Ib):

[0930] [화42]



[0931]

[0932] [식 중,

[0933] R은, 항체에 대한 반응성기를 나타내고,

[0934] L_5 는, 제5 링커를 나타내고,

[0935] L_6 은, 제6 링커를 나타내고,

[0936] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[0937] CLE는, 절단성 부분을 나타내고,

[0938] A는, 항체의 증쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는 것이라도 좋다. R로 표시되는 항체에 대한 반응성기, A로 표시되는 친화성 물질, 및 CLE로 표시되는 절단성 부분의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0939] L_5 로 표시되는 제5 링커 및 L_6 으로 표시되는 제6 링커는, 동일 또는 다른 2가의 기라도 좋다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 2가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다.

[0940] 특정의 실시형태에서는, 제5 링커 및 제6 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자 수의 합계는, 2 내지 10개라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 3개 이상, 또는 4개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 9개 이하, 8개 이하, 또는 7개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로는, 이러한 원자수의 합계는, 3 내지 9개, 4 내지 8개, 또는 4 내지 7개라도 좋다.

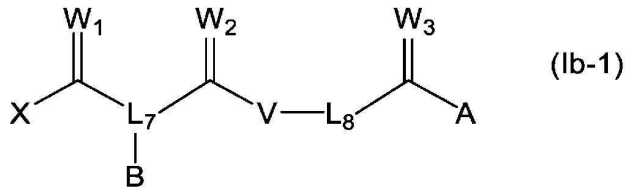
[0941] 제5 링커 및 제6 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자수는, 각각, 1 내지 9개라도 좋다. 이러한 원자수는, 2개 이상, 또는 3개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수는, 8개 이하, 7개 이하, 또는 6개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로, 이러한 원자수는, 2 내지 8개, 3 내지 7개, 또는 3 내지 6개라도 좋다.

[0942] B로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기는, 생체 직교성 관능기로 이루어지는 기라도 좋고, 생체 직교

성 관능기 및 다른 부분을 포함하는 기라도 좋다. 다른 부분으로서, 예를 들면, 생체 직교성 관능기와 링커의 연결 부분을 들 수 있다. 연결 부분은, 예를 들어 2가의 기이다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 생체 직교성 관능기, 2가의 기 및 2가의 기가 치환된 경우의 치환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0943] 특정의 실시형태에서는, 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 하기 식 (Ib-1):

[0944] [화43]



[0945]

[0946] [식 중,

[0947] X는, 탈리기를 나타내고,

[0948] W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0949] L₇은, 제7 링커를 나타내고,

[0950] L₈은, 제8 링커를 나타내고,

[0951] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[0952] V는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0953] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타낸다.]로 표시되는 화합물 또는 그 염이라도 좋다. X에 의해 표시되는 탈리기, B로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기, 및 A로 표시되는 친화성 물질의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0954] W₁, W₂ 및 W₃은 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타낸다. 바람직하게는, W₁, W₂ 및 W₃은 산소 원자라도 좋다.

[0955] L₇로 표시되는 제7 링커, 및 L₈로 표시되는 제8 링커는, 동일 또는 다른 2가의 기라도 좋다. 2가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 2가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다.

[0956] 특정의 실시형태에서는, 제7 링커 및 제8 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자수의 합계는, 2 내지 10개라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 3개 이상, 또는 4개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수의 합계는, 9개 이하, 8개 이하, 또는 7개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로는, 이러한 원자수의 합계는, 3 내지 9개, 4 내지 8개, 또는 3 내지 7개라도 좋다.

[0957] 제7 링커 및 제8 링커에 있어서의 주쇄를 구성하는 원자수는, 각각, 1 내지 9개라도 좋다. 이러한 원자수는, 2개 이상, 또는 3개 이상이라도 좋다. 이러한 원자수는, 8개 이하, 7개 이하, 또는 6개 이하라도 좋다. 보다 구체적으로, 이러한 원자수는, 2 내지 8개, 3 내지 7개, 또는 3 내지 6개라도 좋다.

[0958] V는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타낸다. 바람직하게는, V는 황 원자라도 좋다.

[0959] 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 항체의 구성 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 수식할 수 있다. 본 발명의 화합물 또는 그 염은 또한, 항체의 구성 단위에서의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 수식하면서, 위치 선택적으로 수식된 항체를 제공할 수 있다.

[0960] 상기와 같은 일련의 화합물 또는 그 염의 제조는, 본 발명의 친화성 물질을 항체에 대한 반응성기를 포함하는 부분 화합물과 반응시킴으로써 행할 수 있다. 예를 들어, 이러한 반응은 적절한 유기 용매(예를 들어, CH₂Cl₂ 등의 할로젠화 알킬(예, 할로젠화 메틸) 및 트리에틸아민 등의 아민을 포함하는 유기 용매)에 있어서 적절한 온도(예, 약 -10 내지 30℃)에서 실시할 수 있다. 반응 시간은, 예를 들면 1분 내지 20시간, 바람직하게는 10분

내지 15시간, 보다 바람직하게는 20분 내지 10시간, 보다 더욱 바람직하게는 30분 내지 8시간이다.

[0961] 상기와 같은 일련의 화합물 또는 그 염의 생성의 확인은, 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 역상컬럼 크로마토그래피, HPLC), NMR, 또는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 이러한 화합물 또는 그 염은, 크로마토그래피(예를 들면, 상술한 크로마토그래피, 및 어피니티(affinity) 크로마토그래피) 등의 염의 방법에 의해 적절히 정제할 수 있다.

[0962] 4. 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염

[0963] 4-1. 적어도 1개의 친화성 물질(제1 및 제2 친화성 부분을 포함)을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염

[0964] 본 발명은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함하는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 제공한다. 친화성 물질, 및 항체, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 친화성 펩타이드 등의 친화성 부분, 펩타이드 링커 등의 친화성 부분 사이의 링커, 및 정상 영역)의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0965] 바람직하게는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, (a) 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위), 및 (b) 친화성 물질을 포함하고, 또한 (c) 친화성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중에만 도입되어 있는(즉, 면역글로불린 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중에 친화성 물질 수식 항체가 도입되어 있고, 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역 중에 친화성 물질 수식 항체가 도입되어 있지 않은) 것이라도 좋다. 항체, 면역글로불린 단위, 및 친화성 물질, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 정상 영역)의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0966] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘, 및 라이신으로 이루어지는 14종의 아미노산 잔기 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 친화성 물질을 포함할 수 있다. 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 바람직하게는, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 라이신, 티로신, 트립토판, 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 바람직하게는, 라이신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 더욱 바람직하게는, 라이신 또는 티로신의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 특히 바람직하게는, 라이신의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 친화성 물질을 포함할 수 있다. 상기 정상 영역 중의 이것들의 아미노산 잔기의 위치는, 상술한 바와 같다. 친화성 물질에 의한 항체 또는 그 염의 수식 위치는, 펩타이드 맵핑에 의해 확인할 수 있다. 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식 (II), (IIa), (IIa-1), (IIb), 및 (IIb-1)에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 아미노산 잔기의 측쇄 중의 관능기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[0967] 바람직하게는, 친화성 물질 수식 항체는, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 친화성 물질을 포함할 수 있다(환언하면, 면역글로불린 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여 친화성 물질을 포함하고, 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역 중의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여 친화성 물질을 포함하지 않음). 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치라도 좋다(예, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 수식은 상술한 바와 같이, 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식 (II), (IIa), (IIa-1), (IIb), 및 (IIb-1)에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

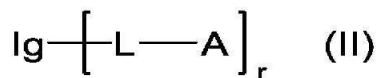
[0968] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염의 제조는, 본 발명의 화합물 또는 그 염을 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다. 반응에 있어서, 항체에 대한 본 발명의 화합물 또는 그 염의 당량(본 발명의 화합물 또는 그 염/항체)은, 본 발명의 화합물 또는 그 염, 및 항체의 종류 등의 인자에 따라 변동하기 때문에 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어 1 내지

100, 바람직하게는 2 내지 80이고, 보다 바람직하게는 4 내지 60이며, 보다 더욱 바람직하게는 5 내지 40이고, 특히 바람직하게는 6 내지 20이다.

[0969] 이러한 반응은, 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건)하에서 적절히 행할 수 있다. 예를 들어, 이러한 온화한 조건 하에서의 반응은, 적절한 반응계, 예를 들어 완충액에서 실온(예, 약 15 내지 30℃)에서 행할 수 있다. 완충액의 pH는, 예를 들면 5 내지 9이고, 바람직하게는 5.5 내지 8.5이며, 보다 바람직하게는 6.0 내지 8.0이다. 완충액은, 적절한 촉매를 포함하고 있어도 좋다. 반응시간은, 예를 들면 1분 내지 20시간, 바람직하게는 10분 내지 15시간, 보다 바람직하게는 20분 내지 10시간, 보다 더욱 바람직하게는 30분 내지 8시간이다. 이러한 반응의 상세에 대해서는, 예를 들어, G.J.L.Bernardes et al., Chem.Rev., 115, 2174(2015); G.J.L.Bernardes et al., Chem.Asian.J., 4, 630(2009); B.G. Davies et al., Nat. Commun., 5, 4740(2014); A.Wagner et al., Bioconjugate.Chem., 25, 825(2014) 참조.

[0970] 특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (II):

[0971] [화44]



[0972]

[0973] [식 중,

[0974] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0975] L은, 링커를 나타내고,

[0976] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타내고,

[0977] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, L로 표시되는 링커, 및 A로 표시되는 친화성 물질, 및 항체의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다(예를 들어, L로 표시되는 링커에 대해서는, 식 (I)의 화합물에서 L로 표시되는 링커 참조).

[0978] 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다. 평균 수식 백분율 r은, 66% 이상, 67% 이상, 68% 이상, 69% 이상, 70% 이상, 72% 이상, 74% 이상, 76% 이상, 78% 이상, 80% 이상, 82% 이상, 84% 이상, 86% 이상, 88% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 또는 96% 이상이라도 좋다. 평균 수식 백분율 r은 또한, 130% 이하, 125% 이하, 120% 이하, 115% 이하, 110% 이하, 105% 이하, 100% 이하, 98% 이하, 96% 이하, 94% 이하, 92% 이하, 90% 이하, 88% 이하, 86% 이하, 84% 이하, 82% 이하, 또는 80% 이하라도 좋다. 평균 수식 백분율 r은, 질량 분석(DAR calculator (Agilent사 소프트웨어)을 병용할 수 있다. 실시예 참조)에 의해 결정할 수 있다.

[0979] 평균 수식 백분율 r은 또한, 바람직하게는 65 내지 100%, 보다 바람직하게는 70 내지 100%, 보다 더욱 바람직하게는 75 내지 100%, 특히 바람직하게는 80 내지 100%, 85 내지 100%, 90 내지 100%, 또는 95 내지 100%라도 좋다. 이들 평균 수식 백분율에 있어서, 상한값은, 98% 이하, 또는 96% 이하 등의 상술한 백분율 이하의 값이어도 좋다. 혹은, 평균 수식 백분율 r은, 96 내지 100%, 97 내지 100%, 98 내지 100%, 99 내지 100%, 또는 100%라도 좋다.

[0980] 상술한 언급된 평균 수식 백분율 r의 정도는, 다른 평균 수식 백분율 r에 대해서도 동일하게 적용될 수 있다. 즉, 상술한 평균 수식 백분율 r의 정도는, 친화성 물질에 의한 후술하는 평균 수식 백분율 r뿐만 아니라, 임의의 수식(예, 생체 직교성 판능기, 기능성 물질)에 의한 후술하는 평균 수식 백분율 r에 동일하게 적용될 수 있다.

[0981] 식 (II)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (I)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.

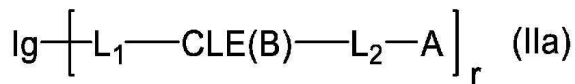
[0982] 특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 친화성 물질과 항체(면역글로불린 단위) 사이에

절단성 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 이 경우, 상기 식 (II)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염은, 절단성 부분을 포함하는 링커를 포함하고 있어도 좋다. 절단성 부분의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0983] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이 절단성 부분을 포함하는 경우, 절단성 부분은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 항체(면역글로불린 단위) 측에 생성할 수 있는 것이라도 좋다. 이러한 절단성 부분으로서, 예를 들어 디설파이드 잔기, 에스테르 잔기(통상의 에스테르 잔기, 및 티오에스테르 잔기와 같은 상술한 다른 에스테르 잔기를 포함함), 아세탈 잔기(통상의 에스테르 잔기, 및 티오아세탈 잔기와 같은 다른 아세탈 잔기를 포함함), 케탈 잔기, 이민 잔기, 비시날디올 잔기를 들 수 있다.

[0984] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 항체(면역글로불린 단위) 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 포함하는 경우, 하기 식 (IIa):

[0985] [화45]



[0986]

[0987] [식 중,

[0988] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[0989] L₁은, 제1 링커를 나타내고,

[0990] L₂는, 제2 링커를 나타내고,

[0991] CLE(B)는, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

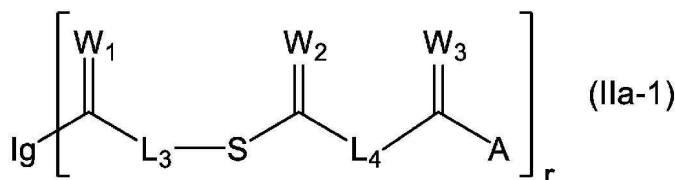
[0992] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타내고,

[0993] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, L₁로 표시되는 제1 링커, L₂로 표시되는 제2 링커, CLE(B)로 표시되는 절단성 부분, A로 표시되는 친화성 물질, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[0994] 식 (IIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ia)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응 시킴으로써 행할 수 있다.

[0995] 특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (IIa-1):

[0996] [화46]



[0997]

[0998] [식 중,

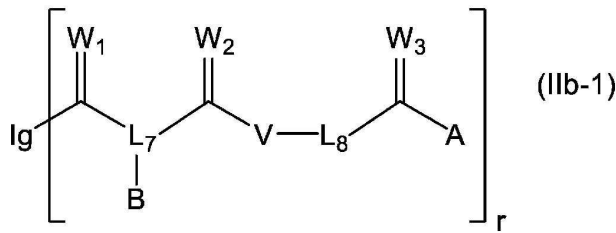
[0999] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1000] W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1001] L₃은, 제3 링커를 나타내고,

- [1002] L₄는, 제4 링커를 나타내고,
- [1003] S는, 황 원자를 나타내고,
- [1004] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타내고,
- [1005] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, W₁, W₂ 및 W₃으로 표시되는 원자, L₃으로 표시되는 제3 링커, L₄로 표시되는 제4 링커, A로 표시되는 친화성 물질, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.
- [1006] 식 (IIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ia-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.
- [1007] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은 또한, 절단성 부분을 포함하는 경우, 항체(면역글로불린 단위)와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하고 있어도 좋다. 생체 직교성 관능기는, 상술한 바와 같다. 바람직하게는, 생체 직교성 관능기는, 아지드 잔기, 알킨 잔기(바람직하게는, 상술한 바와 같은 치환기에 의해 치환되어 있어도 좋은 탄소 원자간 3중 결합을 갖는 환기), 테트라진 잔기, 알켄 잔기, 티올 잔기, 말레이미드 잔기, 티올 잔기, 푸란 잔기 및 할로카르보닐 잔기를 들 수 있다.
- [1008] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 항체(면역글로불린 단위)와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하는 경우, 하기 식 (IIb):
- [1009] [화47]
- $$\text{Ig} \left[\begin{array}{c} \text{L}_5 - \text{CLE} - \text{L}_6 - \text{A} \\ | \\ \text{B} \end{array} \right]_r \quad (\text{IIb})$$
- [1010]
- [1011] [식 중,
- [1012] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [1013] L₅는, 제5 링커를 나타내고,
- [1014] L₆은, 제6 링커를 나타내고,
- [1015] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
- [1016] CLE는, 절단성 부분을 나타내고,
- [1017] A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타내고,
- [1018] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, L₅로 표시되는 제5 링커, L₆으로 표시되는 제6 링커, B로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기, CLE로 표시되는 절단성 부위, A로 표시되는 친화성 물질, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.
- [1019] 식 (IIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ib)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.
- [1020] 특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (IIb-1):

[1021] [화48]



[1022]

[1023] [식 중,

[1024] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1025] W₁, W₂ 및 W₃은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1026] L₇은, 제7 링커를 나타내고,

[1027] L₈은, 제8 링커를 나타내고,

[1028] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[1029] V는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고, A는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질을 나타내고,

[1030] 상기 친화성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, W₁, W₂ 및 W₃으로 표시되는 원자, L₇로 표시되는 제7 링커, L₈로 표시되는 제8 링커, B로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기, V로 표시되는 원자, A로 표시되는 친화성 물질 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1031] 식 (IIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ib-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.

[1032] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 추가의 수식 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 항체의 수식 방법으로는 다양한 방법이 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서는 추가의 수식 부분을 더 포함하도록 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 수식할 수 있다. 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 바람직하게는 항체의 중쇄(특히, 중쇄의 정상 영역에서)에 도입되어 있어도 좋다.

[1033] 특정의 실시형태에서는, 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 친화성 부분을 포함하는 추가의 친화성 물질이라도 좋다. 「제3 친화성 부분」에서의 「친화성 부분」, 및 「추가의 친화성 물질」에서의 「친화성 물질」은 각각 상술한 것과 동일하다. 제3 친화성 부분은 상술한 제1 및/또는 제2 친화성 부분과 동일하거나 달라도 좋지만, 다른 것이 바람직하다.

[1034] 특정의 실시형태에서는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 친화성 부분을 포함하는 추가의 수식 부분은, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있어도 좋다. 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 2개의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 추가의 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는 EU, 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치 또는 317위치라도 좋다(예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 친화성 부분을 포함하는 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질이 도입되는 위치와 다른 것이 바람직하다. 예

를 들어, 상기 친화성 물질이 도입되는 위치가 246/248위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 288/290위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 288/290위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 친화성 물질이 도입되는 위치가 288/290위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는 246/248위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 246/248위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 친화성 물질이 도입되는 위치가 317위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는 246/248위치, 또는 288/290위치의 라이신 잔기가 바람직하다.

[1035] 4-2. 적어도 2개의 친화성 물질(제1, 제2, 제3 및 제4 친화성 부분 포함)을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염

[1036] 본 발명은 또한 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 항체에 대한 친화성을 갖는 제3 및 제4 친화성 부분을 포함하는 제2 친화성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 포함하는, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 제공한다. 친화성 물질 및 항체, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 친화성 펩타이드 등의 친화성 부분, 펩타이드 링커 등의 친화성 부분 사이의 링커, 및 정상 영역)의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 제1 및 제2 수식 부분은, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.

[1037] 바람직하게는, 이러한 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, (a) 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위), 및 (b) 상기 제1 및 제2 수식 부분을 포함하고, (c) 상기 제1 수식 부분이 상기 면역글로불린 단위 중의 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한 (d) 상기 제2 수식 부분이 상기 면역글로불린 단위 중의 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있는 것이라도 좋다. 항체, 면역글로불린 단위, 및 친화성 물질, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 정상 영역)의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1038] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘, 및 라이신으로 이루어지는 14종의 아미노산 잔기 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 친화성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 바람직하게는, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 라이신, 티로신, 트립토판, 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 바람직하게는 라이신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 더욱 바람직하게는 라이신 또는 티로신의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 특히 바람직하게는, 라이신의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 친화성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 상기 정상 영역 중의 이들 아미노산 잔기의 위치는, 상술한 바와 같다. 친화성 물질에 의한 항체 또는 그 염의 수식 위치는, 펩타이드 맵핑에 의해 확인할 수 있다. 수식은 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 아미노산 잔기의 측쇄 중의 관능기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1039] 바람직하게는, 친화성 물질 수식 항체는, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 제1 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 더욱 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분을 포함할 수 있고, 또한 제2 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 상기 아미노기의 수식을 통하여, 상기 제2 친화성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치라도 좋다. 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1040] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염의 제조는, 하기에 의해 행할 수 있다:

[1041] (1) 본 발명의 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체와 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 친화성 물질을

포함하는 제1 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

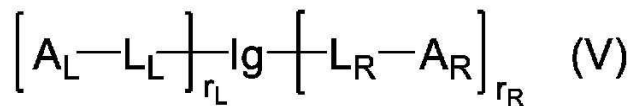
(2) 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 친화성 물질을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 본 발명의 화합물 또는 그 염과 반응시켜, 상기 면역글로불린 단위에 있어서의 중쇄의 정상 영역 중에 상기 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것.

공정 (1)에서 사용되는 본 발명의 화합물 또는 그 염, 및 공정 (2)에서 사용되는 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다. 반응에 있어서의, 항체에 대한 본 발명의 화합물 또는 그 염의 당량(본 발명의 화합물 또는 그 염/항체)은, 본 발명의 화합물 또는 그 염, 및 항체의 종류 등의 인자에 따라 변동하기 때문에 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어 1 내지 100이고, 바람직하게는 2 내지 80이며, 보다 바람직하게는 4 내지 60이고, 보다 더욱 바람직하게는 5 내지 40이며, 특히 바람직하게는 6 내지 20이다.

이러한 반응은 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건)하에서 적절히 행할 수 있다. 예를 들어, 이러한 온화한 조건 하에서의 반응은 상술한 것과 동일하다.

특정의 실시형태에서는, 이러한 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (V):

[화49]



[식 중,

Ig는, 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

L_L 및 L_R 은, 각각 독립적으로, 링커를 나타내고,

A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

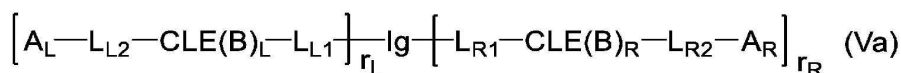
상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, (i') 상기 제1 친화성 물질과 (ii') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii') 제1 절단성 부분을 더 포함하고, 및/또는 (i'') 상기 제2 친화성 물질과 (ii'') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii'') 제2 절단성 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 제1 및 제2 절단성 부분은, 상술한 절단성 부분과 동일하다. 제1 및 제2 절단성 부분은 동일해도 달라도 좋다.

친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이 절단성 부분을 포함하는 경우, 절단성 부분은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 것이라도 좋다. 이러한 절단성 부분으로서, 예를 들어 디설파이드 잔기, 에스테르 잔기(통상의 에스테르 잔기 및 티오에스테르 잔기와 같은 상술한 다른 에스테르 잔기를 포함한다), 아세탈 잔기(통상의 에스테르 잔기, 및 티오아세탈 잔기와 같은 다른 아세탈 잔기를 포함한다), 케탈 잔기, 이민 잔기, 비시날디올 잔기를 들 수 있다.

친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 포함하는 경우, 하기 식 (Va):

[화50]



[식 중,

[1060] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1061] L_{L1} 및 L_{R1}은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

[1062] L_{L2} 및 L_{R2}는, 각각 독립적으로, 제2 링커를 나타내고,

[1063] CLE(B)_L 및 CLE(B)_R은, 각각 독립적으로, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 나타내고,

[1064] A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

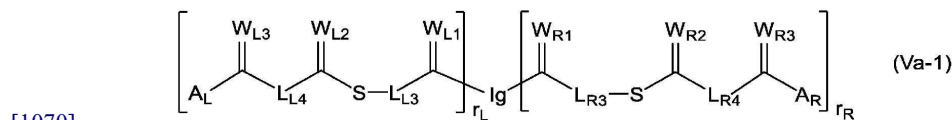
[1065] A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

[1066] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1067] 식 (Va)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ia)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.

[1068] 특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (Va-1):

[1069] [화51]



[1071] [식 중,

[1072] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1073] W_{L1}, W_{L2} 및 W_{L3}, 및 W_{R1}, W_{R2} 및 W_{R3}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1074] L_{L3} 및 L_{R3}은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

[1075] L_{L4} 및 L_{R4}는, 각각 독립적으로, 제4 링커를 나타내고,

[1076] S는, 황 원자를 나타내고,

[1077] A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

[1078] A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

[1079] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

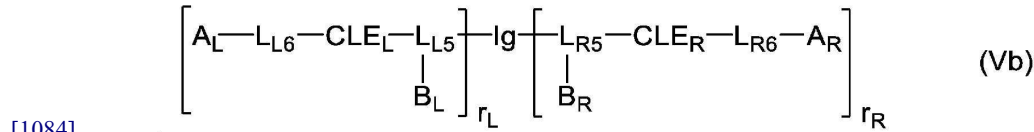
[1080] 식 (Va-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ia-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.

[1081] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은 또한, (ii') 면역글로불린 단위와 (iii') 상기 제1 절단성 부분 사이에 (iv') 제1 생체 직교성 관능기를 더 포함하고; 및/또는 (ii'') 면역글로불린 단위와 (iii'') 상기 제2 절단성 부분 사이에 (iv'') 제2 생체 직교성 관능기를 더 포함하고 있어도 좋다. 생체 직교성 관능기는, 상술한 바와 같다. 바람직하게는, 생체 직교성 관능기는, 아지드 잔기, 알킨 잔기(바람직하게는, 상술한 바와 같은 치환기에 의해 치환되어 있어도 좋은 탄소 원자간 3중 결합을 갖는 환기), 테트라진 잔기, 알켄 잔기, 티올 잔기, 말

레이미드 잔기, 티올 잔기, 푸란 잔기 및 할로카르보닐 잔기를 들 수 있다.

[1082] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 면역글로불린 단위와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하는 경우, 하기 식 (Vb):

[1083] [화52]



[1085] [식 중,

[1086] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1087] L_{L5} 및 L_{R5} 는, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

[1088] L_{L6} 및 L_{R6} 은, 각각 독립적으로, 제6 링커를 나타내고,

[1089] B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

[1090] B_R 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

[1091] CLE_L 및 CLE_R 은, 각각 독립적으로, 절단성 부분을 나타내고,

[1092] A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

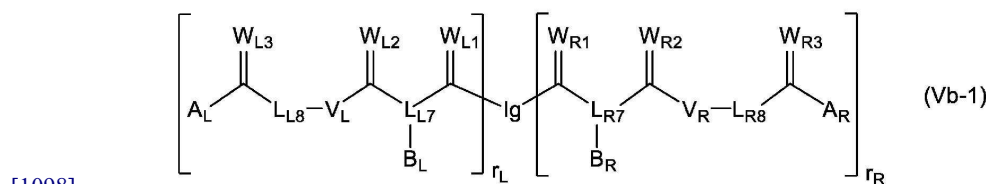
[1093] A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

[1094] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1095] 식 (Vb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ib)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.

[1096] 특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (Vb-1):

[1097] [화53]



[1099] [식 중,

[1100] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

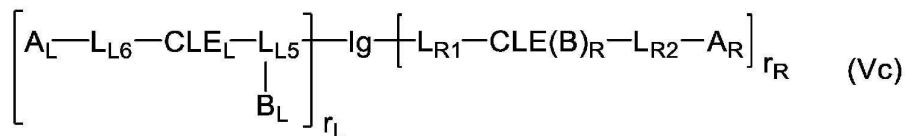
[1101] W_{L1} , W_{L2} 및 W_{L3} , 및 W_{R1} , W_{R2} 및 W_{R3} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1102] L_{L7} 및 L_{R7} 은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

[1103] L_{L8} 및 L_{R8} 은, 각각 독립적으로, 제8 링커를 나타내고,

[1104] B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

- [1105] B_R 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,
- [1106] V_L 및 V_R 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [1107] A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,
- [1108] A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,
- [1109] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.
- [1110] 식 (Vb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ib-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.
- [1111] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은 또한, (i') 제1 친화성 물질과 (ii') 상기 면역글로불린 단위 사이에 (iii') 제1 절단성 부분을 더 포함하고, 또한 (ii'') 상기 면역글로불린 단위와 (iii'') 제2 절단성 부분 사이에 (iv'') 제1 생체 직교성 관능기를 더 포함하는 것이라도 좋다. 이 경우, 상기 제1 절단성 부분이, 절단에 의해 제2 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 절단성 부분이라도 좋다.
- [1112] 특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (Vc):
- [1113] [화54]

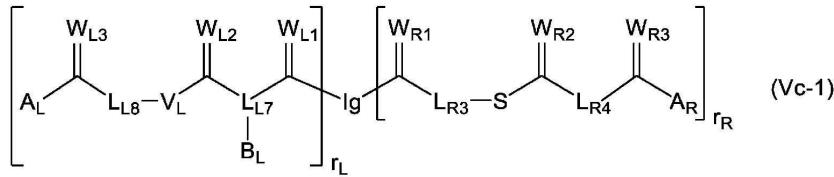


- [1114]
- [1115] [식 중,
- [1116] Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [1117] L_{R1} 은, 제1 링커를 나타내고,
- [1118] L_{R2} 는, 제2 링커를 나타내고,
- [1119] L_{L5} 는, 제5 링커를 나타내고,
- [1120] L_{L6} 은, 제6 링커를 나타내고,
- [1121] B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
- [1122] CLE_L 은, 제1 절단성 부분을 나타내고,
- [1123] $CLE(B)_R$ 은, 절단에 의해 제2 생체 직교성 관능기를 상기 면역글로불린 단위 측에 생성할 수 있는 제2 절단성 부분을 나타내고,
- [1124] A_L 은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,
- [1125] A_R 은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,
- [1126] 상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.
- [1127] 식 (Vc)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ia)로 표시되는 화합물 또는 그 염,

및 식 (Ib)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.

특정의 실시형태에서는, 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 하기 식 (Vc-1):

[화55]



[식 중,

I_g는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

W_{L1}, W_{L2} 및 W_{L3}, 및 W_{R1}, W_{R2} 및 W_{R3}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

L_{R3}은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

L_{R4}는, 각각 독립적으로, 제4 링커를 나타내고,

L_{L7}은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

L_{L8}은, 각각 독립적으로, 제8 링커를 나타내고,

B_L은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

V_L은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

A_L은, 상기 제1 친화성 물질을 나타내고,

A_R은, 상기 제2 친화성 물질을 나타내고,

상기 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 상기 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

식 (Vc-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Ia-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염, 및 식 (Ib-1)로 표시되는 화합물 또는 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시킴으로써 행할 수 있다.

상기 식 (V), (Va), (Va-1), (Vb), (Vb-1), (Vc) 및 (Vc-1)에 있어서, I_g로 표시되는 면역글로불린 단위 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

본원 명세서에 있어서, 임의의 기호에 대한 아래첨자 「L」은, 면역글로불린 단위(I_g)에 대하여 좌측(Left)에 배치되어 있는 기호에 대하여 편의적으로 사용된다. 다른 한편, 임의의 기호에 대한 아래첨자 「R」은, 면역글로불린 단위(I_g)에 대하여 우측(Right)에 배치되어 있는 기호에 대하여 편의적으로 사용된다. 아래첨자 「L」 및 「R」이 붙은 기호의 의미는, 아래첨자 「L」 및 「R」을 제외한 기호의 의미와 같다.

따라서, 상기 식 (V), (Va), (Va-1), (Vb), (Vb-1), (Vc), 및 (Vc-1)에 있어서, 아래첨자 「L」 및 「R」이 붙은 기호는 다음과 같다.

W_{L1} 및 W_{R1}은, W₁과 동일하고, 산소 원자가 바람직하다.

W_{L2} 및 W_{R2}는, W₂와 동일하고, 산소 원자가 바람직하다.

W_{L3} 및 W_{R3}은, W₃과 동일하고, 산소 원자가 바람직하다.

- [1150] L_L 및 L_R 로 표시되는 링커는, L 로 표시되는 링커와 동일하다. L_L 및 L_R 로 표시되는 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1151] L_{L1} 및 L_{R1} 로 표시되는 제1 링커는, L_1 로 표시되는 제1 링커와 동일하다. L_{L1} 및 L_{R1} 로 표시되는 제1 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1152] LL_2 및 L_{R2} 로 표시되는 제2 링커는, L_2 로 표시되는 제2 링커와 동일하다. LL_2 및 L_{R2} 로 표시되는 제2 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1153] L_{L3} 및 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, L_3 으로 표시되는 제3 링커와 동일하다. L_{L3} 및 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1154] L_{L4} 및 L_{R4} 로 표시되는 제4 링커는, L_4 로 표시되는 제4 링커와 동일하다. L_{L4} 및 L_{R4} 로 표시되는 제4 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1155] L_{L5} 및 L_{R5} 로 표시되는 제5 링커는, L_5 로 표시되는 제5 링커와 동일하다. L_{L5} 및 L_{R5} 로 표시되는 제1 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1156] L_{L6} 및 L_{R6} 으로 표시되는 제6 링커는, L_6 으로 나타내는 제6 링커와 동일하다. L_{L6} 및 L_{R6} 으로 표시되는 제6 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1157] L_{L7} 및 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, L_7 로 표시되는 제7 링커와 동일하다. L_{L7} 및 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1158] L_{L8} 및 L_{R8} 로 표시되는 제8 링커는, L_8 로 표시되는 제8 링커와 동일하다. L_{L8} 및 L_{R8} 로 표시되는 제8 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1159] $CLE(B)_L$ 및 $CLE(B)_R$ 로 표시되는 절단성 부분은, $CLE(B)$ 로 표시되는 절단성 부분과 동일하다. $CLE(B)_L$ 및 $CLE(B)_R$ 로 표시되는 절단성 부분은 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1160] B_L 로 표시되는 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기, 및 B_R 로 표시되는 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는, B 로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기와 동일하다. B_L 로 표시되는 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기, 및 B_R 로 표시되는 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1161] CLE_L 및 CLE_R 로 표시되는 절단성 부분은, CLE 로 표시되는 절단성 부분과 동일하다. CLE_L 및 CLE_R 로 표시되는 절단성 부분은 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1162] A_L 및 A_R 로 표시되는 친화성 물질은 A 로 표시되는 친화성 물질과 동일하다. A_L 및 A_R 로 표시되는 친화성 물질은 동일해도 달라도 좋다.
- [1163] r_L 및 r_R 로 표시되는 평균 수식 백분율의 정도 및 그 결정 방법은, r 로 표시되는 평균 수식 백분율과 동일하다. r_L 및 r_R 로 표시되는 평균 수식 백분율은, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1164] 목적의 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염의 생성의 확인은, 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지 만, 예를 들어 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토 그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인은, 펩타이드 맵핑에 의해 행할 수 있다. 펩타이드 맵핑은, 예를 들어, 프로테아제 처리 및 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 프로테아제로서는 엔도 프로테아제가 바람직하다. 이러한 엔도 프로테아제로서는, 예를 들어, 트립신, 키모트립신, Glu-C, Lys-N, Lys-C, Asp-N을 들 수 있다. 친화성 물질의 도입 개수의 확인은, 질량 분석(DAR Calculator(Agilent사 소프트)을 병용할 수 있음)에 의해 행할 수 있다. 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 크로마토그래피(예, 상술한 크로마토그래피, 및 어피니티 크로마토그래피) 등의 임의의 방법에 의해 적절히 정제할 수 있다.

- [1165] 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 추가의 수식 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 항체의 수식 방법으로는 여러가지 방법이 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서는, 추가의 수식 부분을 더 포함하도록 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 수식할 수 있다. 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 바람직하게는 항체의 중쇄 (특히, 중쇄의 정상 영역 중)에 도입되어 있어도 좋다.
- [1166] 특정의 실시형태에서는, 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제5 친화성 부분을 포함하는 추가의 친화성 물질이라도 좋다. 「제5 친화성 부분」에 있어서의 「친화성 부분」, 및 「추가의 친화성 물질」에 있어서의 「친화성 물질」은 각각, 상술한 것과 동일하다. 제5 친화성 부분은, 상술한 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 친화성 부분과 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1167] 특정의 실시형태에서는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제5 친화성 부분을 포함하는 추가의 수식 부분은, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있어도 좋다. 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 2개의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 추가의 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치 또는 317위치라도 좋다(예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제5 친화성 부분을 포함하는 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 제1 친화성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 항체의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제3 및 제4 친화성 부분을 포함하는 제2 친화성 물질을 포함하는 제2 수식 부분이 도입되는 위치와 다른 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분 쌍방이 도입되는 위치가 246/248위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 288/290위치 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 288/290위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분 쌍방이 도입되는 위치가 288/290위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 246/248위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분의 쌍방이 도입되는 위치가 317위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 288/290위치의 라이신 잔기가 바람직하다.
- [1168] 5. 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염
- [1169] 5-1. 개요
- [1170] 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염은, (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 항체(면역글로불린 단위) 사이에 절단성 부분을 더 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 사용하여 제조할 수 있다.
- [1171] 보다 구체적으로는, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염의 제조 방법은, 하기 방법 1-1 또는 1-2라도 좋다.
- [1172] (방법 1-1) (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 항체(면역글로불린 단위) 사이에 절단성 부분을 더 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염의 제조 방법.
- [1173] (방법 1-2) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염의 제조 방법:
- [1174] (1) (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)에 대한 반응성기를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 당해 반응성기 사이에 절단성 부분을 더 포함하는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 친화성 물질과

상기 항체 사이에 절단성 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

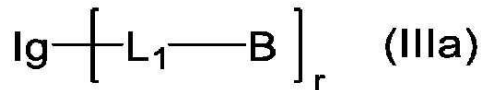
- [1175] (2) 상기 친화성 물질과 상기 항체 사이에 절단성 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1176] 절단 처리로서는, (a) 상술한 산성 물질, 염기성 물질, 환원제, 산화제, 효소로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 물질에 의한 처리, (b) 광 등의 물리 화학적 자극에 의한 처리, 또는 (c) 자기분해성의 절단성 부분을 포함하는 절단성 링커를 사용한 경우의 방지(인큐베이션)를 들 수 있다. 이들 절단 처리에 대해서는 또한, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호를 참조할 수 있다.
- [1177] 이러한 절단 반응은 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건) 하에서 적절히 행할 수 있다. 예를 들어, 이러한 온화한 조건은 상술한 바와 같다. 또한, 절단성 부위가 에스테르(예, 통상의 에스테르, 또는 티오에스테르 등의 다른 에스테르)인 경우, 절단 반응은 하이드록실아민 염산염 용액(예, pH4.0 내지 8.0, 10mM 내지 10M) 중에서 적절한 시간(예, 1시간) 인큐베이션함으로써 행할 수 있다(예, Vance, N. et al., Bioconjugate Chem. 2019, 30, 148-160).
- [1178] 절단 반응에 의해 얻어진 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염의 생성의 확인은, 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토 그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인은, 상술한 바와 같은 펩타이드 맵핑에 의해 행할 수 있다. 친화성 물질의 도입 개수의 확인은, 질량 분석(DAR Calculator(Agilent사 소프트웨어)를 병용할 수 있음)에 의해 행할 수 있다. 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염은, 크로마토그래피(예를 들어, 상술한 크로마토그래피 및 어피니티 크로마토그래피) 등의 임의의 방법에 의해 적절히 정제할 수 있다.
- [1179] 그런데, (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질과 (B) 항체(면역글로불린 단위) 사이에 절단성 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이, (a) 절단성 부분으로서, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 항체(면역글로불린 단위) 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 포함하는 경우, 또는 (b) 항체(면역글로불린 단위)와 절단성 부분의 사이에, 생체 직교성 관능기를 포함하는 경우, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염으로서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조할 수 있습니다.
- [1180] 또한, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시킴으로써, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염으로서, 항체 및 기능성 물질의 컨주게이트 또는 그 염을 제조할 수 있다.
- [1181] 이하, 친화성 물질을 포함하지 않는 항체 또는 그 염으로서, (1) 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염, 및 (2) 항체 및 기능성 물질의 컨주게이트 또는 그 염을 상세히 설명한다.
- [1182] 5-2. 적어도 1개의 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염
- [1183] 본 발명은, (a) 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위), 및 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하고, 또한 (c) 생체 직교성 관능기가 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중에만 도입되어 있는(즉, 면역글로불린 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중에 생체 직교성 관능기가 도입되어 있고, 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역 중에 생체 직교성 관능기가 도입되지 않음), 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제공한다. 항체, 면역글로불린 단위, 및 생체 직교성 관능기, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 정상 영역)의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.
- [1184] 항체 유도체 또는 그 염은, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘, 및 라이신으로 이루어지는 14종의 아미노산 잔기 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 생체 직교성 관능기를 포함할 수 있다. 항체 유도체 또는 그 염은, 바람직하게는, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 라이신, 티로신, 트립토판, 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 바람직하게는, 라이신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 더욱 바람직하게는, 라이신 또는 티로신의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 특히 바람직하게는, 라이신의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 생체 직교성 관능기를 포함할 수 있다. 상기 정상 영역 중의 이들 아미노산 잔기의 위치는, 상술한 바와 같다. 생체 직교성 관능기에 의한 항체 또는 그 염의 수식 위치는, 펩타이드 맵핑에 의해 확인할 수 있다. 수식은,

상술한 바와 같이, 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식 (IIIa), (IIIa-1), (IIIb) 및 (IIIb-1)에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 아미노산 잔기의 측쇄 중의 관능기를 통하여, 해당하는 수식 단위는 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1185] 바람직하게는, 항체 유도체는, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1개 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 생체 직교성 관능기를 포함할 수 있다(환언하면, 면역글로불린 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여 생체 직교성 관능기를 포함하고, 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역 중의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여 생체 직교성 관능기를 포함하지 않음). 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치 또는 317위치라도 좋다(예, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식 (IIIa), (IIIa-1), (IIIb), 및 (IIIb-1)에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여, 해당하는 수식 단위는 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1186] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (IIIa):

[1187] [화56]



[1188]

[1189] [식 중,

[1190] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1191] L₁은, 제1 링커를 나타내고,

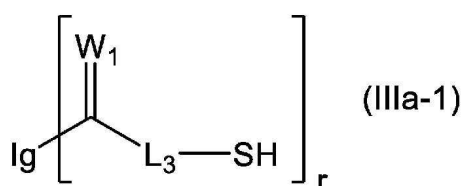
[1192] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[1193] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135 %이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, L₁로 표시되는 제1 링커, B로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 특히 바람직한 생체 직교성 관능기는, 티올기이다.

[1194] 식 (IIIa)에 있어서, L₁-B로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 700 이하라도 좋다. L₁-B로 표시되는 부분 구조의 분자량이 700 이하인 경우, 생체 직교성 관능기를 갖는 항체 유도체 또는 그 염은, 항체 전체의 분자량에 대한 상기 부분 구조의 분자량의 비율이 매우 작기 때문에, 분자량의 차이에 기초한 정제가 상대적으로 곤란하지만, DAR의 고도의 제어를 가능하게 하는 본 발명에 의하면, 분자량의 차이에 기초한 정제를 반드시 필요로 하지 않고, 원하는 DAR을 나타내는 항체 유도체를 고순도로 얻을 수 있다. L₁-B로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하, 또는 100 이하라도 좋다.

[1195] 다른 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (IIIa-1):

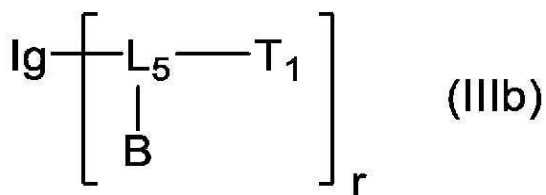
[1196] [화57]



[1197]

[1198] [식 중,

- [1199] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [1200] W₁은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [1201] L₃은, 제3 링커를 나타내고,
- [1202] SH는, 티올기를 나타내고,
- [1203] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135 %이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, W₁로 표시되는 원자, L₃으로 표시되는 제3 링커, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.
- [1204] 식 (IIIa-1)에 있어서, C(=W₁)-L₃-SH로 표시되는 부분 구조의 분자량은 700 이하라도 좋다. C(=W₁)-L₃-SH로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하, 150 이하, 또는 100 이하라도 좋다.
- [1205] 식 (IIIa-1)에 있어서, L₃으로 나타내는 제3 링커는, (CH₂)_{n1}이라도 좋다. n1은 1 내지 10의 정수이다. 바람직하게는, n1은, 2 이상의 정수라도 좋다. n1은 또한, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 또는 2 이하의 정수라도 좋다. 특히 바람직하게는, n1은 2이다.
- [1206] 또 다른 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (IIIb):
- [1207] [화58]



- [1208]
- [1209] [식 중,
- [1210] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,
- [1211] L₅는, 제5 링커를 나타내고,
- [1212] B는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,
- [1213] T₁은, 1가의 기를 나타내고,
- [1214] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135 %이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, L₅로 표시되는 제5 링커, B로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상기와 같다. 특히 바람직한 생체 직교성 관능기는, 아지드기이다.
- [1215] T₁은, 1가의 기이며, 절단성 부분의 절단에 의해 생성할 수 있다. 1가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 1가의 기로서는, 상기한 것을 들 수 있다. 1가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다.
- [1216] 특정의 실시형태에서는, T₁로 표시되는 1가의 기는, 치환되어 있어도 좋은 하이드록시아미노기라도 좋다. 치환되어 있어도 좋은 하이드록시아미노기는, 하기 식 (α)에 의해 표시할 수 있다.
- [1217] NR_i-OR_{ii} (α)
- [1218] [식 중,

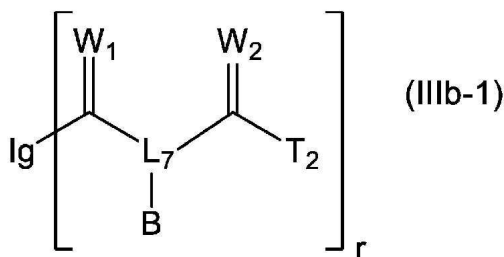
[1219] R_i , R_{ii} 는, 각각 독립적으로, 수소 원자 또는 1가 탄화수소기를 나타낸다.)

[1220] 여기서, 1가의 탄화수소기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 1가의 탄화수소기, 및 1가의 탄화수소기가 치환되어 있는 경우의 치환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 바람직하게는, 치환되어 있어도 좋은 하이드록시아미노기는, $NH-OR_{ii}$ (여기서, R_{ii} 는 알킬기를 나타낸다)라도 좋다. 보다 바람직하게는, 치환되어 있어도 좋은 하이드록시아미노기는, $NH-OR_{ii}$ (여기서, R_{ii} 는 탄소 원자수 1 내지 6의 알킬기를 나타낸다.)라도 좋다.

[1221] 식 (IIIb)에 있어서, $L_5(-B)-T_1$ 로 표시되는 부분 구조의 분자량은 700 이하라도 좋다. $L_5(-B)-T_1$ 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하 또는 100 이하라도 좋다.

[1222] 또 다른 특성의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (IIIb-1):

[1223] [화59]



[1224]

[1225] [식 중,

[1226] Ig 는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1227] W_1 , 및 W_2 는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1228] L_7 은, 제7 링커를 나타내고,

[1229] B 는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기를 나타내고,

[1230] T_2 는, 1가의 기를 나타내고,

[1231] 생체 직교성 관능기에 의한 상기 면역글로불린 단위의 수식 백분율 r 은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig 로 표시되는 면역글로불린 단위, W_1 및 W_2 로 표시되는 원자, L_7 로 표시되는 제7 링커, B 로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기, 및 r 로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 특히 바람직한 생체 직교성 관능기는, 아지드기이다.

[1232] T_2 는, 1가의 기이며, 절단성 부분의 절단에 의해 생성할 수 있다. 1가의 기는, 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 1가의 기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. 1가의 기가 치환되어 있는 경우의 치환기로서는, 상술한 것을 들 수 있다. T_2 로 표시되는 1가의 기는, 치환되어 있어도 좋은 하이드록시아미노기라도 좋다. 치환되어 있어도 좋은 하이드록시아미노기의 상체는, T_1 에서 상술한 것과 동일하다.

[1233] 식 (IIIb-1)에 있어서, $C(=W_1)-L_7(-B)-C(=W_2)-T_2$ 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 700 이하라도 좋다. $C(=W_1)-L_7(-B)-C(=W_2)-T_2$ 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하, 또는 100 이하라도 좋다.

[1234] 식 (IIIb-1)에 있어서, L_7 로 표시되는 제7 링커는, $(CH_2)_{n2}$ 라도 좋다. $n2$ 는, 1 내지 10의 정수이다. 바람직하게는, $n2$ 는, 2 이상 또는 3 이상의 정수라도 좋다. $n2$ 는 또한, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이

하, 또는 3 이하의 정수라도 좋다. 특히 바람직하게는, n_2 는, 3이라도 좋다.

- [1235] 식 (IIIb-1)에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기는, $\text{NH-C(=O)}-(\text{CH}_2)_{n_3}-\text{N}_3$ 이라도 좋다. n_3 은, 1 내지 10의 정수이다. 바람직하게는, n_3 은, 2 이상, 3 이상, 또는 4 이상의 정수라도 좋다. n_3 은 또한, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 또는 4 이하의 정수라도 좋다. 특히 바람직하게는, n_3 은 4라도 좋다.
- [1236] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조는, (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 항체(면역글로불린 단위) 사이에 절단성 부분을 더 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 사용하여 행할 수 있다.
- [1237] 특정의 실시형태에서는, 상기 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이, (a) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 항체(면역글로불린 단위) 측에 생성할 수 있는 절단성 부분을 포함하는 경우, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조할 수 있다.
- [1238] 보다 구체적으로는, 이러한 제조 방법으로서, 예를 들면, 하기 (2-1) 내지 (2-6)을 들 수 있다(도 2 내지 6).
- [1239] (방법 2-1) (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 항체(면역글로불린 단위) 사이에 절단성 부분(여기서, 절단성 부분은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 항체(면역글로불린 단위) 측에 생성할 수 있는 절단성 부분이다)을 더 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법.
- [1240] (방법 2-2) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법:
- [1241] (1) (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)에 대한 반응성기를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 당해 반응성기 사이에 절단성 부분(여기서, 절단성 부분은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 항체(면역글로불린 단위)에 대한 반응성기 측에 생성할 수 있는 절단성 부분이다)을 더 포함하는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 친화성 물질과 상기 항체 사이의 절단성 부분(여기서, 절단성 부분은, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 당해 항체 측에 생성할 수 있는 절단성 부분이다)을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및
- [1242] (2) 상기 친화성 물질과 상기 항체 사이에 절단성 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1243] (방법 2-3) 상기 식 (IIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법.
- [1244] (방법 2-4) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법:
- [1245] (1) 상기 식 (Ia)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및
- [1246] (2) 상기 식 (IIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1247] (방법 2-5) 상기 식 (IIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법.
- [1248] (방법 2-6) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법:
- [1249] (1) 상기 식 (Ia-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항

체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

- [1250] (2) 상기 식 (IIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1251] 상기 방법 2-1은, 상기 방법 2-3, 또는 2-5에 의해 행하여져도 좋다. 상기 방법 2-2는, 상기 방법 2-4, 또는 2-6에 의해 행하여져도 좋다. 상기 방법 2-2, 2-4, 및 2-6은, 본 발명의 친화성 물질을 항체에 대한 반응성기를 함유하는 부분 화합물과 반응시켜, 본 발명의 화합물 또는 그 염을 생성하는 것을 더 포함하고 있어도 좋다 (도 2 내지 6).
- [1252] 다른 특정의 실시형태에서는, 상기 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염이, (b) 항체(면역글로불린 단위)와 절단성 부분 사이에, 생체 직교성 관능기를 포함하는 경우, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조할 수 있다.
- [1253] 보다 구체적으로는, 이러한 제조 방법으로서, 예를 들면, 하기 (2-7) 내지 (2-12)를 들 수 있다(도 2 내지 6).
- [1254] (방법 2-7) (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 항체(면역글로불린 단위) 사이에 절단성 부분, 및 (D) 항체(면역글로불린 단위)와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법.
- [1255] (방법 2-8) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법:
- [1256] (1) (A) 항체(면역글로불린 단위)의 중쇄에 있어서의 정상 영역에 대한 친화성을 갖는 제1 및 제2 친화성 부분을 포함하는 친화성 물질, 및 (B) 항체(면역글로불린 단위)에 대한 반응성기를 포함하고, 또한 (C) (A) 당해 친화성 물질과 (B) 당해 반응성기 사이에 절단성 부분, 및 (D) 당해 반응성기와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 더 포함하는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 친화성 물질과 상기 항체 사이에 절단성 부분, 및 (D) 항체(면역글로불린 단위)와 절단성 부분 사이에 생체 직교성 관능기를 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및
- [1257] (2) 상기 친화성 물질과 상기 항체 사이에 절단성 부분을 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1258] (방법 2-9) 상기 식 (IIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법.
- [1259] (방법 2-10) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법:
- [1260] (1) 상기 식 (Ib)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및
- [1261] (2) 상기 식 (IIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1262] (방법 2-11) 상기 식 (IIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법.
- [1263] (방법 2-12) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 제조 방법:
- [1264] (1) 상기 식 (Ib-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역

글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

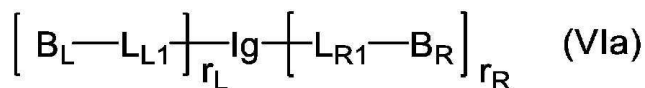
- [1265] (2) 상기 식 (IIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1266] 상기 방법 2-7은, 상기 방법 2-9, 또는 2-11에 의해 행하여져도 좋다. 상기 방법 2-8은, 상기 방법 2-10, 또는 2-11에 의해 행하여져도 좋다. 상기 방법 2-8, 2-10, 및 2-12는, 본 발명의 친화성 물질을 항체에 대한 반응성을 함유하는 부분과 반응시켜 본 발명의 화합물 또는 그 염을 생성하는 것을 추가로 포함한다. 포함될 수 있다(도 2-6).
- [1267] 항체 유도체 또는 그 염은, 추가의 수식 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 항체의 수식 방법으로는 다양한 방법이 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서는 추가의 수식 부분을 더 포함하도록 항체 유도체 또는 그 염을 수식할 수 있다. 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 바람직하게는 항체의 중쇄(특히, 중쇄의 정상 영역 중)에 도입되어 있어도 좋다.
- [1268] 특정의 실시형태에서는, 추가의 수식 부분은, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이라도 좋다. 생체 직교성 관능기는, 상술한 것과 동일하다. 추가의 수식 부분에 포함되는 생체 직교성 관능기는, 상기 (b)의 생체 직교성 관능기와 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1269] 특정의 실시형태에서는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분은, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있어도 좋다. 항체 유도체 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 2개의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 추가의 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치라도 좋다(예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 상기 (b)의 생체 직교성 관능기가 도입되는 위치와 다른 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 (b)의 생체 직교성 관능기가 도입되는 위치가 246/248위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 288/290위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 288/290위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)의 생체 직교성 관능기가 도입되는 위치가 288/290위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 246/248위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)의 생체 직교성 관능기가 도입되는 위치가 317위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 288/290위의 라이신 잔기가 바람직하다.
- [1270] 5-3. 적어도 2개의 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염
- [1271] 본 발명은 또한, (a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 수식 부분을 포함하고,
- [1272] (c) 제1 수식 부분이 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고,
- [1273] (d) 제2 수식 부분이 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한
- [1274] (e) 제1 및 제2 수식 부분이 서로 다른, 제1 및 제2 수식 부분을 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제공한다. 항체, 면역글로불린 단위, 및 생체 직교성 관능기, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 정상 영역)의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.
- [1275] 항체 유도체 또는 그 염은, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘 및 라이신으로 이루어지는 14종의 아미노산 잔기 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 항체 유도체 또는 그 염은, 바람직하게는 상기 정상 영역(바람직하

게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 라이신, 티로신, 트립토판 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 바람직하게는, 라이신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 더욱 바람직하게는 라이신 또는 티로신의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 특히 바람직하게는, 라이신의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 상기 정상 영역 중의 이들 아미노산 잔기의 위치는, 상술한 바와 같다. 생체 직교성 관능기에 의한 항체 또는 그 염의 수식 위치는, 펩타이드 맵핑에 의해 확인할 수 있다. 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 아미노산 잔기의 측쇄 중의 관능기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1276] 바람직하게는, 항체 유도체는, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 각각 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치 또는 317위치라도 좋다. 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1277] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (VIa):

[1278] [화60]



[1279]

[1280] [식 중,

[1281] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1282] L_{L1} 및 L_{R1} 은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

[1283] B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

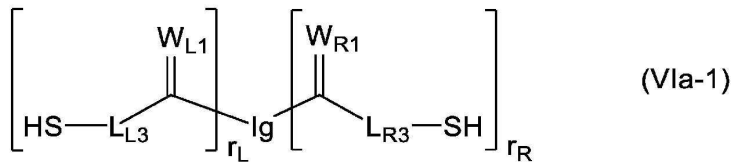
[1284] B_R 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

[1285] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1286] 식 (VIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Va)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염에 있어서의 $CLE(B)_L$ 및 $CLE(B)_R$ 로 표시되는 2개의 절단성 부분을 절단함으로써 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 동일한 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 다른 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 동일한 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우), 또는 2회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 절단 반응의 상세는 상술한 바와 같다.

[1287] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (VIa-1):

[1288] [화61]



[1289]

[1290] [식 중,

[1291] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1292] $\text{W}_{\text{L}1}$ 및 $\text{W}_{\text{R}1}$ 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1293] $\text{L}_{\text{L}3}$ 및 $\text{L}_{\text{R}3}$ 은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

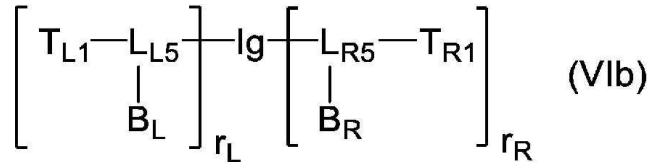
[1294] SH는, 생체 직교성 관능기인 티올기를 나타내고,

[1295] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{L} , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{R} 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1296] 식 (VIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Va-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염에 있어서의 CS로 표시되는 2개의 절단성 부분을 절단함으로써 행할 수 있다. 절단 반응은 1회의 절단 반응에 의해 행할 수 있다. 절단 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1297] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (VIb):

[1298] [화62]



[1299]

[1300] [식 중,

[1301] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1302] $\text{L}_{\text{L}5}$ 및 $\text{L}_{\text{R}5}$ 는, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

[1303] B_{L} 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

[1304] B_{R} 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

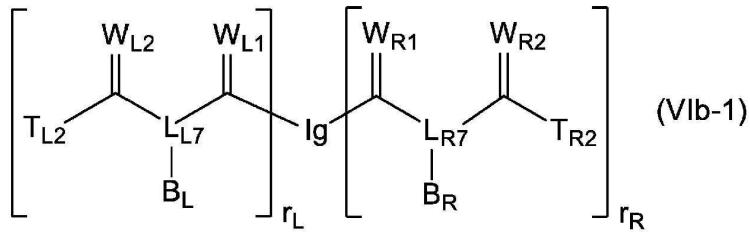
[1305] $\text{T}_{\text{L}1}$ 및 $\text{T}_{\text{R}1}$ 은, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[1306] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{L} , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{R} 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1307] 식 (VIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Vb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염에 있어서의 CLE_{L} 및 CLE_{R} 로 표시되는 2개의 절단성 부분을 절단함으로써 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 동일한 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 다른 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 동일한 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우), 또는 2회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 다른 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 절단 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1308] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (VIb-1):

[1309] [화63]



[1310]

[1311] [식 중,

[1312] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1313] W_{L1} 및 W_{L2} , 및 W_{R1} 및 W_{R2} 는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1314] L_{L7} 및 L_{R7} 은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

[1315] B_{L} 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

[1316] B_{R} 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

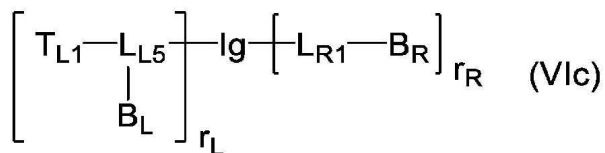
[1317] T_{L2} 및 T_{R2} 는, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[1318] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{L} , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_{R} 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1319] 식 (VIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Vb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염에 있어서의 C- V_{L} 및 C- V_{R} 로 표시되는 2개의 절단성 부분을 절단함으로써 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 동일한 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 다른 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 동일한 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우), 또는 2회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 다른 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 절단 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1320] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (VIc):

[1321] [화64]



[1322]

[1323] [식 중,

[1324] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1325] L_{R1} 은, 제1 링커를 나타내고,

[1326] L_{L5} 는, 제5 링커를 나타내고,

[1327] B_{L} 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

[1328] B_{R} 은, 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기를 나타내고,

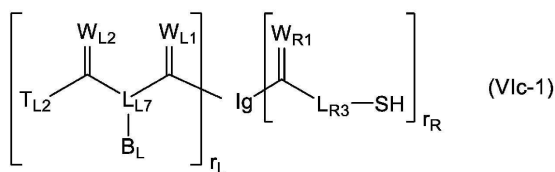
[1329] T_{L1} 은, 1가의 기를 나타내고,

[1330] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1331] 식 (VIc)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Vc)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염에 있어서의 CLE_L 및 $CLE(B)_R$ 로 표시되는 2개의 절단성 부분을 절단함으로써 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 동일한 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 다른 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 동일한 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우), 또는 2회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 다른 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 절단 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1332] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (VIc-1):

[1333] [화65]



[1334] [식 중,

[1335] Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1336] W_{L1} 및 W_{L2} , 및 W_{R1} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1337] L_{R3} 은, 제3 링커를 나타내고,

[1338] L_{L7} 은, 제7 링커를 나타내고,

[1339] B_L 은, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기를 나타내고,

[1340] SH 는, 제2 생체 직교성 관능기인 티올기를 나타내고,

[1341] T_{L2} 는, 1가의 기를 나타내고,

[1342] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1343] 식 (VIc-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염의 제조는, 식 (Vc-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 친화성 물질 수식 항체 또는 그 염에 있어서의 $C-V_L$ 및 $C-S$ 로 표시되는 2개의 절단성 부분을 절단함으로써 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 동일한 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 절단성 부분이 다른 경우, 절단 반응은, 1회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 동일한 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우), 또는 2회의 절단 반응(예, 다른 2개의 절단성 부분이 다른 절단 처리 또는 절단제로 절단 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 절단 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1344] 상기 식 (VIa), (VIa-1), (VIb), (VIb-1), (VIc) 및 (VIc-1)에 있어서, Ig 로 표시되는 면역글로불린 단위 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1345] 상기 식 (VIa), (VIa-1), (VIb), (VIb-1), (VIc) 및 (VIc-1)에 있어서, 아래 첨자 「L」 및 「R」이 붙은 기호는, 다음과 같다.

[1346] W_{L1} 및 W_{R1} 은, W_1 과 동일하고, 산소 원자가 바람직하다.

- [1348] W_{L2} 및 W_{R2} 는, W_2 와 동일하고, 산소 원자가 바람직하다.
- [1349] L_{L1} 및 L_{R1} 로 표시되는 제1 링커는, L_1 로 표시되는 제1 링커와 동일하다. L_{L1} 및 L_{R1} 로 표시되는 제1 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1350] L_{L3} 및 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, L_3 으로 표시되는 제3 링커와 동일하다. L_{L3} 및 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1351] L_{L5} 및 L_{R5} 로 표시되는 제5 링커는, L_5 로 표시되는 제5 링커와 동일하다. L_{L5} 및 L_{R5} 로 표시되는 제1 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1352] L_{L7} 및 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, L_7 로 표시되는 제7 링커와 동일하다. L_{L7} 및 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1353] B_L 로 표시되는 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기, 및 B_R 로 표시되는 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는, B 로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기와 동일하다. B_L 로 표시되는 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기, 및 B_R 로 표시되는 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1354] T_{L1} 및 T_{R1} 로 표시되는 1가의 기는, T_1 로 표시되는 1가의 기와 동일하다. T_{L1} 및 T_{R1} 로 표시되는 1가의 기는 동일해도 달라도 좋다.
- [1355] T_{L2} 및 T_{R2} 로 표시되는 1가의 기는, T_2 로 표시되는 1가의 기와 동일하다. T_{L2} 및 T_{R2} 로 표시되는 1가의 기는 동일해도 달라도 좋다.
- [1356] r_L 및 r_R 로 표시되는 평균 수식 백분율의 정도 및 그 결정 방법은, r 로 표시되는 평균 수식 백분율과 동일하다. r_L 및 r_R 로 표시되는 평균 수식 백분율은, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1357] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIa) 및 (VIc)에 있어서, L_{L1} - B_L , 및/또는 L_{R1} - B_R 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 식 (IIIa)에서의 L_1 - B 로 표시되는 부분 구조의 상기 분자량과 동일해도 좋다.
- [1358] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIa-1) 및 (VIc-1)에 있어서, $C(=W_{L1})$ - L_{L3} -SH, 및/또는 $C(=W_{R1})$ - L_{R3} -SH로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 식 (IIIa-1)에 있어서의 $C(=W_1)$ - L_3 -SH로 표시되는 부분 구조의 상기 분자량과 동일해도 좋다.
- [1359] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIa-1) 및 (VIc-1)에 있어서, L_{L3} , 및/또는 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, 식 (IIIa-1)에 있어서의 L_3 으로 표시되는 제3 링커인 $(CH_2)_{n1}$ 과 동일해도 좋다.
- [1360] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIb), (VIc), (VIb-1) 및 (VIc-1)에 있어서, T_{L1} , T_{R1} , T_{L2} , 및/또는 T_{R2} 로 표시되는 1가의 기는, 식 (IIIb)에 있어서의 T_1 , 및/또는 T_2 로 표시되는 것과 같은, 치환된 하이드록시아미노기라도 좋다.
- [1361] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIb) 및 (VIc)에 있어서, L_{L5} (- B_L)- T_{L1} , 및/또는 L_{R5} (- B_R)- T_{R1} 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 식 (IIIb)에 있어서의 L_5 (- B)- T_1 로 표시되는 부분 구조의 분자량과 동일해도 좋다.
- [1362] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIb-1) 및 (VIc-1)에 있어서, $C(=W_{L1})$ - L_{L7} (- B_L)- $C(=W_{L2})$ - T_{L2} , 및/또는 $C(=W_{R1})$ - L_{R7} (- B_R)- $C(=W_{R2})$ - T_{R2} 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 식 (IIIb-1)에 있어서의 $C(=W_1)$ - L_7 (- B)- $C(=W_2)$ - T_2 로 표시되는 부분 구조의 분자량과 동일해도 좋다.
- [1363] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIb-1) 및 (VIc-1)에 있어서, L_{L7} , 및/또는 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, 식 (IIIb-1)에 있어서의 L_7 로 표시되는 제7 링커인 $(CH_2)_{n2}$ 와 동일해도 좋다.
- [1364] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIb-1) 및 (VIc-1)에 있어서, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기, 및/또는

제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는, 식 (IIIb-1)에 있어서의 생체 직교성 관능기를 포함하는 기로서 표시되는 것과 같은, $\text{NH-C(=O)}-(\text{CH}_2)_{n3}-\text{N}_3$ 이라도 좋다.

[1365] 항체 유도체 또는 그 염은, 추가의 수식 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 항체의 수식 방법으로는, 다양한 방법이 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서는 추가의 수식 부분을 더 포함하도록 항체 유도체 또는 그 염을 수식할 수 있다. 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 바람직하게는 항체의 중쇄(특히, 중쇄의 정상 영역 중)에 도입되어 있어도 좋다.

[1366] 특정의 실시형태에서는, 추가의 수식 부분은, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이라도 좋다. 생체 직교성 관능기는, 상술한 것과 동일하다. 추가의 수식 부분에 포함되는 생체 직교성 관능기는, 상기 (b)에 있어서의 제1 생체 직교성 관능기 및 제2 생체 직교성 관능기와 동일하거나 달라도 좋지만, 다른 것이 바람직하다.

[1367] 특정의 실시형태에서는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분은, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있어도 좋다. 항체 유도체 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 2개의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 추가의 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치라도 좋다(예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 생체 직교성 관능기를 포함하는 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 상기 (b)에 있어서의 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 수식 부분이 도입되는 위치와 다른 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 (b)에 있어서의 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분의 양쪽이 도입되는 위치가 246/248위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 288/290위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 288/290위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)에 있어서의 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분의 양쪽이 도입되는 위치가 288/290위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 246/248위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)에 있어서의 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분의 양쪽이 도입되는 위치가 317위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치 또는 288/290위치의 라이신 잔기가 바람직하다.

[1368] 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염의 생성의 확인은, 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인은, 상술한 바와 같은 펩타이드 맵핑에 의해 행할 수 있다. 생체 직교성 관능기의 도입 개수의 확인은, 질량 분석(DAR calculator(Agilent사 소프트웨어)를 병용할 수 있다)에 의해 행할 수 있다. 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염은, 크로마토그래피(예, 상술한 크로마토그래피, 및 어피니티 크로마토그래피) 등의 임의의 방법에 의해 적절히 정제할 수 있다.

[1369] 5-4. 항체 및 적어도 1개의 기능성 물질의 컨주게이트 또는 그 염

[1370] 본 발명은, (a) 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위), 및 (b) 기능성 물질을 포함하고, 또한 (c) 기능성 물질이 상기 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중에만 도입되어 있는(즉, 면역글로불린 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중에 기능성 물질이 도입되어 있고, 다른 쪽의 중쇄의 정상 영역 중에 기능성 물질이 도입되어 있지 않음), 항체 및 기능성 물질의 컨주게이트 또는 그 염을 제공한다. 항체, 면역글로불린 단위, 및 항체 및 기능성 물질의 컨주게이트, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 정상 영역)의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

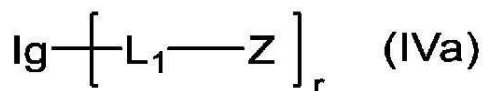
[1371] 컨주게이트 또는 그 염은, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘 및 라이신으로 이루어지는 14종의 아미노산 잔기 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 기능성 물질을 포함할 수 있다. 컨주게이트 또는 그 염은, 바람직하게는 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 라이신, 티로신, 트립토판 또는 시스테인 중 어

는 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 바람직하게는, 라이신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 더욱 바람직하게는 라이신 또는 티로신의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 특히 바람직하게는 라이신의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 기능성 물질을 포함할 수 있다. 상기 정상 영역 중의 이들 아미노산 잔기의 위치는, 상술한 바와 같다. 기능성 물질에 의한 항체 또는 그 염의 수식 위치는, 펩타이드 맵핑에 의해 확인할 수 있다. 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식 (IVa), (IVa-1), (IVb) 및 (IVb-1)에 있어서, 면역글로불린 단위는 상기 아미노산 잔기의 측쇄 중의 관능기를 통하여 해당하는 수식 단위는 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1372] 바람직하게는, 컨주게이트는, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 기능성 물질을 포함할 수 있다(환언하면, 면역글로불린 단위 중의 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여 기능성 물질을 포함하고, 다른 한쪽의 중쇄의 정상 영역 중의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여 기능성 물질을 포함하지 않음). 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치라도 좋다(예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식 (IVa), (IVa-1), (IVb), 및 (IVb-1)에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1373] 특정의 실시형태에서는, 컨주게이트 또는 그 염은, 하기 식 (IVa):

[1374] [화66]



[1375]

[1376] [식 중,

[1377] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1378] L₁은, 제1 링커를 나타내고,

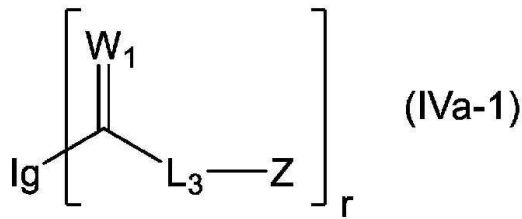
[1379] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

[1380] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, L₁로 표시되는 제1 링커, Z로 표시되는 기능성 물질, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 특히 바람직한 생체 직교성 관능기는, 티올기이다.

[1381] 식 (IVa)에 있어서, L₁-Z로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 700 이하라도 좋다. L₁-Z로 나타내는 부분 구조의 분자량이 700 이하인 경우, 컨주게이트 또는 그 염은, 항체 전체의 분자량에 대한 상기 부분 구조의 분자량의 비율이 매우 작기 때문에, 분자량의 차이에 기초한 정제가 상대적으로 곤란하지만, DAR의 고도의 제어를 가능하게 하는 본 발명에 의하면, 분자량의 차이에 기초한 정제를 반드시 필요로 하는 일 없이, 원하는 DAR을 나타내는 컨주게이트를 고순도로 얻을 수 있다. L₁-Z로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하, 또는 100 이하라도 좋다.

[1382] 다른 특정의 실시형태에서는, 컨주게이트 또는 그 염은, 하기 식 (IVa-1) :

[1383] [화67]



[1384]

[1385] [식 중,

[1386] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1387] W₁은, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1388] L₃은, 제3 링커를 나타내고,

[1389] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

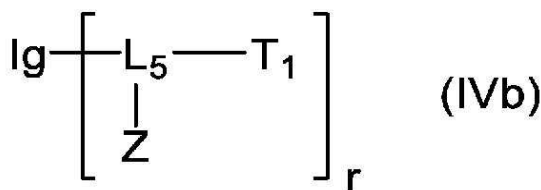
[1390] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, W₁로 표시되는 원자, L₃으로 표시되는 제3 링커, Z로 표시되는 기능성 물질, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1391] 식 (IVa-1)에 있어서, C(=W₁)-L₃-Z로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 700 이하라도 좋다. C(=W₁)-L₃-Z로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하, 150 이하, 또는 100 이하라도 좋다.

[1392] 식 (IVa-1)에 있어서, L₃으로 나타내는 부분 구조는, (CH₂)_{n1}이라도 좋다. n1의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1393] 또 다른 특정의 실시형태에서는, 컨주게이트 또는 그 염은, 하기 식 (IVb):

[1394] [화68]



[1395]

[1396] [식 중,

[1397] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1398] L₅는, 제5 링커를 나타내고,

[1399] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

[1400] T₁은, 1가의 기를 나타내고,

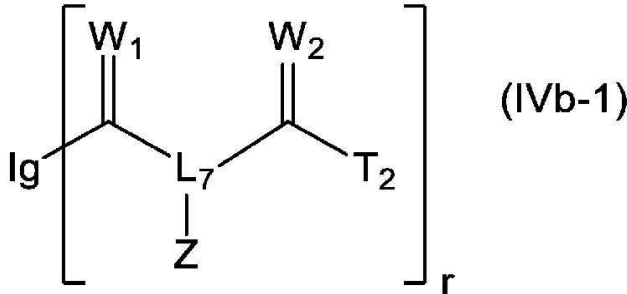
[1401] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, L₅로 표시되는 제5 링커, Z로 표시되는 기능성 물질, T₁로 표시되는 1가의 기, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 특히 바람직한 생체 직교성 관능기는, 아지드기이다.

[1402] 식 (IVb)에 있어서, L₅(-Z)-T₁로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 700 이하라도 좋다. L₅(-Z)-T₁로 표시되는 부

분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하, 또는 100 이하라도 좋다.

[1403] 또 다른 특정의 실시형태에서는, 컨쥬게이트 또는 그 염은, 하기 식 (IVb-1):

[1404] [화69]



[1405]

[1406] [식 중,

[1407] Ig는, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1408] W₁, 및 W₂는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1409] L₇은, 제7 링커를 나타내고,

[1410] Z는, 기능성 물질을 나타내고,

[1411] T₂는, 1가의 기를 나타내고,

[1412] 기능성 물질에 의한 상기 면역글로불린 단위의 수식 백분율 r은, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다. Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, W₁ 및 W₂로 표시되는 원자, L₇로 표시되는 제7 링커, Z로 표시되는 기능성 물질, T₂로 표시되는 1가의 기, 및 r로 표시되는 평균 수식 백분율, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다. 특히 바람직한 생체 직교성 관능기는, 아지드기이다.

[1413] 식 (IVb-1)에 있어서, C(=W₁)-L₇(-Z)-C(=W₂)-T₂로 표시되는 부분 구조의 분자량은 700 이하라도 좋다. C(=W₁)-L₇(-Z)-C(=W₂)-T₂로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 바람직하게는 600 이하이고, 보다 바람직하게는 500 이하이며, 보다 더욱 바람직하게는 400 이하이고, 특히 바람직하게는 300 이하, 250 이하, 200 이하, 또는 100 이하라도 좋다.

[1414] 식 (IVb-1)에 있어서, L₇로 나타내는 부분 구조는 (CH₂)_{n2}라도 좋다. n2의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1415] 식 (IVb-1)에 있어서, 생체 직교성 관능기를 포함하는 기는, NH-C(=O)-(CH₂)_{n3}-N₃이라도 좋다. n3의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1416] 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법은, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성함으로써 행하여져도 좋다.

[1417] 혹은, 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법은, 하기 (1) 및 (2)를 포함하는 방법에 의해 행하여져도 좋다:

[1418] (1) 상기 방법에 의해, 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 제조하는 것; 및

[1419] (2) 생체 직교성 관능기를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 항체 및 기능성 물질을 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

[1420] 보다 구체적으로는, 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법으로서, 예를 들면, 하기 (3-1) 내지 (3-12)를 들 수 있다(도 2 내지 6).

[1421] (방법 3-1) 상기 식 (IIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시

켜, 상기 식 (IVa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법.

[1422] (방법 3-2) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

[1423] (1) 상기 식 (IIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

[1424] (2) 상기 식 (IIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

[1425] (방법 3-3) 하기 (1) 내지 (3)을 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

[1426] (1) 상기 식 (Ia)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을 생성하는 것;

[1427] (2) 상기 식 (IIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

[1428] (3) 상기 식 (IIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

[1429] (방법 3-4) 상기 식 (IIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법.

[1430] (방법 3-5) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

[1431] (1) 상기 식 (IIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

[1432] (2) 상기 식 (IIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

[1433] (방법 3-6) 하기 (1) 내지 (3)을 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

[1434] (1) 상기 식 (Ia-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을 생성하는 것;

[1435] (2) 상기 식 (IIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

[1436] (3) 상기 식 (IIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

[1437] (방법 3-7) 상기 식 (IIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법.

[1438] (방법 3-8) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

[1439] (1) 상기 식 (IIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것; 및

[1440] (2) 상기 식 (IIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염을 생성하는 것.

[1441] (방법 3-9) 하기 (1) 내지 (3)을 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조 방법:

[1442] (1) 상기 식 (Ib)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을 생성하는 것;

는 그 염을 생성하는 것;

- [1443] (2) 상기 식 (IIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것; 및
- [1444] (3) 상기 식 (IIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨주게이트 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1445] (방법 3-10) 상기 식 (IIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨주게이트 또는 그 염을 생성하는 것을 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨주게이트 또는 그 염의 제조 방법.
- [1446] (방법 3-11) 하기 (1) 및 (2)를 포함하는 항체 및 기능성 물질의 컨주게이트 또는 그 염의 제조 방법:
- [1447] (1) 상기 식 (IIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것;
- [1448] (2) 상기 식 (IIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨주게이트 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1449] (방법 3-12) 하기 (1) 내지 (3)을 포함하는, 항체 및 기능성 물질의 컨주게이트 또는 그 염의 제조 방법:
- [1450] (1) 상기 식 (IB-1)로 표시되는 화합물 또는 그 염을, 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위를 포함하는 항체 또는 그 염과 반응시켜, 상기 식 (IIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을 생성하는 것;
- [1451] (2) 상기 식 (IIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염을, 절단성 부분에서 절단 처리하여, 상기 식 (IIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 생성하는 것; 및
- [1452] (3) 상기 식 (IIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염을 기능성 물질과 반응시켜, 상기 식 (IVb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨주게이트 또는 그 염을 생성하는 것.
- [1453] 상기 방법 3-1 내지 3-12는, 본 발명의 친화성 물질을, 항체에 대한 반응성기를 포함하는 부분 화합물과 반응시켜, 본 발명의 화합물 또는 그 염을 생성하는 것을 더 포함하고 있어도 좋다(도 2 내지 6).
- [1454] 컨주게이트 또는 그 염은, 추가의 수식 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 항체의 수식 방법으로는 다양한 방법이 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서는, 추가의 수식 부분을 더 포함하도록 컨주게이트 또는 그 염을 수식할 수 있다. 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 바람직하게는 항체의 중쇄(특히, 중쇄의 정상 영역 중)에 도입되어 있어도 좋다.
- [1455] 특정의 실시형태에서는, 추가의 수식 부분은, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이라도 좋다. 기능성 물질은, 상술한 바와 같다. 추가의 수식 부분에 포함되는 기능성 물질은, 상기 (b)의 기능성 물질과 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1456] 특정의 실시형태에서는, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분은, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있어도 좋다. 컨주게이트 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 2개의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 추가의 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치라도 좋다(예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 상기 (b)의 기능성 물질이 도입되는 위치와 다른 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 (b)의 기능성 물질이 도입되는 위치가 246/248위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는 288/290위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 288/290위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)의 기능성 물질이 도입되는 위치가 288/290위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 246/248위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)의 기능성 물질이 도입되는 위치가 317위의 라이신 잔기인 경우, 상

기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 288/290위치의 라이신 잔기가 바람직하다.

[1457] 5-5. 항체 및 적어도 2개의 기능성 물질의 컨쥬게이트 또는 그 염

[1458] 본 발명은 또한, (a) 제1 및 제2 중쇄로 이루어지는 2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위, 및 (b) 제1 기능성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 기능성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함하고,

[1459] (c) 제1 수식 부분이 상기 제1 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고,

[1460] (d) 제2 수식 부분이 상기 제2 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있고, 또한

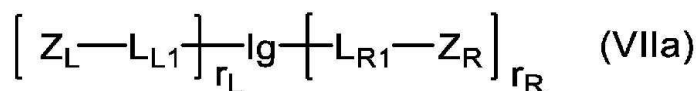
[1461] (e) 제1 및 제2 수식 부분이 서로 다른, 항체 및 제1 및 제2 수식 부분의 컨쥬게이트 또는 그 염을 제공한다. 항체, 면역글로불린 단위, 및 생체 직교성 관능기, 및 그것들을 구성하는 요소(예, 정상 영역)의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.

[1462] 컨쥬게이트 또는 그 염은, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘 및 라이신으로 이루어지는 14종의 아미노산 잔기 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 제1 기능성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 기능성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 항체 유도체 또는 그 염은, 바람직하게는, 상기 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중에 존재하는 라이신, 티로신, 트립토판 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 바람직하게는, 라이신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 보다 더욱 바람직하게는, 라이신 또는 티로신의 측쇄 중의 관능기의 수식을 통하여, 특히 바람직하게는, 라이신의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 제1 기능성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 기능성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 상기 정상 영역 중의 이들 아미노산 잔기의 위치는, 상술한 바와 같다. 기능성 물질에 의한 항체 또는 그 염의 수식 위치는, 펩타이드 맵핑에 의해 확인할 수 있다. 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 아미노산 잔기의 측쇄 중의 관능기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1463] 바람직하게는, 컨쥬게이트 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 제1 및 제2 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 각각, 제1 기능성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 기능성 물질을 포함하는 제2 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치, 또는 317위치라도 좋다. 수식은, 상술한 바와 같이 위치 선택적이라도 좋다. 따라서, 후술하는 식에 있어서, 면역글로불린 단위는, 상기 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기를 통하여, 해당하는 수식 단위를 위치 선택적으로 갖고 있어도 좋다.

[1464] 특정의 실시형태에서는, 컨쥬게이트 또는 그 염은, 하기 식 (VIIa):

[1465] [화70]



[1466]

[1467] [식 중,

[1468] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1469] L_{L1} 및 L_{R1} 은, 각각 독립적으로, 제1 링커를 나타내고,

[1470] Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

[1471] Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

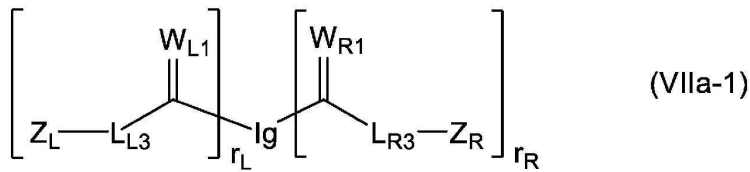
[1472] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로

불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염이라도 좋다.

[1473] 식 (VIIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조는, 식 (VIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 기능성 물질을 반응시킴으로써 행할 수 있다. 식 (VIa)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 있어서의 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 경우, 반응은 1회의 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 경우, 반응은, 1회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 반응 조건에서 반응 가능한 경우), 또는 2회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 반응 조건에서 반응 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1474] 특정의 실시형태에서는, 항체 유도체 또는 그 염은, 하기 식 (VIIa-1):

[1475] [화71]



[1476]

[1477] [식 중,

[1478] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1479] W_{L1} 및 W_{R1} 은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1480] L_{L3} 및 L_{R3} 은, 각각 독립적으로, 제3 링커를 나타내고,

[1481] Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

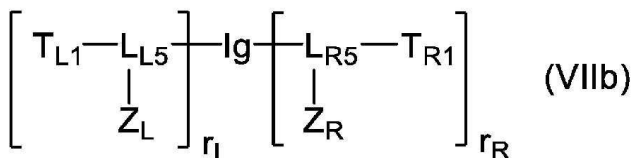
[1482] Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

[1483] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 또는 그 염이라도 좋다.

[1484] 식 (VIIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조는, 식 (VIa-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 기능성 물질을 반응시킴으로써 행할 수 있다. 절단 반응은 1회의 반응에 의해 행할 수 있다. 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1485] 특정의 실시형태에서는, 컨쥬게이트 또는 그 염은, 하기 식 (VIIb):

[1486] [화72]



[1487]

[1488] [식 중,

[1489] Ig는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1490] L_{L5} 및 L_{R5} 은, 각각 독립적으로, 제5 링커를 나타내고,

[1491] Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

[1492] Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

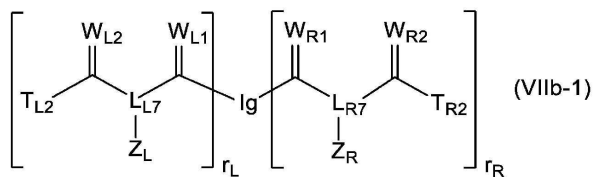
[1493] T_{L1} 및 T_{R1} 은, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[1494] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염이라도 좋다.

[1495] 식 (VIIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조는, 식 (VIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 기능성 물질을 반응시킴으로써 행할 수 있다. 식 (VIb)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 있어서의 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 경우, 반응은, 1회의 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 경우, 반응은 1회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 반응 조건에서 반응 가능한 경우), 또는 2회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 반응 조건에서 반응 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1496] 특정의 실시형태에서는, 컨쥬게이트 또는 그 염은, 하기 식 (VIIb-1):

[1497] [화73]



[1498] [식 중,

[1500] Ig 는, 상기 면역글로불린 단위를 나타내고,

[1501] W_{L1} 및 W_{L2} , 및 W_{R1} 및 W_{R2} 는, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1502] L_{L7} 및 L_{R7} 은, 각각 독립적으로, 제7 링커를 나타내고,

[1503] Z_L 은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

[1504] Z_R 은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

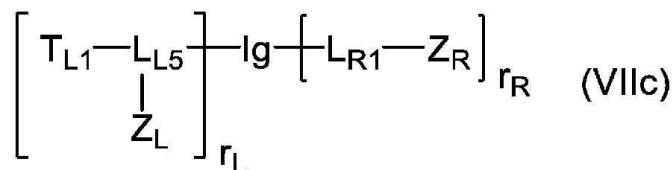
[1505] T_{L2} 및 T_{R2} 는, 각각 독립적으로, 1가의 기를 나타내고,

[1506] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염이라도 좋다.

[1507] 식 (VIIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조는, 식 (VIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 기능성 물질을 반응시킴으로써 행할 수 있다. 식 (VIb-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 있어서의 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 경우, 반응은, 1회의 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 경우, 반응은, 1회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 반응 조건에서 반응 가능한 경우), 또는 2회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 반응 조건에서 반응 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1508] 특정의 실시형태에서는, 컨쥬게이트 또는 그 염은, 하기 식 (VIIc):

[1509] [화74]



[1510]

[1511] [식 중,

[1512] Ig는, 상기 번역글로불린 단위를 나타내고,

[1513] L_{R1}은, 제1 링커를 나타내고,

[1514] L_{L5}는, 제5 링커를 나타내고,

[1515] Z_L은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

[1516] Z_R은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

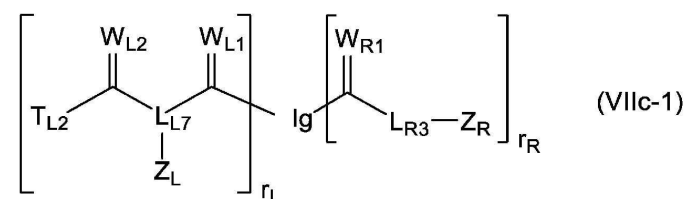
[1517] T_{L1}은, 1가의 기를 나타내고,

[1518] 제1 수식 부분에 의한 상기 번역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L, 및 제2 수식 부분에 의한 상기 번역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염이라도 좋다.

[1519] 식 (VIIc)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨쥬게이트 또는 그 염의 제조는, 식 (VIc)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 기능성 물질을 반응시킴으로써 행할 수 있다. 식 (VIc)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 있어서의 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 경우, 반응은, 1회의 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 경우, 반응은, 1회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 반응 조건에서 반응 가능한 경우), 또는 2회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 반응 조건에서 반응 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.

[1520] 특정의 실시형태에서는, 컨쥬게이트 또는 그 염은, 하기 식 (VIIc-1):

[1521] [화75]



[1522]

[1523] [식 중,

[1524] Ig는, 상기 번역글로불린 단위를 나타내고,

[1525] W_{L1} 및 W_{L2}, 및 W_{R1}은, 각각 독립적으로, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[1526] L_{R3}은, 제3 링커를 나타내고,

[1527] L_{L7}은, 제7 링커를 나타내고,

[1528] Z_L은, 제1 기능성 물질을 나타내고,

[1529] Z_R은, 제2 기능성 물질을 나타내고,

[1530] T_{L2}는, 1가의 기를 나타내고,

- [1531] 제1 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_L , 및 제2 수식 부분에 의한 상기 면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r_R 은, 각각, 65 내지 135%이다.]로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨주게이트 또는 그 염이라도 좋다.
- [1532] 식 (VIIc-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 컨주게이트 또는 그 염의 제조는, 식 (VIc-1)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 기능성 물질을 반응시킴으로써 행할 수 있다. 식 (VIc)로 표시되는 구조 단위를 포함하는 항체 유도체 또는 그 염에 있어서의 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 경우, 반응은, 1회의 반응은, 1회의 반응에 의해 행할 수 있다. 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 경우, 반응은, 1회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 동일한 반응 조건에서 반응 가능한 경우), 또는 2회의 반응(예, 다른 2개의 생체 직교성 관능기가 다른 반응 조건에서 반응 가능한 경우)에 의해 행할 수 있다. 반응의 상세는, 상술한 바와 같다.
- [1533] 상기 식 (VIa), (VIa-1), (VIb), (VIb-1), (VIc) 및 (VIc-1)에 있어서, Ig로 표시되는 면역글로불린 단위, 및 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는, 상술한 바와 같다.
- [1534] 상기 식 (VIa), (VIa-1), (VIb), (VIb-1), (VIc), 및 (VIc-1)에 있어서, 아래 첨자 「L」 및 「R」이 붙은 기호는, 다음과 같다.
- [1535] W_{L1} 및 W_{R1} 은, W_1 과 동일하고, 산소 원자가 바람직하다.
- [1536] W_{L2} 및 W_{R2} 는, W_2 와 동일하고, 산소 원자가 바람직하다.
- [1537] L_{L1} 및 L_{R1} 로 표시되는 제1 링커는, L_1 로 표시되는 제1 링커와 동일하다. L_{L1} 및 L_{R1} 로 표시되는 제1 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1538] L_{L3} 및 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, L_3 으로 표시되는 제3 링커와 동일하다. L_{L3} 및 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1539] L_{L5} 및 L_{R5} 로 표시되는 제5 링커는, L_5 로 표시되는 제5 링커와 동일하다. L_{L5} 및 L_{R5} 로 표시되는 제1 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1540] L_{L7} 및 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, L_7 로 표시되는 제7 링커와 동일하다. L_{L7} 및 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1541] B_L 로 표시되는 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기, 및 B_R 로 표시되는 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는, B 로 표시되는 생체 직교성 관능기를 포함하는 기와 동일하다. B_L 로 표시되는 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기 및 B_R 로 표시되는 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1542] T_{L1} 및 T_{R1} 로 나타내는 1가의 기는, T_1 로 표시되는 1가의 기와 동일하다. T_{L1} 및 T_{R1} 로 표시되는 1가의 기는 동일해도 달라도 좋다.
- [1543] T_{L2} 및 T_{R2} 로 표시되는 1가의 기는, T_2 로 표시되는 1가의 기와 동일하다. T_{L2} 및 T_{R2} 로 표시되는 1가의 기는 동일해도 달라도 좋다.
- [1544] r_L 및 r_R 로 표시되는 평균 수식 백분율의 정도 및 그 결정 방법은, r 로 표시되는 평균 수식 백분율과 동일하다. r_L 및 r_R 로 표시되는 평균 수식 백분율은, 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1545] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIa) 및 (VIIc)에 있어서, L_{L1} - Z_L , 및/또는 L_{R1} - Z_R 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 식 (IVa)에 있어서의 L_1 - Z 로 표시되는 부분 구조의 상기 분자량과 동일해도 좋다.
- [1546] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIa-1) 및 (VIIc-1)에 있어서, $C(=W_{L1})$ - L_{L3} - Z_L , 및/또는 $C(=W_{R1})$ - L_{R3} - Z_R 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, 식 (IVa-1)에 있어서의 $C(=W_1)$ - L_3 - Z 로 표시되는 부분 구조의 상기 분자량과 동일해도 좋다.

- [1547] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIa-1) 및 (VIIc-1)에 있어서, L_{L3} 및/또는 L_{R3} 으로 표시되는 제3 링커는, 식 (IVa-1)에서 L_3 으로 표시되는 제3 링커인 $(CH_2)_{n1}$ 과 동일해도 좋다.
- [1548] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIb), (VIIc), (VIIb-1) 및 (VIIc-1)에 있어서, T_{L1} , T_{R1} , T_{L2} 및/또는 T_{R2} 로 표시되는 1가의 기는, 식 (IVb)에 있어서의 T_1 및/또는 T_2 로 표시되는 것과 같은, 치환되어 있는 하이드록시아미노기라도 좋다.
- [1549] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIb) 및 (VIIc)에 있어서, $L_{L5}(-Z_L)-T_{L1}$ 및/또는 $L_{R5}(-Z_R)-T_{R1}$ 로 표시되는 부분 구조의 분자량은, (IVb)에 있어서의 $L_5(-Z)-T_1$ 로 표시되는 부분 구조의 분자량과 동일해도 좋다.
- [1550] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIb-1) 및 (VIIc-1)에 있어서, $C(=W_{L1})-L_{L7}(-Z_L)-C(=W_{L2})-T_{L2}$ 및/또는 $C(=W_{R1})-L_{R7}(-Z_R)-C(=W_{R2})-T_{R2}$ 로 표시되는 부분구조의 분자량은, 식 (IVb-1)에 있어서의 $C(=W_1)-L_7(-Z)-C(=W_2)-T_2$ 로 표시되는 부분 구조의 분자량과 동일해도 좋다.
- [1551] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIb-1) 및 (VIIc-1)에 있어서, L_{L7} 및/또는 L_{R7} 로 표시되는 제7 링커는, 식 (IVb-1)에 있어서의 L_7 로 표시되는 제7 링커인 $(CH_2)_{n2}$ 와 동일해도 좋다.
- [1552] 특정의 실시형태에서는, 식 (VIIb-1) 및 (VIIc-1)에 있어서, 제1 생체 직교성 관능기를 포함하는 제1 기 및/또는 제2 생체 직교성 관능기를 포함하는 제2 기는, 식 (IVb-1)에 있어서의 생체 직교성 관능기를 포함하는 기로 표시되는 것과 같은, $NH-C(=O)-(CH_2)_{n3}-N_3$ 이라도 좋다.
- [1553] 컨쥬게이트 또는 그 염은, 추가의 수식 부분을 더 포함하고 있어도 좋다. 항체의 수식 방법으로는 다양한 방법이 알려져 있다. 따라서, 본 발명은 추가의 수식 부분을 더 포함하도록 컨쥬게이트 또는 그 염을 수식할 수 있다. 추가의 수식 부분은, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 바람직하게는 항체의 중쇄(특히, 중쇄의 정상 영역 중)에 도입되어 있어도 좋다.
- [1554] 특정의 실시형태에서는, 추가의 수식 부분은, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분이라도 좋다. 기능성 물질은, 상술한 바와 동일하다. 추가의 수식 부분에 포함되는 기능성 물질은, 상기 (b)에 있어서의 제1 기능성 물질 및 제2 기능성 물질과 동일해도 달라도 좋고, 다른 것이 바람직하다.
- [1555] 특정의 실시형태에서는, 기능성 물질을 포함하는 추가의 수식 부분은, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중의 1 이상의 위치에 존재하는 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 상기 2개의 중쇄에 있어서의 정상 영역 중에 도입되어 있어도 좋다. 컨쥬게이트 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 2개의 중쇄의 정상 영역(바람직하게는 Fc 영역 또는 CH2 도메인) 중의 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 측쇄 중의 아미노기의 수식을 통하여, 추가의 수식 부분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 1 이상(바람직하게는 1 또는 2, 보다 바람직하게는 1)의 라이신 잔기의 위치는, EU 넘버링에 따른 인간 IgG 중쇄의 246/248위치, 288/290위치 또는 317 위치라도 좋다(예를 들면, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2018/199337호, 국제공개 제2019/240287호, 국제공개 제2019/240288호, 국제공개 제2020/009165호, 국제공개 제2020/090979호 참조). 기능성 물질을 포함하는 추가적인 수식 부분이 도입되는 위치는, 상기 (b)에서 제1 기능성 물질을 포함하는 제1 수식 부분, 및 제2 기능성 물질을 포함하는 제2 수식 부분이 도입되는 위치와 다른 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 (b)에 있어서의 제1 수식 부분과 제2 수식 부분의 양쪽이 도입되는 위치가 246/248위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 288/290위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 288/290위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)에 있어서의 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분의 양쪽이 도입되는 위치가 288/290위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 317위치의 라이신 잔기가 바람직하고, 246/248위치의 라이신 잔기가 보다 바람직하다. 상기 (b)에 있어서의 제1 수식 부분 및 제2 수식 부분의 양쪽이 도입되는 위치가 317위치의 라이신 잔기인 경우, 상기 추가의 수식 부분이 도입되는 위치는, 246/248위치, 또는 288/290위치의 라이신 잔기가 바람직하다.
- [1556] 컨쥬게이트 또는 그 염의 생성의 확인은, 그 구체적인 특정 원료 및 생성물의 분자량에 따라 다르지만, 예를 들어 전기영동법, 크로마토그래피(예: 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC) 또는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인은, 상술한 바와 같은 펩타이드 맵핑에 의해 행할 수 있다. 기능성 물질의 도입 개수의 확인은, 질량 분석(DAR Calculator(Agilent사 소프트웨어)을 병용

할 수 있다)에 의해 행할 수 있다. 컨쥬게이트 또는 그 염은, 크로마토그래피(예를 들어, 상술한 크로마토그래피 및 어피니티 크로마토그래피)와 같은 임의의 방법에 의해 적절히 정제할 수 있다.

[1557] 6. 용도

[1558] 본 발명의 화합물 또는 그 염은, 항체의 구성 단위(2개의 중쇄 및 필요에 따라 2개의 경쇄를 포함하는 면역글로불린 단위) 중의 한쪽의 중쇄만을 용이하게 수식할 수 있다(면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r 은, 65-135%이다). 본 발명의 화합물 또는 그 염은 또한, 면역글로불린 단위 중의 중쇄에 있어서의 특정의 아미노산 잔기(바람직하게는, 라이신 잔기)를 위치 선택적으로 수식할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그 염을 포함하는, 항체 유도체화용 시약을 제공한다.

[1559] 본 발명의 시약은, 다른 성분을 더 포함하는 조성물의 형태로 제공되어도 좋다. 이러한 다른 성분으로서, 예를 들면 용액, 안정화제(예, 산화 방지제, 보존제)를 들 수 있다. 용액으로는 수용액이 바람직하다. 수용액으로서, 예를 들면, 물(예, 증류수, 멸균 증류수, 정제수, 생리 식염수), 완충액(예, 인산 수용액, Tris-염산 완충액, 탄산-중탄산 완충액, 붕산 수용액), 글라이신-수산화 나트륨 완충액, 구연산 완충액)을 들 수 있지만, 완충액이 바람직하다. 용액의 pH는, 예를 들어 5.0 내지 9.0, 바람직하게는 5.5 내지 8.5이다. 본 발명의 시약은, 액상 또는 분말상(예를 들어, 동결건조 분말)로 제공할 수 있다.

[1560] 본 발명의 친화성 물질 수식 항체, 항체 유도체 또는 그 염은, 예를 들면, 본 발명의 컨쥬게이트 또는 그 염의 조제를 위한 중간체로서 유용하다.

[1561] 본 발명의 컨쥬게이트 또는 그 염은, 예를 들면, 의약, 또는 시약(예, 진단 시약, 연구용 시약)으로서 유용하다. 특히, 항체의 구성 단위에 있어서의 한쪽의 중쇄만이 수식되어 있고(면역글로불린 단위의 평균 수식 백분율 r 은, 65 내지 135다), 게다가 기능성 물질로 위치 선택적으로 수식되어 있는 본 발명의 컨쥬게이트 또는 그 염은 약제로서 유용하다. 항체 약물 복합체(ADC)의 약물의 결합수 및 결합 위치를 변화시키면, 체내 동태나 약물의 방출 속도, 효과가 변화하는 것이 보고되어 있다. 이러한 점으로부터 차세대형 ADC에서는 컨쥬게이션하는 약물의 개수와 위치를 제어하는 것이 요구되고 있다. 개수 및 위치가 일정하면, 기대대로의 efficacy, 컨쥬게이션 약제의 변이, 로트 차 소위 레귤레이션의 문제가 해결되는 것으로 생각되고 있다. 따라서, 본 발명의 컨쥬게이트 또는 그 염은, 이러한 레귤레이션 문제를 해결할 수 있다.

[1562] 본 발명의 컨쥬게이트 또는 그 염은, 의약 조성물의 형태로 제공되어도 좋다. 이러한 의약 조성물은, 본 발명의 컨쥬게이트 또는 그 염에 더하여, 의약상 허용될 수 있는 담체를 포함하고 있어도 좋다. 의약상 허용될 수 있는 담체로서는, 예를 들어, 수크로오스, 전분, 만니톨, 소르비톨, 젓당, 글루코오스, 셀룰로오스, 탈크, 인산 칼슘, 탄산칼슘 등의 부형제, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 폴리프로필피롤리돈, 젤라틴, 아라비아 고무, 폴리에틸렌글리콜, 수크로오스, 전분 등의 결합제, 전분, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 스타치, 탄산수소나트륨, 인산칼슘, 구연산칼슘 등의 붕괴제, 스테아르산 마그네슘, 에어로질, 탈크, 라우릴황산나트륨 등의 활제, 구연산, 멘톨, 글리실리신·암모늄염, 글리신, 오렌지분 등의 방향제, 벤조산나트륨, 아황산수소나트륨, 메틸파라벤, 프로필파라벤 등의 보존제, 구연산, 구연산나트륨, 아세트산 등의 안정제, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 스테아르산알루미늄 등의 현탁제, 계면활성제 등의 분산제, 물, 생리 식염수, 오렌지 주스 등의 희석제, 카카오 기름, 폴리에틸렌 글리콜, 백등유 등의 베이스 왁스 등을 들 수 있지만, 그것들에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 컨쥬게이트 또는 그 염은 또한, 안정성을 실현하는 임의의 수식(예, PEG화)을 갖고 있어도 좋다.

[1563] 경구 투여에 적합한 제제는, 물, 생리 식염수, 오렌지 주스와 같은 희석액에 유효량의 리간드를 용해시킨 액제, 유효량의 리간드를 고체나 과립으로서 포함하고 있는 캡슐제, 사체제 또는 정제, 적당한 분산매 중에 유효량의 유효 성분을 현탁시킨 현탁액제, 유효량의 유효 성분을 용해시킨 용액을 적당한 분산매 중에 분산시키고 유화시킨 유제 등이다.

[1564] 의약 조성물은, 비경구적인 투여(예, 정맥 내 주사, 피하 주사, 근육 주사, 국소 주입, 복강 내 투여)에 적합하다. 이러한 비경구적인 투여에 적합한 의약 조성물로서는, 수성 및 비수성의 등장(等張)인 무균의 주사액제가 있고, 이것에는 항산화제, 완충액, 계균제, 등장화제 등이 포함 되어 있어도 좋다. 또한, 수성 및 비수성의 무균의 현탁액제를 들 수 있고, 이것에는 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 방부제 등이 포함되어 있어도 좋다.

[1565] 의약 조성물의 투여량은, 유효 성분의 종류·활성, 병의 중증도, 투여 대상이 되는 동물종, 투여 대상의 약물 수용성, 체중, 연령 등에 따라 다르지만, 적절하게 설정할 수 있다.

- [1566] 실시예
- [1567] 이하의 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [1568] (실시예 1) 친화성 물질의 설계 및 C.glutamicum에서의 친화성 물질의 분비 발현
- [1569] (1-1) 친화성 물질의 설계 개요
- [1570] 본 발명에서는, 항체에 결합 가능한 부위를 분자 내에 2개소 이상 포함하는 친화성 물질을 설계할 필요가 있다. 즉 친화성 물질은
- [1571] A) 항체에 결합 가능한 2개 이상의 부위(필요에 따라, 이들 부위를 연결하기 위한 링커)를 포함하는 분자가 되도록 설계할 필요가 있다.
- [1572] 다음으로, 본 발명에서는, 면역글로불린 단위를 수식할 수 있도록 하기 위해, 면역글로불린 단위에 대한 반응성기를 갖는 화합물을 친화성 물질에 결합시키는 것이 바람직하다.
- [1573] 또한, 면역글로불린 단위의 수식 후에 친화성 물질을 제거하기 위해서는, 반응성기와 친화성 물질 사이에 절단성 부분을 포함하는 것이 바람직하다.
- [1574] 또한, 친화성 물질 중의 특정 부위에 대한 화합물의 특이적인 결합을 달성하기 위해서는, 화합물과 반응할 수 있는 부위가 친화성 물질 중에 1개만 존재하도록 설계하는 것이 바람직하다. 따라서, 친화성 물질로서 친화성 폴리펩타이드를 사용하고, 친화성 폴리펩타이드 중의 라이신 잔기(K)의 측쇄 중의 아미노기를 통하여, 친화성 폴리펩타이드와 화합물을 결합시키는 경우, 라이신 잔기가 친화성 폴리펩타이드 중에 1개만 존재하도록 친화성 폴리펩타이드를 설계하는 것이 바람직하다. 따라서, 이하와 같이 친화성 폴리펩타이드를 설계하였다.
- [1575] B) 폴리펩타이드가 K를 1잔기만 포함한다.
- [1576] C) N말단의 아미노산을 Q(글루타민)로 함으로써, 피로글루타미화시켜 N말단 아미노기를 아미드로 변환한다.
- [1577] 상기 A), B) 및 C)의 룰에 따라 이하 (a)-(h)와 같이 폴리펩타이드성의 친화성 물질을 설계하였다.
- [1578] (1-2) 친화성 물질의 조제
- [1579] 이하의 친화성 물질을 조제하였다.
- [1580] (a) QET-Z34CM-PA32-Fc3K
- [1581] QET-FNMQCQRRFYELHDPNLNEEQRNARIRSIREEC-GGAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAPGG-RGNCA YHKGQI IWCTYH-NH2(서열번호 1)
- [1582] (b) QET-Z34CM-PA48-Fc3K
- [1583] QET-FNMQCQRRFYELHDPNLNEEQRNARIRSIREEC-GGAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGG-RGNCA YHKGQI IWCTYH-NH2(서열번호 2)
- [1584] (c) QET-Fc3K-PA32-Z34CM
- [1585] QETRGNCAYHKGQI IWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAPAPAAPAPAPAPAPGG-FNMQCQRRFYELHDPNLNEEQRNARIRSIREEC-NH2(서열번호 3)
- [1586] (d) QET-Fc3K-PA48-Z34CM
- [1587] QETRGNCAYHKGQI IWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAPAPAAPAPAPAPAPGG-FNMQCQRRFYELHDPNLNEEQRNARIRSIREEC-NH2(서열번호 4)
- [1588] (e) QET-Fc3K-PA32-ProAR
- [1589] QETRGNCAYHKGQI IWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAPAPAAPAPAPAPAPGG-FNREQNFAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-NH2(서열번호 5)
- [1590] (f) QET-Fc3K-PA48-ProAR
- [1591] QETRGNCAYHKGQI IWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAPAPAAPAPAPAPAPGG-FNREQNFAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-NH2(서열번호 6)

- [1592] (g) QET-ProAR-PA32-Z34CK
- [1593] QET-FNREQQNAFYELHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-GGAAPAAPAPAAPAPAPAPAPAPAPAPGG-FNKQCQRIFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC-NH2(서열번호 7)
- [1594] (h) QET-ProAR-PA48-Z34CK
- [1595] QET-FNREQQNAFYELHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-GGAAPAAPAPAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGG-FNKQCQRIFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC-NH2(서열번호 8)
- [1596] (1-3) 친화성 물질의 발현
- [1597] Corynex(등록상표)를 사용하여 이들 폴리펩타이드성의 친화성 물질의 발현 검토를 행하였다. Corynex(등록상표)에 의한 발현에서는, CspB 융합법(WO2013/062029), 즉 시그널 펩타이드를 코딩하는 염기 서열과 목적 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 서열 사이의 CspB 성숙 단백질의 N말단3잔기 Gln-Glu-Thr(QET)를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 삽입함으로써, 목적 폴리펩타이드의 분비 생산량을 향상할 수 있다고 하는 기술을 활용하였다. 또한 CspB 태그의 N말단이 Q이기 때문에, 시그널 서열 절단 후, 1잔기째의 Q가 피로 글루타밀화되어 N말단 아미노기를 보호할 수 있다는 이점이 있다. 즉, 상기 A), B) 및 C)의 물에 더하여, 하기 D)의 규칙을 고려하는 것이 Corynex(등록상표)를 이용한 친화성 폴리펩타이드의 발현의 향상에 효과적이다.
- [1598] D) N말단에 QET의 3잔기를 부가하여, Corynex(등록상표)에서의 분비 효율 향상
- [1599] 이하, Corynex(등록상표)에 의한 발현 검토의 실시예를 기재한다.
- [1600] (1-4) QET-Z34CM-PA32-Fc3K, QET-Z34CM-PA48-Fc3K, QET-Fc3K-PA32-Z34CM, QET-Fc3K-PA48-Z34CM, QET-Fc3K-PA32-ProAR, QET-Fc3K-PA48-ProAR, QET-ProAR-PA32-Z34CK, 및 QET-ProAR-PA48-Z34CK의 각 분비 발현 플라스미드의 구축
- [1601] 친화성 폴리펩타이드로서, 상기 QET-Z34CM-PA32-Fc3K, QET-Z34CM-PA48-Fc3K, QET-Fc3K-PA32-Z34CM, QET-Fc3K-PA48-Z34CM, QET-Fc3K-PA32-ProAR, QET-Fc3K-PA48-ProAR, QET-ProAR-PA32-Z34CK, 및 QET-ProAR-PA48-Z34CK의 8종류의 아미노산 서열을 각각 설계하고, 이들 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 서열을 *C.glutamicum*의 코돈 사용 빈도를 고려하여 설계하였다. 또한, *C.glutamicum*에 의한 분비 발현을 가능하게 하기 위해, 각각 다음의 발현 카세트를 설계하였다.
- [1602] QET-Z34CM-PA32-Fc3K는, *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Z34CM-PA32-Fc3K의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K」로 표기한다)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 9, 10에 나타낸다.
- [1603] CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K를 코딩하는 염기 서열
- [1604] atgtttaacaaccgatccgcactgcagctctcgctgggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccttaacatgcagtgccaacggcgcttttacgaagcgctccacgatcccaacctgaacgaggaacagcgtaacgcgcgcatctcgctccatccgtgaggaatgtggcgggtgtgcccctgctgccccagaccggcagcacctgcggcaccagctccggcgagctccagctgcaccggcccctgccgctccagcagcgccagctcccggaggcgaggcaattgcgcctatcacaaggggcagatcatctgggtgcattaccattaa(서열번호 9)
- [1605] CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K의 아미노산 서열
- [1606] MFNNRIRTAALAGAIATAASGVAIPAFQETFMQCQRIFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIREECGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGRGNCAHYHKQIIWCTYH(서열번호 10)
- [1607] QET-Z34CM-PA48-Fc3K는, *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Z34CM-PA48-Fc3K의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K」로 표기한다)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 11, 12에 나타낸다.
- [1608] CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K를 코딩하는 염기 서열
- [1609] atgtttaacaaccgatccgcactgcagctctcgctgggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccttaacatgcagtgccaacgtcgcttttacgaagcgctgcacgatcccaacctgaacgaggaacagcgcaatgcgcgaatcgctccatctgcgaggaatgtggc

ggagcagctcccgggctcctgctccagcagcgctgctgctcctgccctgcgccacctgcagcacctgcaccagcagctccggcagcaccagctccagctgcaccgcgccccagctcctgcagcgccagccgctccggccccggaggtaggggcaactgcgcatatcacaaggggcagataatctggtgcacttatcactaa(서열번호 11)

[1610] CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K의 아미노산 서열

[1611] MFNNRIRTAALAGATAIISTAASGVAIPAFQAQETFMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREECGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGRGNCAYHKGQIIWCTYH(서열번호 12)

[1612] QET-Fc3K-PA32-Z34CM은, C.glutamicum ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주(同株) 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PA32-Z34CM의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM」으로 표기한다)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 13, 14에 나타낸다.

[1613] CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM을 코딩하는 염기 서열

[1614] atgtttaacaaccgtatccgactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgctggcaactgtgcctaccacaagggccagatcatctggtgcacgtaccacggaggtgccgcgctgccgcacctgctccagctgctcccgctgccctgcaccagctgcgccagcagcaccagctccagcggcacctgcagcaccggcacctggtggttcaacatgcagtccaacgacgcttctacgaggtctgcacgatccgaacctcaacgaggaaacagcgcaatgccgctattcggtccatcagggaggaatgctaa(서열번호 13)

[1615] CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM의 아미노산 서열

[1616] MFNNRIRTAALAGATAIISTAASGVAIPAFQAQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGPFNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 14)

[1617] QET-Fc3K-PA48-Z34CM은, C.glutamicum ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PA48-Z34CM의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM」으로 표기한다)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각, 서열번호 15, 16에 나타낸다.

[1618] CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM을 코딩하는 염기 서열

[1619] tgtttaacaaccgtatccgactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgctggcaattgcgctatcacaagggtcagatcatctggtgcacctaccatggtggtgcagcaccagctgccccggctccggctgcgctgctgcacctgcgccagctgcacctgcagcaccggcacctgctgctccagcagcaccgctcctgcagctcccgtgcccgagctccagcggcgctgccccgagcaccctggagggttcaacatgcagtccaacgtcgctttacgaggtttgcatgatcctaactgaacgaggaaacagcggaatgcgcggtacgctccatcgcaagaatgttaa(서열번호 15)

[1620] CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM의 아미노산 서열

[1621] MFNNRIRTAALAGATAIISTAASGVAIPAFQAQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGPFNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(서열번호 16)

[1622] QET-Fc3K-PA32-ProAR은, C.glutamicum ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PA32-ProAR의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR」로 표기한다)로 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 17, 18에 나타낸다.

[1623] CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR을 코딩하는 염기 서열

[1624] atgtttaacaaccgtatccgactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgcggcaactgtgcctaccacaaggggcagatcatctggtgcacctaccatggtggtgcggtccggctgctccagcgccagcagctcccgctgcaccagcccaagcgccacctgccgacctgcacctgcagctccagcggtcccgcaccgggaggtttaacgcgaacagcagaacgccttctacgagatttccatctgccaaacctcaacgaggagcaacggaatggcttcatccagagcttgctgacgatccgtctcaatccgccaatctgcttgcggaagcctaa(서열번호 17)

[1625] CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR의 아미노산 서열

[1626] MFNNRIRTAALAGATAIISTAASGVAIPAFQAQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGPFNREQQNAFYELHLPNLNEEQRNQFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 18)

- [1627] QET-Fc3K-PA48-ProAR은, *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PA48-ProAR의 융합 단백질 (이하, 「CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR」로 표기한다)로 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 19, 20에 나타낸다.
- [1628] CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR을 코딩하는 염기 서열
- [1629] atgtttaacaaccgtatccgactgcagctctcgctgggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccggtgggaactgcgcgtaccataagggccagatcatctgggtgcacctatcatggcggtgctgcgcctgcagctccggctcctgccgtccagccgcgccagcccaagcagctccagcagcacctgcacctgctgcaccagcggtccagctcctgcggcaccgcctgcaccggcaccagccgctccggctgccccagctccgggtggctttaaccgcgaacagcagaacgccttctacgagatactccaccttcccaacctgaacgaggagcagcgaacggcttcatccagctctcttcgcatgatccaatcccagagcgctaacttgcttgagaagcgtaa(서열번호 19)
- [1630] CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR의 아미노산 서열
- [1631] MFNNRIRTAALAGAIATAASGVAIPAFQETRGNCAYHKQIIWCTYHGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPPGGFNREQQNAFYEILHLPNLNEEQRNQFIQSLRDDPSQSANLLAEA(서열번호 20)
- [1632] QET-ProAR-PA32-Z34CK는 *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 ProAR-PA32-Z34CK의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK」로 표기한다)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 21, 22에 나타낸다.
- [1633] CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK를 코딩하는 염기 서열
- [1634] atgtttaacaaccgtatccgactgcagctctcgctgggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagacctttaaccgcgaacagcagaacgccttctacgagatcctgcattccccaatctgaacgaagagcagaggaatggctttatccagagccttcgtgacgatccgtccaatctgccaacctgttgccggaagctggaggtgccgcgccagcgccaccagcaccagctgcaccggctgctccgcacctgccgcaccagccgctcctgccccagcagctccggcagctcctgcacctgggtggcttcaacaagcagtgccaacgtcgcttctatgaagcgctacacgatcccaacctcaacgaggaacagcgaatgcccgaatccggtccattcgcaagagtgttaa(서열번호 21)
- [1635] CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK의 아미노산 서열
- [1636] MFNNRIRTAALAGAIATAASGVAIPAFQETFNREQQNAFYEILHLPNLNEEQRNQFIQSLRDDPSQSANLLAEAGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGFNKQQRFFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIREC(서열번호 22)
- [1637] QET-ProAR-PA48-Z34CK는 *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 ProAR-PA48-Z34CK의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK」로 표기한다)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 23, 24에 나타낸다.
- [1638] CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK를 코딩하는 염기 서열
- [1639] atgtttaacaaccgtatccgactgcagctctcgctgggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagacctttaaccgcgaacagcagaacgccttctacgagatcctccatctgccaacctgaacgaagaacagcgaacggctttatccagtcctcaggagacgatccgtctcagtcggccaatttgctagccgaagcgggaggtgctgctccggcagcaccgcaccagccgcgccgctgctccagcgccggcagctcctgcggcaccagctccagcagcaccagcggtccagcacctgccgcacctgcagctccggctcctgcagcccccgccgctcctgcgcggggtggcttcaacaagcagtgccaacgacgcttctatgaggcgcttcagatcccaacctgaatgaggagcaacggaatgcccgatccgtagcatcgcaagaatgttaa(서열번호 23)
- [1640] CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK의 아미노산 서열
- [1641] MFNNRIRTAALAGAIATAASGVAIPAFQETFNREQQNAFYEILHLPNLNEEQRNQFIQSLRDDPSQSANLLAEAGAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGGFNKQQRFFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIREC(서열번호 24)
- [1642] CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K, CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K, CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM, CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM, CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR, CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR, CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK, 및 CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK에 기재된 염기 서열의 상류에 *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB 유전자의 프로모터를 연결하고, 또한 5'-측에 KpnI 사이트, 3'-측에 BamHI 사이트를 부가한, 친화성 폴리펩타이드 8종류의 발현 카세트를 설계하여, 전체 합성하였다. 전체 합성한 DNA 단편(친화성 폴리펩타이드의 발현 카세트)을

일본 공개특허공보 특개평9-322774호에 기재된 pPK4의 KpnI-BamHI 부위에 삽입함으로써 친화성 폴리펩타이드의 분비 발현 플라스미드인 pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K, pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR, pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK, 및 pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK를 각각 구축하였다. 삽입 단편의 염기 서열 결정의 결과, 각각 설계한대로 친화성 폴리펩타이드의 발현 카세트가 구축되어 있는 것을 확인하였다. 염기 서열의 결정은, BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)와 3500xL Genetic Analyzer(Applied Biosystems)를 사용하여 행하였다.

[1643] (1-5) C.glutamicum에서의 친화성 폴리펩타이드의 분비 발현

[1644] 상기에서 구축한 pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K, pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR, pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR, pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK, 및 pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK를 사용하여, WO2016/171224에 기재된 C.glutamicum YDK0107주를 형질 전환하고, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK주, 및 YDK0107/pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK주를 얻었다.

[1645] 얻어진 각 형질 전환체를, 25mg/L의 카나마이신을 포함하는 MMTG 액체 배지(글루코오스 120g, 황산마그네슘 7수화물 3g, 황산암모늄 30g, 인산이수소칼륨 1.5g, 황산철 7수화물 0.03g, 황산망간 5수화물 0.03g, 티아민염산염 0.45mg, 비오틴 0.45mg, DL-메티오닌 0.15g, 대두엽산 가수분해액(전체질소량 0.2g), 탄산칼슘 50g, 물로 1L로 하고 pH 7.0으로 조정)으로 각각 30℃, 72시간 배양하였다.

[1646] 배양 종료 후인, 각 배양액을 원심분리하여 얻어진 배양 상청 6.5μL를 NuPAGE(등록상표) 12% Bis-Tris Gel(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 환원 SDS-PAGE에 제공하고 나서 Quick-CBB(Wako)로 염색을 행하였다. 그 결과, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K주의 배양 상청 중에 QET-Z34CM-PA32-Fc3K로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 16, Lanes 2-5), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K주의 배양 상청 중에 QET-Z34CM-PA32-Fc3K로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 16, Lanes 6-9), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM주의 배양 상청 중에 QET-Fc3K-PA32-Z34CM으로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 16, Lanes 10-13), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM주의 배양 상청 중에 QET-Fc3K-PA48-Z34CM으로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 16, Lanes 14-17), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR주의 배양 상청 중에 QET-Fc3K-PA32-ProAR로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 16, Lanes 18-21), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR주의 배양 상청 중에 QET-Fc3K-PA48-ProAR로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 16, Lanes 22-25), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK주의 배양 상청 중에 QET-ProAR-PA32-Z34CK로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 16, Lanes 26-29), 및 YDK0107/pPK4_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK주의 배양 상청 중에 QET-ProAR-PA48-Z34CK로 추정되는 폴리펩타이드 밴드가 각각 검출되었다(도 16, Lanes 30-33).

[1647] (실시예 2) 친화성 물질의 정제, 및 친화성 물질과 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성의 측정

[1648] 실시예 1(1-5)에서 얻어진 균주를 대량 배양하기 위한 발효층에서의 배양은, 공지된 방법(Appl Microbiol Biotechnol(2008) 78:621-625)에 준하여 실시하였다. 배양액의 원심 상청을, 0.2μm의 PVDF 막 필터를 사용하여 무균 여과를 행하였다. 배양액 중의 협잡 성분을 제거하기 위해, 발현된 폴리펩타이드는, 양이온 교환 컬럼을 사용한 분취 HPLC에 의해 정제하였다. 이어서 얻어진 폴리펩타이드의 친화도 측정을 실시하였다. 구체적으로는, 이하와 같이 행하였다.

[1649] 각 폴리펩타이드와 IgG1 항체 Fc 영역의 친화성은, SPR 측정(Biacore T200(GE Healthcare))에 의해 평가를 행하였다. 측정은 25℃에서 실시하였고, 런닝 버퍼는 HBS-EP+를 사용하였다. 리간드로서 인간 IgG1 항체 Fc 단백질을 30μg/mL가 되도록 아세트산나트륨 버퍼 pH4.5(GE Healthcare)로 희석하고, 아민 커플링법으로 CM5 sensor Chip(GE Healthcare) 표면에 약 1400RU 고정화하였다. 각 펩타이드는 100nM가 되도록 0.1% DMSO를 함유하는 HBS-EP+ 버퍼로 100nM이 되도록 희석 하였다. 측정은 single cycle kinetics method, 애널리이트의 첨가 시간 120초, 유속 30μL/min, 해리 시간 120초로 측정하였다. 또한, 얻어진 센서그램은 affinity에 의해 피팅을 행하여, 해리 상수(KD)의 값을 산출하였다. 측정 결과, 발현된 모든 폴리펩타이드는, 인간 IgG1 항체 Fc 단백질에 대해 결합하는 것이 확인되었다(표 1 및 도 17-1 내지 17-8).

표1 각종 친화성 물질의 항체와의 KD값

	KD (M)
서열번호 1	7.91×10^{-9}
서열번호 2	8.98×10^{-9}
서열번호 3	1.27×10^{-8}
서열번호 4	8.48×10^{-9}
서열번호 5	2.41×10^{-7}
서열번호 6	2.69×10^{-7}
서열번호 7	9.43×10^{-8}
서열번호 8	1.08×10^{-9}

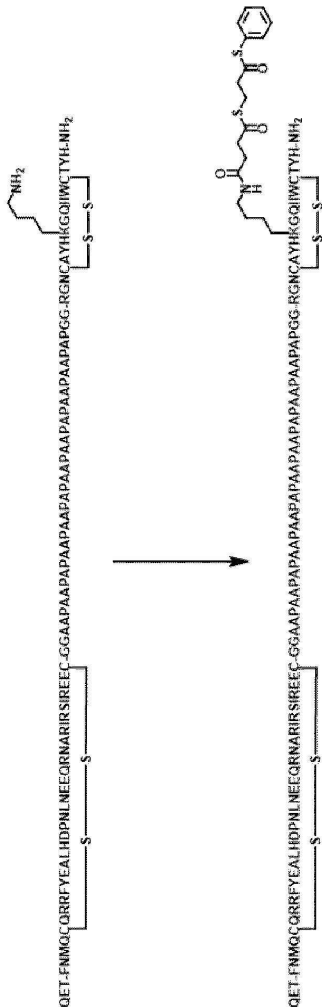
[1650]

[1651] (실시예 3) 항체에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물의 조제

[1652] 정제한 폴리펩타이드에, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물을 결합시켰다.

[1653] 기보(WO2019/0240287)에 따라, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-Z34CM-PA32-Fc3K를 아미드화함으로써 친화성 시약 (1)을 조제하였다.

[1654] [號-76]



[1655]

- [1656] 친화성 시약 (1)
- [1657] 상기 아미노산 서열은 모두, 서열번호 1의 아미노산 서열이다.
- [1658] MS(ESI) $m/z: z=11$ 885.80[M+3H]³⁺
- [1659] 마찬가지로, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-Z34CM-PA48-Fc3K로부터 친화성 시약 (2)를 조제하였다.
- [1660] MS(ESI) $m/z: z=13$ 849.35[M+3H]³⁺
- [1661] 마찬가지로, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-Fc3K-PA32-Z34CM으로부터 친화성 시약 (3)을 조제하였다.
- [1662] MS(ESI) $m/z: z=11$ 886.15[M+3H]³⁺
- [1663] 마찬가지로, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-Fc3K-PA48-Z34CM으로부터 친화성 시약 (4)를 조제하였다.
- [1664] MS(ESI) $m/z: z=13$ 849.20[M+3H]³⁺
- [1665] 마찬가지로, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-Fc3K-PA32-ProAR로부터 친화성 시약 (5)를 조제하였다.
- [1666] MS(ESI) $m/z: z=12$ 885.1[M+3H]³⁺
- [1667] 마찬가지로, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-Fc3K-PA48-ProAR로부터 친화성 시약 (6)을 조제하였다.
- [1668] MS(ESI) $m/z: z=11$ 1082.00[M+3H]³⁺
- [1669] 마찬가지로, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-ProAR-PA32-Z34CK로부터 친화성 시약 (7)을 조제하였다.
- [1670] MS(ESI) $m/z: z=15$ 855.20[M+3H]³⁺
- [1671] 마찬가지로, 실시예 1-2에서 조제한 친화성 물질 QET-ProAR-PA48-Z34CK로부터 친화성 시약 (8)을 조제하였다.
- [1672] MS(ESI) $m/z: z=17$ 830.75[M+3H]³⁺

[1676] 상기 아미노산 서열은, 서열번호 2의 아미노산 서열이다.



[1677]

[1678] 친화성 시약 (3)

[1683] [호]78]



[1684]

[1685] 친화성 시약 (5)

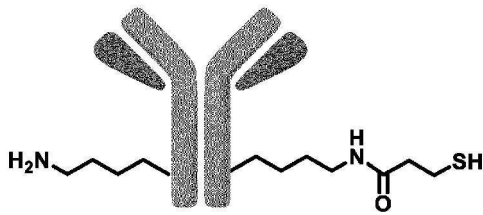
표 2

DAR 피크	관찰된 질량 (Da)	피크 면적	%면적
0	148400	3.11E+004	2.34
1	159300	1.28E+006	95.93
2	170390	2.31E+004	1.74

(4-3) 티오에스테르기의 절단에 의한 티올기 도입 항체 유도체(T-1-SH)의 합성

상기에서 얻어진 항체를, 기보(WO2019/240287)에 따라 티오에스테르기의 절단 반응(하이드록실아민에 의한 처리)에 제공함으로써, 티올기가 1개 도입된 하기 구조식의 티올기 도입 항체 유도체(T-1-SH)를 얻었다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정된 결과, 절단 반응이 진행된 148489에 피크가 확인되었다.

[화80]



(4-4) 친화성 시약 (6)을 이용한 항HER2 항체 트라스투주맙의 특이적 수식 및 티오에스테르기의 절단에 의한 티올기 도입 항체 유도체의 합성

마찬가지로 실시예 3에서 합성한 친화성 시약 (6)을 사용하여, 트라스투주맙의 수식 반응을 실시하였다. 과잉의 친화성 시약 (6)을 제거한 후, ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정할 바, 원료인 트라스투주맙은 148227에 피크가 관측되고, 결합성 펩타이드가 1개 도입된 생성물이 160165에 피크가 관측되고, 결합성 펩타이드가 2개 도입된 생성물이 171953에 피크가 확인되었다. 또한, DAR calculator (Agilent사 소프트웨어)에 의해 펩타이드/항체 결합비의 확인을 행한 결과를 표 3에 나타낸다.

표 3

DAR 피크	관찰된 질량 (Da)	피크 면적	%면적
0	148227	9.64E+004	14.38
1	160165	5.24E+005	78.12
2	171953	4.99E+004	7.44

상기에서 얻어진 항체를, 기보(WO2019/0240287)에 따라 티오에스테르기의 절단 반응에 제공함으로써, 티올기가 1개 도입된 티올기 도입 항체 유도체(T-1-SH)를 얻었다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정된 결과, 절단 반응이 진행된 148489에 피크가 확인되었다.

(4-5) 트립신 처리에 의한 펩타이드 맵핑

(4-3)에서 얻어진 트라스투주맙·티올 도입체(T-1-SH)에 대해서, 하기 공정에서 펩타이드 맵핑을 행하였다.

(4-5-1) 트라스투주맙·티올 도입체의 트립신 처리

1.5mL 저흡착 마이크로테스트 튜브에 샘플 용액을 10 μ L, 150mM 트리스 염산 완충액(pH 8.0), 40% 트리플루오로에탄올에 용해한 20mM의 디티오프레이틀 수용액 10 μ L를 첨가하여 65℃에서 1시간 가온 후, 50mM의 요오드아세트아미드 수용액 10 μ L를 첨가하고, 차광하 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, 150mM 트리스 염산 완충액(pH 8.0)을 40 μ L 첨가하여 교반하고, 20ng/ μ L의 트립신 수용액을 10 μ L 첨가하여 37℃에서 16시간 효소 소화하였다. 소화 후, 20% 트리플루오로아세트산 수용액을 2 μ L 첨가하여 반응을 멈춘 샘플 용액에 대해, 0.1% 포름산, 2% 아세트니트릴 수용액으로 10배 희석하여 LC-MS/MS 측정에 제공하였다.

(4-5-2) 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정

(분석 장치)

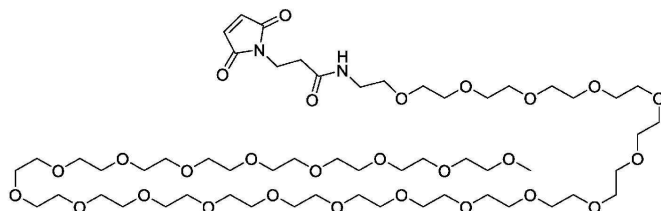
- [1717] 나노 HPLC: EASY-nLC 1000(서모 피셔 사이언티픽사)
- [1718] 질량 분석계: 트라이브리드 질량 분석계 Orbitrap FUSION(서모 피셔 사이언티픽사)
- [1719] (HPLC 분석 조건)
- [1720] 트랩 컬럼: Acclaim PepMap(등록상표) 100, 75 μ m $\times$ 2cm(서모피셔 사이언티픽사)
- [1721] 분석 컬럼: ESI-column(NTCC-360/75-3-125, 75 μ m $\times$ 12.5cm, 3 μ m(닛코 테크노스사))
- [1722] 이동상 A: 0.1% 포름산 수용액
- [1723] 이동상 B: 0.1% 포름산, 아세토니트릴 용액
- [1724] 로딩 용액: 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액
- [1725] 유속: 300nL/min
- [1726] 샘플 주입량: 0.6 μ L
- [1727] 그라디언트 조건(B%): 2%(0.0-0.5분), 2% $\rightarrow$ 50%(0.5-50분), 50% $\rightarrow$ (50-55.5분), 50% $\rightarrow$ 95%(55.5-56.5분), 95%(56.5-60분)
- [1728] (질량 분석계 분석 조건)
- [1729] 이온화법: ESI, Positive 모드
- [1730] 스캔 타입: Data Dependent Aquisition
- [1731] Activation Type: Collision Induced Dissociation (CID)
- [1732] 데이터의 취득은 부속 소프트웨어인 Xcalibur 4.3(서모피셔 사이언티픽사) 및 Thermo Orbitrap
- [1733] FUSION Tune Applition 3.3(서모피셔 사이언티픽사)을 사용하여 행하였다
- [1734] (4-5-3) 트라스투주맙의 수식 부위의 해석
- [1735] LC-MS/MS 측정 결과에 대한 수식 부위 해석에 대해서는, BioPharma Finder 3.2(서모 피셔 사이언티픽사)를 사용하여 행하였다.
- [1736] BioPharma Finder에서의 분석은, S/N Threshold를 64, MS Noise Level을 4000으로 설정하여 실시하였다. 또한, 소화 효소를 Trypsin으로, Specificity를 High로 설정하였다. Static Modification에는 요오도아세트아미드에 의한 시스테인 잔기의 수식으로서, Carbamidomethyl(+57.021Da)를 설정하였다. Dynamic Modifications에 대해서는, 메티오닌 잔기 및 트립토판 잔기의 산화(+15.995Da), 글루타민산 잔기 및 아스파라긴산 잔기의 탈아미드화(+0.984Da), 및 라이신 잔기로의 수식체(요오드아세트아미드에 의한 Carbamidomethyl화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 설정하였다. 또한, 단백질의 N말단으로의 Dynamic Modification으로서 글루타민산 잔기의 피로글루타밀화(-18.011Da), 단백질의 C말단으로의 Dynamic Modification으로서 라이신 부가(+128.095D)를 설정하였다. 또한, Confidence Score가 80 이상, 펩타이드 동정시의 Mass Accuracy가 5ppm 이내, MS/MS를 관측할 수 있는 것만이 되도록 필터를 설정하였다. 또한, 라이신 잔기의 잔기 번호에 관해서, 중쇄 VH 도메인 및 경쇄상에 대해서는 서열 중의 번호(즉, N말의 아미노산을 1번째로 한다. 이하 동일)로, 중쇄 CH1, CH2, CH3 도메인 상에 대해서는 EU 넘버링을 사용하여 표기하였다.
- [1737] (4-5-4) 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과
- [1738] LC-MS/MS를 이용한 해석의 결과, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 라이신 잔기의 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 Carbamidomethyl화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는 아미노산 23잔기로 이루어지는 펩타이드, THTCPPEPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 25)의 펩타이드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 952.22949, 이론값: 952.22942, 4가)이 관측되고, (도 19-1), CID 스펙트럼에 의해 중쇄의 EU 넘버링에서의 246 위치 또는 248위치의 라이신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y20에 해당하는 m/z 1167.12(이론값: 1166.61)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 19-2). 또한 BioPharma Finder에 의해, 248위치의 라이신 잔기로의 수식이 고선택적으로 일어나 있는 것이 나타났다(도 19-3).
- [1739] 이 결과로부터, 상기 (4-3)에서 얻어진 트라스투주맙·티올 도입체(T-1-SH)에서는, 항체의 중쇄상, EU 넘버링에

있어서의 Lys246 또는 Lys248에 위치 선택적으로 컨쥬게이션이 진행되고 있는 것을 알 수 있었다.

[1740] (4-6) ADC mimic의 합성

[1741] 실시예(4-3)에서 얻어진 티올 도입 항체(T-1-SH, PBS 용액)에 대하여, m-dPEG-maleimide(quantabioscience사 제조, 화합물 10)를 반응시켰다. 반응 후, ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정하면, 149735에 피크가 확인되었다. 또한, DAR은, 0.9가 되었다.

[1742] [화81]



[1743] 화합물 10

[1745] (실시예 5) 다른 IgG 항체의 특이적 수식

[1746] 실시예(4-1)의 조건에 따라, 다양한 항체에 대하여 수식 시약 (4)를 반응시켰다. 실시예 4-1과 마찬가지로 ESI-TOFMS를 측정하고, DAR calculator에 의해 평균의 펩타이드/항체 결합비를 산출하였다. 항체와 평균의 펩타이드/항체 결합비의 일람을 표 4에 기재한다.

[1747] [표 4]

항체	펩타이드/항체 결합비
리톡시맵	0.9
인플릭시맵	0.9
세톡시맵	1.0

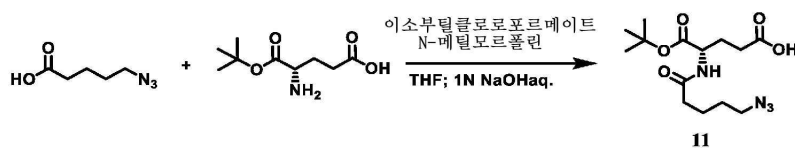
[1749] 이상으로부터, 항체의 차이에 관계없이, 펩타이드/항체 결합비를 컨트롤할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[1750] (실시예 6) 항HER2 IgG 항체 트라스투주맵으로의 아지드기의 특이적인 도입과 ADC mimic의 합성

[1751] (6-1) 아지드기를 갖는 저분자 링커의 합성

[1752] (6-1-1) 링커 중간체 (11)의 합성

[1753] [화82]



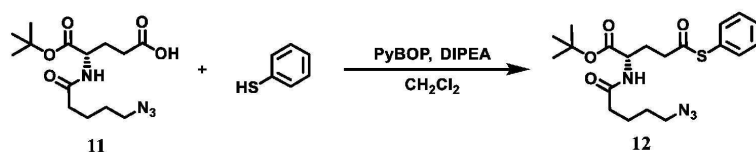
[1754] 5-아지도펜탄산(800mg, 5.59mmol)을 THF(14mL)에 용해시키고, 클로로포름산이소부틸(808 μ L, 6.15mmol), N-메틸모르폴린(873 μ L, 8.39mmol)을 첨가하여 0℃에서 30분 교반한 후, 1M NaOH 수용액(4mL)에 용해한 히드라진 수화물(1.36g, 6.71mmol)을 첨가하여 실온에서 3시간 교반하였다. 감압하에 농축한 후, 1M NaOH 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 pH 10으로 조정하고, 아세트산에틸로 세정 후, 수층에 1M HCl 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 3.0으로 조정하고, 아세트산 에틸을 첨가하고 세정하여, 얻어진 아세트산에틸 용액에 황산나트륨을 첨가하였다. 필터레이션에 의해 황산나트륨을 제거하고, 감압하 농축 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10:1)로 정제하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고, 감압 농축함으로써, 링커 중간체(11)를 얻었다.

[1756] ^1H NMR(400MHz, Chloroform-d) δ 6.29(d, J=7.7Hz, 1H), 4.56(td, J=8.0, 4.9Hz, 1H), 3.32(t, J=6.6Hz, 2H), 2.53-2.38(m, 3H), 2.36-2.16(m, 3H), 2.12(s, 2H), 1.96(dq, J=14.7, 7.6Hz, 1H), 1.84-1.59(m, 4H), 1.50(s, 9H).

[1757] MS(ESI)_{m/z}: 329[M+H]⁺

[1758] (6-1-2) 링커 중간체 (12)의 합성

[1759] [화83]



[1760]

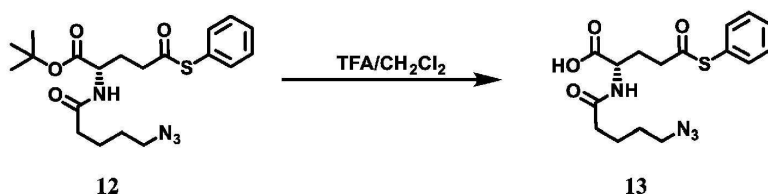
[1761] 링커 중간체(11)(2.41g, 5.59mmol)를 디클로로메탄(28mL)에 용해시키고, 티오펜올(627 μL, 6.15mmol), 벤조트리아졸-1-일옥시(3.49g, 6.71mmol), DIPEA (1.42mL, 8.39mmol)를 첨가하고, 실온에서 2시간 교반하였다. 그 후, 감압하에 농축하고, 컬럼 크로마토그래피(헥산:아세트산에틸=4:1)로 정제하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고, 감압하에 농축함으로써, 링커 중간체(12)를 얻었다(2.20g, 5.23mmol).

[1762] ¹H NMR(400MHz, Chloroform-d) δ 7.43(s, 5H), 6.10(d, J=7.8Hz, 1H), 4.55(td, J=7.7, 4.9Hz, 1H), 3.31(t, J=6.7Hz, 2H), 2.87-2.63(m, 2H), 2.28(dd, J=8.7, 5.9Hz, 2H), 2.16-1.98(m, 1H), 1.83-1.58(m, 4H), 1.50(s, 9H), 1.37-1.22(m, 2H), 0.91(t, J=6.7Hz, 1H).

[1763] MS(ESI) _{m/z}: 421[M+H]⁺

[1764] (6-1-3) 링커 중간체(13)의 합성

[1765] [화84]



[1766]

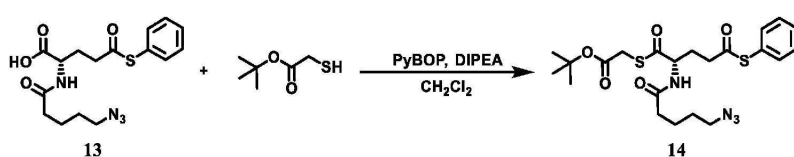
[1767] 링커 중간체(12)(2.20g, 5.23mmol)를 디클로로메탄(10mL)에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(10mL)을 첨가하고, 실온에서 1시간 교반한 후, 감압하 농축하여 디클로로메탄을 제거 후, 물을 첨가하고 동결 건조함으로써, 링커 중간체(13)를 얻었다(1.98g, 5.43mmol).

[1768] ¹H NMR(400MHz, Chloroform-d) δ 7.44(s, J=6.3, 4.6, 2.4Hz, 5H), 6.76(s, 1H), 4.62(td, J=7.5, 4.9Hz, 1H), 3.31(t, J=6.6Hz, 2H), 2.88(qt, J=16.8, 6.8Hz, 2H), 2.33(dt, J=12.4, 6.8Hz, 3H), 2.18(dq, J=14.4, 7.4Hz, 1H), 1.74(dq, J=11.8, 7.5, 6.9Hz, 2H), 1.63(ddd, J=17.7, 10.5, 4.8Hz, 2H).

[1769] MS(ESI) _{m/z}: 365[M+H]⁺

[1770] (6-1-4) 링커 중간체 (14)의 합성

[1771] [화85]



[1772]

[1773] 링커 중간체(13)(100mg, 0.274mmol)를 디클로로메탄(3mL)에 용해시키고, (40.6 μL, 0.280mmol), 벤조트리아졸-1-일옥시(150mg, 0.288mmol), DIPEA(70.1 μL, 0.412mmol)을 첨가하고, 실온에서 2시간 교반하였다. 1M HCl 수용액을 첨가하여 계내를 pH 3으로 조정하고, 디클로로메탄을 첨가하여 희석하고, 물, 식염수로 세정 후, 황산나트륨을 첨가하였다. 필터레이션에 의해, 황산나트륨을 제거한 후, 감압하에 농축하고, 컬럼 크로마토그래피(헥

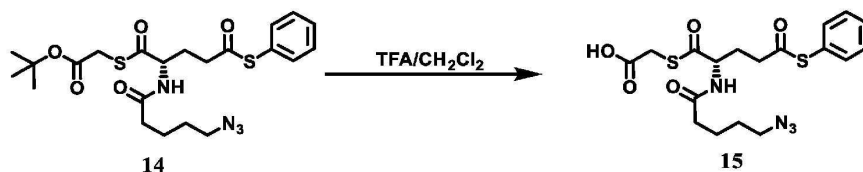
산:아세트산에틸=4:1)로 정제하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고 감압하에 농축시켜 링커 중간체 (14)를 얻었다 (84.7mg, 0.171mmol).

[1774] ^1H NMR(400MHz, Chloroform-d) δ 7.50-7.38(m, 5H), 6.33(d, J=8.4Hz, 1H), 4.78(tdd, J=7.8, 4.6, 3.0Hz, 1H), 3.70-3.54(m, 2H), 3.32(dt, J=9.1, 6.7Hz, 2H), 2.96-2.67(m, 2H), 2.30(pd, J=7.1, 4.5Hz, 2H), 1.85-1.60(m, 6H), 1.49(d, J=2.8Hz, 9H).

[1775] MS(ESI) m/z: 495[M+H]⁺

[1776] (6-1-5) 링커 중간체(15)의 합성

[1777] [화86]



[1778]

[1779] 링커 중간체(14)(84.7mg, 0.171mmol)를 디클로로메탄(5mL)에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(5mL)을 첨가하고, 실온에서 1시간 교반한 후, 감압하 농축하여 디클로로메탄을 제거하고, 물을 첨가하여 동결 건조시킨 후, 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10:1)로 정제하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고 감압하에 농축시켜 링커 중간체(15)를 얻었다(46.8 mg, 0.107 mmol).

[1780] ^1H NMR(400MHz, Methanol-d4) δ 7.44(dq, J=2.3, 1.5Hz, 5H), 4.69-4.57(m, 1H), 3.79-3.67(m, 2H), 3.40-3.30(m, 2H), 2.89-2.71(m, 2H), 2.44-2.23(m, 4H), 2.08-1.95(m, 1H), 1.82-1.61(m, 4H).

[1781] MS(ESI) m/z: 439[M+H]⁺

[1782] (6-2) 아지드기를 갖는 수식 시약 (9)의 합성

[1783] [화87]



[1784]

[1785] 친화성 시약 (9)

[1786] 상기 아미노산 서열은, 서열번호 4의 아미노산 서열이다.

[1787] 실시예 3에 따라, 친화성 물질 QET-Fc3K-PA48-Z34CM과 링커 중간체(16)의 아미드화에 의해 친화성 시약 (9)를 조제하였다.

[1788] MS(ESI) m/z: z=14 798.65[M+3H]³⁺

[1789] (6-3) 항HER2 항체 트라스투주맙의 특이적 수식

[1790] 항HER2 IgG 항체 트라스투주맙(중외제약) 500 μ g을 50mM 아세트산나트륨 버퍼(pH 5.5) 171 μ L에 용해시켰다. 실시예 7-2에서 합성한 친화성 시약 (9)의 N,N'-디메틸포름아미드 용액(10당량)을 트라스투주맙 용액에 첨가하고, 실온에서 16시간 교반하였다. 한외 여과에 의해, 과잉의 친화성 시약 (9)를 제거한 후, ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정하는 바, 원료의 트라스투주맙은 148400에 피크가 관측되고, 결합성 펩타이드가 1개 도입된 생성물 159442에 피크가 관찰되었다. 또한, DAR calculator에 의해 항체 중간체(평균 펩타이드/항체 결합비 1.0)의 생성이 확인되었다.

[1791] (6-4) 티오에스테르기의 절단에 의한 아지드기 도입 항체 유도체(T-1-N3)의 합성

[1792] 티올기 도입 항체 유도체는, 기보(W02019/0240287)에 따라, 메톡시아민에 의한 티오에스테르기의 절단 반응에 제공함으로써, 아지드기가 1개 도입된 하기 구조식에 해당하는 항체를 얻었다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정하는 결과, 절단 반응이 진행된 148672에 피크가 확인되었다.



[1795] (6-5) ADC mimic의 합성

[1796] 실시예(6-4)에서 얻어진 아지드 도입 항체(T-1-N3)(PBS 용액)에 대하여, m-dPEG-DBCO(Quanta BioDesign사 제조, 화합물 16)를 반응시켰다. 반응 후, ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정하면, 149893에 피크가 확인되었다. 또한, 그 DAR은, 0.9가 되었다.

[1797] [화89]



[1799] 화합물 16

[1800] (비교예 1) DAR=2를 얻는 항체 수식 시약을 사용한 항HER2 항체 트라스투주맙의 특이적 수식

[1801] 기보(WO2019/0240287)에서 DAR=2의 ADC가 얻어지는 것으로 보고된 친화성 시약 (17)을 사용하여, 트라스투주맙의 특이적 수식을 실시하였다. 그 때, 시약의 등량수를 검토함으로써, 펩타이드가 항체에 1개 도입된 화합물의 선택성을 높이기 위해서, 친화성 시약 (17)의 당량수를 검토하였다.

[1802] [號-90]



[1804] 수식 시약 (17)

[1805] 상기 아미노산 서열은, 서열번호 26의 아미노산 서열이다.

[1806] [丑 5]

[1807]

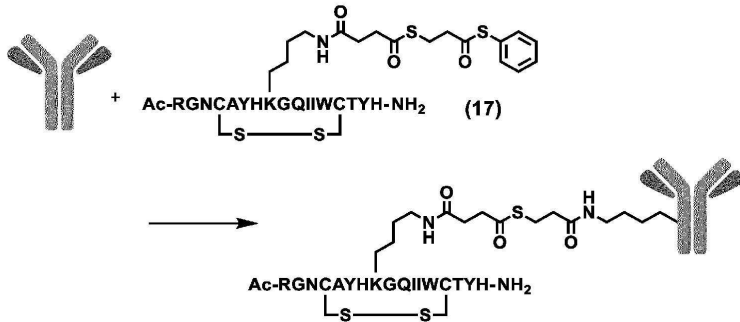
[1808] 선택성은, 실시예 4-2와 마찬가지로, DAR calculator의 %Area로 구하였다. 표 5에 나타난 바와 같이, 수식 시약 (17)은, 당량수를 변화시켜도 60% 미만의 선택성밖에 나타낼 수 없었다. 한편으로, 실시예 4-1, 4-4에서 나타난 바와 같이, 친화성 시약 (4), (6)은, 65% 이상의 선택성을 나타낼 수 있고, 펩타이드가 항체에 1개 도입된 화합물을 얻을 수 있었다.

[1809] (실시예 7) 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체의 합성

[1810] (7-1) 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 트라스투주맙(T-2-N3/SH)의 합성

[1811] (7-1-1) 쿼주게이션과 HPLC 정제에 의한 항HER2 항체 트라스투주맙의 친화성 시약의 1분자 특이적 수식

[1812] [화91]



[1813]

[1814] 상기 아미노산 서열은, 서열번호 26의 아미노산 서열이다.

[1815] 항인간 HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(중의제약)의 10mg/mL의 아세트산 완충액(50mM Sodium acetate, pH 5.5) 용액에 대해서, 기보(WO2019/240287A1)에 기재된 수식 시약 (17)의 디메틸포름아미드 용액(항체에 대하여 1당량, 디메틸포름아미드(DMF)(8%v/v) 용액)를 첨가하고, 실온에서 1시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼(Cytiva사 제조)을 사용하여 정제한 후, AKTA pure25(Cytiva사 제조)를 사용하여 1분자의 펩타이드 시약이 도입된 항체를 취득하였다. 1분자의 펩타이드 시약이 도입된 항체의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 1개의 펩타이드 시약이 도입된 것을 확인하였다.

[1816] AKTA pure25(Cytiva사 제조)에 의한 정제는 하기의 조건으로 행하였다.

[1817] 컬럼: RESOURCE S(Cytiva사 제조)

[1818] 용리액 A: 50mM Sodium acetate, 0.1% tween20(pH 5.0)

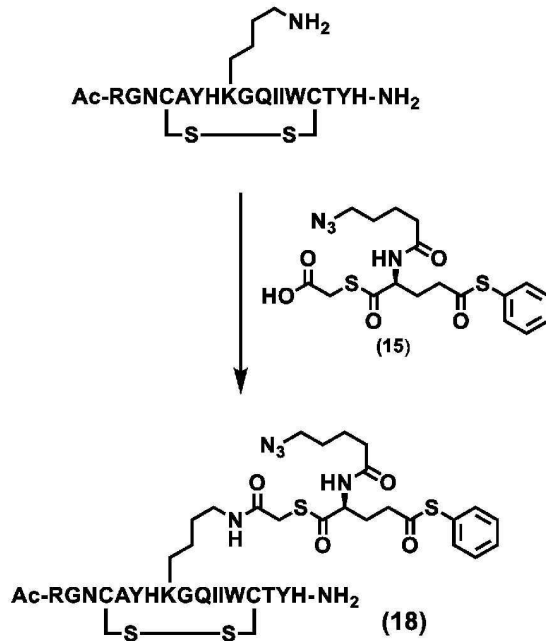
[1819] 용리액 B: 50mM Sodium acetate, 1M NaCl, 0.1% tween20(pH 5.0)

[1820] 유속: 5.0ml/min

[1821] 검출기: 215 및 280nm의 파장으로 검출하였다.

[1822] (7-1-2) 아지드기를 갖는 친화성 시약 (18)의 조제

[1823] [화92]



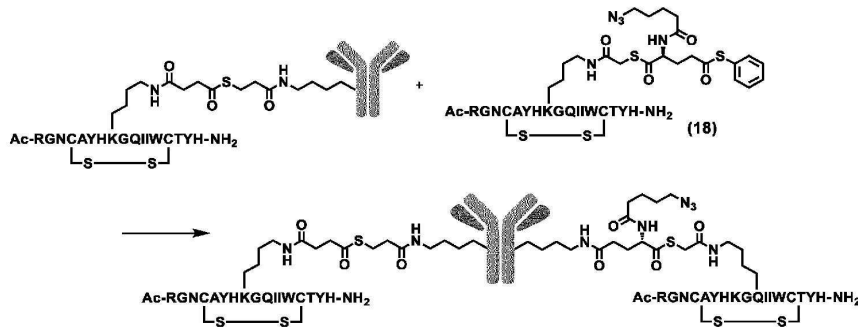
[1824]

[1825] 상기 아미노산 서열은 모두, 서열번호 26의 아미노산 서열이다.

[1826] 기보(WO2019/240287A1)에 기재된 Ac-RGNCA YHKGQIIWCTYH-NH₂(서열번호 26, 30.9mg, 14.9 μmol, 단, 4번째와 14 번째의 2개의 시스테인은, 각각 분자 내에서 디설파이드 결합하고 있다.)를 디메틸포름아미드(468 μL)에 용해하 고, 실시예 6-1-5에서 합성한 링커 중간체(15) 46.8mg, 0.107mmol), WSC·HCl(29.7mg, 0.155mmol)을 첨가하고, 실온에서 5시간 교반한 후, 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하 고, 감압 하에 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 수식 시약 (18)을 얻었다 (15.1mg, 6.02 μmol).

[1827] (7-1-3) 2분자의 펩타이드 시약의 트라스투주맙으로의 도입

[1828] [화93]



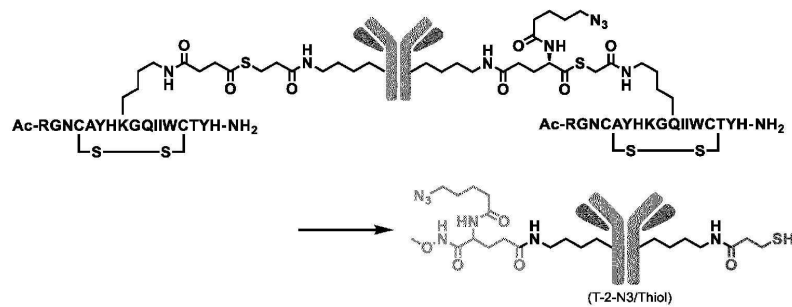
[1829]

[1830] 상기 아미노산 서열은 모두, 서열번호 26의 아미노산 서열이다.

[1831] 계속해서, 실시예 7-1-2에서 조제한 펩타이드 시약 (18)을 이용하여, 실시예 7-1-1에서 얻은 1분자의 펩타이드 시약이 도입된 항체에 대해서 기보(WO2019/240287A1)의 수법에 따라 컨주게이션을 실시하였다. 그 결과, 수식 시약 (17) 및 (18)이 도입된 항체를 얻었다. 펩타이드 시약 (17) 및 (18)이 도입된 항체의 DAR 분석은 기보 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 2개의 펩타이드 시약이 도입되었 음을 확인하였다.

[1832] (7-1-4) 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 트라스투주맙(T-1)의 합성

[1833] [화94]



[1834]

[1835]

상기 아미노산 서열은 모두, 서열번호 26의 아미노산 서열이다.

[1836]

실시에 7-1-2에서 얻은 수식 시약 (17) 및 (18)이 도입된 항체에 대해서, 기보(WO2019/240287A1)의 수법을 참고로, 메톡시아민 용액을 첨가하고, 실온에서 3시간 진탕함으로써, 절단 반응을 행하였다. 그 결과, 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체(T-2-N3/SH)를 얻었다. 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체(T-2-N3/SH)의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입되어 있는 것을 확인하였다.

[1837]

(7-1-5) 2분자의 펩타이드 시약의 트라스투주맙으로의 도입

[1838]

실시에 4-1에서 얻어진 1분자의 친화성 시약 (4)가 도입된 항체에 대해서 기보(WO2019/240287A1)의 수법에 따라, 이어서 실시예 7-1-2에서 조제한 수식 시약 (18)을 사용하여 컨쥬게이션을 실시하였다. 그 결과, 친화성 시약 (4) 및 친화성 시약 (18)이 도입된 항체를 얻었다. 친화성 시약 (4) 및 수식 시약 (11)이 도입된 항체의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 2개의 펩타이드 시약이 도입된 것을 확인하였다.

[1839]

(7-1-6) 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 트라스투주맙(T-1)의 합성

[1840]

실시에 7-1-5에서 얻은 수식 시약 (4) 및 (18)이 도입된 항체에 대하여, 실시예 7-1-4에 따라 메톡시아민 용액을 첨가하고, 실온에서 3시간 진탕함으로써, 절단 반응을 실시하였다. 그 결과, 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체(T-2-N3/SH)를 얻었다. 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체(T-2-N3/SH)의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입되어 있는 것을 확인하였다.

[1841]

(7-1-7) 2분자의 펩타이드 시약의 트라스투주맙으로의 도입

[1842]

실시에 6-3에서 얻어진 1분자의 친화성 시약 (9)가 도입된 항체에 대해서 기보(WO2019/240287A1)의 수법에 따라, 수식 시약 (17)을 이용하여 컨쥬게이션을 실시하였다. 그 결과, 친화성 시약 (9) 및 수식 시약 (17)이 도입된 항체를 얻었다. 친화성 시약 (9) 및 수식 시약 (17)이 도입된 항체의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 2개의 펩타이드 시약이 도입된 것을 확인하였다.

[1843]

(7-1-8) 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 트라스투주맙(T-1)의 합성

[1844]

실시에 7-1-7에서 얻은 수식 시약 (9) 및 (17)이 도입된 항체에 대하여, 실시예 7-1-4에 따라 메톡시아민 용액을 첨가하고, 실온에서 3시간 진탕함으로써, 절단 반응을 실시하였다. 그 결과, 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체(T-2-N3/SH)를 얻었다. 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체(T-2-N3/SH)의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입되어 있는 것을 확인하였다.

[1845]

(7-2) 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 세톡시맙(C-2-N3/SH)의 합성

[1846]

실시에 7-1에 따라, 항인간 EGFR 모노클로날 항체 세톡시맙(머크 바이오파마)를 사용함으로써 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체(C-2-N3/SH)를 얻었다. 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입되어 있는 것을 확인하였다.

[1848] 실시예 6-3에 따라, 항인간 EGFR 모노클로날 항체 세톡시맙(머크 바이오파마)와 수식 시약 (9)를 사용함으로써 수식 시약 (9)가 1분자만 도입된 항체(C-1-N3)를 얻었다.

[1849] 계속해서, 기보(WO2019/240287A1)에 따라 메톡시아민 용액을 첨가하고, 실온에서 3시간 진탕함으로써, 아지드기가 1분자만 도입된 항체(C-1-N3)를 얻었다. 아지드기가 1분자만 도입된 항체의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 아지드기가 1분자만 도입되고 있는 것을 확인하였다.

[1850] (7-4) 아지드기가 2분자씩 도입된 세톡시맙(C-2-N3)의 합성

[1851] 항인간 EGFR 모노클로날 항체 세톡시맙(머크 바이오파마)의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에, 기보(WO2019/240287A1)의 수법에 따라, 실시예 7-1-2에서 조제한 펩타이드 시약 (18)을 첨가하여 실온에서 1시간 진탕하였다.

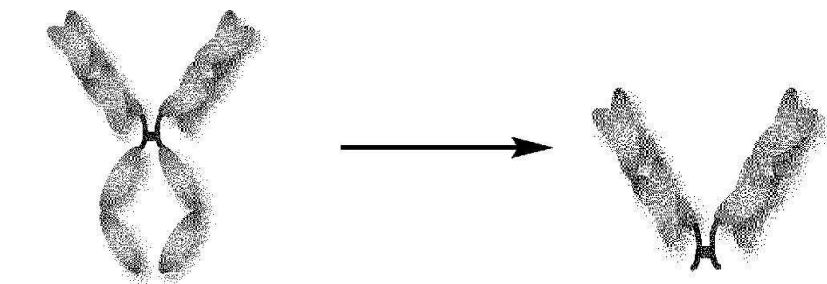
[1852] 계속해서, 기보(WO2019/240287A1)에 따라 메톡시아민 용액을 첨가하고, 실온에서 3시간 진탕함으로써, 아지드기 도입 항체(C-2-N3)를 얻었다. 아지드기가 2분자씩 도입된 항체의 DAR 분석은 기보(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 아지드기가 2분자씩 도입되어 있는 것을 확인하였다.

[1853] (실시예 8) 링커를 도입한 Fab 분자의 합성

[1854] (8-1) 세특시맵으로의 링커의 도입

[1855] (8-1-1) 세특시밥의 $F(ab)_2$ 의 합성

[1856] [호]-95]



[1859] 항인간 EGFR 모노클로날 항체 세톡시맵(머크 바이오파마)의 10mg/mL의 아세트산 완충액(50mM Sodium acetate, pH 4.5) 용액에 Immobilized Pepsin(Thermo Fisher)를 첨가하여, 37℃에서 4시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼(Cytiva사 제조)을 사용하여 정제한 후, AKTA pure25(Cytiva사 제조)를 사용하여 세톡시맵의 F(ab)₂ 분자를 취득하였다. Fab의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 101581에 피크를 관측하였다.

[1860] AKTA pure25(Cytiva사 제조)에 의한 정제는 하기의 조건으로 행하였다.

[1861] 컬럼: RESOURCE S(Cytiva사제)

[1862] 용리액 A: 50mM Sodium acetate, 0.1% tween20(pH 5.0)

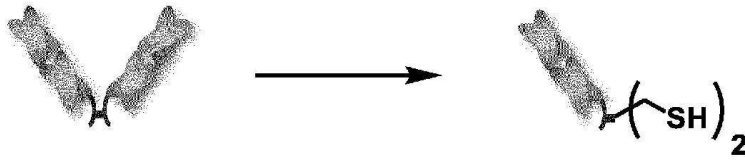
[1863] 용리액 B: 50mM Sodium acetate, 1M NaCl, 0.1% tween20(pH 5.0)

[1864] 유속: 5.0ml/min

[1865] 검출기: 215 및 280nm의 파장에서 검출하였다.

[1866] (8-1-2) 세특시말의 Fab의 합성

[1867] [화96]



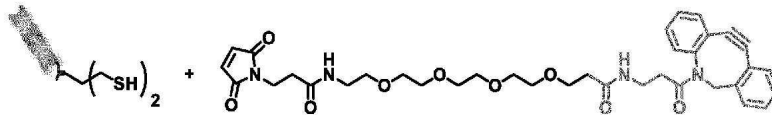
[1868]

[1869] 세록시맵 $F(ab)_2$ 세록시맵 Fab

[1870] 실시예 8-1-1에서 얻은 $F(ab)_2$ 의 PBSE 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Saline(PBS), 10mM EDTA, pH 7.4) 용액에 2-Mercaptoethylamine의 PBSE 완충액 용액(10mM)을 첨가하여, 37℃에서 1시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼 (Cytiva사 제조)을 사용하여 정제하여, Fab를 취득하였다. Fab의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 50793에 피크를 관측하였다.

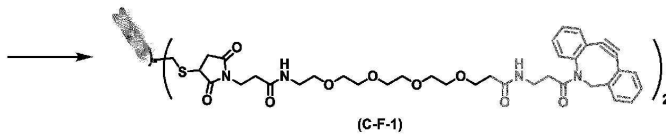
[1871] (8-1-3) 세록시맵의 Fab로의 PEG4-DBCO기의 도입(C-F-1)

[1872] [화97]



[1873]

[1874] 세록시맵 Fab

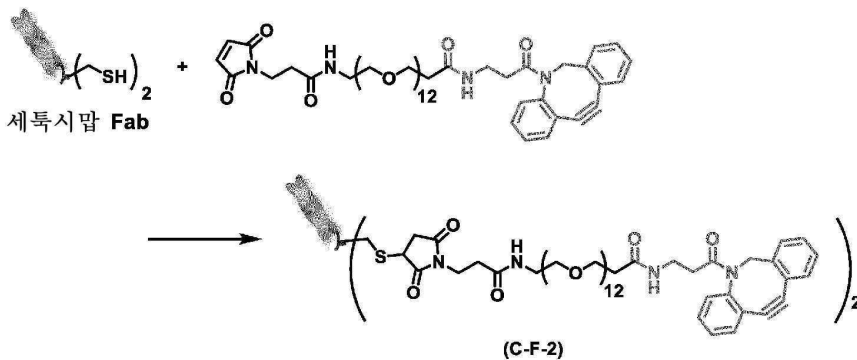


[1875]

[1876] 실시예 8-1-2에서 얻어진 세록시맵의 Fab의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에 시판의 DBCO-PEG4-Maleimide의 디메틸포름아미드 용액(Fab에 대하여 3당량, 디메틸포름아미드(DMF)(8% v/v) 용액)을 첨가하고, 실온에서 1시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼(Cytiva사 제조)을 사용하여 정제하고, PEG4-DBCO기를 도입한 Fab를 취득하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하고, 52142에 피크를 관측하였다.

[1877] (8-1-4) 세록시맵의 Fab로의 PEG12-DBCO기의 도입(C-F-2)

[1878] [화98]



[1879]

[1880] 실시예 8-1-3에 따라, 실시예 8-1-2에서 얻은 세록시맵의 Fab과 시판의 DBCO-PEG12-Maleimide를 사용함으로써, PEG12-DBCO기를 도입한 Fab를 취득하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하고, 52846에 피크를 관측하였다.

[1881] (8-2) 트라스투주맵으로의 링커 도입

[1882] (8-2-1) 트라스투주맙의 F(ab)₂의 합성

[1883] 실시예 8-1-1에 따라, 항HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(중외제약)을 사용하여 트라스투주맙의 F(ab)₂ 분자를 취득하였다. Fab의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 97286에 피크를 관측하였다.

[1884] (8-2-2) 트라스투주맙의 Fab의 합성

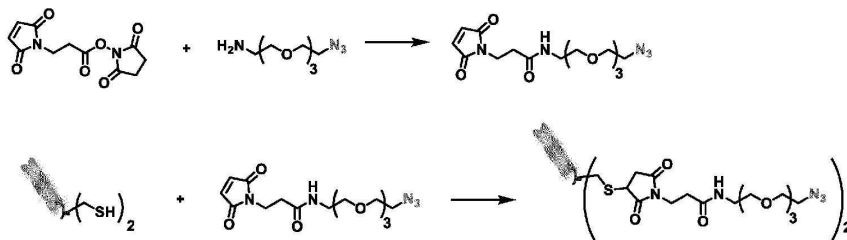
[1885] 실시예 8-1-2에 따라, 실시예 2-2-1에서 얻은 F(ab)₂를 사용하여 Fab를 취득하였다. Fab의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 48644에 피크를 관측하였다.

[1886] (8-2-3) 트라스투주맙의 Fab로의 PEG4-DBCO기의 도입(T-F-1)

[1887] 실시예 8-1-3에 따라, 실시예 8-2-2에서 얻은 트라스투주맙의 Fab를 사용하여 PEG4-DBCO기를 도입한 Fab를 취득하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하고, 49994에 피크를 관측하였다.

[1888] (8-2-4) 트라스투주맙의 Fab로의 아지드기의 도입 (TF-2)

[1889] [화99]



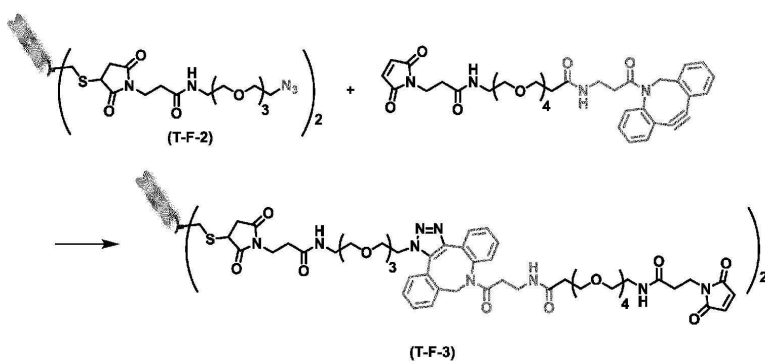
[1890]

[1891] 트라스투주맙 Fab (T-F-2)

[1892] 시판의 N-Succinimidyl 3-Maleimidopropionate의 디메틸포름아미드 용액(20mM)에 동량의 3-Azidopropylamine의 디메틸포름아미드 용액(20mM)을 첨가하고, 30분간 진탕하여, Azido-PEG3-Maleimide의 디메틸포름아미드 용액(10mM)을 조제하였다. 실시예 8-2-2에서 얻어진 트라스투주맙의 Fab의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate(PBS), pH 5.5) 용액으로 조제한 Azido-PEG3-Maleimide의 용액 디메틸포름아미드 용액(Fab에 대하여 3당량, 디메틸포름아미드(DMF)(8%v/v) 용액)를 첨가하고, 1시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼(Cytiva사 제조)을 이용하여 정제하고, 아지드기를 도입한 Fab를 취득하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하고, 49383에 피크를 관측하였다.

[1893] (8-2-5) 트라스투주맙의 Fab로의 말레이미드기의 도입(TF-3)

[1894] [화100]



[1895]

[1896] 실시예 8-2-4에서 얻은 아지드기를 도입한 트라스투주맙의 Fab의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에 시판되는 DBCO-PEG4-Maleimide의 디메틸포름 3당량, 디메틸포름아미드(DMF)(8%v/v) 용액)를 첨가하고, 20시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼(Cytiva사 제조)을 사용하여 정제하고, 말레이미드기가 도입된 트라스투주맙의 Fab를 합성하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라,

ESI-TOFMS 분석을 행하고, 50733에 피크를 관측하였다.

[1897] (8-3) 웹브롤리주맴으로의 링커 도입

[1898] (8-3-1) 웹브롤리주맴의 F(ab)₂의 합성

[1899] 실시예 8-1-1에 따라, 항인간 PD-1 모노클로날 항체 웹브롤리주맴(MSD)를 이용하여 웹브롤리주맴의 F(ab)₂ 분자를 취득하였다. Fab의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 98151에 피크를 관측하였다.

[1900] (8-3-2) 웹브롤리주맴의 Fab의 합성

[1901] 실시예 8-1-2에 따라, 실시예 8-3-1에서 얻은 F(ab)₂를 사용하여 Fab를 취득하였다. Fab의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 49076에 피크를 관측하였다.

[1902] (8-3-3) 웹브롤리주맴의 Fab로의 PEG4-DBCO기의 도입(PF-1)

[1903] 실시예 8-1-3에 따라, 실시예 8-3-2에서 얻은 웹브롤리주맴의 Fab를 사용하여 PEG4-DBCO기를 도입한 Fab를 취득하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하고, 50426에 피크를 관측하였다.

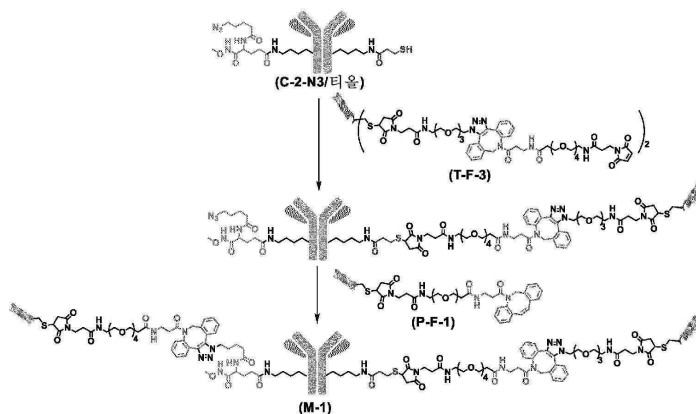
[1904] (8-3-4) 웹브롤리주맴의 Fab로의 PEG12-DBCO기의 도입(PF-2)

[1905] 실시예 8-1-3에 따라, 실시예 8-3-2에서 얻은 웹브롤리주맴의 Fab를 사용하여 PEG12-DBCO기를 도입한 Fab를 취득하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하고, 51130에 피크를 관측하였다.

[1906] (실시예 9) 다중 특이성 항체의 합성

[1907] (9-1) 삼중특이적 항체(M-1)의 합성

[1908] [화101]



[1909]

[1910] 실시예 7-2에서 합성한 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 세록시맴의 PBSE 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Saline(PBS), 10mM의 EDTA, pH 7.4) 용액에 실시예 8-2-5에서 합성한 말레이미드기를 도입한 트라스 투주맴의 Fab의 PBSE 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Saline(PBS), 10mM의 EDTA, pH 7.4) 용액(항체에 대하여 1.5 등량)을 첨가하여 1시간 진탕하였다. 이 반응액에 실시예 8-3-3에서 합성한 PEG4-DBCO기를 도입한 웹브롤리주맴의 Fab의 PBSE 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Sale(PBS), 10mM의 EDTA, pH 7.4)용액(항체에 대하여 2.0등량)을 첨가하고, 20시간 진탕하였다. 반응 용액을 AKTA pure25(Cytiva사 제조)를 사용하여 정제함으로써 삼중특이적 항체(M-1)를 얻었다. 삼중특이적 항체(M-1)의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하여 254362에 피크를 관측하였다.

[1911] AKTA pure25(Cytiva사 제조)에 의한 정제는 하기의 조건으로 행하였다.

[1912] 컬럼: Superdex 200 Increase 10/300GL(Cytiva사 제조)

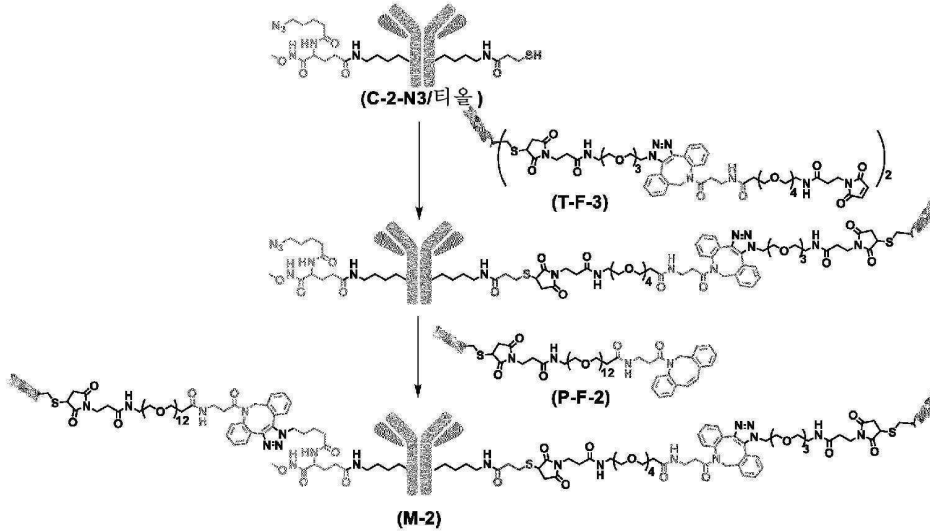
[1913] 용리액: PBS 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4)

[1914] 유속: 0.6ml/min

[1915] 검출기: 215 및 280nm의 파장에서 검출하였다.

[1916] (9-2) 삼중특이적 항체(M-2)의 합성

[1917] [화102]

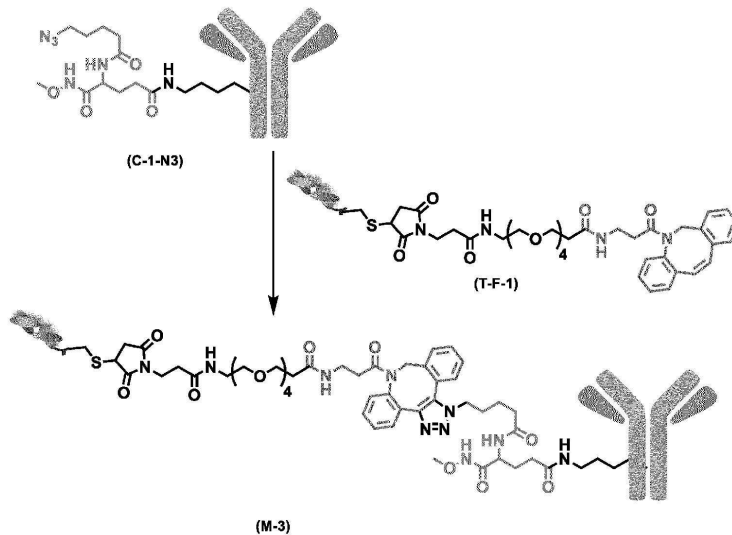


[1918]

[1919] 실시예 9-1에 따라, 실시예 7-2에서 합성한 티올기 및 아지드기가 1분자씩 도입된 항체와 실시예 8-2-5에서 합성한 말레이미드기를 도입한 트라스투주맙의 Fab, 및 실시예 8-3-4에서 합성한 PEG12-DBCO기를 도입한 캄브롤리 주맙의 Fab을 사용함으로써 삼중특이적 항체를 취득하였다. 삼중특이적 항체의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하여 255090에 피크를 관측하였다.

[1920] (9-3) DAR1 이중특이적 항체(세특시맙-트라스투주맙 Fab)(M-3)의 합성

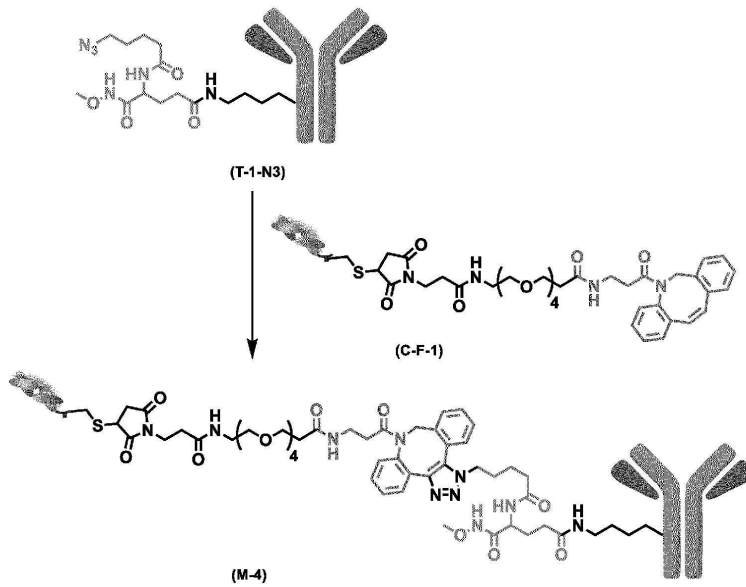
[1921] [화103]



[1922]

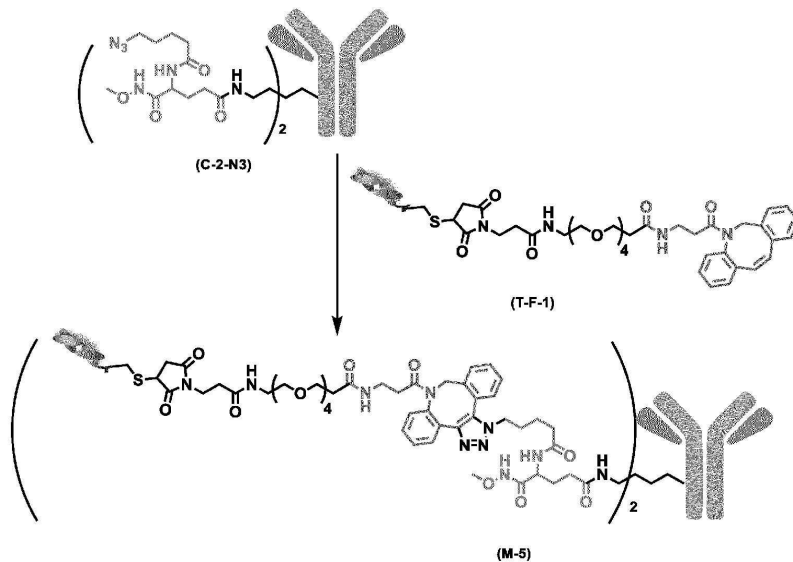
[1923] 실시예 7-3에서 합성한 아지드기가 1분자만 도입된 항체(C-1-N3)의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에 실시예 8-2-3으로 합성한 PEG4-DBCO기를 도입한 트라스투주맙의 Fab의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액(항체에 대하여 2.0등량)을 첨가하고, 20시간 진탕하였다. 반응 용액을 AKTA pure25(Cytiva사 제조)를 사용하여 정제함으로써 이중특이적 항체를 취득하였다. 정제 조건은 실시예 9-1을 따랐다. 이중특이적 항체의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 202941에 피크를 관측하였다.

- [1924] (9-4) DAR1 이중특이적 항체(트라스투주맙-세특시맙 Fab)(M-4)의 합성
[1925] [화104]



- [1926]
[1927] 실시예 9-3에 따라, 실시예 6-4에서 합성한 아지드기가 1분자만 도입된 항체(T-1-N3)와 실시예 8-1-4에서 합성한 PEG12-DBCO기를 사용함으로써 이중특이적 항체를 취득하였다. 이중특이적 항체의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 201356에 피크를 관측하였다.

- [1928] (9-5) DAR2 이중특이적 항체(세특시맙-트라스투주맙 Fab)(M-5)의 합성
[1929] [화105]



- [1930]
[1931] 실시예 7-4에서 합성한 아지드기가 2분자 도입된 항체(C-2-N3)의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에 실시예 8-2-3에서 합성한 PEG4-DBCO기를 도입한 트라스투주맙의 Fab의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.) 용액(항체에 대하여 2.5등량)을 첨가하고, 20시간 진탕하였다. 반응 용액을 AKTA pure25(Cytiva사 제조)를 사용하여 정제함으로써 이중특이적항체를 취득하였다. 정제 조건은 실시예 9-1을 따랐다. 이중특이적 항체의 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하고, 253224에 피크를 관측하였다.
- [1932] (비교예 2) 표면 플라즈몬 공명(SPR)법에 의한 항체의 친화성 평가
- [1933] 트라스투주맙, 세특시맙, 펌브롤리주맙의 항원(HER2, EGFR, PD-1) 및 태아성 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합 상수

는, Biacore T200(Cytiva)을 이용한 SPR 분석에 의해 정량하였다.

- [1934] 재조합(Recombinant) 인간 HER2-Fc(R&D Systems), 재조합 인간 EGFR-Fc(R&D Systems), 재조합 인간 PD-1-Fc(R&D Systems)는 Biotin Labeling Kit(Dojindo)를 사용하여 비오틴화를 행하고, Biotin CAPture Kit(Cytiva)를 사용하여 센서 칩 위에 고정화하였다. FcRn은 비오틴화 재조합 인간 FcRn(Immunitrack)을 사용하여, 센서 칩 SA(Cytiva) 위에 고정화하였다. 항원에 대한 친화성 평가의 실행 버퍼에는 HBS-EP+buffer(Cytiva)를 사용하였다. FcRn에 대한 친화성 평가는, 결합시의 런닝 버퍼에는 pH 6.0으로 조정된 HBS-EP+buffer를, 해리시의 런닝 버퍼에는 pH 7.4의 HBS-EP+buffer를 사용하였다.
- [1935] 항원 및 FcRn에 대한 각 항체의 결합은, 각 항체를 농도 5점에서 첨가하고, Single cycle kinetic법에 의해 평가하였다. 얻어진 센서그램에 대하여 1:1 결합 모델로 피팅을 행하여 결합 상수를 산출하였다. 각 항체가 FcRn에 결합한 후, pH 7.4의 완충액을 첨가함으로써 항체의 해리를 확인하였다.
- [1936] 세특시맵의 친화성 평가 결과의 센서그램을 도 20-1 내지 20-3에 나타낸다. 세특시맵은 EGFR에 결합하고, 해리 상수 $K_D=610\text{pM}$ 임이 밝혀졌다. 또한, FcRn에 pH 6.0이고 $K_D=4.7\text{nM}$ 에서 결합하고, pH 7.4에서 해리되는 것이 밝혀졌다.
- [1937] (실시에 10) 표면 플라즈몬 공명(SPR)법에 의한 다중 특이성 항체의 친화성 평가
- [1938] (10-1) 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)의 친화성 평가
- [1939] 실시예 9-3에서 합성한 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)를 비교예 2의 수법에 따라 친화성을 평가하였다. 결과의 센서그램을 도 21-1 내지 21-4에 나타낸다. Bi-특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)는 친(親)항체인 세특시맵의 항원인 EGFR에 결합하고, 해리 상수 $K_D=300\text{pM}$ 인 것이 밝혀졌다. 또한, 트라스투주맵의 항원인 HER2에도 결합하여 해리 상수 $K_D=110\text{pM}$ 인 것이 밝혀졌다. 또한, FcRn에 pH 6.0이고 $K_D=2.6\text{nM}$ 에서 결합하고, pH 7.4에서 해리되는 것이 밝혀졌다.
- [1940] (10-2) 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-4)의 친화성 평가
- [1941] 실시예 9-4에서 합성한 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4)를 비교예 2의 수법에 따라 친화성을 평가하였다. 결과의 센서그램을 도 22-1 내지 22-4에 나타낸다. 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4)는 친항체인 트라스투주맵의 항원인 HER2에 결합하고, 해리 상수 $K_D=1.9\text{pM}$ 이하인 것이 밝혀졌다. 또한 세특시맵의 항원인 EGFR에도 결합하고, 해리 상수 $K_D=190\text{pM}$ 인 것이 밝혀졌다. 또한, FcRn에 pH 6.0이고 $K_D=2.4\text{nM}$ 에서 결합하고, pH 7.4에서 해리되는 것이 밝혀졌다.
- [1942] (10-3) 삼중특이적 항체(M-2)의 친화성 평가
- [1943] 실시예 9-2에서 합성한 삼중특이적 항체(M-2)의 친화성 평가 결과의 센서그램을 도 23-1 내지 23-5에 나타낸다. 삼중특이적 항체(M-2)는 친항체인 세특시맵의 항원인 EGFR에 결합하고, 해리 상수 $K_D=250\text{pM}$ 인 것이 밝혀졌다. 또한, 트라스투주맵의 항원인 HER2와, 펌브롤리주맵의 항원인 PD-1에도 결합하여, 각각 해리 상수 $K_D=6.8\text{pM}$, 1.1nM 인 것이 밝혀졌다. 또한, FcRn에 pH 6.0이고 $K_D=2.4\text{nM}$ 에서 결합하고, pH 7.4에서 해리되는 것이 밝혀졌다.
- [1944] 이들 결과로부터, 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3)와 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4)는 EGFR과 HER2에 각각 친화성을 갖는 이중 특이성 항체이며, 삼중특이적 항체(M-2)는 EGFR, HER2 및 PD-1에 친화성을 갖는 삼중 특이성 항체임이 밝혀졌다. 또한, 생체 내에서의 항체의 리사이클링에 관여하는 FcRn과의 친화성 및 해리능도 유지되고 있는 것이 밝혀졌다.
- [1945] (실시에 11) 유동 세포측정법에 의한 세포 위의 항원에 대한 다중 특이적 항체의 결합 평가
- [1946] 세포에는 HER2 양성 SKBR-3 세포, EGFR 양성 A-431 세포 및 PD-1 양성 세포가 포함되는 CD3 활성화 인간 T세포를 사용하였다. 각 세포에 대한 세특시맵, 트라스투주맵, 펌브롤리주맵, 이중특이적 항체(세특시맵-트라스투주맵 Fab)(M-3), 이중특이적 항체(트라스투주맵-세특시맵 Fab)(M-4), 삼중특이적 항체(M-2) 결합 평가는 유세포 분석(Flow Cytometry)법으로 실시하였다.
- [1947] 10% FBS(Thermo Fisher Scientific)를 첨가한 D-MEM 배지(Thermo Fisher Scientific)에서 배양한 각 세포를

200,000세포 회수하고, Human TruStain FcX(Biolegend)를 첨가한 PBS를 20 μ L 첨가하고, 10분간 얼음 위에서 Fc 수용체에 대한 블로킹을 행하였다. 1차 항체로서 상술한 각 항체를 세로 농도 20 μ g/mL가 되도록 세포 염색 버퍼(1% FBS를 첨가한 PBS)에 첨가하고, 세포에 20 μ L 첨가하고, 20분간 얼음 위에서 인큐베이션함으로써 1차 항체 반응을 행하였다. 1차 항체 반응을 행한 세포는, 세포 염색 버퍼로 2회 세정하였다. 2차 항체로서 10 μ g/mL가 되도록 세포 염색 버퍼로 희석한 Goat anti-Human IgG(H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa FluorTM 488(Thermo Fisher Scientific)을 세포에 40 μ L 첨가하고, 20분간 얼음 위에서 인큐베이션함으로써 2차 항체 반응을 행하였다. 세포 염색 완충액으로 2회 세정한 후, Attune NxT 유세포 분석기(Flow Cytometer)(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 분석을 행하였다.

[1948] 각 세포에 대한 분석 결과를 도 24-1 내지 24-8에 나타낸다. SKBR-3 세포에 대해서는 트라스투주맙, 이중특이적 항체(세톡시맙-트라스투주맙 Fab)(M-3), 이중특이적 항체(트라스투주맙-세톡시맙 Fab)(M-4), 삼중특이적 항체(M-2)의 각 항체에서 97% 이상의 세포에서 형광이 인정되었다. 또한, A-431 세포에 대해서는 세톡시맙, 이중특이적 항체(세톡시맙-트라스투주맙 Fab)(M-3), 이중특이적 항체(트라스투주맙-세톡시맙 Fab)(M-4), 삼중특이적 항체(M-2)의 각 항체에서 98% 이상의 세포에서 형광이 인정되었다. 즉, 트라스투주맙은 HER2 양성 세포인 SKBR3 세포에만, 세톡시맙은 EGFR 양성 세포인 A-431 세포에만 결합하는 한편, 이중 특이적 항체인 bi-특이적 항체(세톡시맙-트라스투주맙 Fab)(M-3), 이중특이적 항체(트라스투주맙-세톡시맙 Fab)(M-4), 삼중특이적 항체(M-2)는 SKBR3 세포와 A-431 세포 모두에 결합할 수 있는 것이 확인되었다. CD3 활성화 인간 T세포에 대해서는 PD-1을 인식하지 않는 세톡시맙에서는 거의 형광이 인정되지 않았지만, PD-1 특이적인 펙트폴리주맙에서 약 23%의 세포에 형광이 인정되었기 때문에, PD-1 발현 세포가 약 23% 포함되는 것이 밝혀졌다. 삼중특이적 항체(M-2)에서 거의 동등한 세포에 형광이 인정되었기 때문에, 삼중특이적 항체(M-2)가 PD-1에 결합할 수 있는 것이 밝혀졌다. 이러한 결과로부터, 삼중특이적 항체(M-2)는 EGFR, HER2, PD-1의 항원 모두에 결합할 수 있는 것이 확인되었다.

[1949] (실시예 12) 부위 특이적으로 아지도페닐알라닌(AzF)을 도입한 VHH 항체(CD3-VHH, V-1)의 발현

[1950] (12-1) pPK5 벡터에 AzFN3 DNA 카세트를 탑재한 플라스미드 벡터(pPK14e)의 구축

[1951] C.glutamicum에서의 이중 단백질의 분비 생산에 있어서, 목적 단백질에 부위 특이적으로 아지도페닐알라닌(AzF)을 도입할 수 있는 것이 알려져 있다(WO2023/282315).

[1952] WO2023/282315를 참고로, AzFN3 DNA 카세트(서열번호 43)를 전체 합성에 의해 취득하였다. AzFN3 DNA 카세트는, 아지도페닐알라닐 tRNA 합성효소(AzFRS) 유전자 및 그 하류에 ApaI 사이트를 포함하고, 또한 그 하류에 F1 프로모터 및 그 하류에 연결된 UAG 코돈을 아지도페닐알라닌(AzF)으로 번역 가능한 서프레스 tRNA (tRNA_{CTA}) 유전자, 또한 그 하류에 rrnC 터미네이터를 포함하고, 또한 5'-말단에 KpnI 사이트, 3'-말단에 XbaI 사이트를 포함한다. AzFRS는, Y32T/E107N/D158P/I159L/L162Q의 변이를 갖는, 아지도페닐알라닌을 기질이 되도록 개변된 고세균 Methanococcus jannaschii 유래의 개변형 티로실 tRNA 합성효소이다.(J.AM.CHEM.SOC.2002, 124, 9026-9027). AzFRS 유전자의 염기 서열 및 AzFRS의 아미노산 서열을, 각각 서열번호 44 및 서열번호 45에 나타낸다. tRNA_{CTA}는, UAG(앰버)에 대응하는 안티코돈(CTA)을 갖도록 개변된 고세균 Methanococcus jannaschii 유래의 개변된 티로실 tRNA이다. tRNA_{CTA} 유전자의 염기 서열 및 동일한 유전자가 코딩하는 tRNA(Tyr)의 염기 서열을, 각각 서열번호 46 및 서열번호 47에 나타낸다. 이 AzFN3 DNA 카세트를 코리네형 세균에 도입하여 아지도페닐알라닌을 첨가한 배지에서 배양하면, 아지도페닐알라닌이 코리네형 세균에 놓여져, AzFRS에 의해 tRNA_{CTA}의 말단에 결합하여, 아지도페닐알라닐 tRNA가 생성된다. 아지도페닐알라닐 tRNA는 단백질 번역 과정에서 mRNA 중의 UAG 코돈에 결합하고, UAG 코돈이 아지도페닐알라닌으로 번역되고, UAG 코돈의 위치에 아지도페닐알라닌이 도입된 단백질이 합성된다.

[1953] 전체 합성된 AzFN3 DNA 카세트(서열번호 43)를 WO2016/171224에 기재된 pPK5 벡터의 KpnI-XbaI 사이트에 인퓨전 반응에 의해 통합함으로써, AzFN3 DNA 카세트를 통합한 벡터 pPK14e를 구축하였다. 인퓨전 반응에는 In-Fusion(등록상표) HD Cloning Kit(Takara Bio)를 사용하고, 반응 조건은 업자가 권장하는 프로토콜에 따랐다. 삽입 단편의 염기 서열의 결과, 설계대로 AzFN3 DNA 카세트 탑재 벡터가 구축되어 있는 것을 확인하였다. 염기 서열의 결정은 BigDye(등록상표) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)와 3500xL Genetic Analyzer(Applied systems)를 사용하여 행하였다.

[1954] 서열번호 43

- [1955] ggtaccggagaccacaacgggttccctctagaataatTTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCAATGGATGAGTTCGAGATGATCAAACGTAACTTCCGAGATCATTTCCGAGGAAGAAGTGCgcgaagtGCTTAAGAAAGATGAGAAGTCTGCGACGATTGGCTTCGAACCATCAGGGAAGATTACCTTGGCCACTACTTCGAGATCAAGAAGATGATCGACTTGCAGAAATGCTGGCTTCGACATCATCATTTCTGCTGGCGGATCTGCATGCCTACCTCAATCAGAAGGGAGAAGTGGACGAAATCCGCAAGATCGCGGACTACAACAAGAAAGTCTTTGAAGCAATGGGCTCTGAAGGCGAAATACGCTCTATGGGAGCAACTTCCAGCTTGACAAGACTACACCTTGAACGTGTATCGGCTTGCTCTGAAAACCACTCAAACGTGCACGCCGATCGATGGAACCTCATCGCACGGGAGGACGAGAATCCGAAGGTGCTGAAGTCATCTATCCCATCATGCAAGTTAACCCGCTTCATTACCAAGGAGTGGATGTTGCAGTTGGTGGTATGGAACAGCGCAAGATTACATGTTGGCACGCAACTGCTGCCGAAGAAAGTGGTCTGCATCCACAATCCCCTGCTCACTGGTTTGGACGGTGAAGGCAAGATGAGTCTCTAAAGGCAACTTTATCGCTGTCTGATGATTCGCTGAAGAGATTCTGTCGAAGTTACTGTCCAGCGGGAGTAGTGGAAGGCAACCAATCATGGAGATTGCCAAGTACTTCTGGAGTATCCATTGACCATCAAGCGTCTGAGAAGTTTGGCGGTGATCTCACCGTAAACTCTACGAGGAAGTGGAAATCCCTCTTCAAGAACAAGAGCTGCACCAATGGATCTCAAGAACGCAGTTGCCGAGGAGCTGATCAAGATCCTTGAGCCTATTTCGAAACGCCTGTAAAGGCCCGGCGATGGATGAAGTATACGATCTACTGTTACTCAAGGCAAGCTCGAGCGGGACGGTCGAACCGCTTCAAGCGACCGGATGAGTATGTTACAGTAGTAGCGACGGGGTCTCATAGTAAAGTATGAGGCGCACCAACGAGGTGCCCCCGCTTAGTTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAATCCGCATGGCACGGGTCAAATCCCCTAGGCGGGACCCTGCAGATCCTTAGCGAAAGCTAAGGATTTTTTTTGATATCTCTAGA
- [1956] 서열번호 44
- [1957] atggatgagttcgagatgatcaaacgtaacacttccgagatcatttccgaggaagaactgcgcgaagtGCTTAAGAAAGATGAGAAGTCTGCGACGATTGGCTTCGAACCATCAGGGAAGATTACCTTGGCCACTACTTCGAGATCAAGAAGATGATCGACTTGCAGAAATGCTGGCTTCGACATCATCATTTCTGCTGGCGGATCTGCATGCCTACCTCAATCAGAAGGGAGAAGTGGACGAAATCCGCAAGATCGCGGACTACAACAAGAAAGTCTTTGAAGCAATGGGTCTGAAGGCGAAATACGTCTATGGGAGCAACTTCCAGCTTGACAAGACTACACCTTGAACGTGTATCGGCTTGCTCTGAAAACCACTCAAACGTGCACGCCGATCGATGGAACCTCATCGCACGGGAGGACGAGAATCCGAAGGTGCTGAAGTCATCTATCCCATCATGCAAGTTAACCCGCTTCATTACCAAGGAGTGGATGTTGCAGTTGGTGGTATGGAACAGCGCAAGATTACATGTTGGCACGCAACTGCTGCCGAAGAAAGTGGTCTGCATCCACAATCCCCTGCTCACTGGTTTGGACGGTGAAGGCAAGATGAGTCTCTAAAGGCAACTTTATCGCTGTCTGATGATTCGCTGAAGAGATTCTGTCGAAGTTACTGTCCAGCGGGAGTAGTGGAAGGCAACCAATCATGGAGATTGCCAAGTACTTCTGGAGTATCCATTGACCATCAAGCGTCTGAGAAGTTTGGCGGTGATCTCACCGTAAACTCTACGAGGAAGTGGAAATCCCTCTTCAAGAACAAGAGCTGCACCAATGGATCTCAAGAACGCAGTTGCCGAGGAGCTGATCAAGATCCTTGAGCCTATTTCGAAACGCCTGTAAGGCCCGGCGATGGATGAAGTATACGATCTACTGTTACTCAAGGCAAGCTCGAGCGGGACGGTCGAACCGCTTCAAGCGACCGGATGAGTATGTTACAGTAGTAGCGACGGGGTCTCATAGTAAAGTATGAGGCGCACCAACGAGGTGCCCCCGCTTAGTTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAATCCGCATGGCACGGGTCAAATCCCCTAGGCGGGACCCTGCAGATCCTTAGCGAAAGCTAAGGATTTTTTTTGATATCTCTAGA
- [1958] 서열번호 45
- [1959] MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLKKDEKSATIGFEPGSGIKHLGHYLIKKMIDLQNAFGDIIILLADLHAYLNQKGELDEIRKIGDYNKKVFEAMGLKAKYVYGSNFQLDKDYTLNVYRLAKTTLKRARRSMELIAREDENPKVAEVIYIMQVNPLHYQGVDAVVGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEKMSSSKGNFIAVDDSPEEIRAKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKNKELHPMDLKNVAEELIKILEPIRKRL
- [1960] 서열번호 46
- [1961] cccgccttagttcagcagggcagaacggcggactctaaatccgcatggcacgggttcaaatacccgtaggcgggacca
- [1962] 서열번호 47
- [1963] cccgccuuaguucagcagggcagaacggcggacucuaaaucgcauggcacgggucaaaucgccguaggcgggacca
- [1964] pPK14e 벡터는, AzF 도입 단백질 발현의 기본 벡터로서 이용할 수 있다. 즉, pPK14e의 ApaI 사이트를 이용하여 목적 단백질의 발현 카세트를 서브클로닝함으로써, AzFN3 DNA 카세트(아지도페닐알라닌 tRNA 합성효소(AzFRS) 유전자 및 UAG 코돈을 아지도페닐알라닌(AzF)으로 번역 가능한 서프레서 tRNA(tRNA_{CTA}) 유전자)와 AzF 도입 단백질의 발현 카세트를, 1플라스미드로 동시에 발현시킬 수 있다.
- [1965] (12-2) CD3-VHH-PA24H6-WT 및 CD3-VHH-PA24H6-AzF의 각 분비 발현 플라스미드의 구축
- [1966] 아지도페닐알라닌을 도입하는 VHH 항체로서, WO2015/095412에 기재된 항CD3-VHH 항체(CD3-VHH)를 사용하였다. CD3-VHH 서열 내부를 개변시키지 않고 아지도페닐알라닌을 도입하기 위해, CD3-VHH의 C말단에 PA24 링커 및 6xHis 태그를 부가한 개변형 CD3-VHH를 설계하였다(CD3-VHH-PA24H6-WT). 또한, CD3-VHH-PA24H6-WT의 PA24 링커내(141-142위치 사이)에 AzF를 도입하도록 변이형 CD3-VHH-PA24H6을 설계하였다(CD3-VHH-PA24H6-AzF). 설계한 CD3-VHH-PA24H6-WT 및 CD3-VHH-PA24H6-AzF의 아미노산 서열을 각각 서열번호 48, 49에 나타낸다.
- [1967] CD3-VHH-PA24H6-WT의 아미노산 서열
- [1968] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSNYHMGWFRQAPGKERELVAASGSGGSTYYTDSVKGRFTISRNNKNTMSLQMSNLKPEDTGVIYYCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPHHHHHHH(서열번호 48)

- [1969] CD3-VHH-PA24H6-AzF의 아미노산 서열

[1970] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSNYHMGWFRQPAPGERELVAATSGSGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKNTMSLQMSNLKPEDTGVIYCTTPTEKGSSIDYWGGGTQTIVTSRGYPDYDPDYAAPAAPAAPAFAPAAAPAPHHHHHH(서열번호 49; 142위치의 F는 아지드화되어 있음)

[1971] 이들 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 서열을 C.glutamicum의 코돈 사용 빈도를 고려하여 설계하였다. 또한, C.glutamicum에 의한 분비 발현을 가능하게 하기 위해, 각각 다음의 발현 카세트를 설계하였다.

[1972] CD3-VHH-PA24H6-WT는, C.stationis 유래의 CspA의 시그널 펩타이드 25아미노산 잔기 및 CD3-VHH-PA24H6-WT의 융합 단백질(이하, 「CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT」로 표기함)으로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 50, 51에 나타낸다.

[1973] 서열번호 50

[1974]
atgaaacgcataaaaatcgctggcgtgaggcgtccaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggcaacggcacaggtacagctacaggaatccggaggc
ggctcttgtagaggcaggaggcagtattgctgttgcctgtgctgctgctggcgtcgactttccaactatcacatgggggtgggttcgcccaagcaccaggcaaa
gaacgcgaggttggttgcccgcatttagcgggtctggagggaagcacgtactacaccgatagcgtcaaaggccgtttcacgatcagccgcaaataacgctaagaac
accatgtctctgcagatgtcgaaacctcaagcctgaagacactggcgtgtactactgcactacacctaccgagaaagggttcctcgatcgactattgggggtcaa
ggcactcaagtcaccgtctcgagtgaggaggtatccctatgatgtgccggatttatgctgcaccgcagcaccgcgccagcagcgccagctgcgcctgctcca
gcagcaccagccgctcctgctccgcaccatcaccaccatcactaa

[1975] 서열번호 51

[1976] MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSNYHMGWFRQPAPGERELVAATSGSGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKN
TMSLQMSNLKPEDTGVIYCTTPTEKGSSIDYWGGGTQTIVTSRGYPDYDPDYAAPAAPAAPAFAPAAAPAPHHHHHH

[1977] CD3-VHH-PA24H6-AzF는, C.I.stationis 유래의 CspA의 시그널 펩타이드 25아미노산 잔기 및 CD3-VHH-PA24H6-AzF의 융합 단백질(이하, 「CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber」로 표기함)로서 분비 발현시켰다. CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber 유전자는, 구체적으로는 CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT 유전자의 염기 서열에서 종지 코돈 중 하나인 UAG 코돈(앰버)에 대응하는 TAG 트리플렛의 삽입을 포함하고, 상기 TAG 트리플렛은 Azf로 번역될 수 있다. 설계한 CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각, 서열번호 52, 53에 나타낸다.

[1978] 서열번호 52

[1979]
atgaaacgcataaaaatcgctggcgtgaggcgtccaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggcaacggcacaggtacagctacaggaatccggaggc
ggctcttgtagaggcaggaggcagtattgctgttgcctgtgctgctgctggcgtcgactttccaactatcacatgggggtgggttcgcccaagcaccaggcaaa
gaacgcgaggttggttgcccgcatttagcgggtctggagggaagcacgtactacaccgatagcgtcaaaggccgtttcacgatcagccgcaaataacgctaagaac
accatgtctctgcagatgtcgaaacctcaagcctgaagacactggcgtgtactactgcactacacctaccgagaaagggttcctcgatcgactattgggggtcaa
ggcactcaagtcaccgtctcgagtgaggaggtatccctatgatgtgccggatttatgctgcaccgcagcaccgcgccagcagcgccagctTAGgcgcctgct
ccagcagcaccagccgctcctgctccgcaccatcaccaccatcactaa

[1980] 서열번호 53(167위치의 F는 아지드화되어 있음)

[1981] MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSNYHMGWFRQPAPGERELVAATSGSGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKN
TMSLQMSNLKPEDTGVIYCTTPTEKGSSIDYWGGGTQTIVTSRGYPDYDPDYAAPAAPAAPAFAPAAAPAPHHHHHH

[1982] CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT 및 CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber에 기재된 염기 서열의 상류에 C.glutamicum ATCC13869주 유래의 cspB 유전자의 프로모터를 연결하고, 또한 5'-측 및 3'-측에 ApaI 사이트를 부가한, 야생형 및 변이형의 CD3-VHH-PA24H6 발현 카세트를 각각 설계하고, 전체 합성하였다. 전체 합성한 DNA 단편(CD3-VHH-PA24H6의 발현 카세트)을 실시예(12-1)에서 구축한 pPK14e 벡터의 ApaI 사이트에 삽입함으로써, 야생형 및 변이형의 CD3-VHH-PA24H6의 분비 발현 플라스미드인 pPK14e-CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT 및 pPK14e-CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber를 각각 구축하였다. 삽입 단편의 염기 서열 결정의 결과, 각각 설계대로의 CD3-VHH-PA24H6+AzFN3 탑재 벡터가 구축되어 있는 것을 확인하였다.

[1983] (12-3) 아지도페닐알라닌을 도입한 CD3-VHH-PA24H6(CD3-VHH-PA24H6-Azf, V-1)의 C.glutamicum에서의 분비 발현

[1984] 상기에서 구축한 CD3-VHH-PA24H6-Amber+AzFN3 발현 벡터인 pPK14e CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber를 사용하여

C.glutamicum YDK0107주를 형질 전환하여, CD3-VHH-PA24H6-Amber 발현주를 얻었다. 대조로서, CD3-VHH-PA24H6-WT+AzFN3 발현 벡터인 pPK14e_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT를 사용하여 C.glutamicum YDK0107주를 형질 전환하여, CD3-VHH-PA24H6-WT 발현주를 얻었다.

[1985] 얻어진 각 형질 전환체를, 0.3mM의 아지도페닐알라닌 및 25mg/L의 카나마이신을 포함하는 MMTG 액체 배지에서 각각 25℃, 120시간 배양하였다. 배양 종료 후, 각 배양액을 원심분리하여 얻어진 배양 상청 1.0μL를 NuPAGE (등록상표) 12% Bis-Tris Gel(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 환원 SDS-PAGE에 제공하고 나서 Quick-CBB(Wako)로 염색을 행하였다.

[1986] 그 결과, CD3-VHH-PA24H6-WT 발현주의 배양 상청 중에, 아지도페닐알라닌의 유무에 상관없이 CD3-VHH-PA24H6-WT로 추정되는 단백질 밴드가 각각 검출되었다(도 25, Lanes 4-5). 또한, CD3-VHH-PA24H6-Amber 발현주의 배양 상청 중에, 아지도페닐알라닌의 비존재하에서는 CD3-VHH-PA24H6-WT보다 저분자측의 단백질 밴드가 주로 검출되었기 때문에, PA24 링커 내의 Amber 코돈 부위(142위치)에서 번역이 종결된 것이 주로 분비되어 있는 것으로 추찰되어(도 25, Lane 6), 한편으로, 아지도페닐알라닌의 존재하에서는 CD3-VHH-PA24H6-WT와 동등한 위치의 단백질 밴드가 주로 검출되었기 때문에, PA24링커 내의 Amber 코돈 부위(142위치)에서 번역이 종결되지 않고, 아지도페닐알라닌이 도입된 CD3-VHH-PA24H6-AzF 전체 길이가 발현되고 있는 것으로 추찰되었다(도 25, Lane 7).

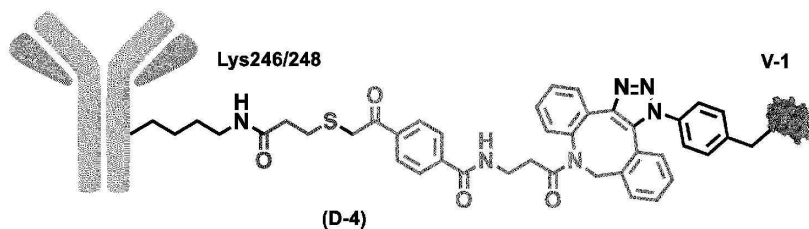
[1987] (12-4) CD3-VHH-PA24H6-AzF(V-1)의 정제

[1988] 실시예(12-3)에서 얻어진 CD3-VHH-PA24H6-AzF 발현주 배양액의 원심 상청을, 0.2μm의 PVDF막 필터를 사용하여 무균 여과를 행하였다. 배양액 중의 협잡 성분 및 AzF가 도입되어 있지 않은 유연체(類緣體)를 제거하기 때문에, 발현된 CD3-VHH-PA24H6-AzF를, C말단의 6xHis-tag를 이용한 어피니티 컬럼에 의해 정제하였다. 6xHis-tag 부가 단백질의 정제는 Ni-NTA Spin Kin(QIAGEN)을 사용하고, 정제 조건은 업자가 권장하는 프로토콜에 따랐다.

[1989] (실시예 13) 1분자의 VHH(V-1)이 결합한 세록시맵(D-4)의 합성

[1990] [화106]

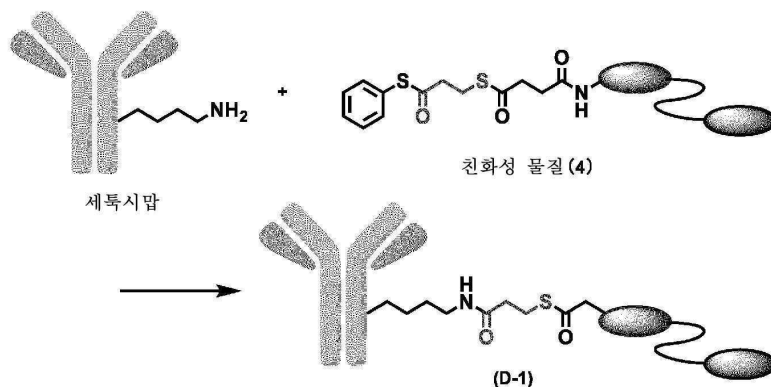
[1991] 세록시맵



[1992]

[1993] (13-1) 친화성 시약 (4)를 이용한 세록시맵(D-1)의 수식

[1994] [화107]



[1995]

[1996] 항인간 EGFR 모노클로날 항체 세록시맵(머크 바이오파마)의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에, 실시예 3에서 합성한 친화성 시약 (4)의 DMF 용액(항체에 대하여 5등량)을 첨가하여, 1시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼(Cytiva사 제조)을 사용하여 정제하여, 친화성 시약 (4)가 1분자 결합한 세록시맵(D-1)을 취득하였다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을

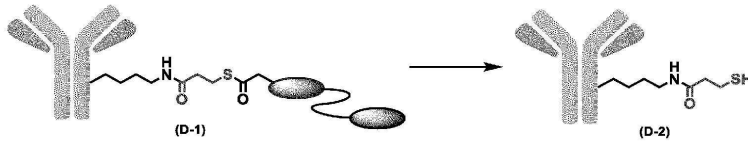
행하여, 세특시맵에 친화성 시약 (4)가 1분자 결합한 것을 확인하였다.

[1997]

(13-2) 티올기를 1분자 갖는 세특시맵(D-2)의 합성

[1998]

[화108]



[1999]

[2000]

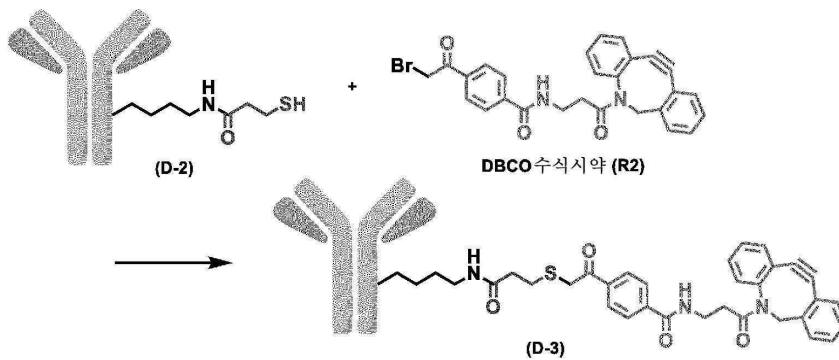
계속해서 실시예(4-3)에 따라 하이드록실아민 용액을 첨가하고, 실온에서 1시간 진탕함으로써, 티올기 도입 항체(D-2)를 얻었다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 티올기가 1분자 도입되어 있는 것을 확인하였다.

[2001]

(13-3) DBCO기를 1분자 갖는 세특시맵(D-3)의 합성

[2002]

[화109]



[2003]

[2004]

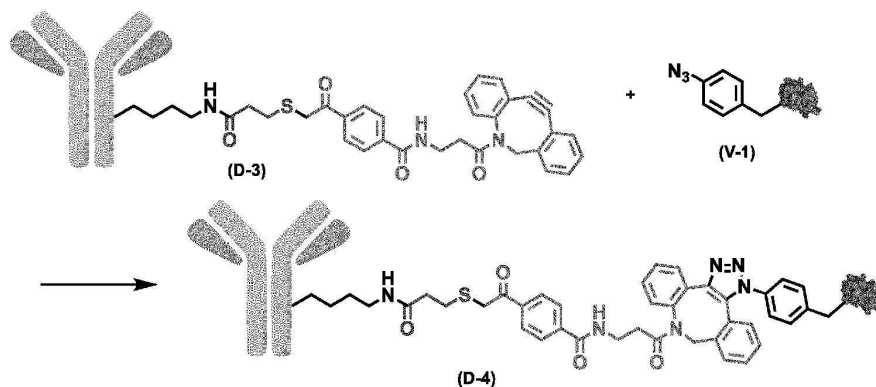
실시예 13-2에서 합성한 1분자의 티올기가 도입된 세특시맵(D-2)과 W02022/154127에 기재된 DBCO기 시약 (R2)를 사용하여, W02022/154127에 기재된 수법에 따름으로써 DBCO기가 1분자 도입된 항체(D-3)를 얻었다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 세특시맵에 DBCO기가 1분자 결합한 것을 확인하였다.

[2005]

(13-4) VHH(V-1)가 1분자 결합한 세특시맵(D-4)의 합성

[2006]

[화110]

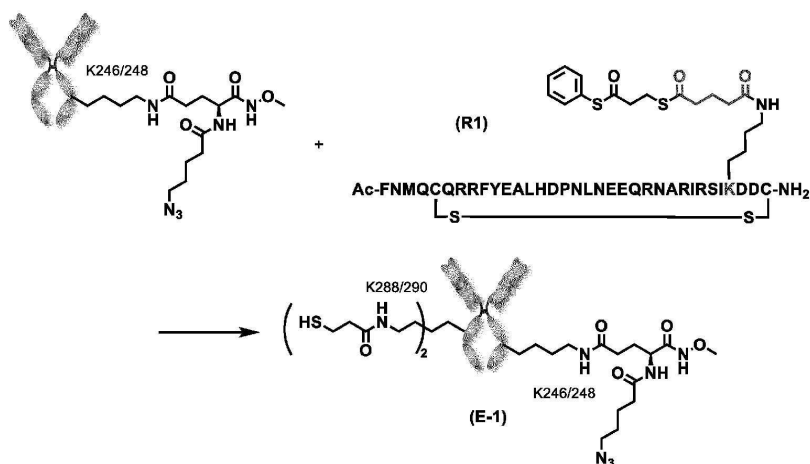


[2007]

[2008]

실시예(13-3)에서 합성한 DBCO기가 1분자 결합한 세특시맵(D-3)의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에, 실시예 Z에서 합성한 아지도페닐알라닌 도입 VHH(항체에 대하여 3등량)을 첨가하여, 20시간 진탕하였다. 반응 용액을 AKTA pure25(Cytiva사 제조)를 사용하여 정제함으로써 VHH가 1분자 결합한 항체(D-4)를 취득하였다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하여, 170492에 피크를 관측하였다.

- [2009] AKTA pure25(Cytiva사 제조)에 의한 정제는 하기의 조건으로 행하였다.
- [2010] 컬럼: Superdex 200 Increase 10/300GL(Cytiva사 제조)
- [2011] 용리액: PBS 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Saline(PBS), pH 7.4)
- [2012] 유속: 0.6ml/min
- [2013] 검출기: 215 및 280nm의 파장에서 검출되었다.
- [2014] (13-5) 표면 플라즈몬(SPR)법에 의한 VHH(V-1)가 1분자 결합한 세특시맵(D-4)의 친화성 평가
- [2015] 실시예(13-4)에서 합성한 VHH(V-1)가 1분자 결합한 세특시맵(D-4)의 항원(EGFR, CD3)에의 결합 상수는, Biacore T200(Cytiva)를 이용한 SPR 해석에 의해 정량하였다.
- [2016] 재조합 인간 EGFR-Fc(R&D Systems)는 Biotin Labeling Kit(Dojindo)를 사용하여 비오틴화를 행하고, Biotin CAPture kit(Cytiva)를 사용하여 센서 칩 위에 고정화하였다. CD3은 비오틴화 재조합 인간 CD3 ϵ/δ -Fc(ACROBiosystems)를 사용하고, Biotin CAPture Kit(Cytiva)를 사용하여 센서 칩 위에 고정화하였다. 항원에 대한 친화성 평가의 러닝 버퍼에는 HBS-EP+buffer(Cytiva)를 사용하였다.
- [2017] 각 항원에 대한 VHH(V-1)가 1분자 결합한 세특시맵(D-4)의 결합은, 각각을 농도 5점에서 첨가하고, Single cycle kinetics법에 의해 평가하였다. 얻어진 센서그램에 대하여 1:1 결합 모델로 피팅을 행하여, 결합 상수를 산출하였다.
- [2018] 비교예 2에 나타난 바와 같이, 세특시맵은 항원인 EGFR에 대하여 해리 상수 $K_D=610\text{pM}$ 으로 결합한다.
- [2019] CD3-VHH(V-1)의 친화성 평가 결과의 센서그램을 도 26에 나타낸다. CD3-VHH(V-1)는 CD3 ϵ/δ 에 결합하여, 해리 상수 $K_D=7.6\text{nM}$ 임이 밝혀졌다.
- [2020] VHH(V-1)가 1분자 결합한 세특시맵(D-4)의 친화성 평가 결과의 센서그램을 도 27에 나타낸다. (D-4)는 친항체인 세특시맵의 항원인 EGFR에 결합하여, 해리 상수 $K_D=630\text{pM}$ 인 것이 밝혀졌다. 또한, CD3-VHH(V-1)의 항원인 CD3 ϵ/δ 에도 결합하여, 해리 상수 $K_D=13\text{nM}$ 인 것이 밝혀졌다.
- [2021] 이들 결과로부터, VHH(V-1)가 1분자 결합한 세특시맵(D-4)는 각각의 결합 분자인 항체 및 VHH의 결합 친화성을 손상시키지 않고, EGFR과 CD3에 결합 가능하다. 이중 특이적 항체인 것이 밝혀졌다.
- [2022] (실시예 14)
- [2023] (14-1) 항체의 Lys288/290에 티올기를 2분자 결합시킨 트라스투주맵(E-1)의 합성
- [2024] [화111]



- [2025]
- [2026] 실시예(6-4)에서 합성한 아지드기가 1분자 도입된 트라스투주맵과 기보(W02022/154116A1)에 기재된 펩타이드 시약 (R1)을 이용하여, 기보(W02022/154116A1)에 기재된 수법에 따름으로써 2분자의 티올기를 도입한 항체(E-1)를 취득하였다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 1분자의 아지

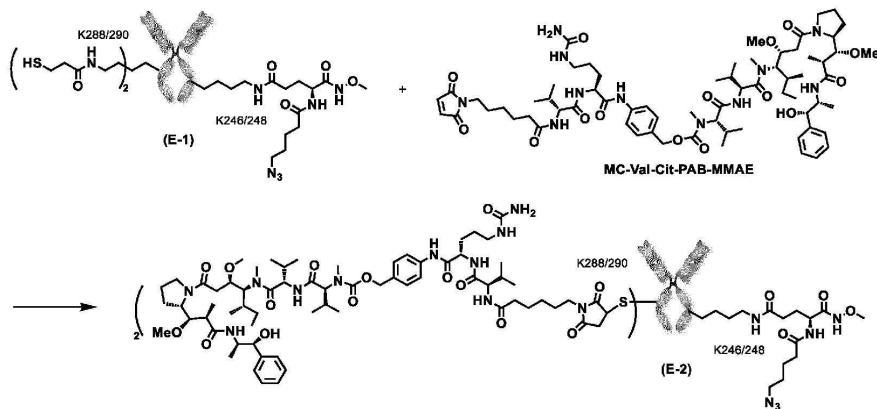
드기 및 2분자의 티올기가 도입된 것을 확인하였다.

[2027]

(14-2) DAR2의 ADC(E-2)의 합성

[2028]

[화112]



[2029]

[2030]

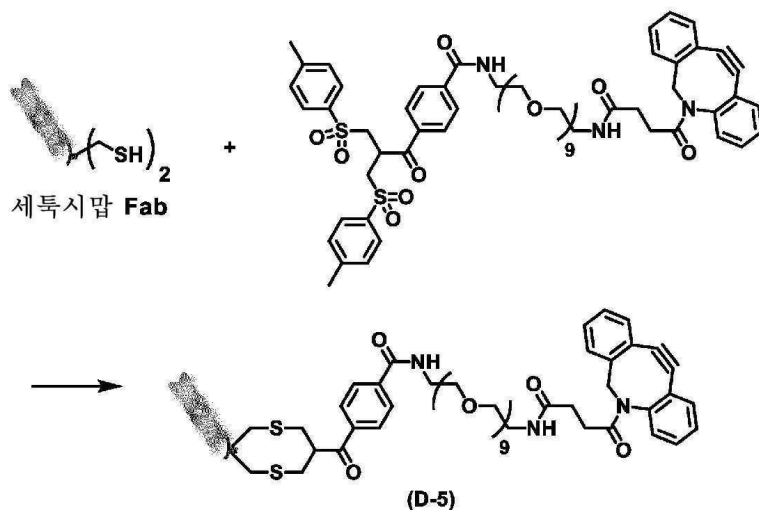
실시예 14-1에서 얻은 1분자의 아지드기 및 2분자의 티올기를 갖는 항체(E-1)로 기존 물질인 MC-Val-Cit-PABA-MMAE(Organic & Biomolecular, Chemistry, 9501-9518)을 사용하여 2분자의 Val-Cit-PABA-MMAE가 도입된 항체(E-2)를 얻었다. 기보(WO2019/240287A1)에 따라 HIC-HPLC 분석을 행하여, 2분자의 Val-Cit-PABA-MMAE가 도입된 것을 확인하였다.

[2031]

(14-3) DBCO기를 갖는 세특시맙의 Fab(D-5)의 합성

[2032]

[화113]



[2033]

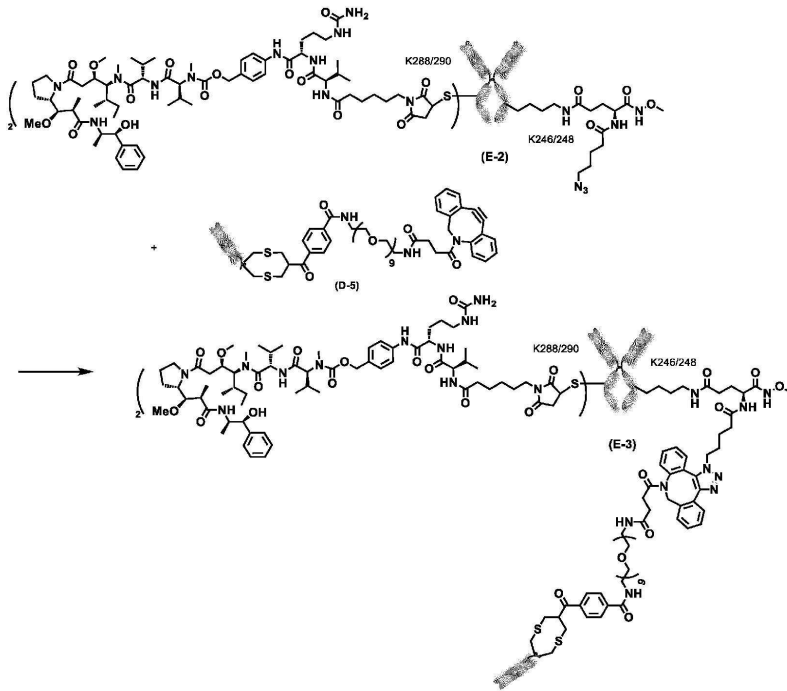
[2034]

실시예 (8-1-2)에서 합성한 세특시맙의 Fab의 PBSE 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Saline(PBS), 10mM EDTA, pH 7.4) 용액에 시판의 Bis-Sulfone-PEG9-DBCO(Broadpharma사)의 디메틸포름아미드 용액(Fab에 대하여 3 당량, 디메틸포름아미드(DMF)(8% v/v) 용액)을 첨가하고, 2시간 진탕하였다. 반응 용액을 NAP-25 탈염 컬럼(Cytiva사 제조)을 사용하여 정제하고, DBCO기가 도입된 세특시맙의 Fab(D-5)를 합성하였다. 분석은 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하고, 51706에 피크를 관측하였다.

[2035]

(14-4) 1분자의 세특시맙의 Fab이 결합한 DAR2의 ADC(E-3)의 합성

[2036] [화114]



[2037]

[2038] 실시예(14-2)에서 합성한 1분자의 아지드기를 갖는 DAR2의 ADC(E-2)의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액에, 실시예(B-3)에서 합성한 DBCO기를 갖는 세특시맵의 Fab의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 5.5) 용액(항체에 대하여 3등량)을 첨가하여, 40시간 진탕하였다. 반응 용액을 AKTA pure25(Cytiva사 제조)를 사용하여 정제함으로써 Fab가 1분자 결합한 ADC(E-3)를 취득하였다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라 ESI-TOFMS 분석을 행하여, 203036에 피크를 관측하였다.

[2039] AKTA pure25(Cytiva사 제조)에 의한 정제는 하기의 조건으로 행하였다.

[2040] 컬럼: Superdex 200 Increase 10/300GL(Cytiva사 제조)

[2041] 용리액: PBS 완충액(10mM의 Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4)

[2042] 유속: 0.6ml/min

[2043] 검출기: 215 및 280nm의 파장에서 검출되었다.

[2044] 실시예 15: 친화성 물질의 설계 및 C.glutamicum에서의 분비 발현

[2045] (15-1) 친화성 물질의 설계 개요

[2046] 본 발명에서는, 항체에 결합 가능한 부위를 분자 내에 2개소 이상 포함하는 친화성 물질을 설계할 필요가 있다. 즉, 친화성 물질은

[2047] A) 2개 이상의 항체에 결합 가능한 부위가 상기 항체에 결합 가능한 부위를 연결하기 위한 링커를 통하여 연결된 분자

[2048] 가 되도록 설계할 필요가 있다.

[2049] 또한, 본 발명에서는 친화성 물질에 링커를 결합시킬 필요가 있다. 즉, 친화성 물질 중의 특정 부위로의 링커의 특이적인 결합을 달성하기 위해서는, 링커와 반응할 수 있는 부위가 친화성 물질 중에 1개만 존재하도록 설계할 필요가 있다.

[2050] 친화성 물질을 폴리펩타이드로 하고, 폴리펩타이드의 K(라이신)의 아미노기에 링커를 결합시키는 경우, 링커와 반응하는 아미노기가 폴리펩타이드 중에 1개만 존재하도록 폴리펩타이드를 설계할 필요가 있다. 이것을 염두에 두고 이하의 설계를 실시하였다.

[2051] B) 폴리펩타이드 중이 K를 1잔기만 포함한다

- [2052] C) N말단의 아미노산을 Q(글루타민)로 함으로써, 피로글루타밀화시켜 N말단 아미노기를 아미드로 변환한다.
- [2053] 상기 (A), B) 및 C)의 물에 따라 이하 (i)-(n)과 같이 폴리펩타이드성 친화성 물질을 설계하였다.
- [2054] (15-2) 친화성 물질의 조제
- [2055] 이하의 친화성 물질을 조제하였다.
- [2056] (i) QET-Fc3K-PA48G-Fc3R
- [2057] QET-RGNCAYHKGQIIWCTYH-GGGGSGGAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPGGSGGGSGG-RGNCAYHRGQIIWCTYH-NH2 (서열번호 54)
- [2058] (j) QET-Fc3K-PAS56-Fc3R
- [2059] QET-RGNCAYHKGQIIWCTYH-GGGAAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPGGG-RGNCAYHRGQIIWCTYH-NH2(서열번호 55)
- [2060] (k) QET-Fc3K-PAS60-Fc3R
- [2061] QET-RGNCAYHKGQIIWCTYH-GGAPSSSPSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSG-RGNCAYHRGQIIWCTYH-NH2(서열번호 56)
- [2062] (l) QET-Fc3K-PAS64-Fc3R
- [2063] QET-RGNCAYHKGQIIWCTYH-GGASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPGG-RGNCAYHRGQIIWCTYH-NH2(서열번호 57)
- [2064] (m) QET-Fc3K-PAS68-Fc3R
- [2065] QET-RGNCAYHKGQIIWCTYH-GGAPSSSPSPASPSSPASPSSPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPSSSPSPASPSSPASPSSG-RGNCAYHRGQIIWCTYH-NH2(서열번호 585)
- [2066] (n) QET-Fc3K-PAS80-Fc3R
- [2067] QET-RGNCAYHKGQIIWCTYH-GGAPSSSPSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSPASPSSG-RGNCAYHRGQIIWCTYH-NH2(서열번호 59)
- [2068] (15-3) 친화성 물질의 발현
- [2069] 친화성 물 Corynex (등록상표)를 사용하여 이들 폴리펩타이드 친화성 물질의 발현 검토를 행하였다. Corynex (등록상표)에 의한 발현에서는, CspB 융합법(WO2013/062029), 즉 시그널 펩타이드를 코딩하는 염기 서열과 목적 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 서열 사이의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3잔기 Gln-Glu-Thr (QET)을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 삽입함으로써, 목적 폴리펩타이드의 분비 생산량을 향상시킬 수 있다는 기술을 활용하였다. 또한 CspB 태그의 N말단이 Q이기 때문에, 시그널 서열 절단 후, 1잔기째의 Q가 피로글루타밀화되어 N말단 아미노기를 보호할 수 있다는 이점이 있다. 즉, 상기 A), B) 및 C)의 물에 더하여, 하기 D)의 물을 고려하는 것이 Corynex(등록상표)를 이용한 친화성 폴리펩타이드의 발현에 있어서 유효하다.
- [2070] D) N말단에 QET의 3잔기를 부가하여 Corynex(등록상표)에서의 분비 효율 향상
- [2071] 이하, Corynex(등록상표)에 의한 발현 검토의 실시예를 기재한다.
- [2072] (15-4) QET-Fc3K-PA48G-Fc3R, QET-Fc3K-PAS56-Fc3R, QET-Fc3K-PAS60-Fc3R, QET-Fc3K-PAS64-Fc3R, QET-Fc3K-PAS68-Fc3R, 및 QET-Fc3K-PAS80-Fc3R의 각 분비 발현 플라스미드의 구축
- [2073] 친화성 폴리펩타이드로서, 상기 QET-Fc3K-PA48G-Fc3R, QET-Fc3K-PAS56-Fc3R, QET-Fc3K-PAS60-Fc3R, QET-Fc3K-PAS64-Fc3R, QET-Fc3K-PAS68-Fc3R, 및 QET-Fc3K-PAS80-Fc3R의 6종류의 아미노산 서열을 각각 설계하고, 이들 폴리펩타이드를 코딩하는 염기 서열을 C.glutamicum의 코돈 사용 빈도를 고려하여 설계하였다. 또한, C.glutamicum에 의한 분비 발현을 가능하게 하기 위해, 각각 다음의 발현 카세트를 설계하였다.
- [2074] QET-Fc3K-PA48G-Fc3R은, C.glutamicum ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PA48G-Fc3R의 융합 단백질 (이하, 「CspBss-QET-

Fc3KR-PA48G」라고 표기함)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3KR-PA48G를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 60, 61에 나타낸다.

[2075] CspBss-QET-Fc3KR-PA48G를 코딩하는 염기 서열

[2076] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccggtggcaattgcgccctatcacaaggggtcagatcatttgggtgcacctaccatggtggtggagggttctggtggtgccgccccggctgcaccagcgccagcgccccagcggtctcctgcaccggctgctccagctgcgccagctcctgcagctcccgagcaccggcgctgcagcaccagcgccagcaccggcgctccggcgccctgccccggcggtccggggaggcgccagcggaggacgcggttaactgcgcataccatcgcgcccaattatctggtgcacttatcactaa(서열번호 60)

[2077] CspBss-QET-Fc3KR-PA48G의 아미노산 서열

[2078] MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPFAAQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGGSGGAAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPPGSGGGSGGRGNCAHYHRGQIIWCTYH(서열번호 61)

[2079] QET-Fc3K-PAS56-Fc3R은, C.glutamicum ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PAS56-Fc3R의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Fc3KR-PAS56」이라고 표기함)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3KR-PAS56을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 62, 63에 나타낸다.

[2080] CspBss-QET-Fc3KR-PAS56을 코딩하는 염기 서열

[2081] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccggtggcaattgcgccctatcacaaggggtcagatcatttgggtgcacctaccatggtggtggcgctccagcatccccagccccggcgccacctgcaagccctgctcccgtgctccggcttaccagcgccagcagcacctgcctctcccgctcctgcggcaccagcgagtcctgcgccagccgctccggcatgccccgaccagcggtccggcctccccggccccggcgaggacgcggttaactgcgcataccatcgcgcccaattatctggtgcacttatcactaa(서열번호 62)

[2082] CspBss-QET-Fc3KR-PAS56의 아미노산 서열

[2083] MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPFAAQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGGAAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPASPAPAPGGGRGNCAHYHRGQIIWCTYH(서열번호 63)

[2084] QET-Fc3K-PAS60-Fc3R은, C.glutamicum ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PAS60-Fc3R의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Fc3KR-PAS60」이라고 표기함)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3KR-PAS60을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각, 서열번호 64, 65에 나타낸다.

[2085] CspBss-QET-Fc3KR-PAS60을 코딩하는 염기 서열

[2086] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccggtggcaattgcgccctatcacaaggggtcagatcatttgggtgcacctaccatggtggtgccccatcctctccctcacctcgccaccagagctcccatctccggcgtaccatcctccgcacctcttcccccttctccatcggtccttctgctcccttccccagcttccccagctccgcacctccagcccccttccatcagcgcttctcgccatcaccggcctctccgagctccggaggacgcggttaactgcgcataccatcgcgcccaattatctggtgcacttatcactaa(서열번호 64)

[2087] CspBss-QET-Fc3KR-PAS60의 아미노산 서열

[2088] MFNNRIRTAALAGAIAISTAASGVAIPFAAQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGAPSSPSPAPSSPSPAPSSPSPAPSSPSPAPSSPSPAPSSPSPAPSSPSPSSGGRGNCAHYHRGQIIWCTYH(서열번호 65)

[2089] QET-Fc3K-PAS64-Fc3R은, C.glutamicum ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PAS64-Fc3R의 융합 단백질(이하, 「CspBss-QET-Fc3KR-PAS64」라고 표기함)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3KR-PAS64를 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 66, 67에 나타낸다.

[2090] CspBss-QET-Fc3KR-PAS64를 코딩하는 염기 서열

[2091] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccggtggcaattgcgccctatcacaaggggtcagatcatttgggtgcacctaccatggtggtgctccccctcagctcccgacctgcagtcctagcgcgccagcacctgcatcccccttccgctccggcacctgctctccgtcagcaccggctccagcaagcccatccgccccagctccagcttctccgtccgcaccagcccccgctct

ccttcggcgccagctccggcgtcgccaagcgtccagccccggaggacgcggttaactgcgcataccatcgcgccaaattatctggtgcacttatcactaa
(서열번호 66)

[2092] CspBss-QET-Fc3KR-PAS64의 아미노산 서열

[2093] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAFQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPASPSAPAPAS
PSAPAPASPSAPAPGGRGNCAYHRGQIIWCTYH(서열번호 67)

[2094] QET-Fc3K-PAS68-Fc3R은, *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PAS68-Fc3R의 융합 단백질 (이하, 「CspBss-QET-Fc3KR-PAS68」 이라고 표기한다)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3KR-PAS68을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 68, 69에 나타낸다.

[2095] CspBss-QET-Fc3KR-PAS68을 코딩하는 염기 서열

[2096] atgtttaacaacgctatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgct
ggcaattgcgcctatcacaagggtcagatcatttgggtgcacctaccatggtggtgcaccgagctctccctccccctctgccccgtcttcgccgtcaccagct
tccccatccagtcagctccggcgctgcccctgccccagcaccggtcctgctcctgcgccagctccagcaccagcgctgcaccagcccctgcagcacc
tctctaccatcgccaagtgcgcctcctcccccttccccggttctccagcagcggaggacgcggttaactgcgcataccatcgcgccaaattatctggtgc
acttatcactaa(서열번호 68)

[2097] CspBss-QET-Fc3KR-PAS68의 아미노산 서열

[2098] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAFQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAAP
SSPSAPSSPSAPSSGGRGNCAYHRGQIIWCTYH(서열번호 69)

[2099] QET-Fc3K-PAS80-Fc3R은, *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB의 시그널 펩타이드 30아미노산 잔기, 동주 유래의 CspB 성숙 단백질의 N말단 3아미노산 잔기 QET, 및 Fc3K-PAS80-Fc3R의 융합 단백질 (이하, 「CspBss-QET-Fc3KR-PAS80」 이라고 표기함)로서 분비 발현시켰다. 설계한 CspBss-QET-Fc3KR-PAS80을 코딩하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 각각 서열번호 70, 71에 나타낸다.

[2100] CspBss-QET-Fc3KR-PAS80을 코딩하는 염기 서열

[2101] atgtttaacaacgctatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgct
ggcaattgcgcctatcacaagggtcagatcatttgggtgcacctaccatggtggtgccccgtcctccccatccccatctgccccctcgagcccatccccctgca
tcacctcctcggtccttctcaccctctccatccgcgccatctagcccatctccagcctcccccttcttcgctccttcattccttcgccccctcgccacc
agctcccaagccctggtccccgtctagcgaccgtcgtcgccgtccccatccgcaccgtcatccccgtcaccagctagccctcctccggaggacgcggt
aactgcgcataccatcgcgccaaattatctggtgcacttatcactaa(서열번호 70)

[2102] CspBss-QET-Fc3KR-PAS80의 아미노산 서열

[2103] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAFQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAP
SSPSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSGGRGNCAYHRGQIIWCTYH(서열번호 71)

[2104] CspBss-QET-Fc3KR-PA48G, CspBss-QET-Fc3KR-PAS56, CspBss-QET-Fc3KR-PAS60, CspBss-QET-Fc3KR-PAS64, CspBss-QET-Fc3KR-PAS68, 및 CspBss-QET-Fc3KR-PAS80에 기재된 염기 서열의 상류에 *C.glutamicum* ATCC13869주 유래의 CspB 유전자의 프로모터를 연결하고, 또한 5'-측에 KpnI 사이트, 3'-측에 BamHI 사이트를 부가한, 친화성 폴리펩타이드 6종류의 발현 카세트를 설계하여, 전체 합성하였다. 전체 합성 한 DNA 단편(친화성 폴리펩타이드의 발현 카세트)을, 일본 특허공개공보 특개평9-322774호에 기재된 pPK4의 KpnI-BamHI 부위에 삽입함으로써, 친화성 폴리펩타이드의 분비 발현 플라스미드인 pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G, pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56, pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60, pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64, pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68, 및 pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80을 각각 구축하였다. 삽입 단편의 염기 서열 결정의 결과, 각각 설계한 친화성 폴리펩타이드의 발현 카세트가 구축되어 있는 것을 확인하였다. 염기서열의 결정은 BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)과 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 행하였다.

[2105] (15-5) *C.glutamicum*에서의 친화성 폴리펩타이드의 분비 발현

[2106] 실시예(15-4)에서 구축한 pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G, pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56, pPK4_CspBss-QET-

Fc3KR-PAS60, pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64, pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68, 및 pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80을 사용하여, WO 2016/171224에 기재된 *C. glutamicum* YDK0107주를 형질 전환하고, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64주, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68주, 및 YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80주를 얻었다.

[2107] 마찬가지로, 각 플라스미드를 사용하여 후술하는(참고예 1)에서 구축한 YDK0107 Δ 주를 형질 전환하고, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G주, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56주, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60주, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64주, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68주, 및 YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80주를 얻었다.

[2108] 얻어진 각 형질 전환체를, 25 mg/L의 카나마이신을 포함하는 MMTG 액체 배지에서 각각 30℃, 72시간 배양하였다.

[2109] 배양 종료 후, 각 배양액을 원심분리하여 얻어진 배양 상청 6.5 μ L를 NuPAGE(등록상표) 12% Bis-Tris Gel(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 환원 SDS-PAGE에 제공하고 나서 Quick-CBB(Wako)로 염색을 행하였다. 그 결과, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G주 및 YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G주의 배양 상청 중에 QET-Fc3KR-PA48G라고 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 28, Lanes 3-4), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56주 및 YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56 주의 배양 상청 중에 QET-Fc3KR-PAS56으로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 28, Lanes 5-6), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60주 및 YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60주의 배양 상청 중에 QET-Fc3KR-PAS60으로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 28, Lanes 7-8), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64주 및 YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64주의 배양 상청 중에 QET-Fc3KR-PAS64로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 28, Lanes 9-10), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68주 및 YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68주의 배양 상청 중에 QET-Fc3KR-PAS68로 추정되는 폴리펩타이드 밴드(도 28, Lanes 11-12), YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80주 및 YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80주의 배양 상청 중에 QET-Fc3KR-PAS80으로 추정되는 폴리펩타이드 밴드가 각각 검출되었다(도 28, Lane 13-14).

[2110] YDK0107주를 숙주로서 QET-Fc3KR-PAS56, QET-Fc3KR-PAS60, QET-Fc3KR-PAS64, QET-Fc3KR-PAS68, 및 QET-Fc3KR-PAS80의 폴리펩타이드를 발현시켰을 때는 스미어 형상의 밴드가 검출되고, PAS 링커 중의 Ser 잔기에 O-형 당쇄 수식이 발생하고 있는 것이 시사되었다(도 28, Lanes 5, 7, 9, 11, 13).

[2111] 한편으로 YDK0107 Δ 주를 숙주로서 이들 폴리펩타이드를 발현시켰을 때는 샤프한 밴드가 검출되었기 때문에, O-형 당쇄 수식이 해소된 것이 시사되었다(도 28, Lanes 6, 8, 10, 12, 14).

[2112] (참고예 1) O-mannosyltransferase 유전자 pmt1을 결손시킨 *Corynebacterium glutamicum*의 구축

[2113] (1) pmt1 유전자 결손용 벡터 pBS5T Δ 의 구축

[2114] *C. glutamicum*을 숙주로서 발현한 분비 단백질에서 O-형 당쇄 수식이 발생하는 것, 및, Protein O-mannosyltransferase PMT1의 결손에 의해 분비 단백질로의 O-형 당쇄 수식능을 결실(缺失)할 수 있는 것이 알려져 있다(Martina Mahne et al., The *Corynebacterium glutamicum* gene pmt encoding a glycosyltransferase related to eukaryotic protein-O-mannosyltransferases is essential for glycosylation of the resuscitation promoting factor (Rpf2) and other secreted proteins. FEMS Microbiol Lett. 2006 Jun; 259(2): 226-33.).

[2115] 또한, *C. glutamicum* YDK0107주를 숙주로서 Proline/Alanine/Serine(PAS) biopolymer를 분비 발현시켰을 때, PAS 서열 중의 Ser 잔기에 O-형 당쇄 수식이 발생하는 것, 및, PMT1유전자를 결손시킨 YDK0107 Δ pmt1주를 숙주로 함으로써 O-형 당쇄 수식을 해소할 수 있는 것이 알려져 있다(L. Friedrichl et al., Efficient secretory production of proline/alanine/serine (PAS) biopolymers in *Corynebacterium glutamicum* yielding a monodisperse biological alternative to polyethylene glycol (PEG). Microb Cell Fact. 2022 Oct 28; 21(1): 227).

[2116] *C. glutamicum* ATCC13869주의 게놈 서열 및 Protein O-mannosyltransferase PMT1을 코딩하는 pmt1 유전자의 염기 서열은 이미 결정되어 있다(GenBank Accession No. AP017557, NCBI locus_tag CGBL_0109730). *C. glutamicum* ATCC 13869주의 pmt1 유전자의 염기 서열, 및 동 유전자가 코딩하는 PMT1의 아미노산 서열을 각각

서열번호 72 및 73에 나타낸다.

[2117]

서열번호 72

[2118]

gtgagccaagccctacctgttcgtgaccagggcgggaccaggggattttcgctggtagctctcccggccgaccgccaagtccaagtgaccgcctggat
acctataacctggcgcatcatcgcggtgtttgcttttagtcacgcgttttacaggtttgagcagtgcaaccgctcaggcacccagttttgatgaaaaacac
tagctcccacaagcctgggacatggtccgctcctggatcaaccccatcacggcgcgcatgaatccaacccggatacggactcgtcgttcacccaccgttg
gccaacaacttgaagcactcggtagtggtcttcggatcacccccctcgctggcgcatcatggtcgccatttcggaaactcaccattttcgccatc
atggcaatcgacggcgctcagcggatccaccattgtgactttcatcgccggaattctcgcgcttgccgacggcgctcctcctcgtctcatcacgcttcggc
atgctggacatcttccttgtttcttcatcaccgcagcagcatgggcattgatccgagatcaccaacaaatgcaccaacgcctcaacgatttactcctcacc
aacggccaatcaccaagactttggccccgattcggtctccgatggtggcgtttcaccacaggtgtattccttggctcgcgctctccgtcaaatggtcc
ggactgtactacatcgcatcttcggcctgaccagcgtgttcctagacttgtggctgcgcaaacgctacggcgtccgacgctacgtcacggcacccctaaaa
aatgacgtcatcccagcgtcggtccttggtagcatccttgcctgctttatctcgagctggcgagcctggttcgcctccgaacacctcgtctaccgc
cacgcaaacacagcggcaccatcacagaagactccatcctgcagctcttcctgaatcaattgcgggctggatccactatcacatcagcgtcctggaattc
cacggctcactgaccacatcctcaggtcacagccacccctgggattccaagcgtgggcctggttgtctccggtcgacccatcctctacttctcctccacc
gacatctcctgcgacgttggcggcacctgccgacgcatgatctacctcttcggcacgcccgccatttgggtggctgacagtcacagtcattctgtggcgctg
tggctttcttcgcagctcggagtcgtggctatattgtcccactagtggccttcgctgcaggatttttgcggtggcttgacagcatagaccgccaatgtac
ttcttctacgccaccgcatgttgccattcaccatcatcatgttggcactcgctgcggtgaactgtggggccgtggaaaaatgacccccactggcttaacc
cgcggtatcaatggcagtggtcacctacatttcctcgtggtgatgatgtttctcgcgcttttcgccactgttttacggatttgtcatcccagattatgtctac
gaatccttgatgtggttcccaagctggcgctaa

[2119]

서열번호 73

[2120]

MSQALPVRDQGRDQGFAGTLPPAPPKFKWTRLDTYTWAI IAVFALVTRFTGLSSATASGTPVFDEKHYVPQAWDMVRSWINPITGGIESNPGYGLVHHPPL
AKQLEALGEWVFGYTPLGWRIMVAIFGTLTIFA IMAIARRLSGSTIVTFIAGILALADGVLLVSSRFGMLDIFLVFFITAAAWALIRDHQQMHQRLNLLLLT
NGQITKDFGPRFGRFWRFTTGVLGLALS VKWSGLYYIAFFGLT SVFLDLWLKRKYGVRRYVTGLKNDVIPALGSLVIIPALLYIWSRAWFASETSVYR
HAKTDGTITEDSILQLFPESIAGWIHYSVLEFHGSLTSSGHSHPWDSKPWAWLVSGRPILYFSSTDISC DVGGTCRRMIYLFGTPIIWWLTPVILWAL
WSFFARRSRGYIVPLVAFAAGFLPWLAAYDRQMYFFYATALVPFTIIMLALACGELWGRGKMTPTGLTRGSMVAVTYISLVMMFLAFSPLFYGFVIPDYVY
ESLMWFPSWR

[2121]

PurElute™ Genomic DNA Kit(EdgeBio)를 사용하여 조제한 *C.glutamicum* ATCC13869주의 염색체 DNA를 주형(鑄型)으로 하고, 서열번호 74와 서열번호 75의 프라이머를 사용하여 pmt1 유전자의 5'측 상류 약 1kbp를, 서열번호 76과 서열번호 77의 프라이머를 사용하여 pmt1 유전자의 3'측 하류 약 1kbp의 영역을, 각각 PCR법에 의해 증폭하였다. 다음으로, 증폭한 양 DNA 단편을 주형에, 서열번호 74와 서열번호 77에 나타내는 DNA를 프라이머로서 사용한 PCR법에 의해 양 DNA 단편이 융합한 약 2kbp의 DNA 단편을 얻었다. PCR에는 Pyrobest(등록상표) DNA polymerase(Takara Bio)를 사용하고, 반응 조건은 공급 업체의 권장 프로토콜에 따랐다. 이 DNA 단편을 WO2006/057450에 기재된 pBS5T의 SmaI 부위에 삽입함으로써, pmt1 유전자 결손을 위한 벡터 pBS5TΔ을 얻었다. 라이게이션 반응에는 DNA Ligation Kit <Migty Mix> (Takara Bio)를 사용하고, 반응 조건은 업자가 추천하는 프로토콜에 따랐다.

[2122]

pmt1 유전자 결손용 프라이머 서열

[2123]

서열번호 74

[2124]

gtttcgtacctaaaccgacccgaacc

[2125]

서열번호 75

[2126]

tcggttgattgtaggccttggcg

[2127]

서열번호 76

[2128]

gccaaggtctacaatcaaccgatggccgaaccaagtaccaatgc

[2129]

서열번호 77

[2130]

aagctccggcattgattccgttacc

[2131]

(2) *C.glutamicum* YDK0107주의 pmt1 유전자 결핍주의 구축

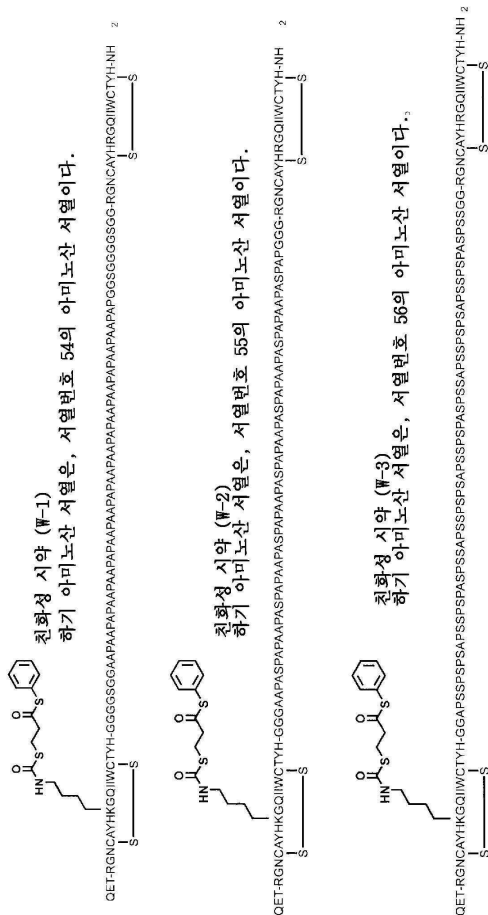
[2132] (1)에서 구축한 pBS5TΔ에서, WO2016/171224에 기재된 C.glutamicum YDK0107 주를 형질 전환하였다. C.glutamicum YDK0107주는, C.glutamicum YDK010주를 친주(親株)로서 얻어진, phoS 유전자에 W302C 변이가 도입된 자연 변이주이다(WO2016/171224). C.glutamicum YDK010주는, C.glutamicum AJ12036(FERM BP-734)의 세포 표층 단백질 CspB의 결손주이다(WO2002/081694). 얻어진 형질 전환체로부터 WO2006/057450에 기재된 방법에 따라 균주를 선택하여 pmt1 유전자가 결핍된 YDK0107Δ주를 얻었다.

[2133] 실시예 16

[2134] (16-1) 친화성 시약의 합성

[2135] 실시예 3에 따라, 실시예 15에서 합성한 펩타이드(서열번호 54 내지 59)를 아미드화함으로써 친화성 물질(W-1,2,3,4,5,6)을 조제하였다.

[2136] [호]-115]



[2137]

표 6

	DAR 피크	관찰된 질량(Da)	피크 면적	%면적
W-3	0	148224	2.73E+04	4.6
	1	158484	5.67E+05	95.4
W-4	1	158506	8.65E+05	90.98
	2	168788	8.57E+04	9.02
W-5	1	158957	5.29E+05	65.35
	2	169690	2.81E+05	34.65

그 결과, 친화성 시약 (W-3)을 반응시킨 경우, 친화성 시약이 1분자 결합한 친화성 시약이 1분자 결합한 트라스투주맵의 비율이 약 95%의 선택성으로 얻어지고 있는 것을 확인하였다.

친화성 시약 (W-4)를 반응시킨 경우, 친화성 시약이 1분자 결합한 친화성 시약이 1분자 결합한 트라스투주맵의 비율이 약 91%의 선택성으로 얻어지는 것을 확인하였다.

친화성 시약 (W-5)를 반응시킨 경우, 친화성 시약이 1분자 결합한 친화성 시약이 1분자 결합한 트라스투주맵의 비율이 약 65%의 선택성으로 얻어지는 것을 확인하였다.

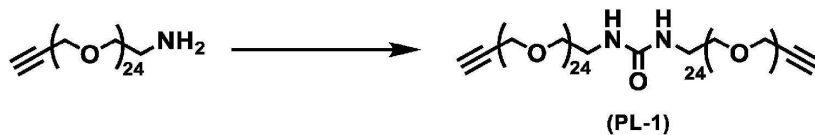
(16-4) 티올기를 1분자 갖는 트라스투주맵의 합성

실시예(4-3)에 따라, 실시예(16-3)에서 합성한 1분자의 친화성 시약이 결합한 항체를 사용함으로써, 티올기 도입 항체를 얻었다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 티올기가 1분자 도입되어 있는 것을 확인하였다.

실시예 17 친화성 시약의 합성

(17-1) 화합물(PL-1)의 합성

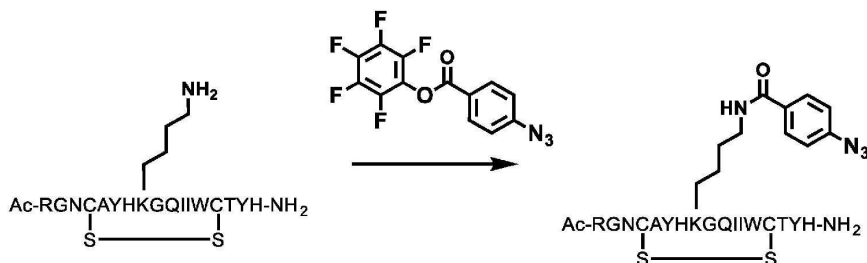
[화117]



시판의 Propargyl-PEG24-amine(BroadPharma사, 51.7mg)의 DMF 용액(1mL)에 1,1'-Carbodiimidazole(3.3mg)과 트리에틸아민(8.5 μ L)을 첨가하여, 실온에서 3시간 교반하였다. 반응 종료 후, 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고, 감압 하에 농축함으로써 아세트니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 실시하여, 상기 수식 시약 (PL-1)을 얻었다(34.7 mg).

(17-2) 화합물(PL-2)의 합성

[화118]



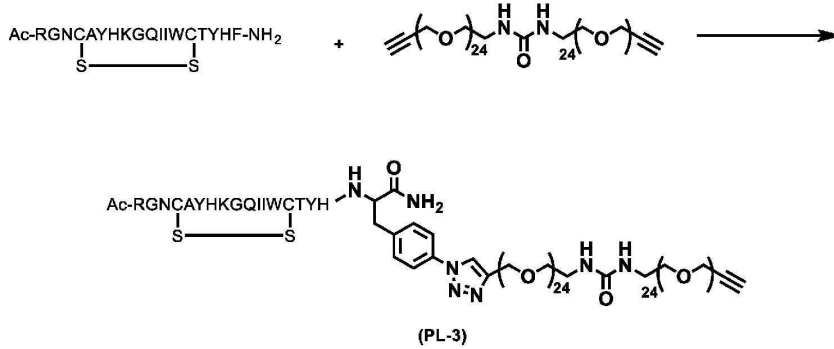
상기 아미노산 서열은 모두, 서열번호 38의 아미노산 서열이다.

기보(WO2019/240287A1)에 기재된 Ac-RGNCAYHKGQIIWCTYH-NH2(서열번호 38, 51.7mg, 단, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은, 각각 분자 내에서 디설파이드 결합하고 있다)를 디메틸포름(1mL)에 용해하고, 이미 알려진 2, 3, 4, 5, 6-Pentafluorophenyl 4-azidobenzoate(40.7mg)와 트리에틸아민(17.2 μ L)을 첨가하고, 실온에서 1시간

교반하였다. 반응 종료 후, 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고, 감압 하에 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 실시하여, 상기 수식 시약 (PL-2)를 얻었다(37.8 mg).

[2160] (17-3) 화합물(PL-3)의 합성

[2161] [화119]

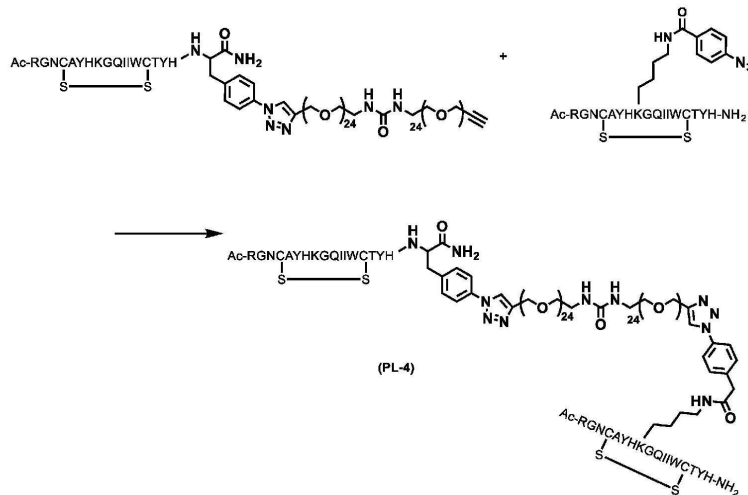


[2162] 상단의 아미노산 서열은, 서열번호 79의 아미노산 서열이다.
 [2163] 하단의 아미노산 서열은, 서열번호 38의 아미노산 서열이다.

[2164] 기보(WO2019/240287A1)에 기재된 수법에 준거하여 합성한 Ac-RGNCA YHKGQIIWCTYH-NH₂(서열번호 79, 6.7mg, 단, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은, 각각 분자 내에서 디설파이드 결합하고 있고, F는 아지드화되어 있다)와 (17-1)에서 합성한 화합물(PL-1, 10mg)을 물(0.3mL)에 용해하고, 황산구리 5수화물(3.0 μmol)과 L(+)-아스코르빈산나트륨(7.4 μmol), Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine(3.0 μmol)을 첨가하고, 실온에서 20분간 교반하였다. 반응 종료 후, 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고, 감압 하에 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 수식 시약 (PL-3)을 얻었다 (1.5mg).

[2166] (17-4) 화합물(PL-4)의 합성

[2167] [화120]

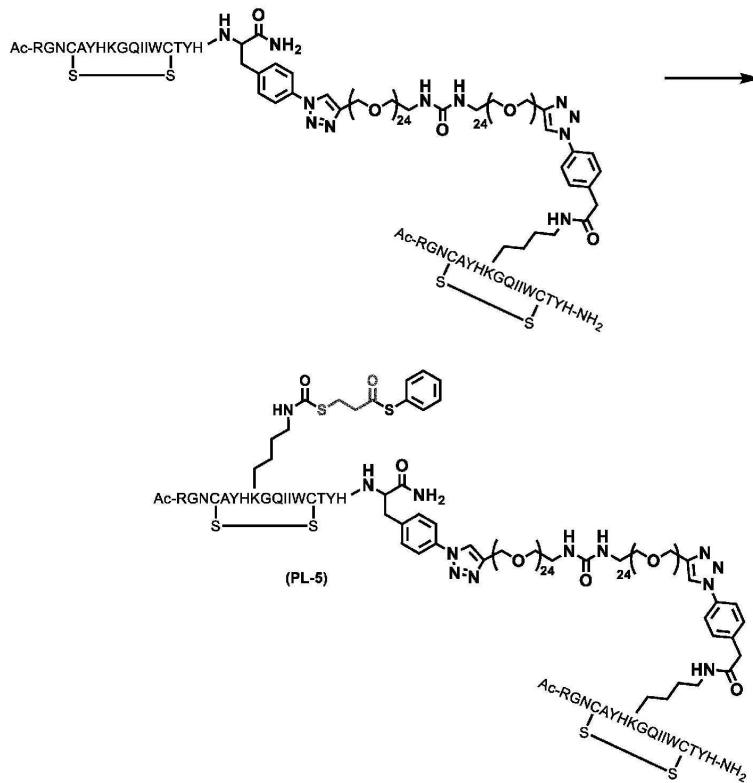


[2168] 상기 아미노산 서열은 모두, 서열번호 38의 아미노산 서열이다.
 [2169]

[2170] (17-3)에서 합성한 PL-3(1.5mg)과 (17-2)에서 합성한 PL-2(1.1mg)를 물(1.0mL)에 용해하고, 황산구리5수화물 (0.33 μmol)과 L(+)-아스코르빈산나트륨(0.83 μmol), Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine(0.33 μmol)을 첨가하고, 실온에서 20분간 교반하였다. 반응 종료 후, 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함되는 프랙션을 회수하고, 감압 하에 농축함으로써 아세토 니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 수식 시약 (PL-4)를 얻었다(2.0mg).

[2171] (17-5) 친화성 물질(PL-5)의 합성

[2172] [화121]



[2173]

[2174] 상기 아미노산 서열은 모두, 서열번호 38의 아미노산 서열이다.

[2175] 기보(WO2019/0240287)에 따라, (17-4)에서 조제한 PL-4를 아미드화함으로써 친화성 시약 (PL-5)를 조제하였다.

[2176] MS(ESI) $m/z: z=17$ 1174[M+6H]⁶⁺

[2177] 실시예 18 친화성 시약 (PL-5)를 이용한 트라스투주맙의 수식

[2178] (18-1) 친화성 시약 (PL-5)를 이용한 트라스투주맙의 수식

[2179] 실시예(4-1)에 따라, 항인간 HER2 모노클로날 항체 트라스투주맙(중외제약)의 아세트산 완충액(50mM의 Sodium acetate, pH 6.5) 용액에, 실시예(17-5)에서 합성한 친화성 시약 (PL-5)의 DMF 용액(항체에 대해 5등량)을 첨가하여, 1시간 진탕하였다. 반응 용액을 Nap25(Cytiva사 제조)를 사용하여 정제함으로써 친화성 시약이 1분자 결합한 트라스투주맙을 취득하였다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, ESI-TOFMS 분석을 행하여, 트라스투주맙에 친화성 시약이 1분자 결합한 것을 확인하였다.

[2180] (18-2) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 DAR calculator에 의한 펩타이드/항체 결합비의 확인

[2181] 실시예(18-1)에서 해석한 MS 데이터에 대해, DAR calculator(Agilent사 소프트)에 의해 펩타이드/항체 결합비의 확인을 행한 결과를, 표 7에 나타낸다.

표 7

DAR 피크	관찰된 질량 (Da)	피크 면적	%면적
1	155271	3.52E+05	66.8
2	162314	1.75E+05	33.2

[2182]

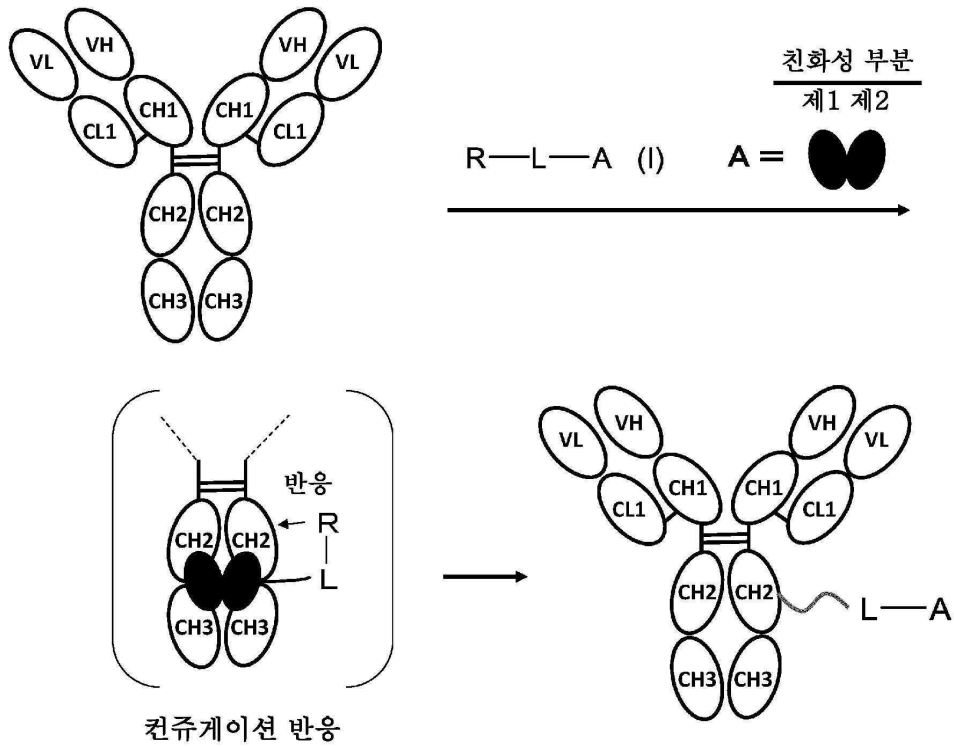
[2183] 그 결과, 친화성 시약 (PL-5)를 반응시킨 경우, 친화성 시약이 1분자 결합한 친화성 시약이 1분자 결합한 트라스투주맙의 비율이 약 67%의 선택성으로 얻어지는 것이 확인되었다.

[2184] (18-3) 티올기를 1분자 갖는 트라스투주맙의 합성

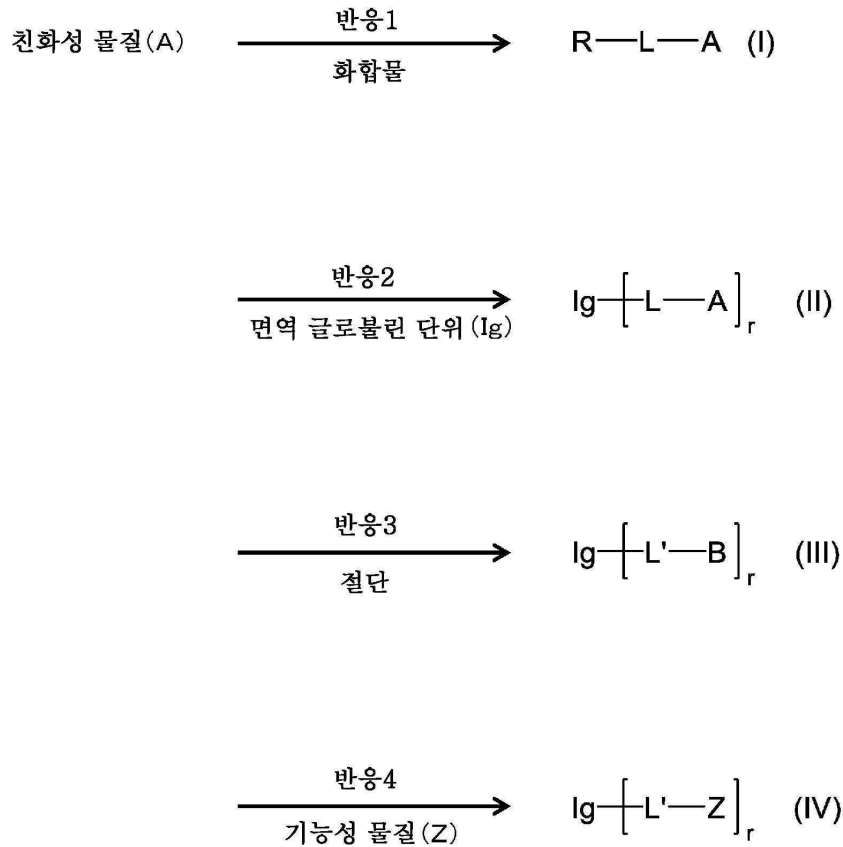
[2185] 실시예(4-3)에 따라, 실시예(18-1)에서 합성한 1분자의 친화성 시약이 결합한 항체를 사용함으로써, 티올기 도입 항체를 얻었다. 기보(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)에 따라, HIC-HPLC 분석을 행하여, 티올기가 1분자 도입되어 있는 것을 확인하였다.

도면

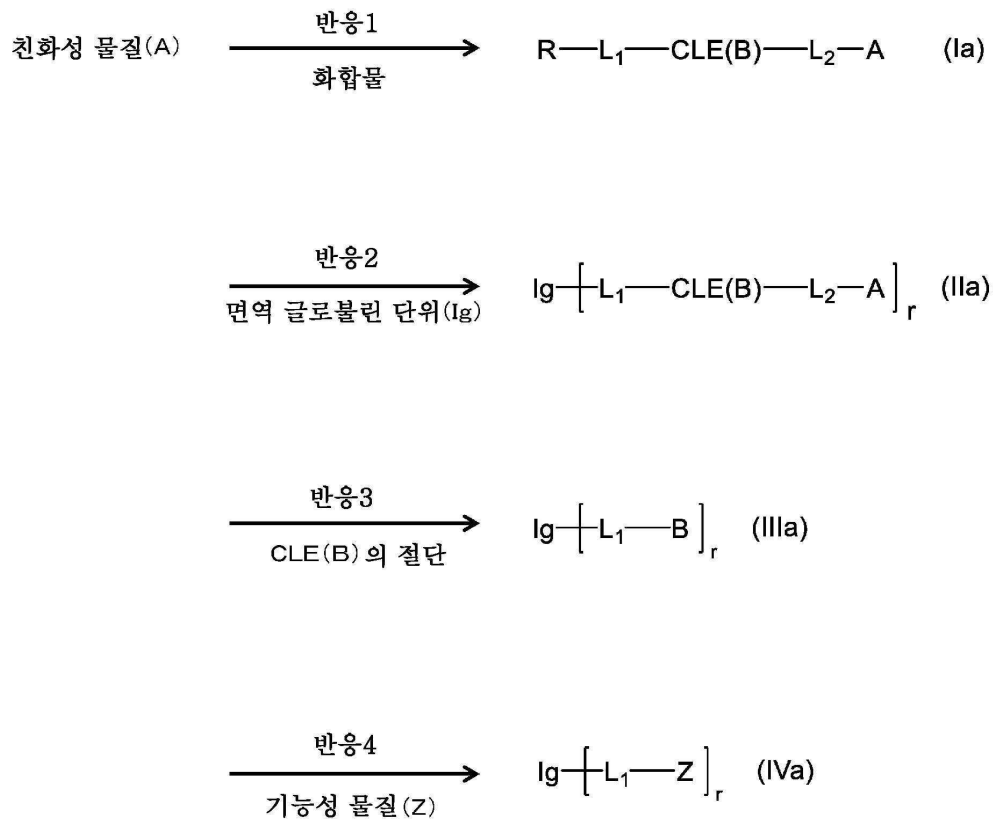
도면1



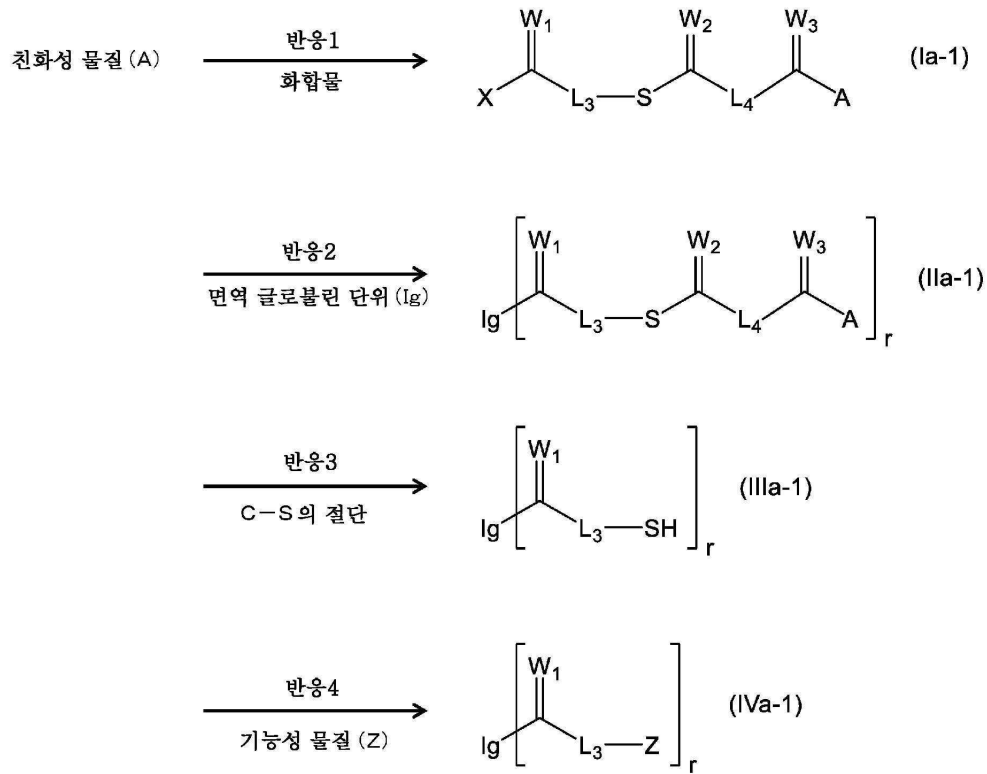
도면2



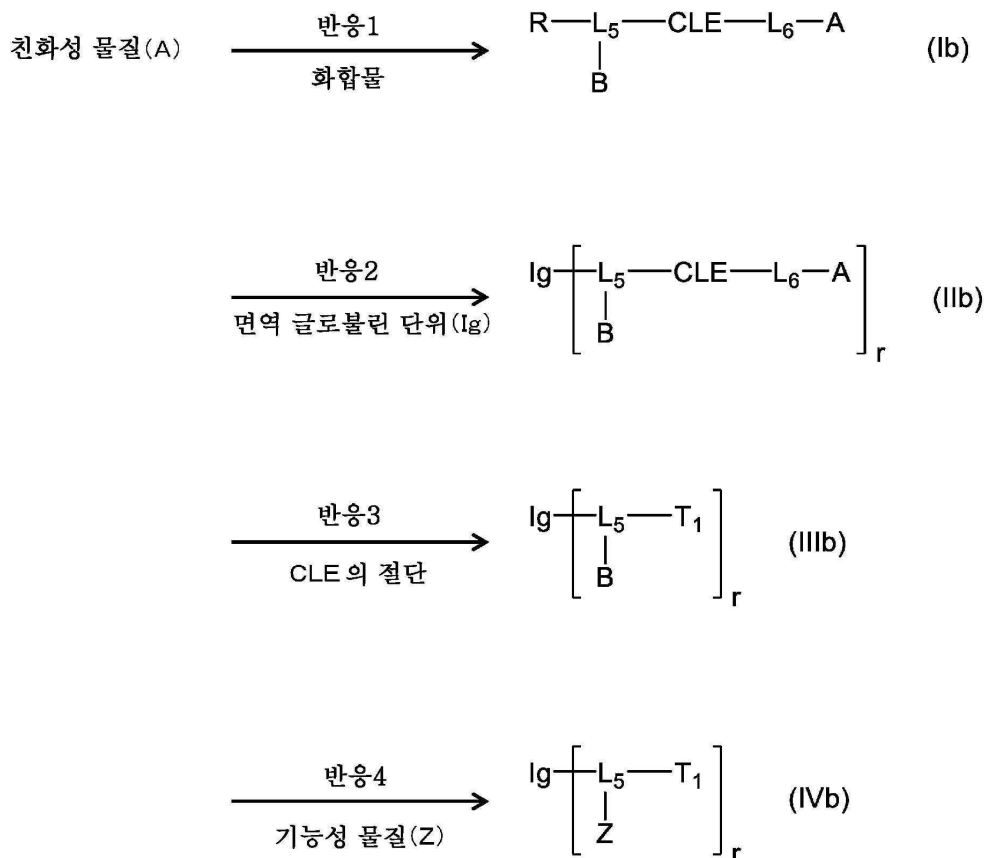
도면3



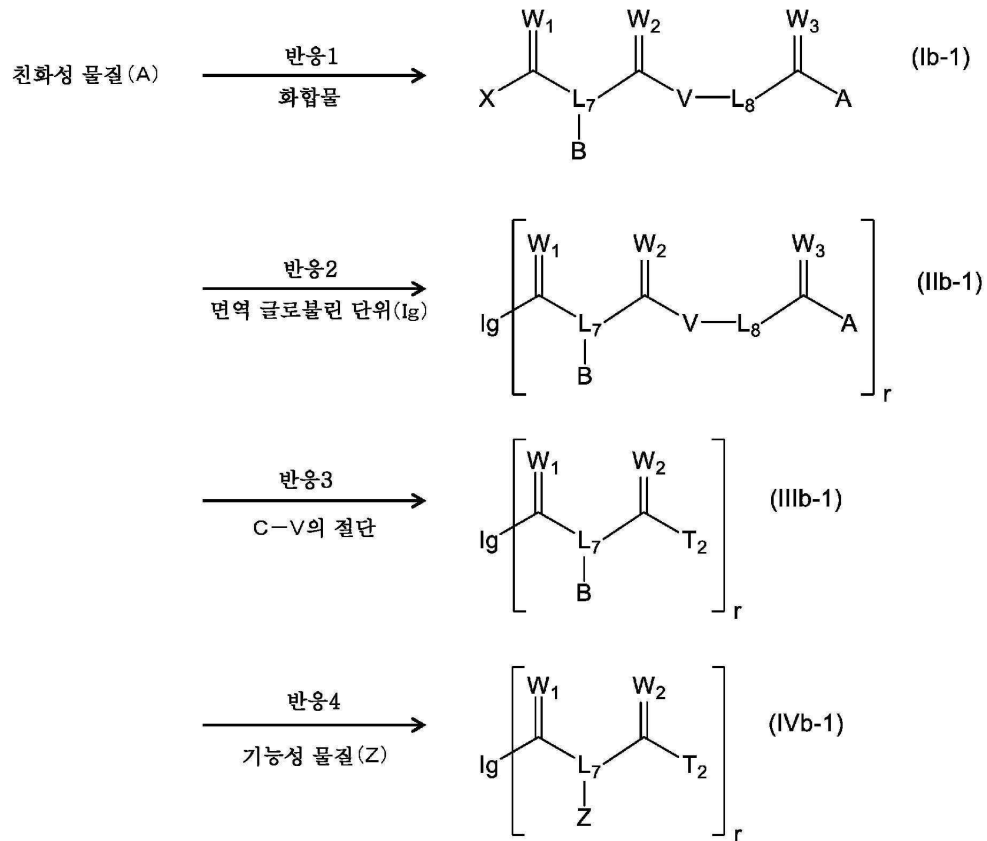
도면4



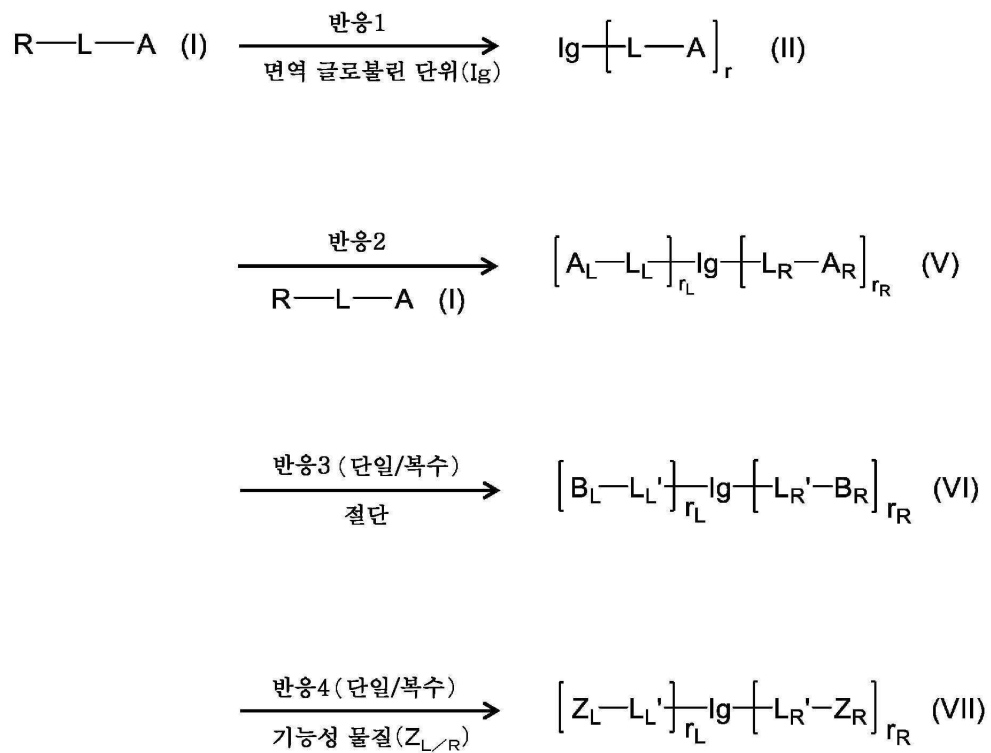
도면5



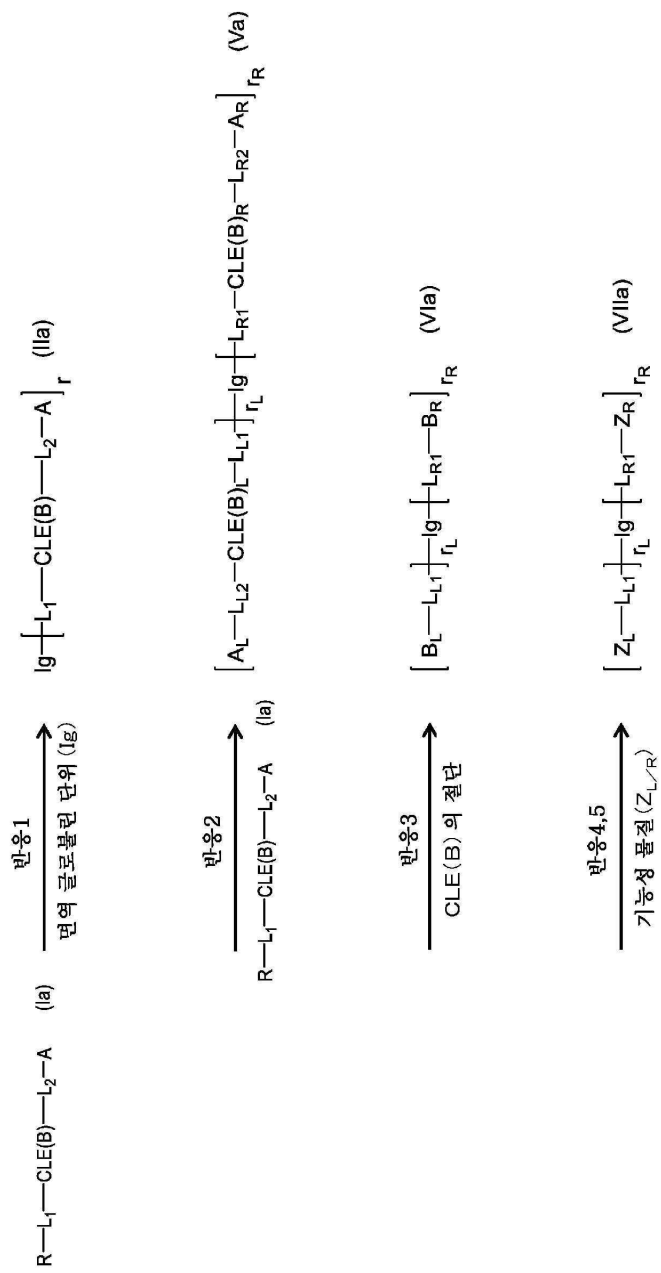
도면6



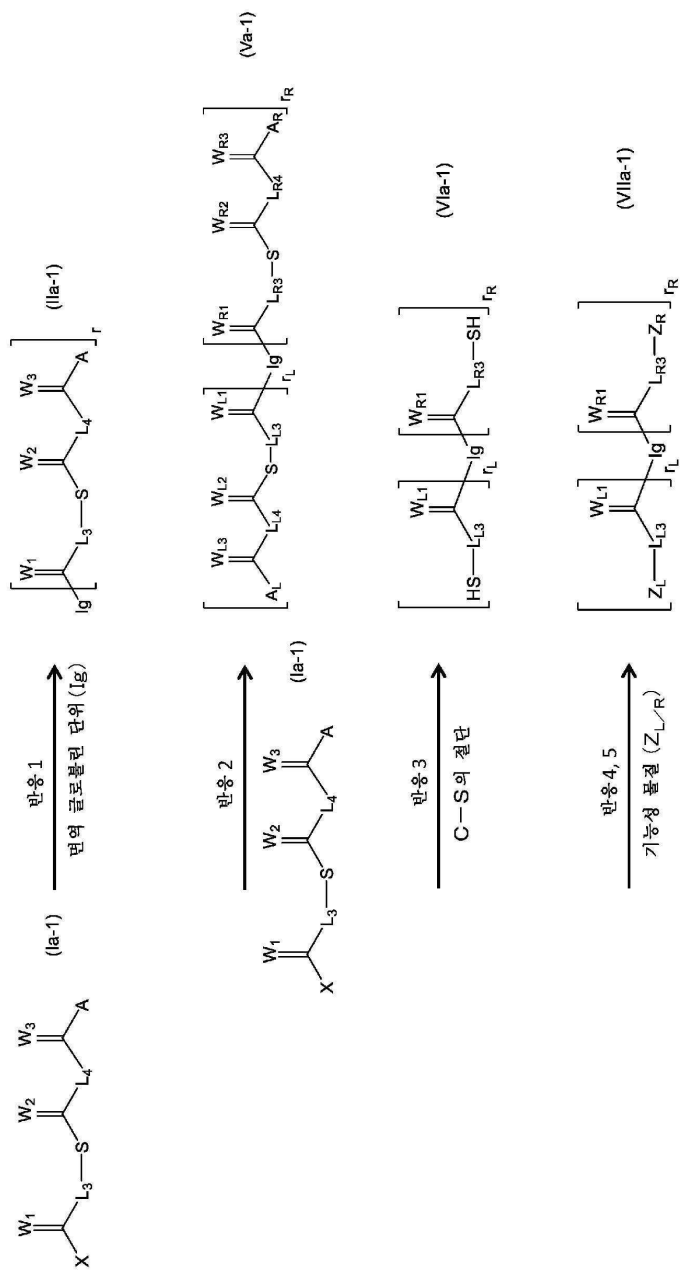
도면7



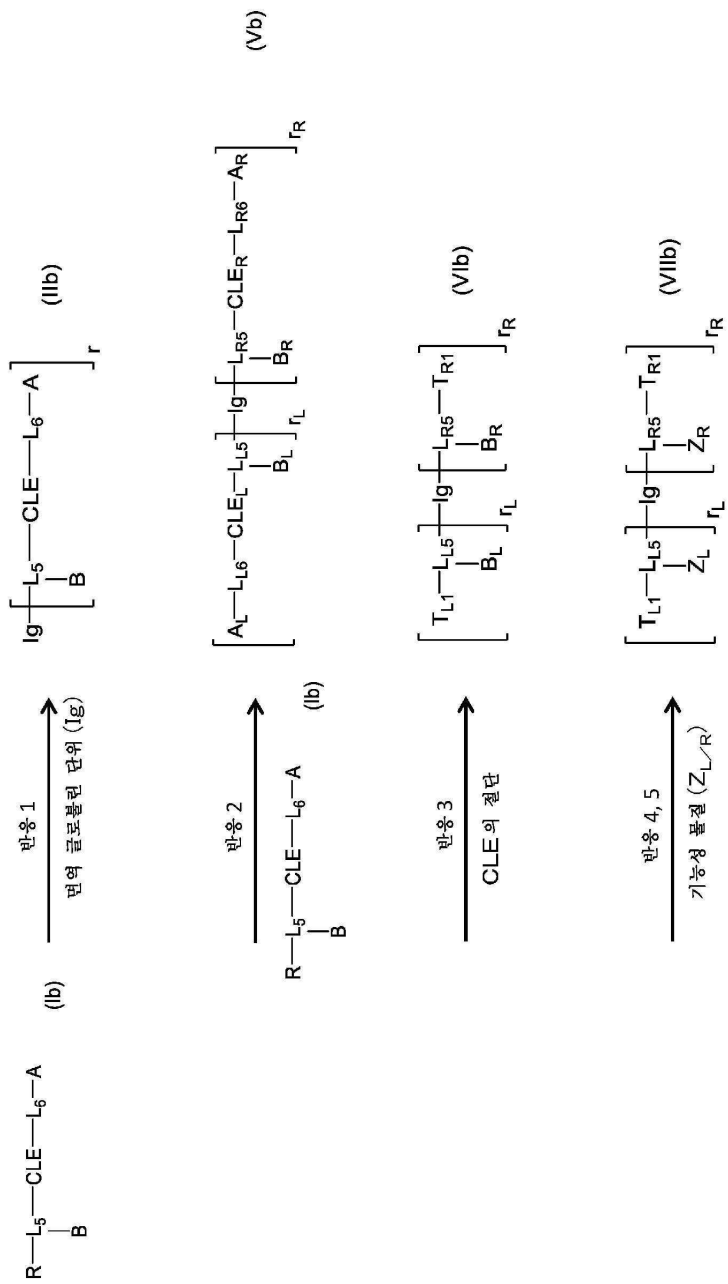
도면8



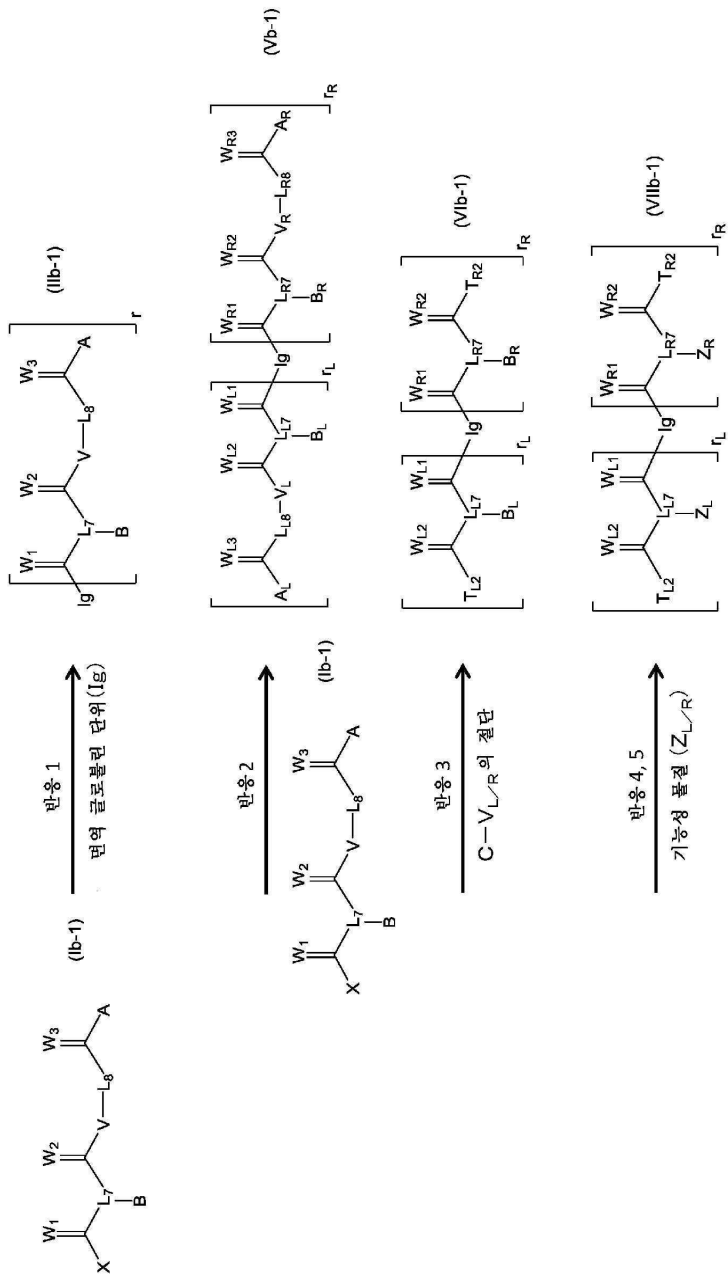
도면9



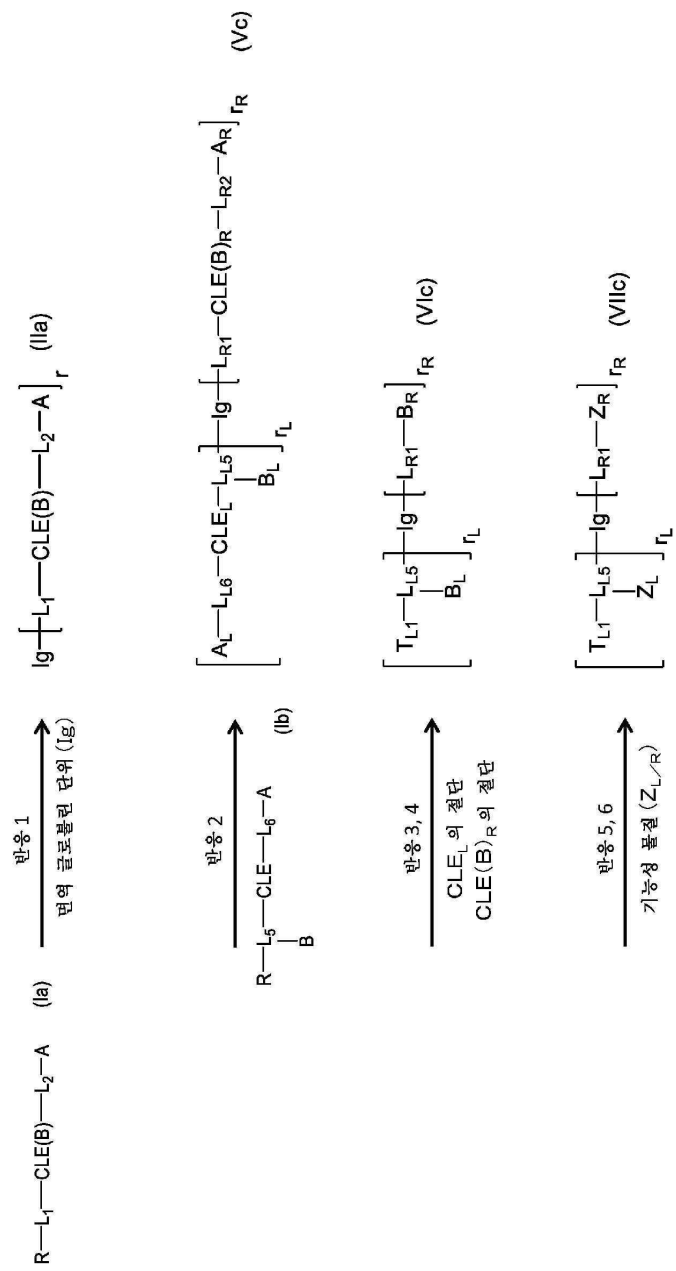
도면10



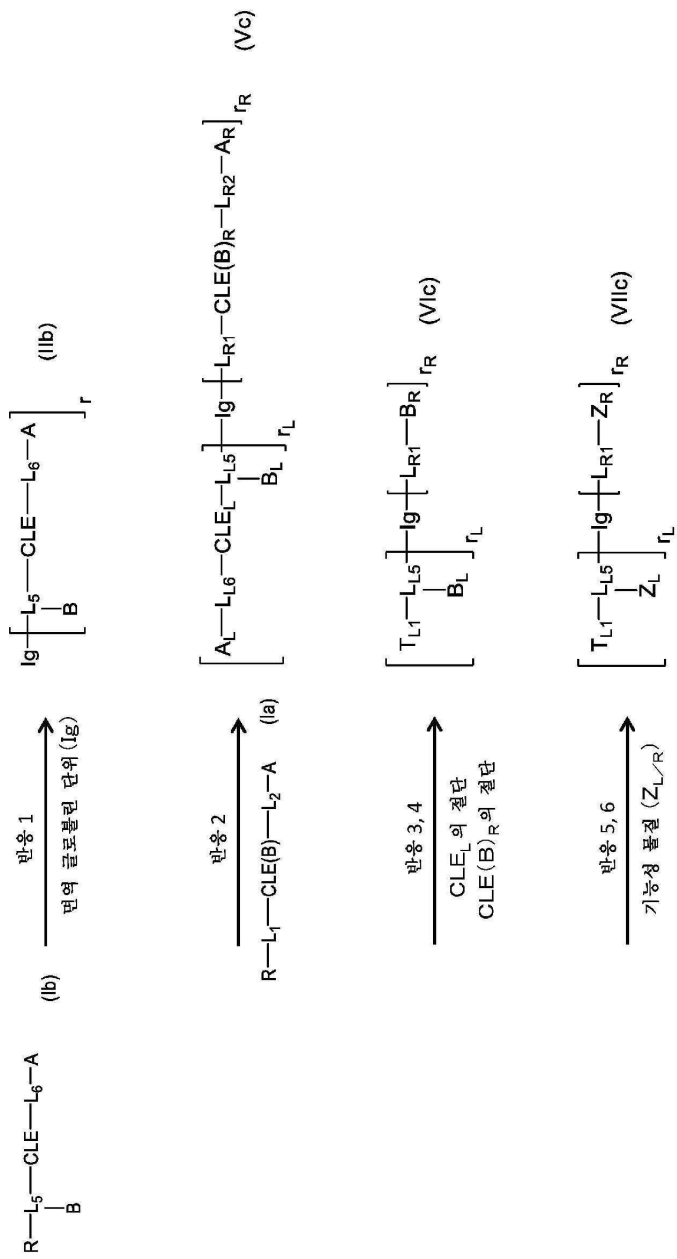
도면11



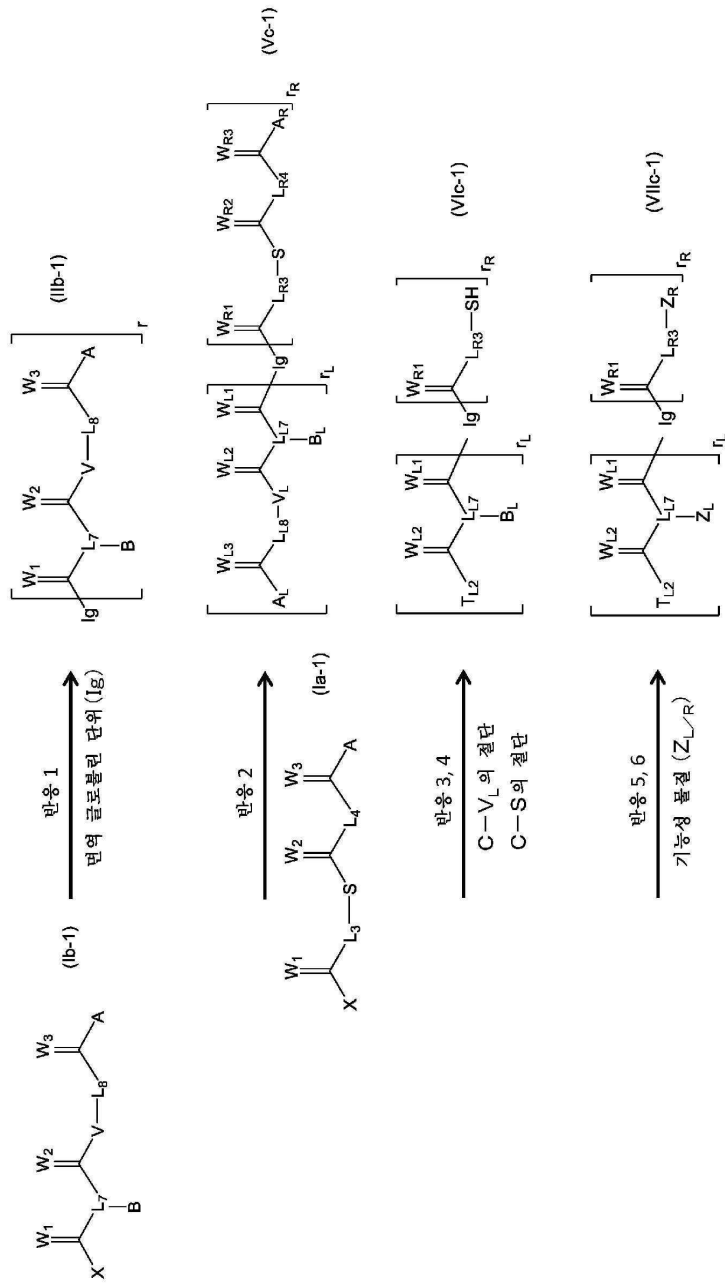
도면12



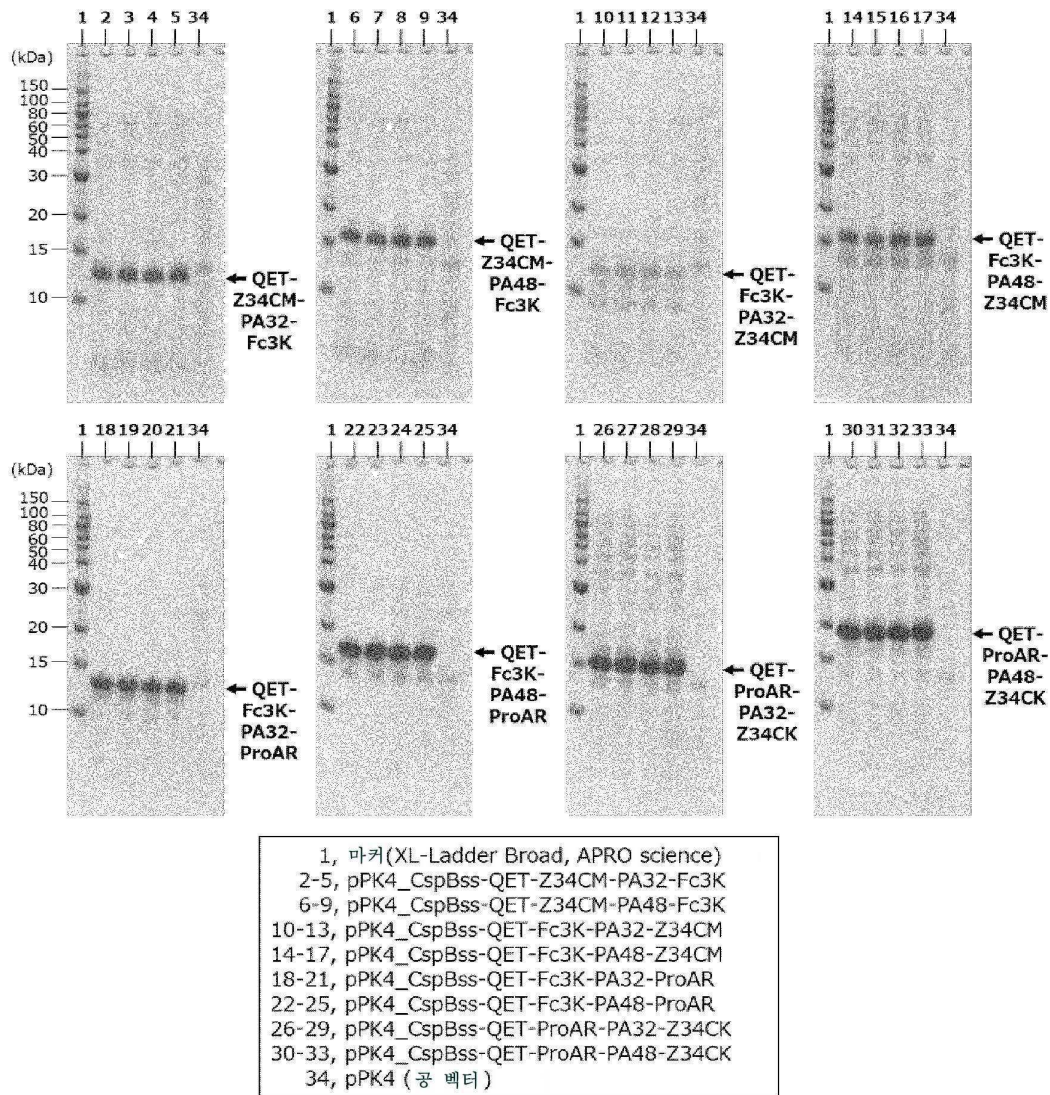
도면14



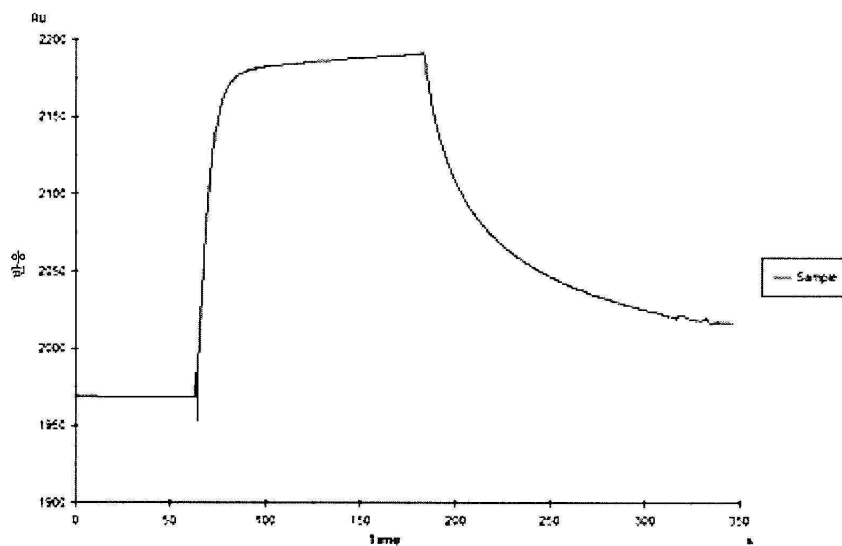
도면15



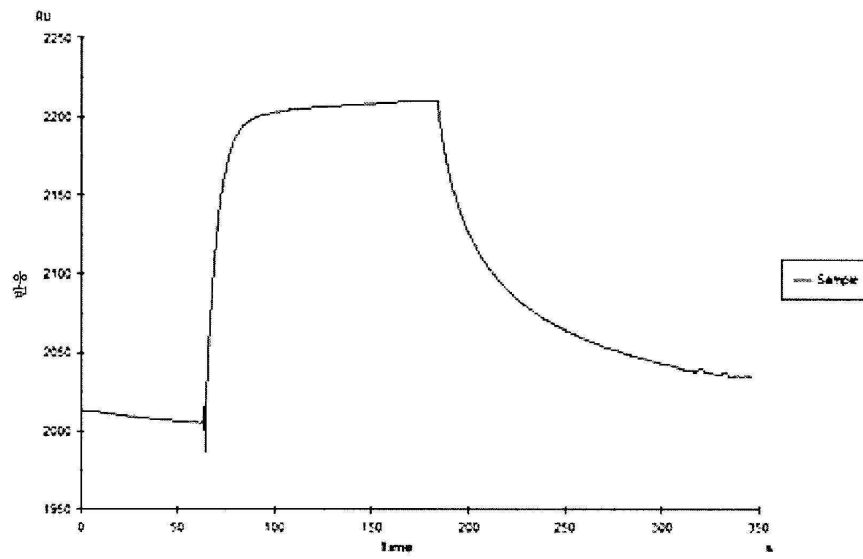
도면16



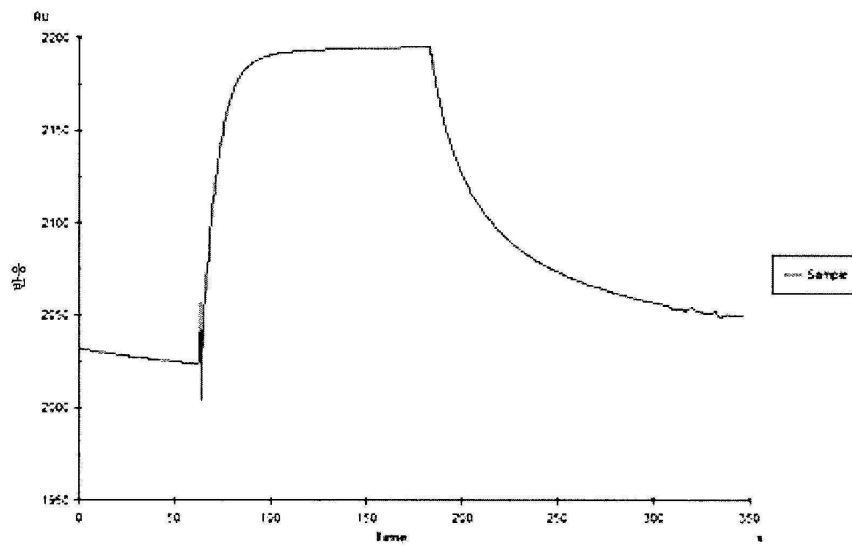
도면17a



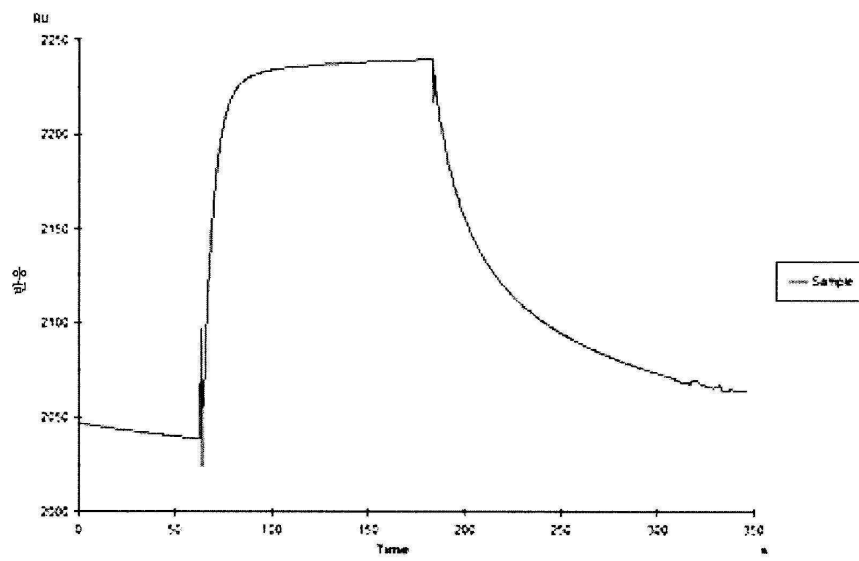
도면17b



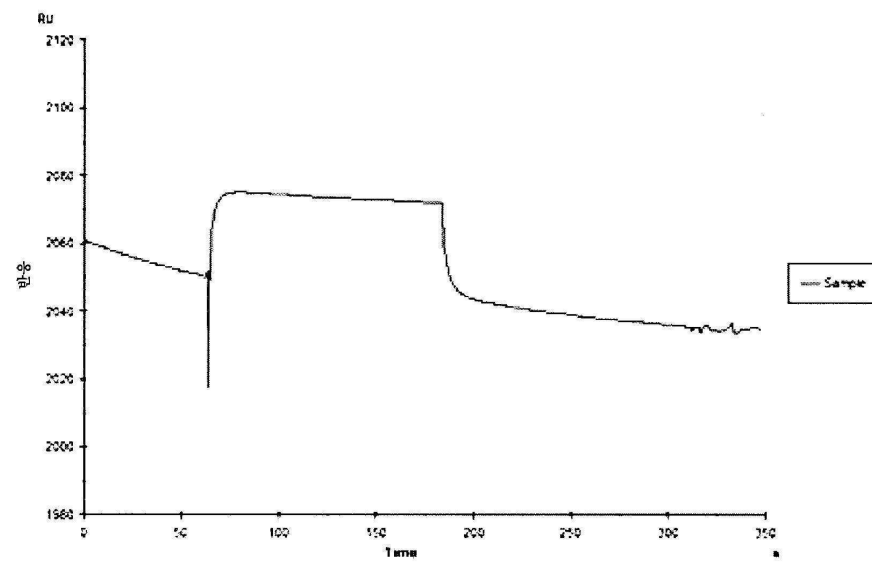
도면17c



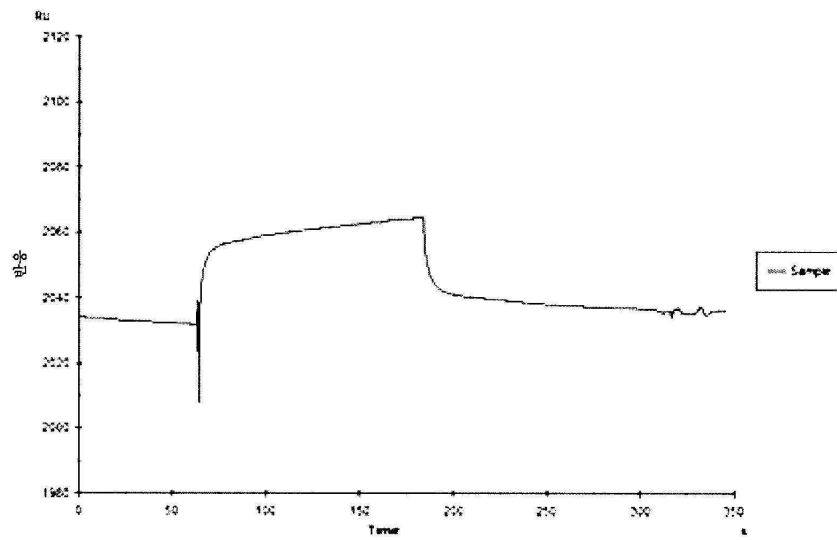
도면17d



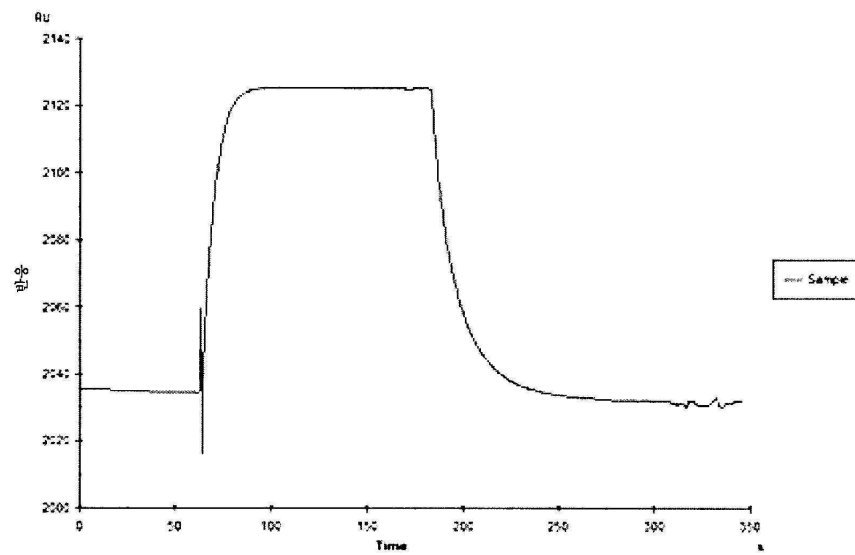
도면17e



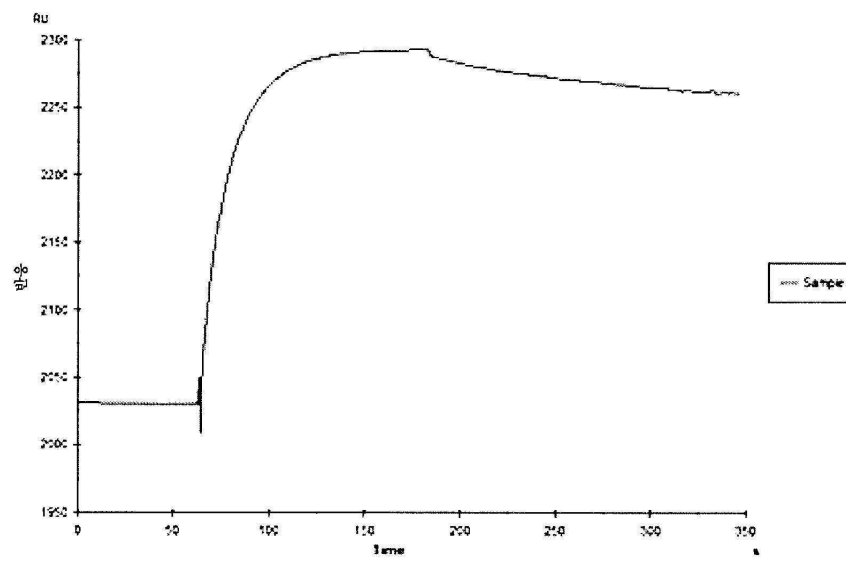
도면17f



도면17g

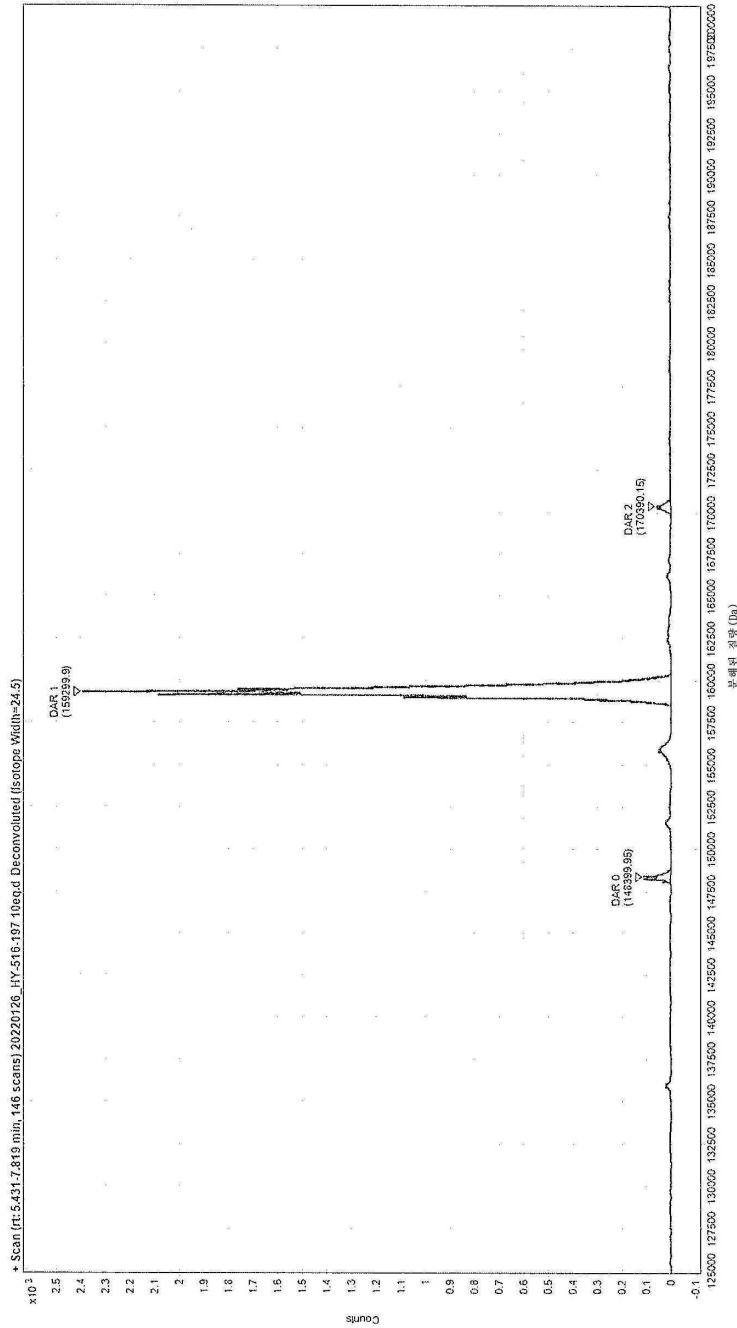


도면17h



도면18

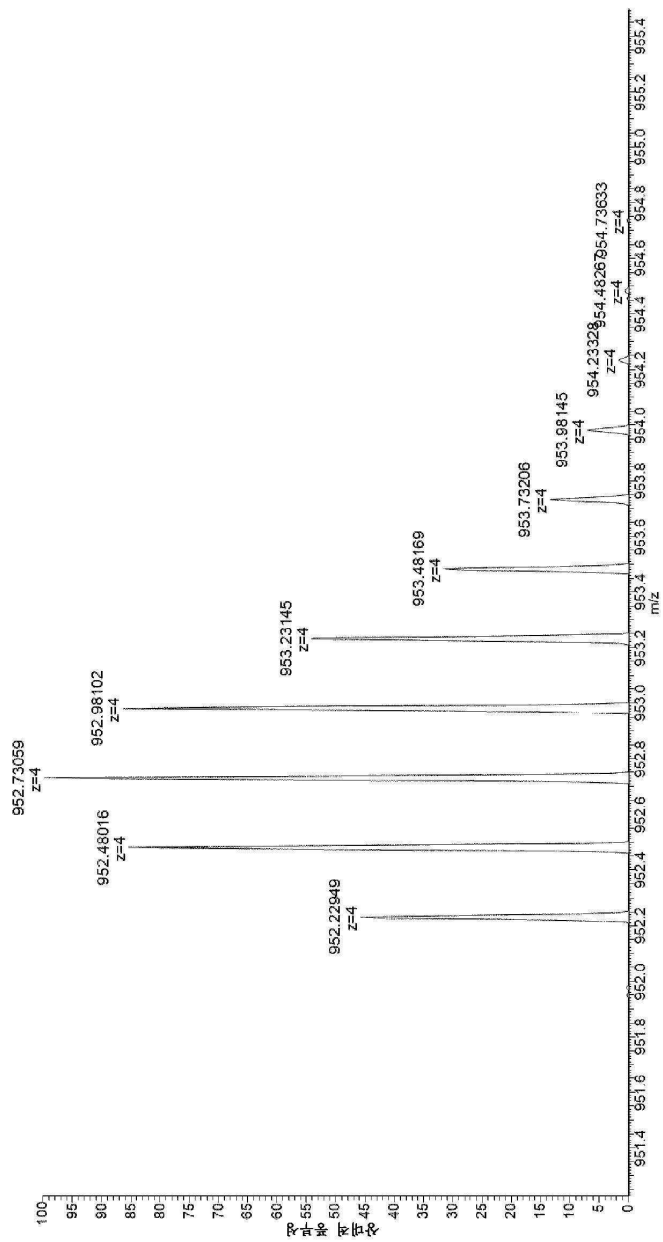
분해된 스펙트럼



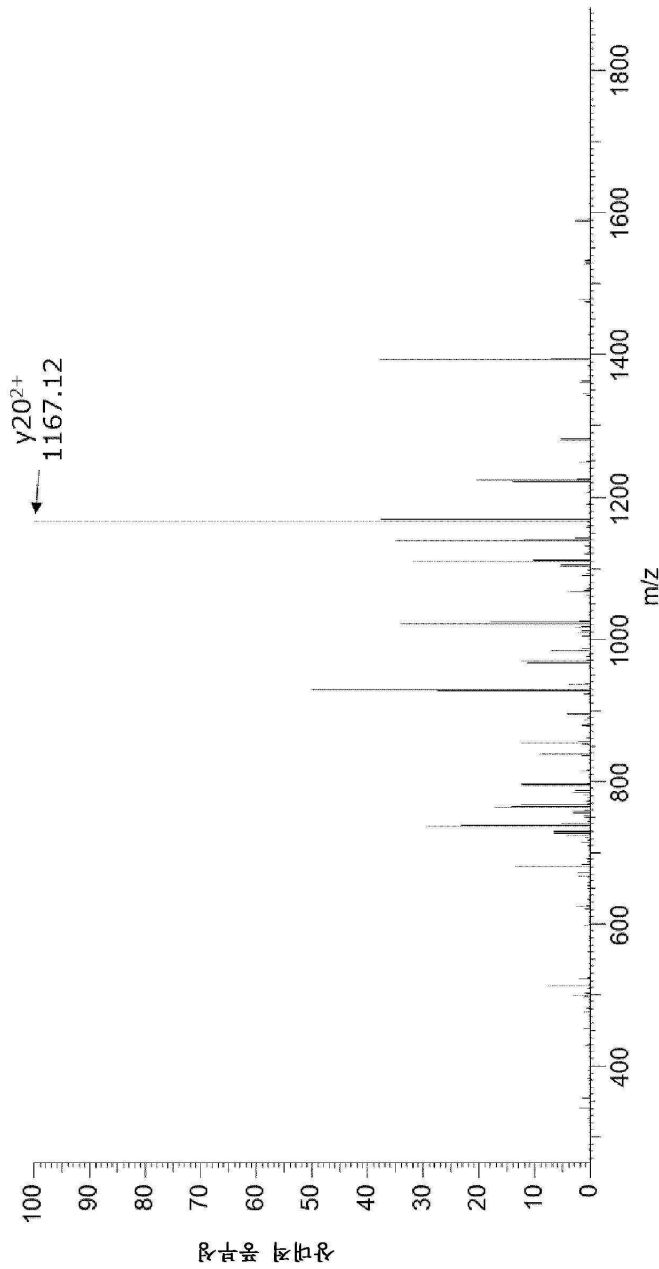
DAR 피크 목록

DAR 피크	이론적 질량 (Da)	관찰된 질량 (Da)	면적	% Area
0	148225	148399.95	3.11E+004	2.34
1	159945	159299.9	1.28E+006	95.93
2	171665	170390.15	2.31E+004	1.74

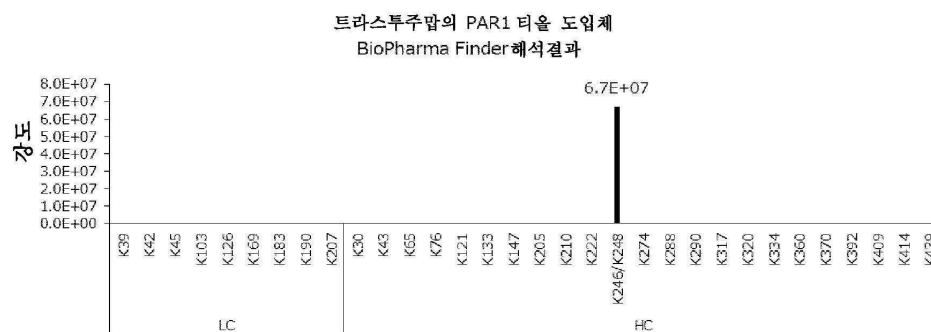
도면19a



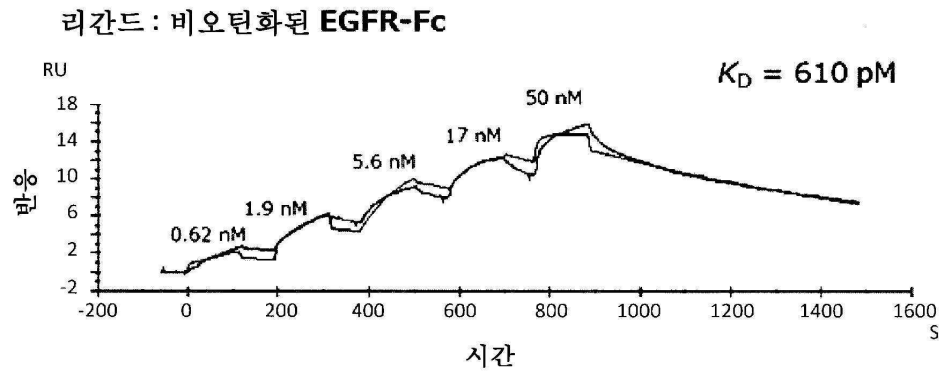
도면19b



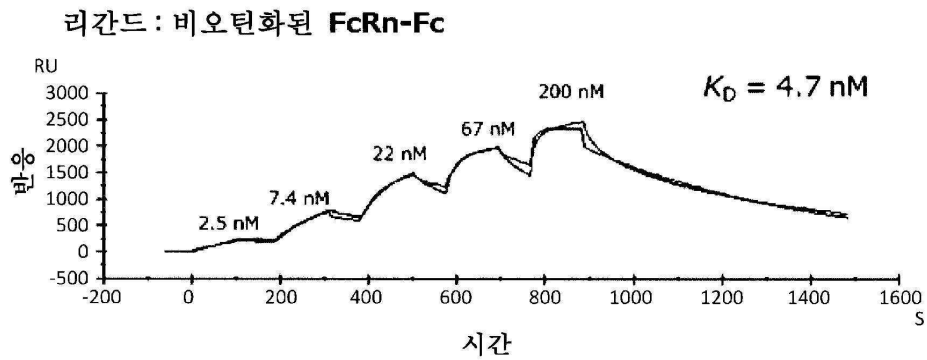
도면19c



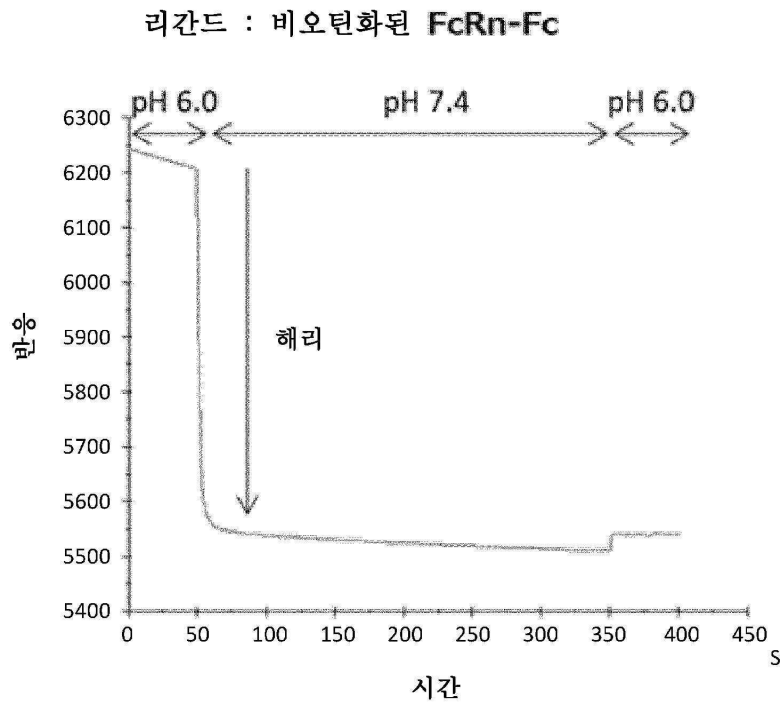
도면20a



도면20b

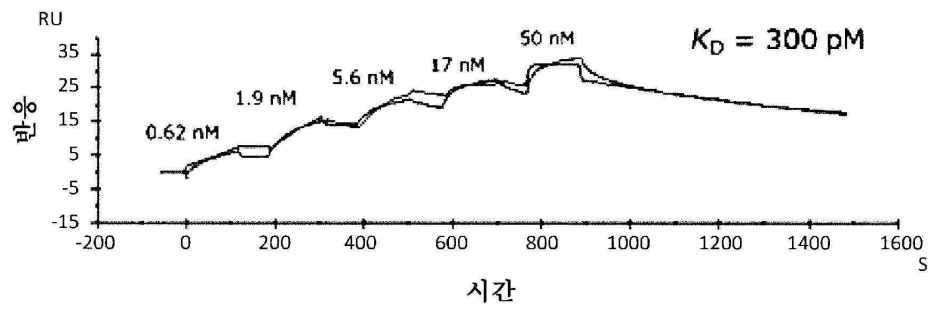


도면20c



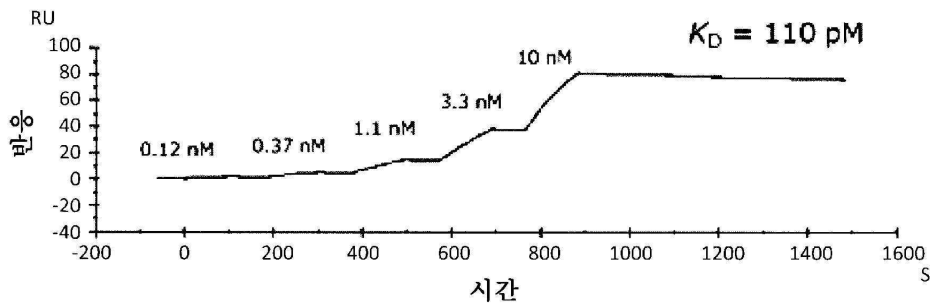
도면21a

리간드 : 비오틴화된 **EGFR-Fc**



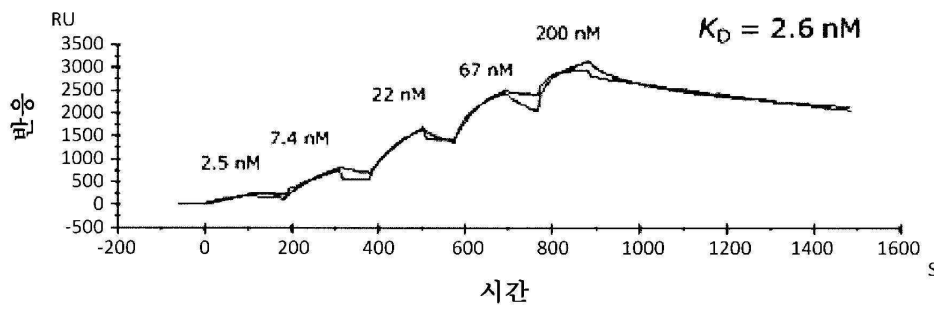
도면21b

리간드 : 비오틴화된 **HER2-Fc**

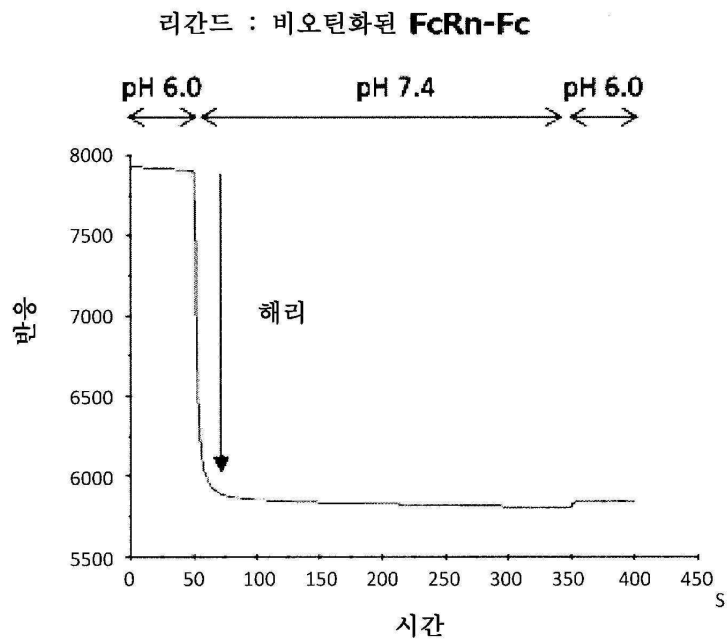


도면21c

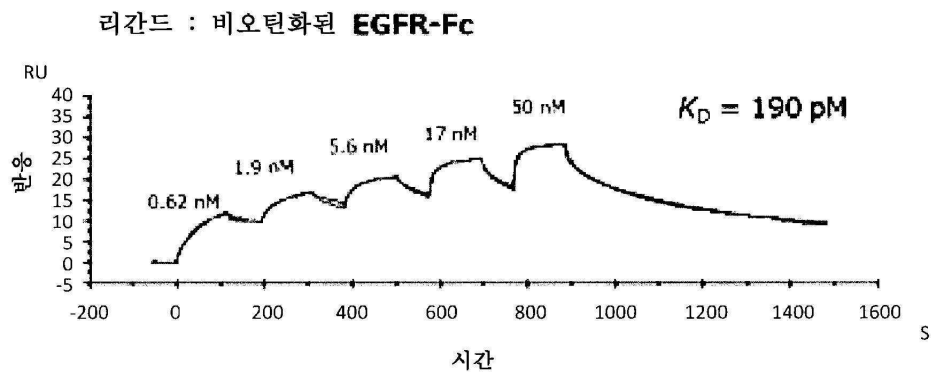
리간드 : 비오틴화된 **FcRn-Fc**



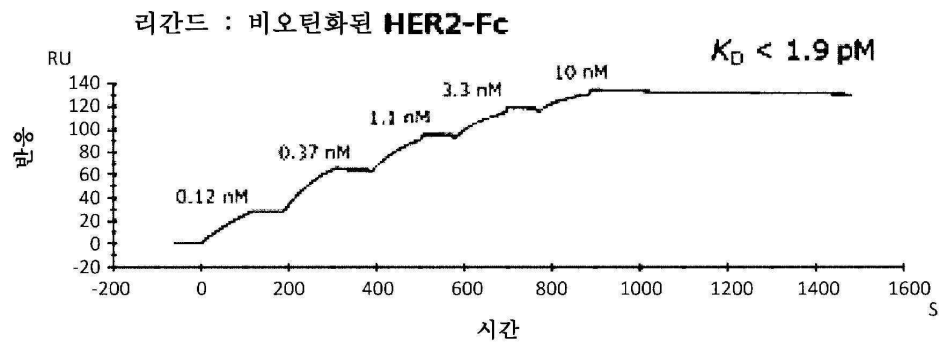
도면21d



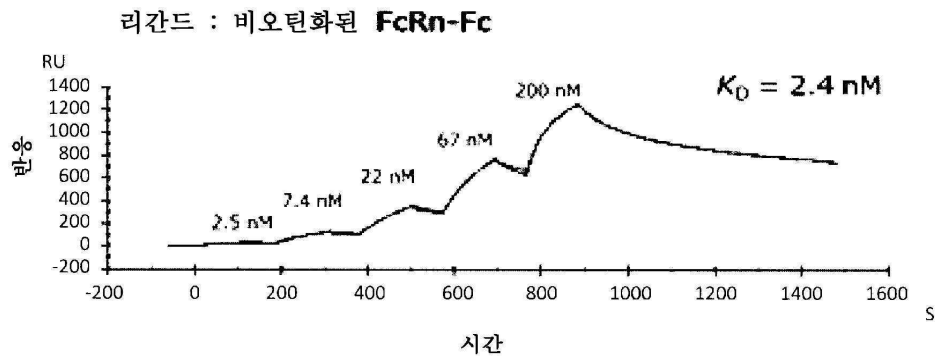
도면22a



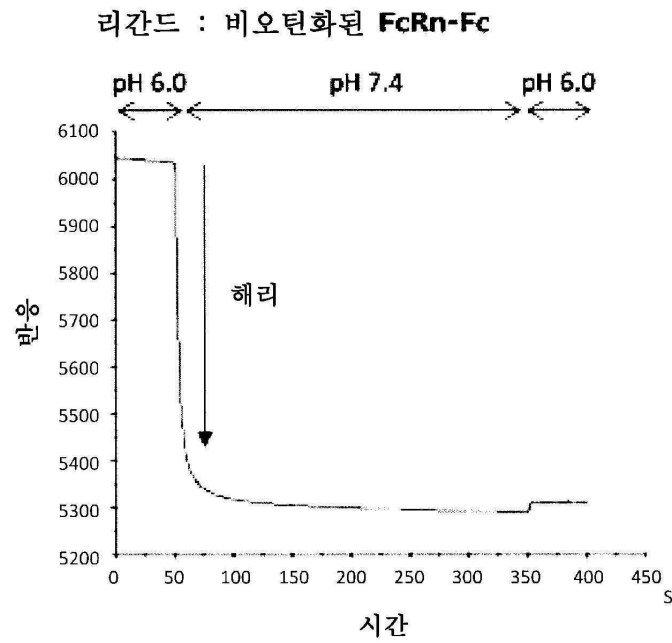
도면22b



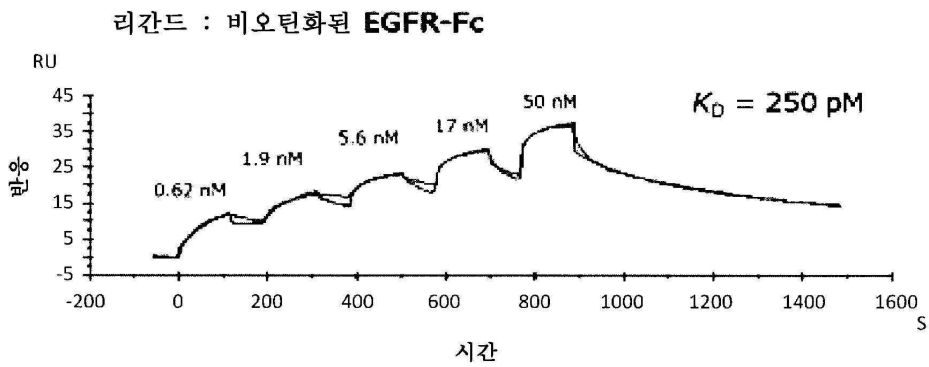
도면22c



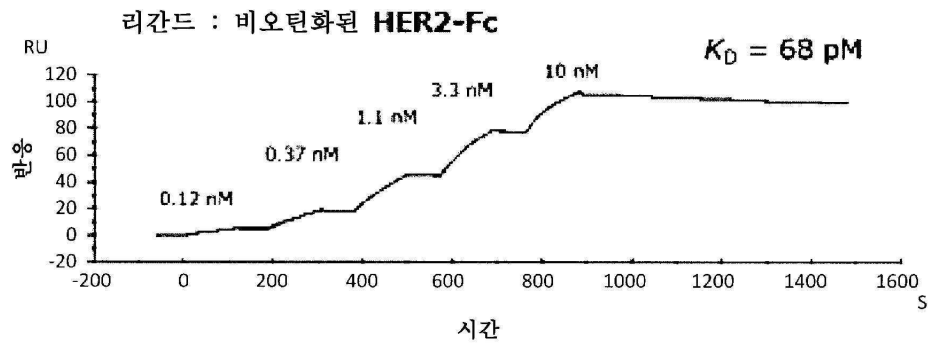
도면22d



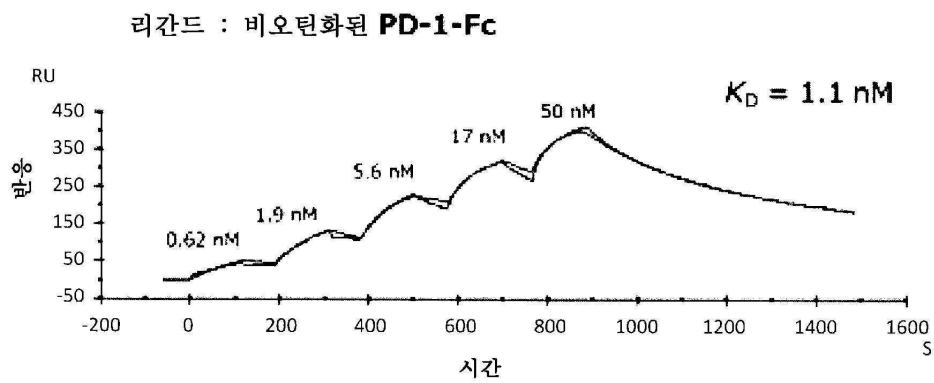
도면23a



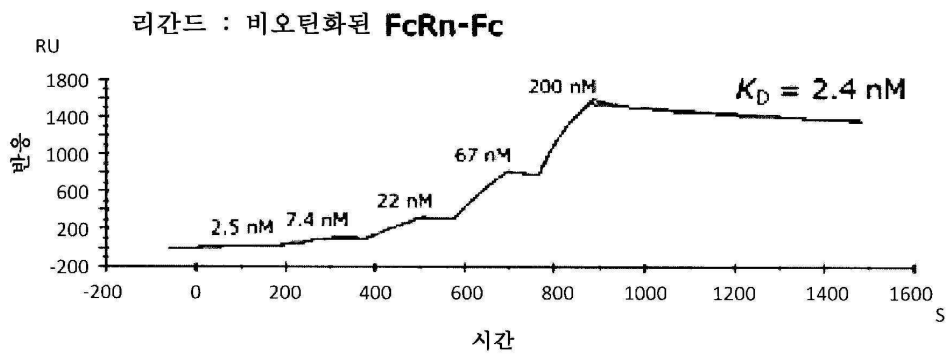
도면23b



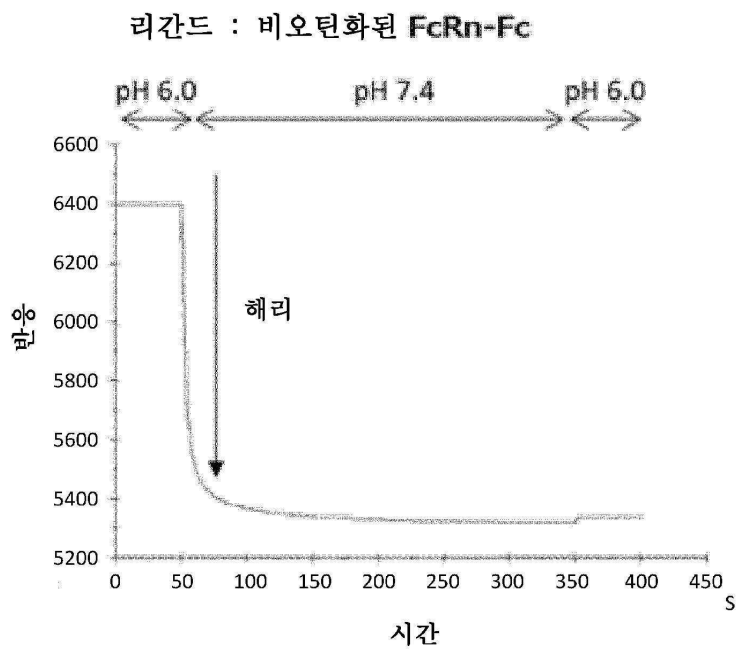
도면23c



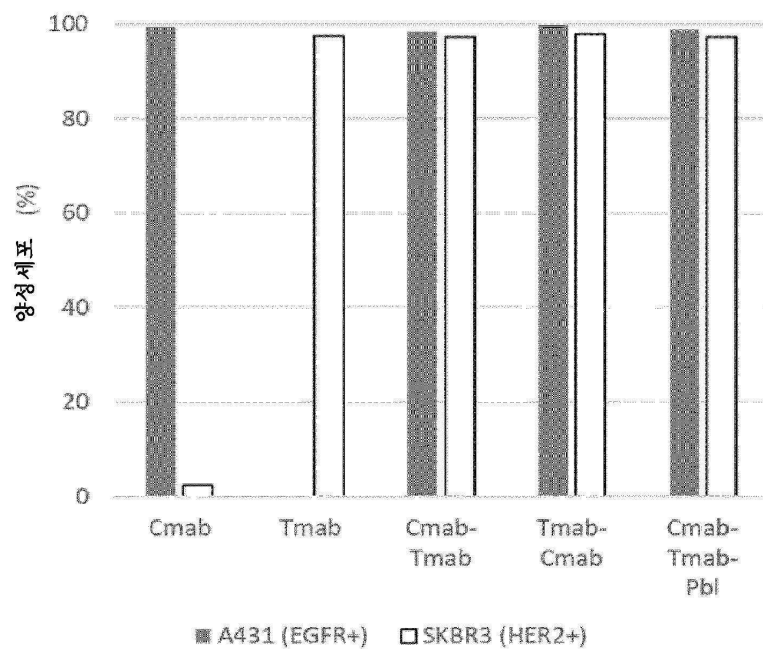
도면23d



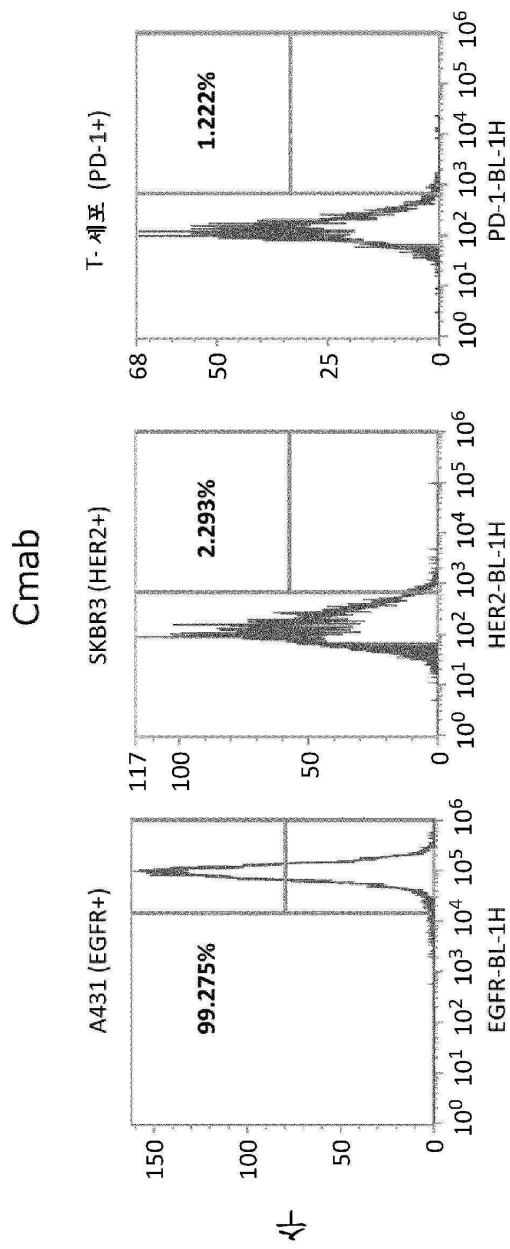
도면23e



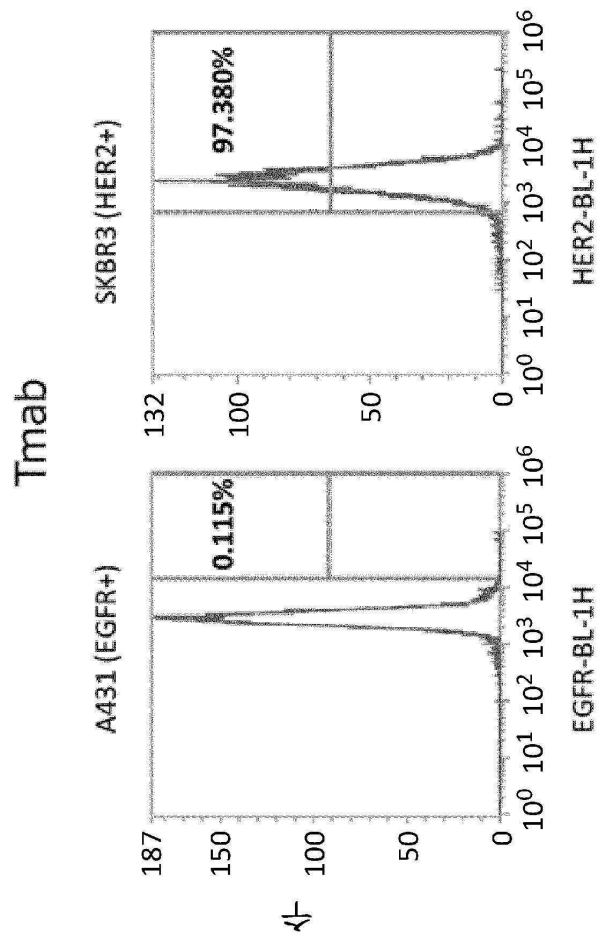
도면24a



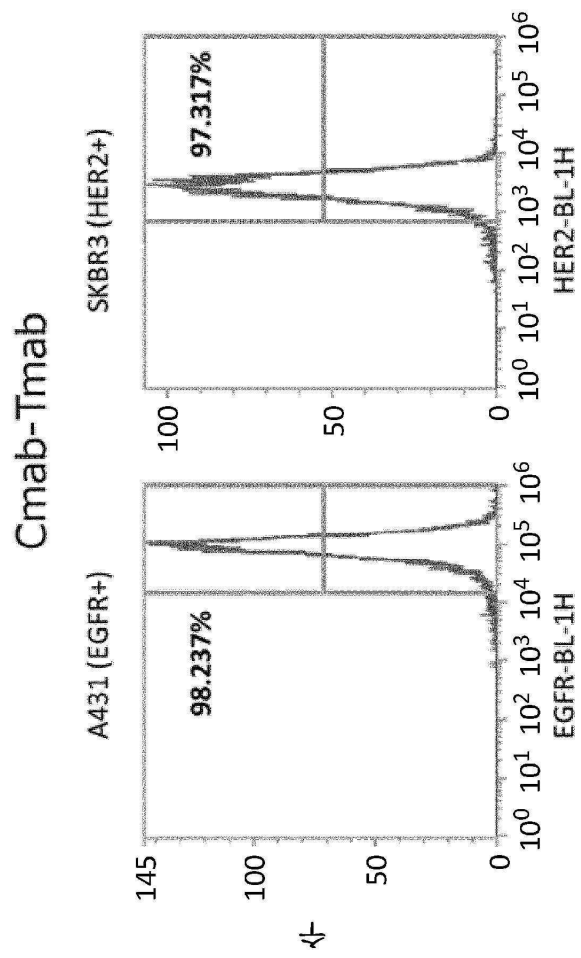
도면24b



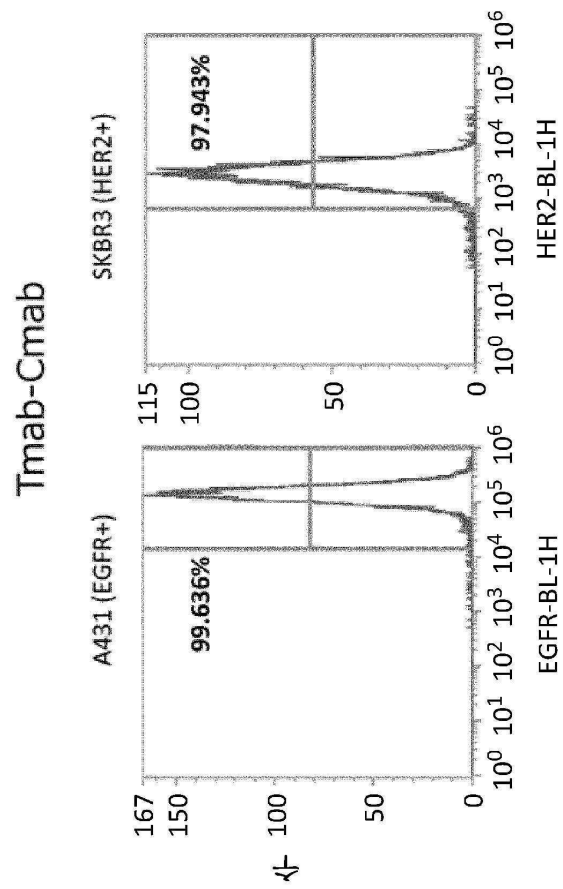
도면24c



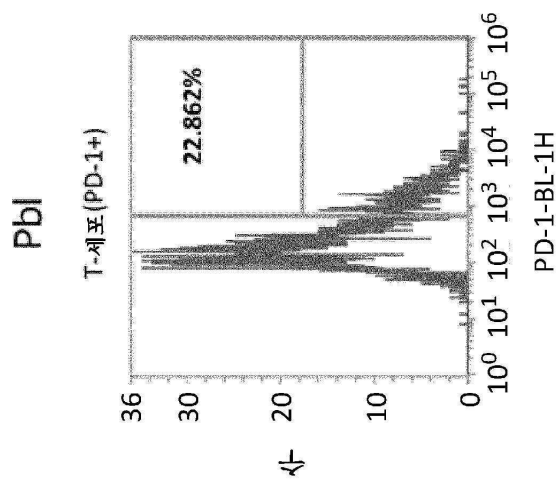
도면24d



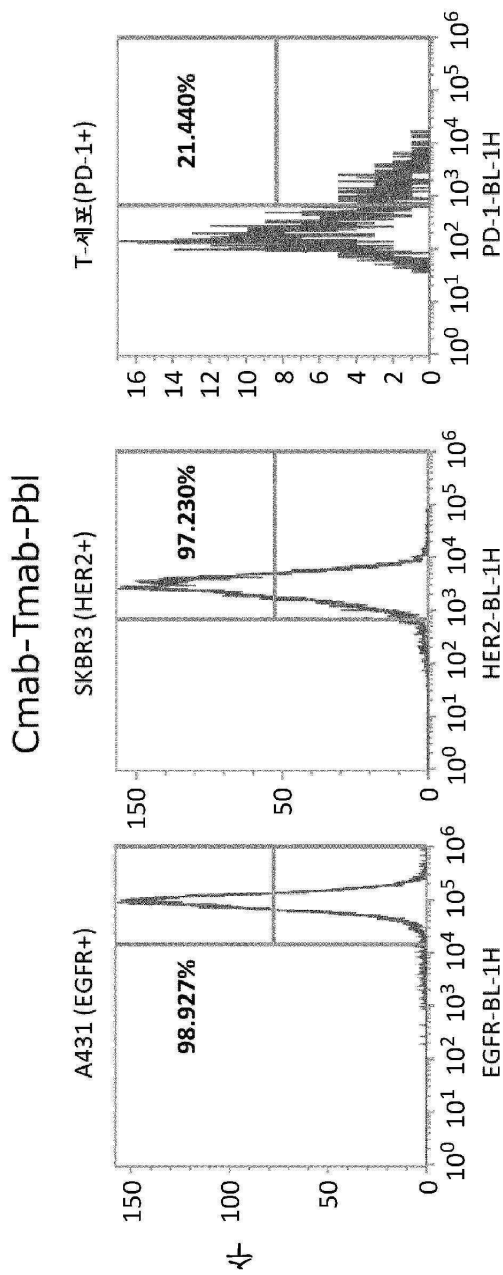
도면24e



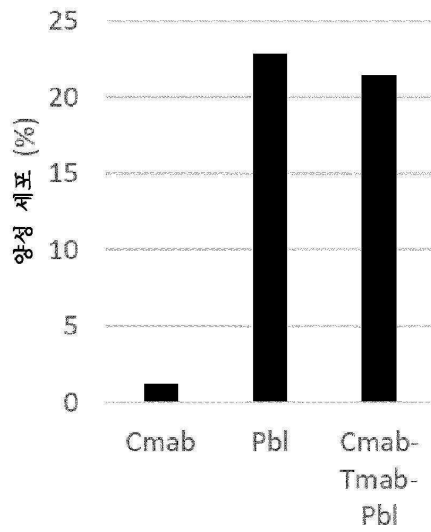
도면24f



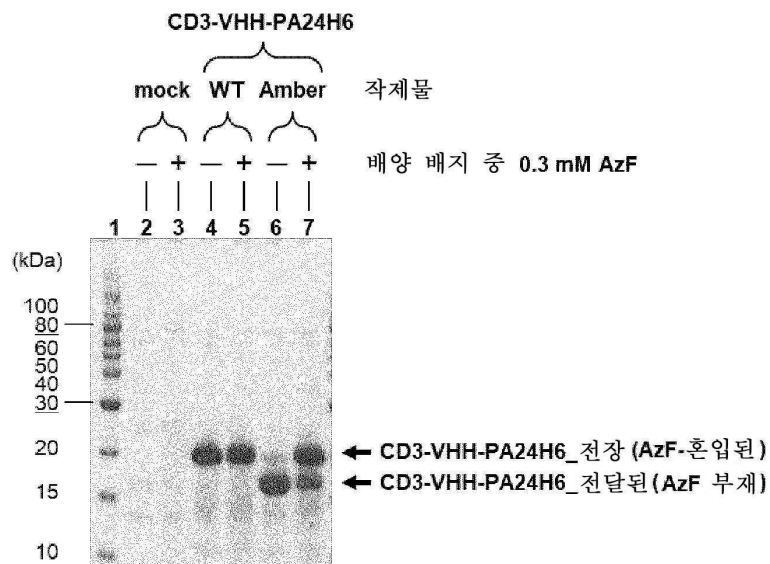
도면24g



도면24h



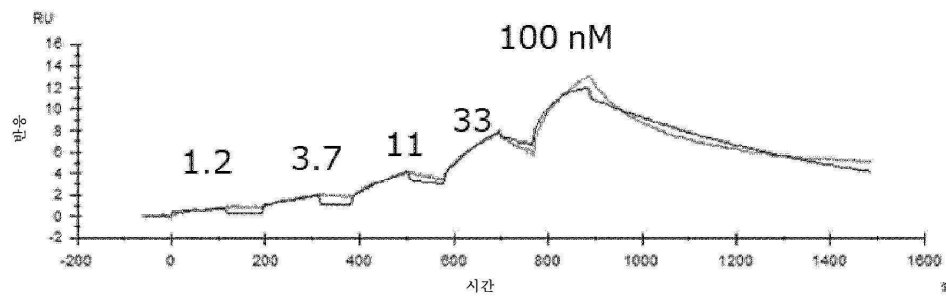
도면25



- 1, 마커 (XL-Ladder Broad, APRO Science)
2, pPK14e (공 벡터), No AzF
3, pPK14e (공 벡터), 0.3 mM AzF
4, pPK14e_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT, No AzF
5, pPK14e_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT, 0.3 mM AzF
6, pPK14e_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber, No AzF
7, pPK14e_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-Amber, 0.3 mM AzF

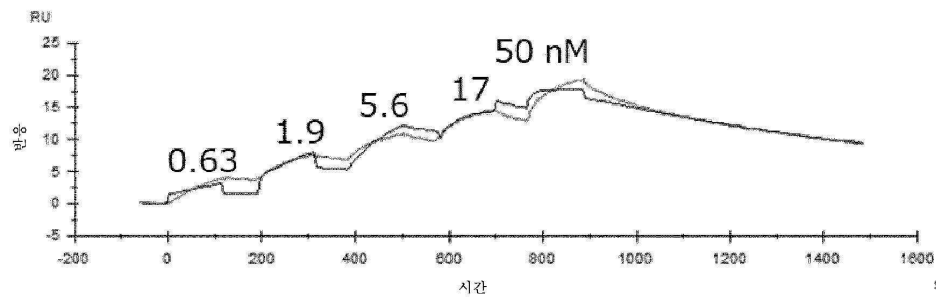
도면26

리간드: rhCD3 ϵ / δ

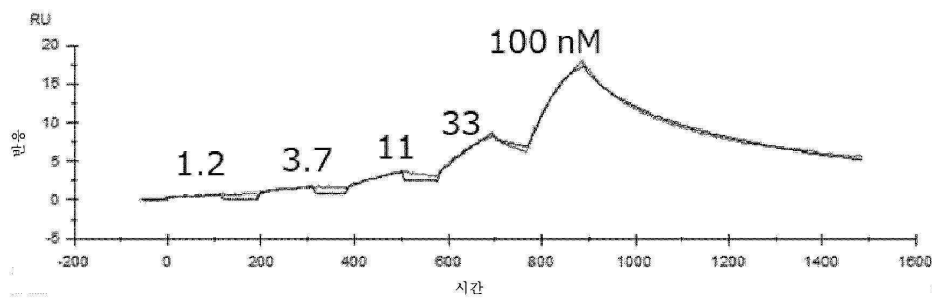


도면27

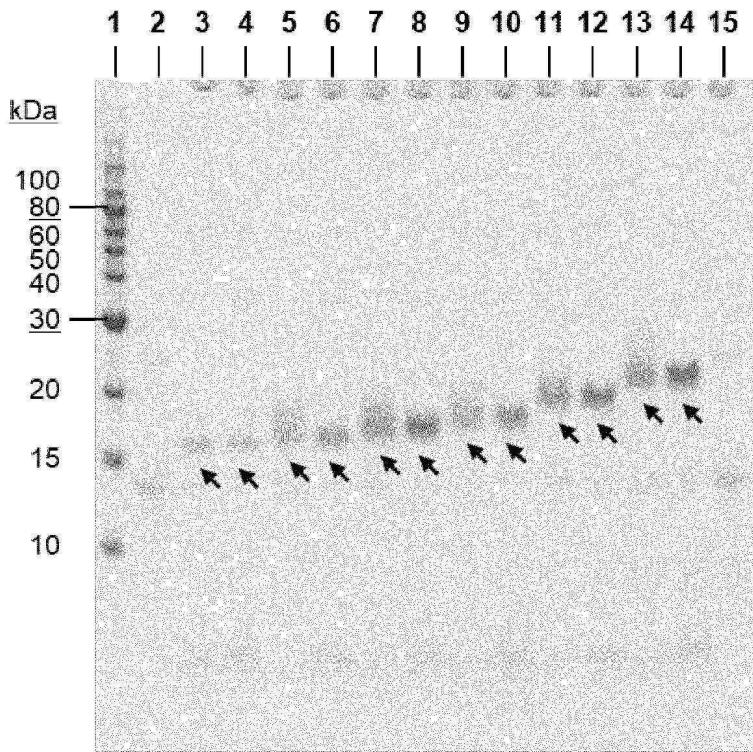
리간드: rhEGFR



리간드: rhCD3 ϵ / δ



도면28



- 1, 마커(XL-Ladder Broad, APRO science)
- 2, YDK0107/pPK4 (공 벡터)
- 3, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G
- 4, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G
- 5, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56
- 6, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56
- 7, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60
- 8, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60
- 9, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64
- 10, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64
- 11, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68
- 12, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68
- 13, YDK0107/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80
- 14, YDK0107 Δ pmt1/pPK4_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80
- 15, YDK0107 Δ pmt1/pPK4 (공 벡터)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.