



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월10일

(11) 등록번호 10-2715397

(24) 등록일자 2024년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/61 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/69 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/61 (2017.08)

A61K 47/6903 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2019-7030528

(22) 출원일자(국제) 2018년03월22일

심사청구일자 2021년03월16일

(85) 번역문제출일자 2019년10월17일

(65) 공개번호 10-2020-0007776

(43) 공개일자 2020년01월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/023857

(87) 국제공개번호 WO 2018/175788

국제공개일자 2018년09월27일

(30) 우선권주장

62/475,094 2017년03월22일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2016193371 A1*

KR1020140103099 A*

WO2014173759 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아센디스 파마 에이에스

덴마크 디케이-2900 헬러롭 투보그 불러바드 12

(72) 발명자

슈타르크, 제바스티안

독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트 584 아센디스 파마 게엠베하 내

크나페, 토마스

독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트 584 아센디스 파마 게엠베하 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 8 항

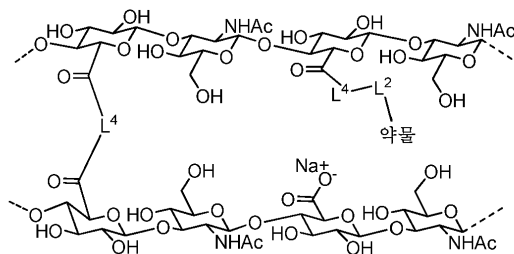
심사관 : 하재욱

(54) 발명의 명칭 히드로겔 가교된 히알루론산 전구약물 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 가교된 히알루론산 (HA) 또는 그의 유도체 또는 염을 포함하며, 여기서 가교제 시스템은 생분해성 스페이서를 포함하고, 가교된 HA는 접합된 약물-링커를 포함하고, 링커는 생리학적 조건 하에 약물을 방출시킬 수 있는 것인 히드로겔 전구약물 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 히드로겔 전구약물 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 히드로겔 조성물을 사용하여 안구 상태를 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도



1

(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/0048 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C07K 16/22 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/567 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

라우, 하랄트

독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트
584 아센디스 파마 게엠베하 내

비제크, 니콜라

독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트
584 아센디스 파마 게엠베하 내

라우퍼, 부르크하르트

독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트
584 아센디스 파마 게엠베하 내

바이스브로트, 자무엘

독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트
584 아센디스 파마 게엠베하 내

포이크트, 토비아스

독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트
584 아센디스 파마 게엠베하 내

푸, 저메인

미국 94044 캘리포니아주 퍼시픽카 아마폴라 애비
뉴 149

콰니그, 패트릭

미국 94114 캘리포니아주 샌 프란시스코 세븐틴쓰
스트리트 4116에이

리, 창웨이 비비안

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 멘헤이든 코
트 342

야다브, 다니엘라 봄바카

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

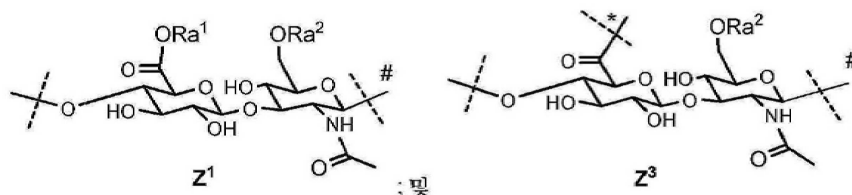
명세서

청구범위

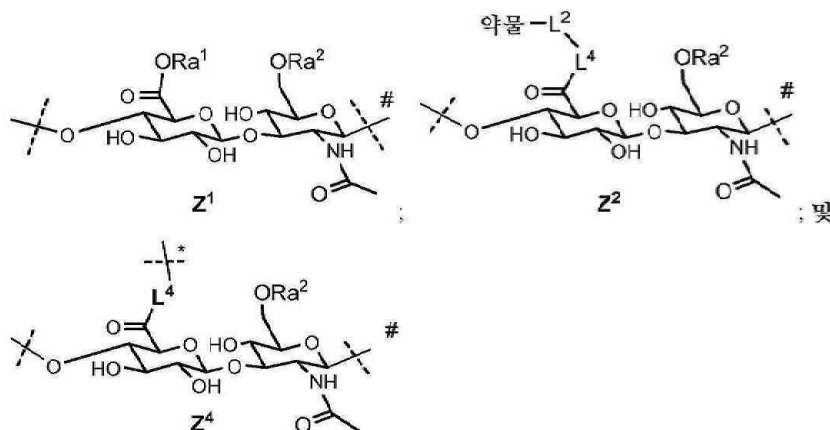
청구항 1

복수의 히알루론산 중합체 2A 및 복수의 히알루론산 중합체 2B를 포함하는 가교된 히알루론산 (HA) 약물 접합체인 히드로겔 약물 접합체로서, 여기서,

각각의 2A는 복수의 선형으로 연결된 단위를 포함하고, 단위는 하기로 본질적으로 이루어지고:



각각의 2B는 복수의 선형으로 연결된 단위를 포함하고, 단위는 하기로 본질적으로 이루어지고:



여기서,

표시되지 않은 파선은 #로 표시된 파선에서의 인접 단위에 대한 부착 지점 또는 수소에 대한 부착 지점을 나타내고,

#로 표시된 파선은 표시되지 않은 파선에서의 인접 단위에 대한 부착 지점 또는 히드록실에 대한 부착 지점을 나타내고,

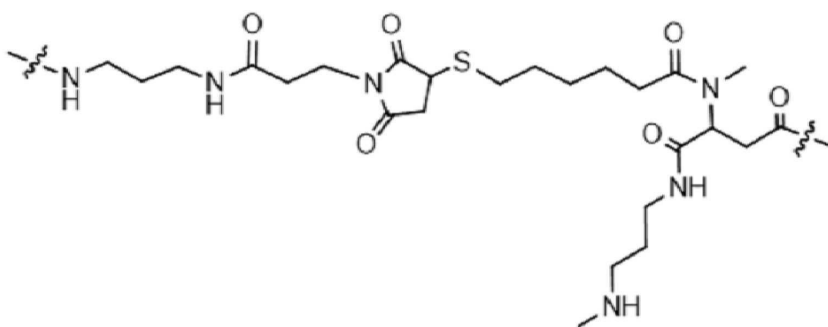
*로 표시된 파선은 적어도 1개의 2A가 적어도 1개의 2B에 가교되도록 하는 2A의 단위 Z^3 와 2B의 단위 Z^4 사이의 가교 부착 지점을 나타내고,

약물은 라니비주맙이고, 여기서 하이드로겔 약물 접합체는 대상체의 유리체에 투여되고, 하이드로겔 약물 접합체의 안구 유효 반감기는 비변형 약물에 비해 적어도 16배 증가되고,

Ra^1 및 Ra^2 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 알칼리 금속 이온, 암모늄 이온 또는 알칼리 토금속 이온이고,

가역적 전구약물 링커 L^2 가 스페이서 L^4 와 함께 화학식 VIId를 갖는 것이고:

화학식 VIId

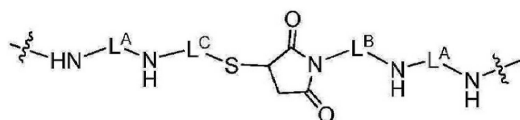


여기서,

최우측 파상선은 약물의 질소 원자에 대한 부착 지점을 나타내고,

최좌측 파상선은 히알루론산 2B의 단위 Z^2 에 대한 부착 지점을 나타내고,

히알루론산 중합체 2A를 히알루론산 중합체 2B에 연결하는 생분해성 스페이서 L^4 는 하기 화학식을 갖고:



여기서,

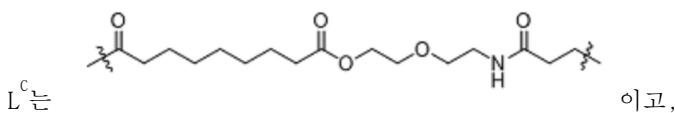
최우측 파상선은 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^4 에 대한 부착 지점을 나타내고,

최좌측 파상선은 히알루론산 중합체 2A 상의 단위 Z^3 에 대한 부착 지점을 나타내고,

여기서,

L^A 는 선형 C_{2-4} 알킬렌이고,

L^B 는 치환되거나 개재된 C_{1-10} 알킬렌이고,



2A는 총 s 개의 단위를 포함하며, 여기서 s 는 25 내지 2500이고, 여기서,

2A에서의 Z^1 단위의 수는 $0.8s$ 내지 $0.99s$ 이고,

Z^3 단위의 수는 $0.1s$ 내지 $0.01s$ 이고,

2B는 총 t 개의 단위를 포함하며, 여기서 t 는 25 내지 2500이고, 여기서,

2B에서의 Z^1 단위의 수는 $0.75t$ 내지 $0.94t$ 이고,

Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 $0.14t$ 내지 $0.06t$ 이고,

Z^2 단위의 수는 적어도 $0.01t$ 이고,

Z^4 단위의 수는 적어도 $0.01t$ 인

히드로겔 약물 접합체.

청구항 2

제1항의 히드로겔 약물 접합체, 및

제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제

를 포함하는 안구 장애의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물로서,

안구 장애가 연령-관련 황반 변성 (AMD), 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME), 당뇨병성 망막병증 (DR) 및 근시성 맥락막 신생혈관화로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 안구 장애가 AMD인 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, AMD가 습성 AMD인 제약 조성물.

청구항 5

제1항의 히드로겔 약물 접합체, 및

제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제

를 포함하는 안구 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 제약 조성물로서,

방법은 안구 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료량의 상기 제약 조성물의 용액을 투여하는 것을 포함하고,

제약 조성물은 대상체의 유리체 내로 주사되고,

안구 장애가 연령-관련 황반 변성 (AMD), 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME), 당뇨병성 망막병증 (DR) 및 근시성 맥락막 신생혈관화로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 조성물이 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 또는 32의 페이지를 갖는 바늘을 사용하여 주사되는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 안구 장애가 AMD인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, AMD가 습성 AMD인 제약 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 3월 22일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/475,094를 우선권 주장하며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본원은 EFS-웹을 통해 제출된 서열 목록을 함유하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2018년 3월 21

일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P34128_W0_Sequence Listing.txt로 명명되고, 크기가 38,048 바이트이다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 제약 조성물, 관련 제조 방법, 및 1종 이상의 안구 상태의 치료를 위한 제약 조성물의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 실명의 주요 원인은 눈의 특정 질환을 충분히 치료하지 못해서이다. 주요 한계는 눈 안에 약물 또는 치료제를 도입하고 이들 약물 또는 치료제를 필요한 지속기간 동안 그 안에서 치료상 유효한 농도로 유지하는 적합한 옵션이 결여되어 있다는 것이다. 전신 투여는 이상적인 해결책이 아닐 수 있으며, 이는 종종 효과적인 안내 농도를 달성하기 위해 허용되지 않게 높은 수준의 전신 투여가 필요하여 허용되지 않는 약물 부작용의 발생률이 증가하기 때문이다. 단순한 안구 점적주입 또는 적용은 다수의 경우에서 허용되는 대안이 아니며, 이는 약물이 눈물-작용에 의해 신속하게 세척 제거되거나 또는 눈 안으로부터 전신 순환으로 흘러 고갈되기 때문이다. 국소 점안제 요법은 불량한 흡수, 수일 내지 수년의 기간에 걸친 빈번한 및/또는 만성 투여에 대한 필요성, 방수의 신속한 교체, 눈물막의 생성 및 이동, 및 요법이 완료되거나 적절한 용량이 전달되기 훨씬 전에 치료제를 효과적으로 제거할 수 있는 다른 원인에 의해 제한된다.

[0008] 안내 주사는 다른 전달 메카니즘, 예컨대 국소 전달에 비해 눈의 표적 위치 (예를 들어, 망막)에 증진된 생체이용률을 제공할 수 있다는 이점을 갖는다. 그러나, 이들은 또한 단점을 가지며 다양한 상이한 합병증을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 유리체내 주사는 표적 위치에 또는 특히 치료제가 비교적 가용성인 경우 다른 곳에 바람직하지 않게 높은 농도의 치료제의 전달을 유발할 수 있다. 추가로, 안내 주사는 환자에게 매우 불편하다. 게다가, 안내 주사 자체가 안내염 및 망막 박리와 같은 합병증을 야기할 수 있기 때문에, 눈에서 약물의 치료 수준을 유지하면서 주사들 사이의 지속기간이 가능한 가장 긴 것이 매우 바람직하다.

[0009] 상기 이외에도, 유리체내 주사에 의해 전달된 치료제는 치료제가 주사 후에 눈 안에서 종종 신속하게 분산될 수 있기 때문에 작용 지속기간이 부족할 수 있다. 이러한 지속기간의 부족은 보다 많은 주사 빈도를 필요로 할 수 있기 때문에 특히 바람직하지 않다. 예를 들어, 라니비주맙 및 페갑타닙은 각각 4주마다 및 6주마다 안내 주사를 통해 환자에게 투여되며, 이는 환자에게 매우 불편한 경험이다.

[0010] 따라서, 안과학 분야는 더 오래 지속되는 체제로부터 이익을 얻을 것이라는 점이 널리 인식되고 있다. 이들은 처방된 치료적 의료 요법에 대한 환자 순응도와 연관된 문제를 최소화하면서 눈에 연장된 치료제 전달을 제공함으로써 환자 관리 및 안구 건강에 이익을 줄 것이다.

[0011] 혈관생성 및 혈관신생을 자극하는 세포에 의해 생산된 신호 단백질인 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 발현은 다양한 안구 상태에서, 예컨대 특정 형태의 황반 변성 및 망막병증에서 중요한 역할을 한다.

[0012] 이러한 안구 상태를 치료하기 위한 다양한 의약, 예컨대 라니비주맙, 아플리베르셉트 및 페갑타닙이 판매 중이다. 환자에 대한 적용은 4주마다 및 8주마다 안내 주사를 통해 이루어진다.

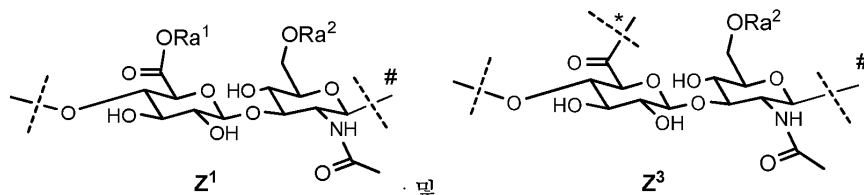
[0013] 상기에 비추어, 적어도 부분적으로 이들 결점을 극복하는 투여 형태를 제공할 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은 가교된 히알루론산 (HA) 약물 접합체, 제약 조성물 및 안구 적응증의 치료를 위한 상기 접합체의 사용 방법 및 상기 접합체의 제조 방법을 제공한다.

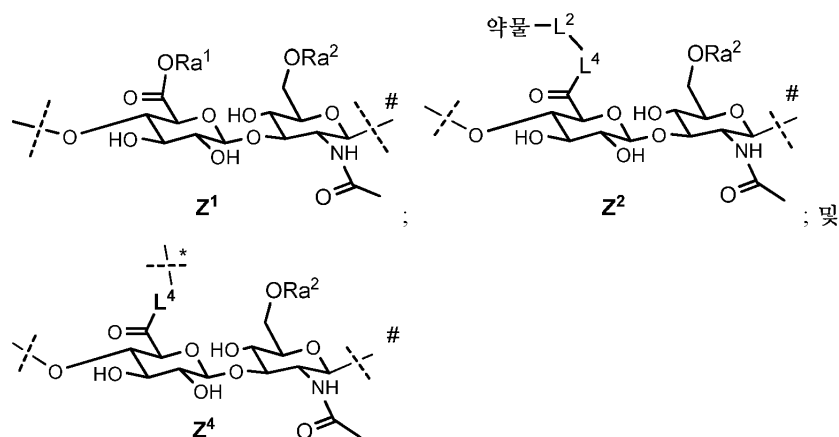
[0015] 특정 실시양태에서, 본 발명은 복수의 히알루론산 중합체 2A 및 복수의 히알루론산 중합체 2B를 포함하는 가교된 HA 약물 접합체이며, 여기서

[0016] 각각의 2A는 복수의 선형으로 연결된 단위를 포함하고, 단위는 하기로 본질적으로 이루어지고:



[0017]

[0018] 각각의 2B는 복수의 선형으로 연결된 단위를 포함하고, 단위는 하기로 본질적으로 이루어지고:



[0019]

[0020] 여기서

[0021] 표시되지 않은 파선은 #로 표시된 파선에서의 인접 단위에 대한 부착 지점 또는 수소에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0022] #로 표시된 파선은 표시되지 않은 파선에서의 인접 단위에 대한 부착 지점 또는 히드록실에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0023] *로 표시된 파선은 적어도 1개의 2A가 적어도 1개의 2B에 가교되도록 하는 2A의 단위 Z^3 과 2B의 단위 Z^4 사이의 가교 부착 지점을 나타내고;

[0024] 약물은 치료제이고;

[0025] Ra^1 및 Ra^2 는 각각 독립적으로 수소; C_{1-4} 알킬; 알칼리 금속 이온, 암모늄 이온, 알칼리 토금속 이온 또는 다른 적합한 반대이온이고;

[0026] L^2 는 가역적 전구약물 링커이고;

[0027] L^4 는 임의로 생분해성인 스페이서이고, Z^2 및 Z^4 에서 동일하거나 상이할 수 있고;

[0028] 2A는 총 s개의 단위를 포함하며, 여기서 s는 25 내지 2500이고, 여기서

[0029] 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.8s 내지 약 0.99s이고,

[0030] Z^3 단위의 수는 약 0.2s 내지 약 0.01s이고;

[0031] 2B는 총 t개의 단위를 포함하며, 여기서 t는 25 내지 2500이고, 여기서

[0032] 2B에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.75t 내지 약 0.94t이고;

[0033] Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.25t 내지 약 0.06t이고;

- [0034] Z^2 단위의 수는 적어도 0.01t 이고;
- [0035] Z^4 단위의 수는 적어도 0.01t 인
- [0036] 가교된 HA 약물 접합체를 제공한다.
- [0037] 특정 실시양태에서, s는 50 내지 2000이다.
- [0038] 특정 실시양태에서, s는 75 내지 1500이다.
- [0039] 특정 실시양태에서, s는 75 내지 1000이다.
- [0040] 특정 실시양태에서, s는 80 내지 500이다.
- [0041] 특정 실시양태에서, s는 100 내지 250이다.
- [0042] 특정 실시양태에서, s는 100 내지 200이다.
- [0043] 특정 실시양태에서, s는 200 내지 800, 또는 300 내지 600이다.
- [0044] 특정 실시양태에서, t는 50 내지 2000이다.
- [0045] 특정 실시양태에서, t는 75 내지 1500이다.
- [0046] 특정 실시양태에서, t는 75 내지 1000이다.
- [0047] 특정 실시양태에서, t는 80 내지 500이다.
- [0048] 특정 실시양태에서, t는 100 내지 250이다.
- [0049] 특정 실시양태에서, t는 100 내지 200이다.
- [0050] 특정 실시양태에서, t는 200 내지 800, 또는 300 내지 600이다.
- [0051] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.91s 내지 약 0.98s이다.
- [0052] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.8s 내지 약 0.99s이다.
- [0053] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.82s 내지 약 0.99s이다.
- [0054] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.84s 내지 약 0.99s이다.
- [0055] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.86s 내지 약 0.99s이다.
- [0056] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.88s 내지 약 0.99s이다.
- [0057] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.9s 내지 약 0.99s이다. 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.92s 내지 약 0.97s이다.
- [0058] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.93s 내지 약 0.96s이다.
- [0059] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.94s 내지 약 0.95s이다.
- [0060] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^3 단위의 수는 약 0.2s 내지 약 0.01s이다.
- [0061] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^3 단위의 수는 약 0.18s 내지 약 0.01s이다.
- [0062] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^3 단위의 수는 약 0.16s 내지 약 0.01s이다.
- [0063] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^3 단위의 수는 약 0.14s 내지 약 0.01s이다. 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^3 단위의 수는 약 0.12s 내지 약 0.01s이다.

- [0064] 특정 실시양태에서, 2A에서의 Z^3 단위의 수는 약 0.10s 내지 약 0.01s이다.
- [0065] 특정 실시양태에서, Z^3 단위의 수는 약 0.09s 내지 약 0.02s이다.
- [0066] 특정 실시양태에서, Z^3 단위의 수는 약 0.08s 내지 약 0.03s이다.
- [0067] 특정 실시양태에서, Z^3 단위의 수는 약 0.07s 내지 약 0.04s이다.
- [0068] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.88s 내지 약 0.92s이다.
- [0069] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.86s 내지 약 0.94s이다.
- [0070] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.89s 내지 약 0.91s이다.
- [0071] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^1 단위의 수는 약 0.86s 내지 약 0.94s이다.
- [0072] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.25t 내지 약 0.05t이다.
- [0073] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.23t 내지 약 0.05t이다.
- [0074] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.21t 내지 약 0.05t이다.
- [0075] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.19t 내지 약 0.05t이다.
- [0076] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.17t 내지 약 0.05t이다.
- [0077] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.15t 내지 약 0.05t이다.
- [0078] 특정 실시양태에서, 2B에서의 Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.13t 내지 약 0.05t이다.
- [0079] 특정 실시양태에서, Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.12t 내지 약 0.06t이다.
- [0080] 특정 실시양태에서, Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.11t 내지 약 0.07t이다.
- [0081] 특정 실시양태에서, Z^2 및 Z^4 단위의 합한 수는 약 0.25t 내지 약 0.06t이다.
- [0082] 특정 실시양태에서, Z^2 단위의 수는 0.02t 내지 0.12t이다.
- [0083] 특정 실시양태에서, Z^2 단위의 수는 0.04t 내지 0.10t이다.
- [0084] 특정 실시양태에서, Z^2 단위의 수는 0.06t 내지 0.08t이다.
- [0085] 특정 실시양태에서, Z^2 단위의 수는 0.07t 내지 0.08t이다.
- [0086] 특정 실시양태에서, Z^2 단위의 수는 0.075t 내지 0.08t이다.
- [0087] 특정 실시양태에서, Z^2 단위의 수는 0.077t이다.
- [0088] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.01t 내지 0.12t이다.
- [0089] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.02t 내지 0.12t이다.
- [0090] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.04t 내지 0.10t이다.
- [0091] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.06t 내지 0.08t이다.

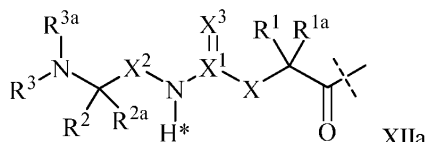
[0092] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.01t 내지 0.04t이다.

[0093] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.02t 내지 0.03t이다.

[0094] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.02t 내지 0.025t이다.

[0095] 특정 실시양태에서, Z^4 단위의 수는 0.023t이다.

[0096] 특정 실시양태에서, 약물을 스페이서 L^4 에 커플링시키는 가역적 전구약물 링커 L^2 는 화학식 XIIa를 갖는다.



[0097]

[0098] 여기서

[0099] 파선은 아마이드 결합 형성에 의한 약물 화합물 (나타내지 않음)의 질소에 대한 부착을 나타내고;

[0100] -X-는 $-C(R^4 R^{4a})-$; $-N(R^4)-$; $-O-$; $-C(R^4 R^{4a})-C(R^5 R^{5a})-$; $-C(R^5 R^{5a})-C(R^4 R^{4a})-$; $-C(R^4 R^{4a})-N(R^6)-$; $-N(R^6)-C(R^4 R^{4a})-$; $-C(R^4 R^{4a})-O-$; $-O-C(R^4 R^{4a})-$; 또는 $-C(R^7 R^{7a})-$ 이고;

[0101] X^1 은 C; 또는 S(O)이고;

[0102] $-X^2-$ 는 $-C(R^8 R^{8a})-$; 또는 $-C(R^8 R^{8a})-C(R^9 R^{9a})-$ 이고;

[0103] $=X^3$ 은 $=O$; $=S$; 또는 $=N-CN$ 이고;

[0104] $-R^1$, $-R^{1a}$, $-R^2$, $-R^{2a}$, $-R^4$, $-R^{4a}$, $-R^5$, $-R^{5a}$, $-R^6$, $-R^8$, $-R^{8a}$, $-R^9$, $-R^{9a}$ 는 독립적으로 -H; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0105] $-R^3$, $-R^{3a}$ 는 독립적으로 -H; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단 $-R^3$, $-R^{3a}$ 중 하나 또는 둘 다가 -H 이외의 것인 경우에, 이들은 SP^3 -혼성화 탄소 원자를 통해 이들이 부착되어 있는 N에 연결되고;

[0106] $-R^7$ 은 $-N(R^{10} R^{10a})$; 또는 $-NR^{10}-(C=O)-R^{11}$ 이고;

[0107] $-R^{7a}$, $-R^{10}$, $-R^{10a}$, $-R^{11}$ 은 서로 독립적으로 -H; 또는 C_{1-10} 알킬이고;

[0108] 임의로, 쌍 $-R^{1a}/-R^{4a}$, $-R^{1a}/-R^{5a}$, $-R^{1a}/-R^{7a}$, $-R^{4a}/-R^{5a}$, $-R^{8a}/-R^{9a}$ 중 1개 이상은 화학 결합을 형성하고;

[0109] 임의로, 쌍 $-R^1/-R^{1a}$, $-R^2/-R^{2a}$, $-R^4/-R^{4a}$, $-R^5/-R^{5a}$, $-R^8/-R^{8a}$, $-R^9/-R^{9a}$ 중 1개 이상은 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 연결되어 C_{3-10} 시클로알킬; 또는 3- 내지 10-원 헤테로시클릴을 형성하고;

[0110] 임의로, 쌍 $-R^1/-R^4$, $-R^1/-R^5$, $-R^1/-R^6$, $-R^1/-R^{7a}$, $-R^4/-R^5$, $-R^4/-R^6$, $-R^8/-R^9$, $-R^2/-R^3$ 중 1개 이상은 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 연결되어 고리 A를 형성하고;

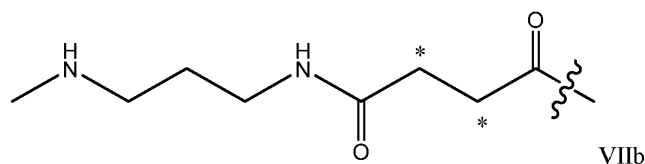
[0111] 임의로, R^3/R^{3a} 는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 연결되어 3- 내지 10-원 헤테로사이클을 형성하고;

[0112] 고리 A는 페닐; 나프틸; 인데닐; 인다닐; 테트라리닐; C_{3-10} 시클로알킬; 3- 내지 10-원 헤테로시클릴; 및 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0113] 여기서 화학식 XIIa의 기는 $-L^4$ 로 치환되며, 단 화학식 XIIa에서 별표로 표시된 수소는 $-L^4$ 또는 다른 치환기에 의해 대체되지 않고;

[0114] 여기서 $-L^4$ 는 단일 화학 결합 또는 본원에 정의된 바와 같은 스페이서 모이어티이다.

[0115] 특정 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 는 화학식 VIIa를 갖는다:

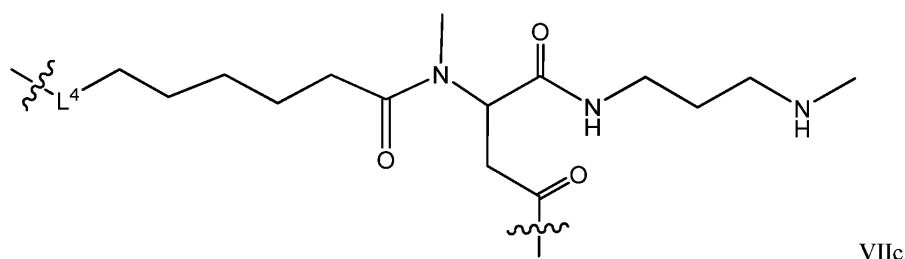


[0116]

[0117] 여기서

[0118] 각각의 별표는 스페이서 L^4 에 대한 독립적인 부착 부위를 나타낸다.

[0119] 특정 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 는 스페이서 L^4 와 함께 화학식 VIIc를 갖는다:



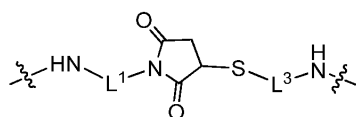
[0120]

[0121] 여기서

[0122] 최우측 파상선은 약물의 질소 원자에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0123] 최좌측 파상선은 히알루론산 2B의 단위 Z^2 에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0124] 특정 실시양태에서, 히알루론산 중합체 2A를 히알루론산 중합체 2B에 연결하는 (중합체 2A의 단위 Z^3 을 중합체 2B의 단위 Z^4 에 연결함으로써) 스페이서 L^4 는 하기 화학식을 갖는다:



[0125]

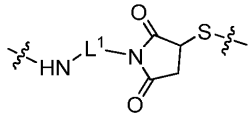
[0126] 여기서

[0127] 최우측 파상선은 히알루론산 중합체 2A 상의 단위 Z^3 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0128] 최좌측 파상선은 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^4 에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0129] 히알루론산 중합체 2A를 히알루론산 중합체 2B에 연결하는 스페이서 L^4 는, 특정 실시양태에서, 상기 화학식의 최우측 파상선이 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^4 에 대한 부착 지점을 나타내고 최좌측 파상선이 히알루론산 중합체 2A 상의 단위 Z^3 에 대한 부착 지점을 나타도록 하는 배향으로 역전될 수 있다.

[0130] 특정 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 를 히알루론산 중합체 2B에 연결하는 스페이서 L^4 는 하기 화학식을 갖는다:



[0131]

[0132] 여기서

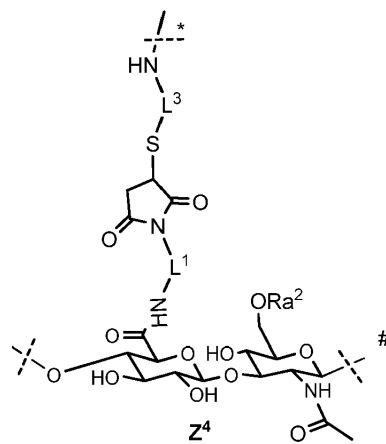
[0133] 최우측 파상선은 L^2 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0134] 최좌측 파상선은 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^2 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0135] 여기서

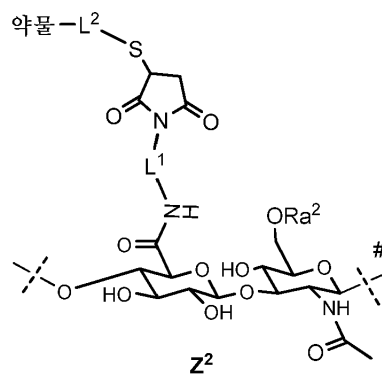
[0136] L^1 은 스페이서이고;

[0137] L^3 은 생분해성 스페이서이다.



[0138] 특정 실시양태에서, 단위 Z^4 는
된 바와 같다.

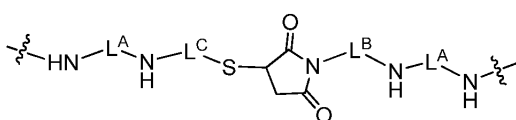
이고; 여기서 L^1 , L^3 및 Ra^2 는 본원에 정의



[0139] 특정 실시양태에서, 단위 Z^2 는
정의된 바와 같다.

이고; 여기서 L^1 , L^2 , L^3 및 Ra^2 는 본원에

[0140] 특정 실시양태에서, 히알루론산 중합체 2A를 히알루론산 중합체 2B에 연결하는 스페이서 L^4 는 하기 화학식을 갖는다:



[0141]

[0142] 여기서

[0143] 최우측 파상선은 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^3 에 대한 부착 지점을 나타내고;

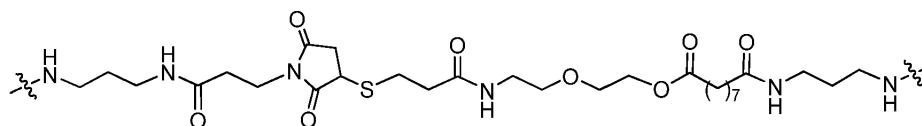
[0144] 최좌측 파상선은 히알루론산 중합체 2A 상의 단위 Z^4 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0145] L^A 는 스페이서이고;

[0146] L^B 는 스페이서이고;

[0147] L^C 는 생분해성 스페이서이다.

[0148] 특정 실시양태에서, 히알루론산 중합체 2A를 히알루론산 중합체 2B에 연결하는 스페이서 L^4 는 하기 화학식을 갖는다:



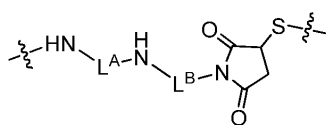
[0149]

[0150] 여기서

[0151] 최우측 파상선은 히알루론산 중합체 2A 상의 단위 Z^3 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0152] 최좌측 파상선은 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^4 에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0153] 특정 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 를 히알루론산 중합체 2A에 연결하는 스페이서 L^4 는 하기 화학식을 갖는다:



[0154]

[0155] 여기서

[0156] 최우측 파상선은 L^2 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0157] 최좌측 파상선은 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^2 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0158] 여기서

[0159] L^A 는 스페이서이고;

[0160] L^B 는 스페이서이고;

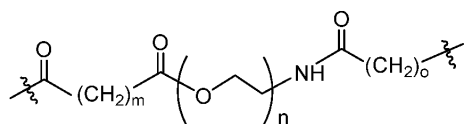
[0161] L^C 는 생분해성 스페이서이다.

[0162] 특정 실시양태에서, L^A 는 임의로 치환되고/거나 임의로 개재된 C_{1-10} 알킬렌이다.

[0163] 특정 실시양태에서, L^A 는 선형 C_{2-4} 알킬렌이다.

[0164] 특정 실시양태에서, L^B 는 선형 $-(O)-C_{1-5}$ 알킬렌이다.

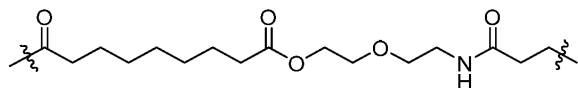
[0165] 특정 실시양태에서, L^c 는 하기이다:



[0166]

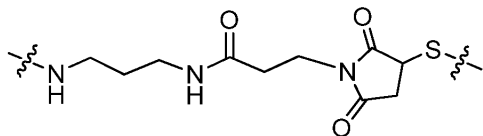
[0167] 여기서 m 은 0 내지 10이고, n 은 1 내지 4이고, o 는 1 내지 4이다.

[0168] 특정 실시양태에서, L^c 는 하기이다:



[0169]

[0170] 특정 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 를 히알루론산 중합체 2B에 연결하는 스페이서 L^4 는 하기 화학식을 갖는다:



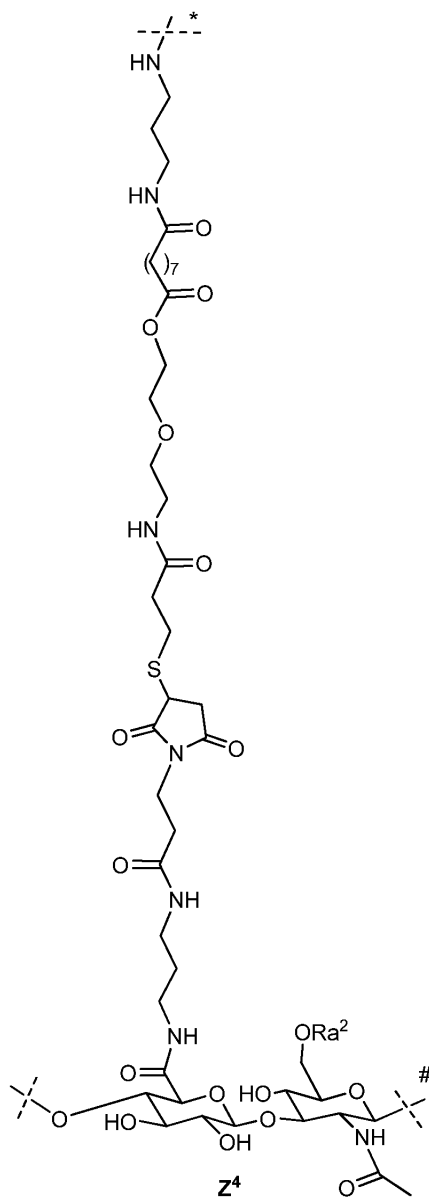
[0171]

[0172] 여기서

[0173] 최우측 파상선은 히알루론산 중합체 2A 상의 단위 Z^3 에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0174] 최좌측 파상선은 히알루론산 중합체 2B 상의 단위 Z^4 에 대한 부착 지점을 나타낸다.

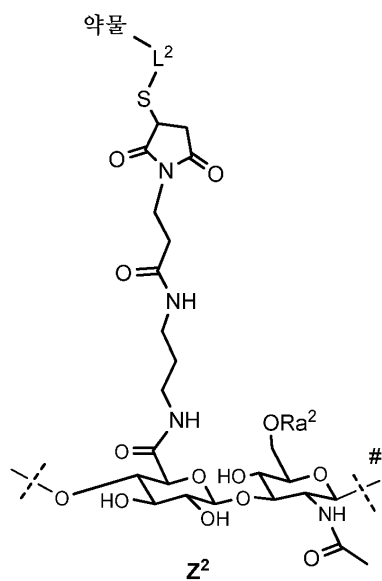
[0175] 특정 실시양태에서, 단위 Z^4 는 하기이다:



[0176]

[0177] 여기서 Ra^2 는 본원에 정의된 바와 같다.

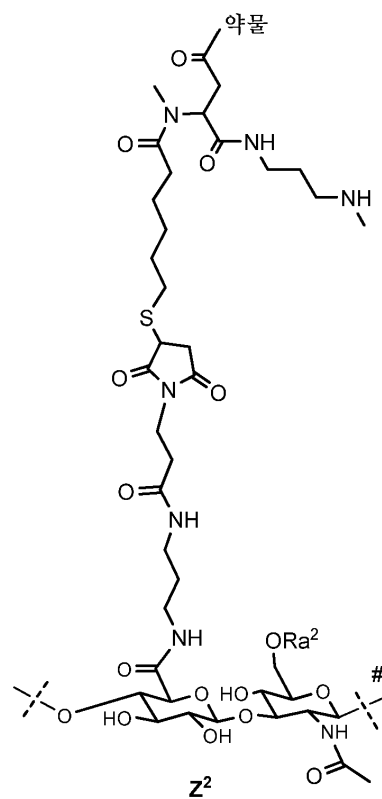
[0178] 특정 실시양태에서, 단위 Z^2 는 하기이고:



[0179]

[0180] 여기서 L^2 , Ra^2 및 약물은 본원에 정의된 바와 같다.

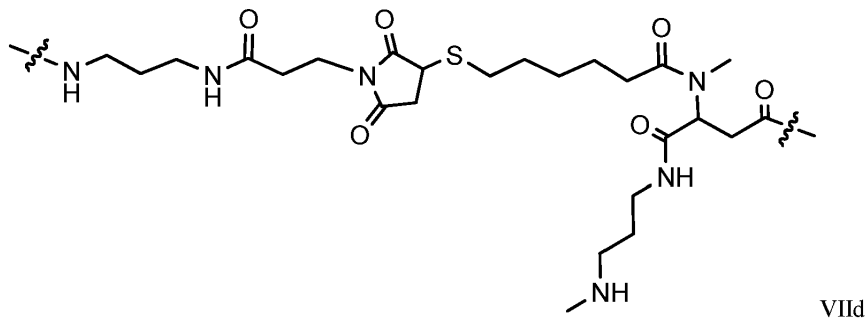
[0181] 특정 실시양태에서, 단위 Z^2 는 하기이고:



[0182]

[0183] 여기서 Ra^2 및 약물은 본원에 정의된 바와 같다.

[0184] 특정 실시양태에서, 스페이서 L^4 와 함께 합해진 가역적 전구약물 링커 L^2 는 화학식 VIId를 갖는다:



[0185]

[0186] 여기서

[0187] 최우측 파상선은 약물의 질소 원자에 대한 부착 지점을 나타내고;

[0188] 최좌측 파상선은 히알루론산 2B의 단위 Z^2 에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0189] 특정 실시양태에서, 약물은 항체이다.

[0190] 특정 실시양태에서, 항체는 VEGF 길항제이다.

[0191] 특정 실시양태에서, 항체는 항-VEGF 항체 단편이다.

[0192] 특정 실시양태에서, 항체 단편은 Fab 항체 단편이다.

[0193] 특정 실시양태에서, Fab 항체 단편은 라니비주맙 또는 루센티스(LUCENTIS)®이다.

[0194] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 6개의 초가변 영역 (HVR)을 포함한다:

[0195] (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0196] (b) $GX_1TPX_2GGX_3X_4X_5YX_6DSVX_7X_8$ (서열식별번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 Ile 또는 His이고, X_2 는 Ala 또는 Arg이고, X_3 은 Tyr 또는 Lys이고, X_4 는 Thr 또는 Glu이고, X_5 는 Arg, Tyr, Gln 또는 Glu이고, X_6 은 Ala 또는 Glu이고, X_7 은 Lys 또는 Glu이고, X_8 은 Gly 또는 Glu인 HVR-H2;

[0197] (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0198] (d) RASQX₁VSTAVA (서열식별번호: 4)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 Asp 또는 Arg인 HVR-L1;

[0199] (e) X_1 ASFLYS (서열식별번호: 5)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 Ser 또는 Met인 HVR-L2; 및

[0200] (f) X_1 QGYGX₂PFT (서열식별번호: 6)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 Gln, Asn 또는 Thr이고, X_2 는 Ala, Asn, Gln 또는 Arg인 HVR-L3.

[0201] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다:

[0202] (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0203] (b) GITPAGGYTRYADSVKG (서열식별번호: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (서열식별번호: 21) 또는 GITPAGGYEYYADSVKG (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

[0204] (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0205] (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0206] (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0207] (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10) 또는 QQGYGNPFT (서열식별번호: 23)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0208] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다:

- [0209] (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0210] (b) GITPAGGYTRYADSVKG (서열식별번호: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0211] (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0212] (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0213] (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0214] (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0215] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 중쇄 가변 (VH) 도메인 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함한다:
- [0216] (a) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열식별번호: 13)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1;
- [0217] (b) WVRQAPGKGLEWVA (서열식별번호: 14)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2;
- [0218] (c) RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 15)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및
- [0219] (d) WGQGTLLTVSS (서열식별번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.
- [0220] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 경쇄 가변 (VL) 도메인 FR을 추가로 포함한다:
- [0221] (a) DIQMTQSPSSLASVGDRTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1;
- [0222] (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2;
- [0223] (c) GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및
- [0224] (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.
- [0225] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다:
- [0226] (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0227] (b) GITPAGGYEYADSVEG (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0228] (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0229] (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0230] (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0231] (f) QQGYGNPFT (서열식별번호: 23)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0232] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 VL 도메인 FR을 추가로 포함한다:
- [0233] (a) DIQMTQSPSSLASVGDRTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1;
- [0234] (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2;
- [0235] (c) GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (서열식별번호: 24)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및
- [0236] (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.
- [0237] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다:
- [0238] (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0239] (b) GITPAGGYEYADSVEG (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0240] (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0241] (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0242] (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0243] (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.
- [0244] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 VL 도메인 FR을 추가로 포함한다:

- [0245] (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC (서열식별번호: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVITIC (서열식별번호: 25) 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDEVITIC (서열식별번호: 26)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1;
- [0246] (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18) 또는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 27)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2;
- [0247] (c) GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19) 또는 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 28)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및
- [0248] (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.
- [0249] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 VH 도메인 FR을 추가로 포함한다:
- [0250] (a) EEQLVEEGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (서열식별번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1;
- [0251] (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2;
- [0252] (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및
- [0253] (d) WGQGELVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.
- [0254] 특정 실시양태에서, 항체는 하기 VH 도메인 FR을 추가로 포함한다:
- [0255] (e) EEQLVEEGGLVQPGESLELSCAASGFEIS (서열식별번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 52)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1;
- [0256] (f) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2;
- [0257] (g) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및
- [0258] (h) WGQGELVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.
- [0259] 특정 실시양태에서, 항체는 (a) 서열식별번호: 11, 40 또는 42의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 서열식별번호: 12, 41 또는 46의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다.
- [0260] 특정 실시양태에서, 항체는 (a) 서열식별번호: 11, 40 또는 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 서열식별번호: 12, 41 또는 46의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다.
- [0261] 특정 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0262] 특정 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0263] 특정 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0264] 특정 실시양태에서, 항체-히드로겔 접합체는 히드로겔에 공유 부착되지 않는 참조 항체에 비해 증가된 안구 유효 반감기를 갖는다.
- [0265] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 참조 항체에 비해 적어도 약 2배 증가된다.
- [0266] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 참조 항체에 비해 적어도 약 5배 증가된다.
- [0267] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 참조 항체에 비해 적어도 약 8배 증가된다.
- [0268] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 참조 항체에 비해 적어도 약 10배 증가된다.
- [0269] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 참조 항체에 비해 적어도 약 12배 증가된다.
- [0270] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 참조 항체에 비해 적어도 약 15배 증가된다.

- [0271] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 참조 항체에 비해 적어도 약 16배 증가된다.
- [0272] 특정 실시양태에서, 안구 유효 반감기는 유리체 반감기이다.
- [0273] 특정 실시양태에서, 참조 항체는 항체 접합체의 항체와 동일하다.
- [0274] 특정 실시양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 대상체에서 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에서 사용하기 위한, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는데 사용하기 위한, 및/또는 대상체에서 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물을 제공한다.
- [0275] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 히드로겔 접합체 및 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함한다.
- [0276] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 제2 작용제를 추가로 포함하며, 여기서 제2 작용제는 항체, 항혈관신생제, 시토킴, 시토킴 길항제, 코르티코스테로이드, 진통제, 및 제2 생물학적 분자에 결합하는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0277] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 제2 작용제를 추가로 포함하며, 여기서 제2 작용제는 항체, 항혈관신생제, 시토킴, 시토킴 길항제, 코르티코스테로이드, 진통제, 및 제2 생물학적 분자에 결합하는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0278] 특정 실시양태에서, 제약 조성물의 항혈관신생제는 VEGF 길항제이다.
- [0279] 특정 실시양태에서, 제약 조성물의 VEGF 길항제는 항-VEGF 항체, 항-VEGF 수용체 항체, 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질, 압타머, 항-VEGF DARPIn® 또는 VEGFR 티로신 키나제 억제제이다.
- [0280] 특정 실시양태에서, 제약 조성물의 항-VEGF 항체는 라니비주맙 (루센티스®), RTH-258 또는 이중특이적 항-VEGF 항체이다.
- [0281] 특정 실시양태에서, 이중특이적 항-VEGF 항체는 항-VEGF/항-Ang2 항체이다.
- [0282] 특정 실시양태에서, 항-VEGF/항-Ang2 항체는 RG-7716이다.
- [0283] 특정 실시양태에서, 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질은 아플리베르셉트 (아일리아(EYLEA)®)이다.
- [0284] 특정 실시양태에서, 압타머는 폐갑타닙 (마큐젠(MACUGEN)®)이다.
- [0285] 특정 실시양태에서, 항-VEGF DARPIn®은 아비시파르 폐골이다.
- [0286] 특정 실시양태에서, VEGFR 티로신 키나제 억제제는 4-(4-브로모-2-플루오로아닐리노)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라닙 (PTK787), 세막사닙 (SU5416) 및 수텐트(SUTENT)® (수니티닙)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0287] 특정 실시양태에서, 제2 생물학적 분자는 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 안지오프이에틴; 안지오프이에틴 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 및 α 5 β 1; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트르포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 및 AMD 위험과 유전적으로 연관된 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0288] 특정 실시양태에서, VEGF 수용체는 VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR 또는 sVEGFR이다.
- [0289] 특정 실시양태에서, AMD 위험과 유전적으로 연관된 단백질은 보체 경로 성분 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC, COL10A1; 및 TNFRSF10A로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0290] 특정 실시양태에서, 제2 생물학적 분자에 결합하는 화합물은 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.
- [0291] 특정 실시양태에서, 항원-결합 항체 단편은 Fab, Fab-C, Fab'-SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0292] 특정 실시양태에서, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애이다.
- [0293] 특정 실시양태에서, 안구 장애는 연령-관련 황반 변성 (AMD), 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME)

(초점성, 비-중심 DME 및 미만성, 중심-침범 DME 포함), 망막병증, 당뇨병성 망막병증 (DR) (증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR) 및 높은-고도 DR 포함), 다른 허혈-관련 망막병증, 미숙아 망막병증 (ROP), 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태 포함), CNV (근시성 CNV 포함), 각막 신생혈관화, 각막 신생혈관화와 연관된 질환, 망막 신생혈관화, 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 질환, 병리학적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, 가족성 삼출성 유리체망막병증 (FEVR), 코우즈병, 노리병, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압성 망막병증, 망막 혈관종성 증식, 황반 모세혈관확장증, 홍채 신생혈관화, 안내 신생혈관화, 망막 변성, 낭포양 황반 부종 (CME), 혈관염, 유두부종, 망막염, 결막염 (감염성 결막염 및 비-감염성 (예를 들어, 알레르기성) 결막염 포함), 레베르 선천성 흑암시, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염, 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조, 외상성 눈 손상 및 쇼그렌병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0294] 특정 실시양태에서, 안구 장애는 AMD, DME, DR 또는 RVO이다.
- [0295] 특정 실시양태에서, 안구 장애는 AMD이다.
- [0296] 특정 실시양태에서, AMD는 습성 AMD이다.
- [0297] 특정 실시양태에서, 본 발명은 치료량의 본원에 기재된 제약 조성물의 용액을 투여하는 것을 포함하는, 안구 적응증을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0298] 특정 실시양태에서, 제약 조성물의 투여는 안내 투여이다.
- [0299] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 대상체의 유리체 내로 주사된다.
- [0300] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 또는 32의 계이지를 갖는 바늘을 사용하여 주사된다.
- [0301] 특정 실시양태에서, 안구 적응증은 연령-관련 황반 변성 (AMD), 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME) (초점성, 비-중심 DME 및 미만성, 중심-침범 DME 포함), 망막병증, 당뇨병성 망막병증 (DR) (증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR) 및 높은-고도 DR 포함), 다른 허혈-관련 망막병증, 미숙아 망막병증 (ROP), 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태 포함), CNV (근시성 CNV 포함), 각막 신생혈관화, 각막 신생혈관화와 연관된 질환, 망막 신생혈관화, 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 질환, 병리학적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, 가족성 삼출성 유리체망막병증 (FEVR), 코우즈병, 노리병, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압성 망막병증, 망막 혈관종성 증식, 황반 모세혈관확장증, 홍채 신생혈관화, 안내 신생혈관화, 망막 변성, 낭포양 황반 부종 (CME), 혈관염, 유두부종, 망막염, 결막염 (감염성 결막염 및 비-감염성 (예를 들어, 알레르기성) 결막염 포함), 레베르 선천성 흑암시, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염, 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조, 외상성 눈 손상 및 쇼그렌병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0302] 특정 실시양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 히드로겔 약물 접합체의 제조 방법을 제공한다:
- [0303] (a) 적어도 3개의 제1 반응성 기를 갖는 제1 히알루론산 또는 그의 알칼리 금속 염 또는 유도체를 제공하는 단계;
- [0304] (b) 적어도 2개의 제2 반응성 기를 갖는 제2 히알루론산 또는 그의 알칼리 금속 염 또는 유도체를 제공하는 단계이며, 여기서 제1 및 제2 반응성 기는 서로 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 것인 단계;
- [0305] (c) 적어도 1종의 약물을 제1 반응성 기 중 하나에 커플링시키는 단계; 및
- [0306] (d) 제1 반응성 기와 제2 반응성 기의 반응에 의해 제1 히알루론산과 제2 히알루론산을 가교시켜 가교제를 형성하고 히드로겔 접합체를 형성하는 단계.
- [0307] 특정 실시양태에서, 약물을 가역적 전구약물 링커를 통해 제1 히알루론산에 커플링시킨다.
- [0308] 특정 실시양태에서, 약물을 가역적 전구약물 링커에 커플링시키고 정제하여 정제된 약물-가역적 전구약물 링커 접합체를 형성한 후에 제1 히알루론산과 커플링시키며, 여기서 약물-가역적 전구약물 링커 접합체는 하기 단계에 의해 정제한다:
- [0309] (a) 약물-가역적 전구약물 링커 접합체를 정제 태그로 태그부착하여 태그부착된 약물-가역적 전구약물 링커 접합체 혼합물을 형성하는 단계;

- [0310] (b) 태그부착된 약물-가역적 전구약물 링커 단일접합체를 크로마토그래피 분리에 의해 혼합물로부터 정제하는 단계; 및
- [0311] (c) 정제 태그를 태그부착된 약물-가역적 전구약물 링커 단일접합체로부터 제거하여 정제된 약물-가역적 전구약물 링커 접합체를 형성하는 단계.
- [0312] 특정 실시양태에서, 가교제는 생분해성 스페이서 모이어티를 포함한다.
- [0313] 특정 실시양태에서, 가교제는 아젤라산 에스테르 모이어티를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0314] 도 1은 본 발명에 따른 가교된 히알루론산 약물 접합체이다.
- 도 2는 말레이미드 관능화된 히알루론산 (HA) 및 접합된 약물을 갖는 말레이미드 관능화된 히알루론산의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 3은 보호된 티올 관능화된 히알루론산, 티올 관능화된 히알루론산 및 가교된 히알루론산 전구약물 조성물의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 4는 말레이미드 관능화된 히알루론산 및 보호된 디설피드 관능화된 히알루론산의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 5는 티올 관능화된 히알루론산, 접합된 약물을 갖는 티올 관능화된 히알루론산 및 가교된 히알루론산 전구약물 조성물의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 6은 아민 관능화된 히알루론산의 제조 및 그로부터의 말레이미드 관능화된 히알루론산의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 7은 말레이미드 관능화된 히알루론산 및 접합된 약물을 갖는 말레이미드 관능화된 히알루론산을 보여주는 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 8은 아민 관능화된 히알루론산, 보호된 디설피드 관능화된 히알루론산 및 티올 관능화된 히알루론산의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 9는 가교된 히알루론산 전구약물 조성물의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 10은 가교된 히알루론산 전구약물 조성물의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 11은 가교된 히알루론산 전구약물 조성물의 제조에 대한 본 개시내용의 한 측면에 따른 반응식이다.
- 도 12는 NZW 토끼에서 가교된 HA RabFab로부터의 방출 후 RabFab 유리체 PK (적색 점 및 선)를 유리 RabFab의 경우 (청색 점 및 선)와 비교하여 보여준다.
- 도 13A 및 13B는 NHP 눈에서의 가교된 HA 히드로겔 위약의 최소 단편화 및 입자 이동을 보여주는 예시이다.
- 도 14는 가교된 HA 히드로겔 Rabfab 접합체의 토끼 눈에서의 내약성을 예시한다.
- 도 15는 가교된 HA G6.3.1 AAR 접합체의 시물구스 마카크 눈에서의 내약성을 예시한다.

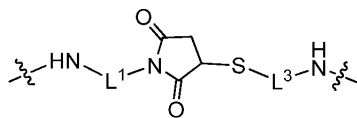
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0315] 일부 측면에서, 본 개시내용은 일반적으로 가교된 히알루론산 (HA) 또는 그의 유도체 또는 염을 포함하며, 여기서 가교제 시스템은 생분해성 스페이서를 포함하고, 가교된 HA는 접합된 약물-링커를 포함하고, 링커는 생리학적 조건 하에 약물을 방출시킬 수 있는 것인 히드로겔 전구약물 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 일부 이러한 측면에서, 본 개시내용의 히드로겔 HA 전구약물 조성물은 각각 도 1, 3, 5 및 9에 제시된 바와 같은 화학식 1, 10, 16 및 26을 갖는다. 본원의 화학식, 구조 및 반응식에서, 탄소, 질소, 산소 또는 황 원자 상의 임의의 개방 원자가는 수소 원자를 나타내는 것으로 이해되어야 한다.
- [0316] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 가교된 HA 약물 접합체 화합물 1이 제시된다. 화합물 1은 하기에 추가로 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 화합물 1에서, 된 약물 모이어티는 본원에 추가로 기재된 바와 같은 가역적 전구약물 링커 모이어티인 링커 L^2 및 스페이서 L^4 를 통해 HA 모이어티에 연결된다. 약물 모이어티는 본원에 또

한 추가로 기재된 바와 같은 임의의 치료적 또는 생물학적 활성 모이어티를 포함할 수 있다. HA 모이어티는 스페이서 L^4 에 의해 함께 연결되거나 가교되고, L^2 -약물 모이어티는 스페이서 L^4 에 의해 HA 모이어티에 연결된다. 스페이서 L^4 는 각 경우에 동일하거나 상이할 수 있고, 많은 실시양태에서 본원에 추가로 기재된 바와 같이 생분해성일 수 있다.

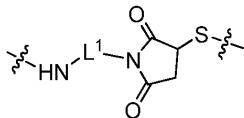
[0317] 스페이서 L^4 는 HA 모이어티를 가교시키고 L^2 -약물 모이어티를 HA 모이어티에 부착시키는데 사용되는 화학의 유형에 따라 달라질 수 있다. 많은 실시양태에서, 본 발명의 가교된 HA 약물 접합체는 티올-말레이미드 화학에 기초하고, 따라서 스페이서 L^4 는 티올 및 말레이미드의 반응으로부터 생성된 티오숙신이미드 기를 포함한다. 그러나, 본 발명에 따라, HA 모이어티를 가교시키고 L^2 -약물 모이어티를 HA 모이어티에 부착시키는데 다양한 유형의 화학이 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 하며, 이는 본 개시내용의 범주 내에 있다. 예를 들어, WO2003101972, WO2011136645, WO2013036748 및 WO2013171485 (이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 바와 같은 알킨과 아지드와의 반응에 기초한 "클릭" 화학이 HA 모이어티를 가교시키고 L^2 -약물 모이어티를 HA 모이어티에 부착시키는데 사용될 수 있다. 아크릴계 가교 화학, 아민-에폭시드 가교 화학 및 다른 연결 형성 화학이 또한 본 발명과 함께 사용될 수 있다.

[0318] 또한 도 2 및 3을 참조하면, 본 발명에 따른 가교된 HA 약물 접합체 히드로겔 화합물 10 (도 3)이 제시된다. 화합물 10에서, HA 모이어티들을 서로 연결하는 화합물 1의 스페이서 L^4 는 보다 구체적으로 하기와 같이 제시되고:



[0319]

[0320] L^2 -약물 모이어티를 HA 모이어티에 연결하는 스페이서 L^4 는 보다 구체적으로 하기와 같이 제시되고:



[0321]

[0322] 여기서 L^1 및 L^3 은 본원에 정의된 바와 같다. 일반적으로, 화합물 10은 도 2 및 3에 도시된 방법에 따라 제조될 수 있다. 제1 단계에서, 제1 HA 화합물 2 (또는 그의 유도체 또는 염)는 말레이미드 화합물 3과 접합되어 스페이서 L^1 에 의해 HA에 접합된 말레이미드 반응성 기를 포함하는 화합물 4를 형성한다.

[0323] 제2 단계에서, 티올- L^2 -약물 접합체 화합물 5는 화합물 4의 말레이미드 반응성 기와 반응하여 접합된 $-S-L^2$ -약물 접합체 모이어티를 포함하는 화합물 6을 형성한다. 일부 측면에서, L^2 는 생리학적 조건 하에 약물을 제어 방출시킬 수 있는, 본원 다른 곳에 추가로 기재된 바와 같은 가역적 전구약물 링커 모이어티이다. 화합물 5에서의 티올 기는 가역적 전구약물 링커 L^2 의 일부일 수 있다. 일부 측면에서, 약물은 눈에서의 질환의 치료에 유용한 치료제, 예컨대 항-VEGF 분자이다. 화합물 4 상의 말레이미드 기의 당량은 약물 접합체 화합물 5의 당량을 초과하여 화합물 6이 유리 말레이미드 기를 포함한다.

[0324] 제3 단계에서, 제2 HA 화합물 2 (또는 그의 유도체 또는 염)는 보호된 (보호기 PG로 제시됨) 티올 화합물 7과 함께 접합되어 스페이서 L^3 에 의해 HA에 접합된 보호된 티올 기를 포함하는 화합물 8을 형성한다. 일부 측면에서, L^3 은 생분해성 스페이서 모이어티이다.

[0325] 제4 단계에서, 화합물 8의 보호기는 제거되어 티올 기를 갖는 화합물 9를 생성한다. 특정 실시양태에서, 보호기는 티올 기와 디설피드를 형성할 수 있어 보호기의 제거가 환원제를 사용하여 달성될 수 있다.

[0326] 제5 단계에서, 화합물 6과 화합물 9는 합해지고 반응하여 가교된 HA 히드로겔 전구약물 화합물 10을 형성한다.

[0327] 도면에 제시된 바와 같은 말레이미드 및 티올의 관능화도는 단지 예시적인 것이고, HA 화합물 2에서의 카르복실

레이트 기 모두가 반응을 겪지는 않는 것으로 이해되어야 하며, 대부분의 실시양태에서 카르복실레이트 기 대다수는 미반응한다. 도 2에서 말레이미드 관능화된 HA 화합물 4는 충분한 관능화도를 가져, 화합물 4에서의 말레이미드 관능기의 한 부분은 약물의 부착에 이용가능하고 (화합물 6에 제시된 바와 같음) 나머지 말레이미드 기는 화합물 9의 티올 기와 가교 반응을 겪는데 이용가능하여, 궁극적으로 본 발명에 따른 가교된 HA 히드로겔 전구약물 조성물 10을 제공할 것이다. 예를 들어, 화합물 4의 말레이미드 관능화도는 약 5% 내지 약 15%의 범위일 수 있는 반면, 티올 화합물 9의 관능화도는 약 1% 내지 약 7%의 범위일 수 있다.

[0328] 특정 실시양태에서, HA 화합물 4의 말레이미드에 의한 관능화도는 약 6% 내지 약 14%, 약 7% 내지 약 13%, 약 8% 내지 약 12%, 약 10% 내지 약 12%, 및 약 9% 내지 약 11%의 범위일 수 있다. 도 3에 제시된 바와 같은 HA 화합물 9의 티올에 의한 관능화도는, 예를 들어 약 1% 내지 약 7%, 약 2% 내지 약 6%, 및 약 3% 내지 약 5%로 달라질 수 있다.

[0329] 특정 실시양태에서, 도 2에 제시된 바와 같은 HA 화합물 4 상의 말레이미드 관능화도는 약 10%여서, 제1 HA 화합물 2 상의 10개의 카르복실레이트 기 중 약 1개가 말레이미드로 유도체화될 수 있다. 다시 말해서, HA 화합물 2가 그 상에 x개수의 카르복실레이트 기를 갖는다면, 화합물 4는 0.1x개의 말레이미드 기를 포함한다. 도 3에 제시된 바와 같은 HA 화합물 9 상의 티올 관능화도는 약 4%일 수 있거나, 또는 HA 화합물 2 상의 x개의 카르복실레이트 기의 경우, 화합물 9 상에 0.04x개의 티올 기 (및 상응하게 화합물 8 상에 0.04x개의 보호된 티올 기)가 존재한다.

[0330] 화합물 6에서, 평균적으로 말레이미드의 약 77%가 약물로 치환될 것이고, 한편 나머지 대략 23%는 화합물 9와의 가교 반응에 사용되어 가교된 겔 10을 제공한다. 따라서, 예를 들어, 말레이미드로 10% 관능화된 116 kDa HA는 그 상에 대략 28개의 말레이미드 기가 존재할 것이고, 그 중 대략 22개의 말레이미드 기가 약물에 의해 다루어질 것이다.

[0331] 이제 도 4 및 5를 참조하면, 화합물 16의 제조가 제시된다.

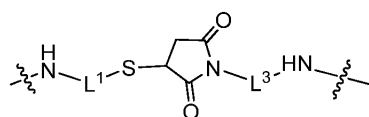
[0332] 제1 단계에서, 제1 HA 화합물 2 (또는 그의 유도체 또는 염)는 말레이미드 화합물 3과 접합되어 스페이서 L^3 에 의해 HA에 접합된 말레이미드 반응성 기를 포함하는 화합물 11을 형성한다.

[0333] 제2 단계에서, 제2 HA 화합물 2 (또는 그의 유도체 또는 염)는 보호된 (PG) 디설피드 화합물 7과 접합되어 스페이서 L^1 에 의해 HA에 접합된 보호된 디설피드 기를 포함하는 화합물 12를 형성한다. 일부 측면에서, L^1 은 생분해성 스페이서 모이어티이다.

[0334] 제3 단계에서, 화합물 12의 보호기는 제거되어 티올 기를 갖는 화합물 13을 생성한다.

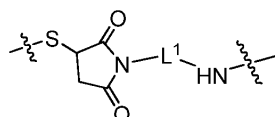
[0335] 제4 단계에서, 말레이미드- L^2 -약물 접합체 화합물 14는 화합물 13의 티올 반응성 기와 반응하여 접합된 약물 모이어티를 포함하는 화합물 15를 형성한다. 티올 기의 당량은 화합물 14의 당량을 초과하여 화합물 15가 유리 티올 기를 포함한다. 일부 측면에서, L^2 는 생리학적 조건 하에 약물을 제어 방출시킬 수 있는 가역적 전구약물 링커 모이어티이다. 일부 측면에서, 약물은 항-VEGF 분자이다.

[0336] 단계 5에서, 화합물 11과 화합물 15는 합해져 각각 그 상의 유리 말레이미드 기와 유리 티올 기가 반응하여 가교된 HA 히드로겔 전구약물 화합물 16을 형성한다. 화합물 16에서, HA 모이어티들을 서로 연결하는 도 1에 제시된 바와 같은 스페이서 L^4 는 보다 구체적으로 하기에 의해 나타내어지고:



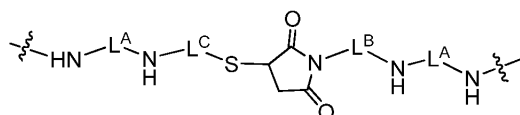
[0337]

[0338] L^2 -약물 모이어티를 HA 모이어티에 연결하는 스페이서 L^4 는 보다 구체적으로 하기로 나타내어진다:



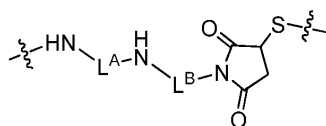
[0339]

- [0340] 여기서 L^1 및 L^3 은 본원에 정의된 바와 같다.
- [0341] 상기 기재된 바와 같이, 도면에 제시된 바와 같은 HA 화합물 2 상의 카르복실레이트 기의 관능화도는 임의적이고 예시적 목적을 위한 것이다. 티올 관능화된 HA 화합물 13 (및 보호된 티올 관능화된 화합물 12)은 말레이미드 관능화된 HA 화합물 11보다 더 높은 관능화도를 가질 것이다. 화합물 13에서의 티올 관능기의 한 부분은 약물의 부착에 사용될 것이고 나머지 티올 기는 화합물 11의 말레이미드 기와 가교 반응을 겪는데 이용가능하여 가교된 HA 히드로겔 전구약물 조성물 16을 제공한다. 예를 들어, 화합물 13의 티올 관능화도는 약 5% 내지 약 15%의 범위일 수 있고, 한편 말레이미드 화합물 11의 관능화도는 약 1% 내지 약 7%의 범위일 수 있다. 티올 및 말레이미드 관능화도의 변동은 상기 기재된 바와 같은 본 발명의 생체접합체에서 약물의 상이한 가교 밀도 및 상이한 로딩 정도를 가능하게 한다.
- [0342] 일부 측면에서, 도 6 내지 9에 도시된 바와 같이, 가교된 HA 히드로겔 전구약물은 (1) 제1 아민 관능화된 HA의 제조 및 그로부터 말레이미도-관능화된 HA의 제조, (2) 제2 아민 관능화된 HA의 제조 및 그로부터 티올-관능화된 HA의 제조, (3) 약물-링커 접합체의 말레이미도-관능화된 HA에 대한 접합 (여기서 말레이미도 기의 한 부분은 약물-링커 접합체와 접합되지 않음), 및 (4) 제1 관능화된 HA 상의 말레이미도 기와 제2 관능화된 HA 상의 티올 기와의 반응에 의한 가교된 HA 히드로겔 전구약물의 형성에 의해 제조될 수 있다.
- [0343] 도 6, 단계 1에서, 제1 히알루론산나트륨 화합물 2 (또는 그의 산 형태 또는 유도체)는 $H_2N-L^A-NH_2$ 화합물 17과 반응하여 아민 관능화된 HA 화합물 18을 형성하고, 여기서 HA의 아민 관능화도는 약 5% 내지 약 15%, 약 6% 내지 약 14%, 약 7% 내지 약 13%, 약 8% 내지 약 12%, 약 9% 내지 약 11%, 또는 일부 실시양태에서, 약 10%; 약 11%; 또는 약 12%이다. 일부 측면에서, L^A 는 본원에 정의된 바와 같은 스페이서 모이어티이다.
- [0344] 도 6, 단계 2에 도시된 바와 같이, 화합물 18은 N-히드록시숙신이미드- L^B 말레이미드 화합물 19와 반응하여 도 7에 도시된 말레이미도-관능화된 HA 화합물 20을 형성한다. 일부 측면에서, L^B 는 시약 19의 숙신이미드 부분과 활성화된 에스테르를 형성하는 스페이서 모이어티이다.
- [0345] 도 7, 단계 3에 도시된 바와 같이, 화합물 20은 티올 약물 접합체 화합물 5와 반응하여 전구약물 전구체 화합물 21을 형성한다. L^2 는 본원에 정의된 바와 같은 가역적 전구약물 링커이다.
- [0346] 도 8, 단계 4에 제시된 바와 같이, 제2 히알루론산나트륨 화합물 2 (또는 그의 산 형태 또는 유도체)는 $H_2H-L^A-NH_2$ 화합물 17과 반응하여 아민-관능화된 HA (화합물 22)를 형성하고, 여기서 HA의 아민 관능화도는 약 1% 내지 약 7%, 약 2% 내지 약 6%, 약 3% 내지 약 5%, 및 특정 실시양태에서 4%로 달라질 수 있다.
- [0347] 도 8, 단계 5에 추가로 도시된 바와 같이, 화합물 22는 N-히드록시숙신이미드- L^C -S보호기 ("PG"로서 제시된 보호기) 화합물 23과 반응하여 화합물 24를 형성한다. 이어서, 화합물 24는 단계 6에서 탈보호되어 보호기를 제거하고 티올-관능화된 HA 화합물 25를 형성한다. 일부 측면에서, L^C 는 시약 23의 숙신이미드 부분과 활성화된 에스테르를 형성하는 생분해성 스페이서 모이어티이다. 도 9에 도시된 바와 같이, 전구약물 전구체 화합물 21은 티올-관능화된 HA 화합물 25와 가교되어 가교된 HA 히드로겔 전구약물 조성물 26을 형성한다. 화합물 26에서, HA 모이어티들을 서로 연결하는 도 1에 제시된 바와 같은 스페이서 L^4 는 보다 구체적으로 하기에 의해 나타내어지고:



[0348]

[0349] L^2 -약물 모이어티를 HA 모이어티에 연결하는 스페이서 L^4 는 보다 구체적으로 하기로서 나타내어진다:



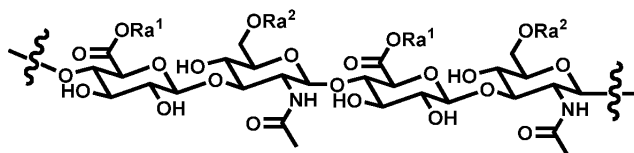
[0350]

[0351] 여기서 L^A , L^B 및 L^C 는 본원에 정의된 바와 같다.

[0352] 상기 기재한 도 2-3의 실시양태에서와 같이, 도 6-9의 실시양태에서, 도 7에서의 말레이미드 관능화된 HA 화합물 20은 도 8에서의 티올 관능화된 HA 화합물 25보다 더 높은 관능화도를 가질 것이다. 화합물 20에서의 말레이미드 관능기의 한 부분은 약물의 부착에 사용될 것이고 (화합물 21에 제시된 바와 같음) 나머지 말레이미드기는 화합물 25의 티올 기와 가교 반응을 겪는데 이용가능하여 본 발명에 따른 가교된 HA 히드로겔 전구약물 조성물 26을 제공한다. 말레이미드 및 티올 기의 관능화도의 범위 및 값, 가교 밀도에 대한 범위 및 값, 및 본원 다른 곳에서의 관련된 약물 로딩에 대한 범위 및 값은 또한 도 6-9의 실시양태에 적용된다.

[0353] 정의

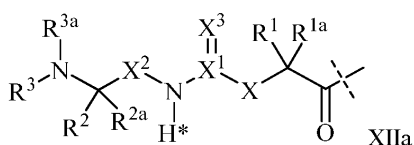
[0354] 본원에 사용된 히알루론산 (HA)은 HA 및 그의 임의의 유도체 및 염을 지칭한다. 특정 실시양태에서, HA는 하기 화학식을 가질 수 있다:



[0355]

[0356] 여기서 Ra^1 및 Ra^2 는 각각 독립적으로 수소, 저급 알킬 또는 다른 에스테르 형성 기, 금속 또는 암모늄 (모노-, 디-, 트리- 및 테트라-알킬 암모늄 포함) 반대 이온 또는 다른 유형의 반대 이온을 나타낸다. 특정 실시양태에서, Ra^1 은 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬 및 알칼리 금속 반대-이온으로부터 선택되고, 각각의 Ra^2 는 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬 및 알칼리 금속 반대-이온으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 각각의 Ra^1 은 Na^+ 이고, 각각의 Ra^2 는 H이다. 상기 나타낸 바와 같은 HA의 일부 가능한 유도체에서, 히드록실 기는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬 에테르 (나타내지 않음) 또는 C_{1-4} 알킬 에스테르 (나타내지 않음)로 대체될 수 있고, 각각의 아미드 관능기의 질소 원자는 임의로 C_{1-4} 알킬 (또한 나타내지 않음)로 치환될 수 있다. HA 수 평균 분자량은 약 10 kDa, 약 25 kDa, 약 50 kDa, 약 75 kDa, 약 100 kDa, 약 125 kDa, 약 150 kDa, 약 175 kDa, 약 200 kDa, 약 225 kDa, 약 250 kDa, 약 275 kDa, 약 300 kDa, 약 325 kDa, 약 350 kDa, 약 375 kDa, 약 400 kDa, 약 425 kDa, 약 450 kDa, 약 475 kDa, 약 500 kDa, 약 550 kDa, 약 600 kDa, 약 650 kDa, 약 700 kDa, 및 그의 범위, 예컨대 약 10 kDa 내지 약 1000 kDa, 약 25 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 175 kDa, 약 100 kDa 내지 약 150 kDa, 또는 약 100 kDa 내지 약 125 kDa이다.

[0357] 용어 "가역적 전구약물 링커" 또는 간단히 "링커"는 그의 한 말단 상에서 가역적 연결을 통해 약물, 예를 들어 VEGF 중화 약물에 부착되고 또 다른 말단 상에서 영구 결합을 통해 담체, 예컨대 본 발명에 따른 히드로겔에 부착되어 약물을 담체에 연결시키는 모이어티를 지칭한다. 본 발명에 사용가능한 예시적 가역적 전구약물 링커는 W02009095479에 개시되어 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 이러한 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커는 화학식 XIIa의 기이다:



[0358]

[0359] 여기서

- [0360] 파선은 아미드 결합 형성에 의한 약물 화합물 (나타내지 않음)의 질소에 대한 부착을 나타내고;
- [0361] $-X-$ 는 $-C(R^{4_{4a}})R^{4_{4a}}-$; $-N(R^{4_{4a}})R^{4_{4a}}-$; $-O-$; $-C(R^{4_{4a}})R^{5_{5a}}-$; $-C(R^{5_{5a}})R^{4_{4a}}-$; $-C(R^{4_{4a}})N(R^{6_{6a}})R^{6_{6a}}-$; $-N(R^{6_{6a}})C(R^{4_{4a}})R^{4_{4a}}-$; $-C(R^{4_{4a}})O-$; $-O-C(R^{4_{4a}})R^{4_{4a}}-$; 또는 $-C(R^{7_{7a}})R^{7_{7a}}-$ 이고;
- [0362] X^1 은 C; 또는 S(O)이고;
- [0363] $-X^2-$ 는 $-C(R^{8_{8a}})R^{8_{8a}}-$; 또는 $-C(R^{8_{8a}})R^{9_{9a}}-$ 이고;
- [0364] $=X^3$ 은 $=O$; $=S$; 또는 $=N-CN$ 이고;
- [0365] $-R^1$, $-R^{1a}$, $-R^2$, $-R^{2a}$, $-R^4$, $-R^{4a}$, $-R^5$, $-R^{5a}$, $-R^6$, $-R^8$, $-R^{8a}$, $-R^9$, $-R^{9a}$ 는 독립적으로 $-H$; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0366] $-R^3$, $-R^{3a}$ 는 독립적으로 $-H$; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단 $-R^3$, $-R^{3a}$ 중 하나 또는 둘 다가 $-H$ 이외의 것인 경우에, 이들은 SP^3 -혼성화 탄소 원자를 통해 이들이 부착되어 있는 N에 연결되고;
- [0367] $-R^7$ 은 $-N(R^{10_{10a}})R^{10_{10a}}-$; 또는 $-NR^{10}-(C=O)-R^{11}$ 이고;
- [0368] $-R^{7a}$, $-R^{10}$, $-R^{10a}$, $-R^{11}$ 은 서로 독립적으로 $-H$; 또는 C_{1-10} 알킬이고;
- [0369] 임의로, 쌍 $-R^{1a}/-R^{4a}$, $-R^{1a}/-R^{5a}$, $-R^{1a}/-R^{7a}$, $-R^{4a}/-R^{5a}$, $-R^{8a}/-R^{9a}$ 중 1개 이상은 화학 결합을 형성하고;
- [0370] 임의로, 쌍 $-R^1/-R^{1a}$, $-R^2/-R^{2a}$, $-R^4/-R^{4a}$, $-R^5/-R^{5a}$, $-R^8/-R^{8a}$, $-R^9/-R^{9a}$ 중 1개 이상은 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 연결되어 C_{3-10} 시클로알킬; 또는 3- 내지 10-원 헤테로시클릴을 형성하고;
- [0371] 임의로, 쌍 $-R^1/-R^4$, $-R^1/-R^5$, $-R^1/-R^6$, $-R^1/-R^{7a}$, $-R^4/-R^5$, $-R^4/-R^6$, $-R^8/-R^9$, $-R^2/-R^3$ 중 1개 이상은 이들이 부착되어 있는 원자와 함께 연결되어 고리 A를 형성하고;
- [0372] 임의로, R^3/R^{3a} 는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 연결되어 3- 내지 10-원 헤테로사이클을 형성하고;
- [0373] A는 페닐; 나프틸; 인데닐; 인다닐; 테트라리닐; C_{3-10} 시클로알킬; 3- 내지 10-원 헤테로시클릴; 및 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0374] 여기서 화학식 XIIa의 기는 $-L^4$ 로 치환되며, 단 화학식 XIIa에서 별표로 표시된 수소는 $-L^4$ 또는 다른 치환기에 의해 대체되지 않고;
- [0375] 여기서 $-L^4$ 는 단일 화학 결합 또는 본원에 정의된 바와 같은 스페이서 모이어티이고;
- [0376] 여기서 C_{1-10} 알킬은 본원에 정의된 바와 같이 임의로 개재되고/거나 임의로 치환될 수 있다.
- [0377] 본 발명의 다른 실시양태에서 사용가능한 추가의 가역적 전구약물 링커는 W005099768A2, W006136586A2, W02011/012722A1, W02011/089214A1, W02011/089216A1, W02011/089215A1, W02013/024053A1, W02013/160340A1, W02016/020373A1, W02016/196124A2, EP1536334B1, W02009/009712A1, W02008/034122A1, W02009/143412A2, W02011/082368A2, US8618124B2, US8946405B2, US8754190B2, W02013/036857A1, US7585837B2 및 W02002/089789A1에 기재되어 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0378] 스페이서 또는 스페이서 모이어티는 많은 실시양태에서 $-T-$, $-C_{1-10}$ 알킬렌, $-C(O)O-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^{y1})-$, $-S(O)_2N(R^{y1})-$, $-S(O)N(R^{y1})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{y1})S(O)_2N(R^{y1a})-$, $-S-$, $-N(R^{y1})-$, $-OC(OR^{y1})(R^{y1a})-$, $-N(R^{y1})C(O)N(R^{y1a})-$, $-OC(O)N(R^{y1})-$, C_{1-50} 알킬, C_{2-50} 알케닐 및 C_{2-50} 알킬닐로부터 선택될 수 있고; 여기서 $-T-$, C_{1-50} 알킬, C_{2-50} 알케닐 및 C_{2-50} 알킬닐은 동일하거나 상이한 1개 이상의 $-R^{y2}$ 로 임의로 치환되고, 여기서 C_{1-50}

알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐에는 -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂N(R^{y3})-, -S(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y3})S(O)₂N(R^{y3a})-, -S-, -N(R^{y3})-, -OC(OR^{y3})(R^{y3a})-, -N(R^{y3})C(O)N(R^{y3a})- 및 -OC(O)N(R^{y3})-로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 기가 임의로 개재되고;

[0379] 여기서

[0380] -R^{y1} 및 -R^{y1a}는 서로 독립적으로 -H, -T, C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 -T, C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐은 동일하거나 상이한 1개 이상의 -R^{y2}로 임의로 치환되고, 여기서 C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐에는 -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y4})-, -S(O)₂N(R^{y4})-, -S(O)N(R^{y4})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y4})S(O)₂N(R^{y4a})-, -S-, -N(R^{y4})-, -OC(OR^{y4})(R^{y4a})-, -N(R^{y4})C(O)N(R^{y4a})- 및 -OC(O)N(R^{y4})-로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 기가 임의로 개재되고;

[0381] 각각의 T는 독립적으로 페닐, 나프틸, 인테닐, 인다닐, 테트라리닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, 3- 내지 10-원 헤테로시클릴, 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴, 8- 내지 30-원 카르보폴리시클릴 및 8- 내지 30-원 헤테로폴리시클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 각각의 T는 독립적으로 동일하거나 상이한 1개 이상의 -R^{y2}로 임의로 치환되고;

[0382] 각각의 -R^{y2}는 독립적으로 할로젠, -CN, 옥소 (=O), -COOR^{y5}, -OR^{y5}, -C(O)R^{y5}, -C(O)N(R^{y5}, R^{y5a}), -S(O)₂N(R^{y5}, R^{y5a}), -S(O)N(R^{y5}, R^{y5a}), -S(O)₂R^{y5}, -S(O)R^{y5}, -N(R^{y5})S(O)₂N(R^{y5a}, R^{y5b}), -SR^{y5}, -N(R^{y5}, R^{y5a}), -NO₂, -OC(O)R^{y5}, -N(R^{y5})C(O)R^{y5a}, -N(R^{y5})S(O)₂R^{y5a}, -N(R^{y5})S(O)R^{y5a}, -N(R^{y5})C(O)OR^{y5a}, -N(R^{y5})C(O)N(R^{y5a}, R^{y5b}), -OC(O)N(R^{y5}, R^{y5a}) 및 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 C₁₋₆ 알킬은 동일하거나 상이한 1개 이상의 할로젠으로 임의로 치환되고;

[0383] 각각의 -R^{y3}, -R^{y3a}, -R^{y4}, -R^{y4a}, -R^{y5}, -R^{y5a} 및 -R^{y5b}는 독립적으로 -H 및 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C₁₋₆ 알킬은 동일하거나 상이한 1개 이상의 할로젠으로 임의로 치환된다.

[0384] 스페이서 모이어티가 적어도 1개의 생분해성 연결을 포함하는 경우에 이러한 스페이서는 "생분해성 스페이서"이다.

[0385] 특정 실시양태에서, 스페이서 모이어티는 -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂N(R^{y1})-, -S(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y1})S(O)₂N(R^{y1a})-, -S-, -N(R^{y1})-, -OC(OR^{y1})(R^{y1a})-, -N(R^{y1})C(O)N(R^{y1a})-, -OC(O)N(R^{y1})-, C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐로부터 선택될 수 있고; 여기서 -T-, C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐 및 C₂₋₂₀ 알키닐은 동일하거나 상이한 1개 이상의 -R^{y2}로 임의로 치환되고, 여기서 C₁₋₂₀ 알킬, C₂₋₂₀ 알케닐 및 C₂₋₂₀ 알키닐에는 -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂N(R^{y3})-, -S(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y3})S(O)₂N(R^{y3a})-, -S-, -N(R^{y3})-, -OC(OR^{y3})(R^{y3a})-, -N(R^{y3})C(O)N(R^{y3a})- 및 -OC(O)N(R^{y3})-로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 기가 임의로 개재되고;

[0386] 여기서

[0387] -R^{y1} 및 -R^{y1a}는 서로 독립적으로 -H, -T, C₁₋₁₀ 알킬, C₂₋₁₀ 알케닐 및 C₂₋₁₀ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 -T, C₁₋₁₀ 알킬, C₂₋₁₀ 알케닐 및 C₂₋₁₀ 알키닐은 동일하거나 상이한 1개 이상의 -R^{y2}로 임의로 치환되고, 여기서 C₁₋₁₀ 알킬, C₂₋₁₀ 알케닐 및 C₂₋₁₀ 알키닐에는 -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y4})-,

$-S(O)_2N(R^{y4})-$, $-S(O)N(R^{y4})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{y4})S(O)_2N(R^{y4a})-$, $-S-$, $-N(R^{y4})-$, $-OC(OR^{y4})(R^{y4a})-$, $-N(R^{y4})C(O)N(R^{y4a})-$ 및 $-OC(O)N(R^{y4})-$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 기가 임의로 개재되고;

[0388] 각각의 T는 독립적으로 페닐, 나프틸, 인테닐, 인다닐, 테트라리닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, 3- 내지 10-원 헤테로시클릴, 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴, 8- 내지 30-원 카르보폴리시클릴 및 8- 내지 30-원 헤테로폴리시클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 각각의 T는 독립적으로 동일하거나 상이한 1개 이상의 $-R^{y2}$ 로 임의로 치환되고;

[0389] $-R^{y2}$ 는 할로젠, $-CN$, 옥소 ($=O$), $-COOR^{y5}$, $-OR^{y5}$, $-C(O)R^{y5}$, $-C(O)N(R^{y5}R^{y5a})$, $-S(O)_2N(R^{y5}R^{y5a})$, $-S(O)N(R^{y5}R^{y5a})$, $-S(O)_2R^{y5}$, $-S(O)R^{y5}$, $-N(R^{y5})S(O)_2N(R^{y5a}R^{y5b})$, $-SR^{y5}$, $-N(R^{y5}R^{y5a})$, $-NO_2$, $-OC(O)R^{y5}$, $-N(R^{y5})C(O)R^{y5a}$, $-N(R^{y5})S(O)_2R^{y5a}$, $-N(R^{y5})S(O)R^{y5a}$, $-N(R^{y5})C(O)OR^{y5a}$, $-N(R^{y5})C(O)N(R^{y5a}R^{y5b})$, $-OC(O)N(R^{y5}R^{y5a})$ 및 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 C₁₋₆ 알킬은 동일하거나 상이한 1개 이상의 할로젠으로 임의로 치환되고;

[0390] 각각의 $-R^{y3}$, $-R^{y3a}$, $-R^{y4}$, $-R^{y4a}$, $-R^{y5}$, $-R^{y5a}$ 및 $-R^{y5b}$ 는 서로 독립적으로 $-H$, 및 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 C₁₋₆ 알킬은 동일하거나 상이한 1개 이상의 할로젠으로 임의로 치환된다.

[0391] 스페이서 모이어티가 적어도 1개의 생분해성 연결을 포함하는 경우에 이러한 스페이서는 "생분해성 스페이서"이다.

[0392] 또 다른 실시양태에서, 스페이서 모이어티는 $-T-$, $-C(O)O-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^{y1})-$, $-S(O)_2N(R^{y1})-$, $-S(O)N(R^{y1})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{y1})S(O)_2N(R^{y1a})-$, $-S-$, $-N(R^{y1})-$, $-OC(OR^{y1})(R^{y1a})-$, $-N(R^{y1})C(O)N(R^{y1a})-$, $-OC(O)N(R^{y1})-$, C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐로부터 선택될 수 있고; 여기서 $-T-$, C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐은 동일하거나 상이한 1개 이상의 $-R^{y2}$ 로 임의로 치환되고, 여기서 C₁₋₅₀ 알킬, C₂₋₅₀ 알케닐 및 C₂₋₅₀ 알키닐에는 $-T-$, $-C(O)O-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^{y3})-$, $-S(O)_2N(R^{y3})-$, $-S(O)N(R^{y3})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{y3})S(O)_2N(R^{y3a})-$, $-S-$, $-N(R^{y3})-$, $-OC(OR^{y3})(R^{y3a})-$, $-N(R^{y3})C(O)N(R^{y3a})-$ 및 $-OC(O)N(R^{y3})-$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 기가 임의로 개재되고;

[0393] 여기서

[0394] $-R^{y1}$ 및 $-R^{y1a}$ 는 독립적으로 $-H$, $-T$, C₁₋₁₀ 알킬, C₂₋₁₀ 알케닐 및 C₂₋₁₀ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0395] 각각의 T는 독립적으로 페닐, 나프틸, 인테닐, 인다닐, 테트라리닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, 3- 내지 10-원 헤테로시클릴, 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴, 8- 내지 30-원 카르보폴리시클릴 및 8- 내지 30-원 헤테로폴리시클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0396] 각각의 $-R^{y2}$ 는 독립적으로 할로젠 및 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0397] 각각의 $-R^{y3}$, $-R^{y3a}$, $-R^{y4}$, $-R^{y4a}$, $-R^{y5}$, $-R^{y5a}$ 및 $-R^{y5b}$ 는 서로 독립적으로 $-H$ 및 C₁₋₆ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 C₁₋₆ 알킬은 동일하거나 상이한 1개 이상의 할로젠으로 임의로 치환된다.

[0398] 스페이서 모이어티가 적어도 1개 이상의 생분해성 연결을 포함하는 경우에 이러한 스페이서는 "생분해성 스페이서"이다. 추가 실시양태에서, 스페이서 모이어티는 $-O-$, $-T-$ 및 $-C(O)N(R^{y1})-$ 로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 기가 임의로 개재된 C₁₋₂₀ 알킬 섹일 수 있고; 이 C₁₋₂₀ 알킬 섹은 $-OH$, $-T$ 및 $-C(O)N(R^{y6}R^{y6a})$ 로부터 독립적으로 선택된 1개 이상의 기로 임의로 치환되고; 여기서 $-R^{y1}$, $-R^{y6}$, $-R^{y6a}$ 는 독립적으로 H 및 C₁₋₄ 알킬로 이루어

진 군으로부터 선택되고, 여기서 T는 페닐, 나프틸, 인데닐, 인다닐, 테트라리닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, 3- 내지 10-원 헤테로시클릴, 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴, 8- 내지 30-원 카르보폴리시클릴 및 8- 내지 30-원 헤테로 폴리시클릴로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0399] 스페이서 모이어티가 적어도 1개의 생분해성 연결을 포함하는 경우 이러한 스페이서는 "생분해성 스페이서"이다.
- [0400] 생분해성 연결은, 예를 들어 에스테르 또는 카르보네이트 연결일 수 있다.
- [0401] 본원에 사용된 "태그" 및 "정제 태그"는, 제2 모이어티에 접합되는 경우에, (a) 태그 모이어티가 없는 상기 제2 모이어티에 존재하지 않는 물리적 및/또는 화학적 특성/특성들을 부여하고, 이 상이한 물리적 및/또는 화학적 특성/특성들이 이러한 접합체의 정제를 가능하게 하는 것인 모이어티를 지칭한다.
- [0402] 본원에 사용된 "보호기" 또는 "PG"는 화학 반응 공정 동안 관능기의 가역적 보호에 사용되어 상기 화학 반응 공정에서 이들 관능기가 본질적으로 미반응성이 되게 하는 모이어티를 지칭한다.
- [0403] 본원에 사용된 용어 "전구약물"은 약물이 가역적 링커 모이어티에 공유적으로 및 가역적으로 접합된 접합체를 의미하며, 이 가역적 전구약물 링커 모이어티는 직접적으로 스페이서 모이어티를 통해 또는 간접적으로 본 발명에 따른 히드로겔과 같은 담체에 부착된다. 전구약물은 생리학적 조건 (수성 완충제, 37.4℃, pH 7.4) 하에 약물을 방출시킨다. 이러한 방출된 약물은 비변형될 수 있으며, 이는 가역적 전구약물 링커 모이어티로부터의 어떤 잔기도 방출된 약물에 부착된 채로 남아있지 않는다는 것을 의미한다.
- [0404] 본원에 사용된 용어 "약물"은 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 동물 및 인간을 포함하나 이에 제한되지 않는 생물학적 유기체의 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 미칠 수 있는 임의의 물질을 지칭한다. 특히, 본원에 사용된 상기 용어는 유기체, 특히 인간 또는 동물에서의 질환의 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방을 위해, 또는 달리 유기체, 특히 인간 또는 동물의 신체적 또는 정신적 웰빙을 증진시키기 위해 의도된 임의의 물질을 포함한다. 일부 측면에서, 약물은 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 산성 섬유모세포 성장 인자 (aFGF), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF α), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF β), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 안지오텐신, 혈소판-유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 인터류킨-1 (IL-1), 인터류킨-8 (IL-8), 인터류킨-12, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 안지오프로테아제-1, Del-1, 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 간 세포 성장 인자 (HGF), 렙틴, 미드카인, 태반 성장 인자, 플레이오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프로리페린, 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파), 안지오프로테아제, 안지오프로테아제 플라스미노겐 단편, 항혈관신생 항트롬빈 III, 연골-유래 억제제 (CDI), CDS9 보체 단편, 엔도스타틴 콜라겐 XVIII 단편, 피브로넥틴 단편, 그로-베타, 헤파리나제, 헤파린 헥사사카라이드 단편, 인간 융모성 고나도트로핀 (hCG), 인터페론 알파/베타/감마, 인터페론 유도성 단백질 (IP-10), 크링글 S 플라스미노겐 단편, 메탈로프로테이나제 억제제 (TIMP), 2-메톡시에스트라디올, 태반 리보뉴클레아제 억제제, 플라스미노겐 활성화제 억제제, 혈소판 인자-4 (PF4), 프로락틴 16 kD 단편, 프로리페린-관련 단백질 (PRP), 레티노이드, 테트라히드로코르티솔-S, 트롬보스폰딘-I (TSP-I), 바스쿨로스타틴, 바소스타틴 칼라티쿨린 단편, 프로스타글란딘 수용체, 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), 스펅고신-1-포스페이트, 인자 D, RTP801, 보체 억제제, α 2 아드레날린성 효능제, mTOR, 섬모 신경영양 인자 (CNTF), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 신경교 세포-유래 신경영양 인자 (GDNF), 수정체 상피 유래 성장 인자 (LEDGF), 간 세포-유래 추체 생존 인자 (RdCVF), 색소 상피-유래 인자 (PEDF), 호중구-활성화 단백질, 단백질 화학유인물질 단백질, 대식세포-염증성 단백질, 소형 유도성 분비 (SIS) 단백질, 혈소판 인자, 혈소판 염기성 단백질, 흑색종 성장 자극 활성, 표피 성장 인자, 신경 성장 인자, 골 형태발생 단백질, 골 성장 연골-유도 인자, 인터류킨, 인터류킨 억제제, 인터류킨 수용체, 조혈 인자, 과립구 콜로니 자극 인자, 대식세포 콜로니 자극 인자, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자, 인히빈, 및 액티빈을 포함하는 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질(들)의 활성을 조정하는 생물학적 활성 모이어티이다. 일부 측면에서, 약물은 VEGF 길항제이다. 용어 "약물"은 또한 유리 약물과 비교하여 수소가 결여된 접합된 약물에 대해 사용된다.
- [0405] 본원에 사용된 용어 "VEGF 길항제"는 VEGF에 결합하거나, VEGF 발현 수준을 감소시키거나, 또는 1종 이상의 VEGF 수용체에 대한 VEGF 결합, VEGF 신호전달 및 VEGF 매개된 혈관신생 및 내피 세포 생존 또는 증식을 포함하나 이에 제한되지는 않는 VEGF 생물학적 활성을 중화, 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. 예를 들어, VEGF 생물학적 활성을 중화, 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해할 수 있는 분자는 1종 이상의 VEGF 수용체 (VEGFR) (예를 들어, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, 막-결합된 VEGF 수용체 (mbVEGFR) 또는 가용성 VEGF 수용체 (sVEGFR))에 결합함으로써 그의 효과를 발휘할 수 있다. VEGF에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 항-VEGF 항체 및 그의 항원-결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합하여 1종 이상의 수용체에 대한 그의 결합을

격리시키는 수용체 분자 및 유도체, 융합 단백질 (예를 들어, VEGF-트랩 (레게네론(Regeneron)) 및 VEGF121-겔로닌 (페레그린(Peregrine))이 본 발명의 방법에 유용한 VEGF 길항제로서 포함된다. VEGF 길항제는 또한 VEGF 폴리펩티드의 길항제 변이체, VEGF 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 적어도 한 단편에 상보적인 안티센스 뉴클레오타이드 올리고머; VEGF 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 적어도 한 단편에 상보적인 소형 RNA; VEGF를 표적화하는 리보자임; VEGF에 대한 펩티다이드; 및 VEGF 압타머를 포함한다. VEGF 길항제는 또한 VEGFR에 결합하는 폴리펩티드, 항-VEGFR 항체 및 그의 항원-결합 단편, 및 VEGFR에 결합하여 VEGF 생물학적 활성 (예를 들어, VEGF 신호전달)을 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해하는 유도체, 또는 융합 단백질을 포함한다. VEGF-특이적 길항제는 또한 VEGF 또는 VEGFR에 결합하고 VEGF 생물학적 활성을 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해할 수 있는 비펩티드 소분자를 포함한다. 따라서, 용어 "VEGF 활성"은 구체적으로 VEGF의 VEGF-매개된 생물학적 활성을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 길항제는 VEGF의 발현 수준 또는 생물학적 활성을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과만큼 감소 또는 억제한다. 일부 실시양태에서, VEGF-특이적 길항제에 의해 억제되는 VEGF는 VEGF (8-109), VEGF (1-109) 또는 VEGF165이다.

[0406] 본원에 사용된 VEGF 길항제는 항-VEGFR2 항체 및 관련 분자 (예를 들어, 라무시루맙, 타니비루맙, 아플리베르셉트), 항-VEGFR1 항체 및 관련 분자 (예를 들어, 이크루쿠맙, 아플리베르셉트 (VEGF 트랩-아이; 아일리아®), 및 짐-아플리베르셉트 (VEGF 트랩; 잘트랩(ZALTRAP)®)), 이중특이적 VEGF 항체 (예를 들어, MP-0250, 바누시주맙 (VEGF-ANG2), 및 US 2001/0236388에 개시된 이중특이적 항체), 항-VEGF, 항-VEGFR1 및 항-VEGFR2 아암 중 2종의 조합을 포함하는 이중특이적 항체, 항-VEGF 항체 (예를 들어, 베바시주맙, 세바시주맙 및 라니비주맙), 및 비펩티드 소분자 VEGF 길항제 (예를 들어, 파조파닙, 악시티닙, 반데타닙, 스티바르가, 카보잔티닙, 렌바티닙, 닌테다닙, 오란티닙, 텔라티닙, 도비티닙, 세디라닙, 모테사닙, 술파티닙, 아파티닙, 포레티닙, 파미티닙, 및 티보자닙)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가의 VEGF 길항제는 하기에 기재되어 있다.

[0407] "장애"는 본원에 기재된 항체 접합체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 임의의 상태이다. 예를 들어, 포유동물은 비정상적 혈관신생 (과도한, 부적절한 또는 비체화된 혈관신생) 또는 혈관 투과성을 앓고 있거나 이에 대한 예방을 필요로 한다. 이것은 포유동물이 해당 장애에 대한 소인이 있는 병리학적 상태를 포함한 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비제한적 예는 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 (예를 들어, 안구 장애 및 세포 증식성 장애) 및 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 포함한다.

[0408] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 효과적인 양을 지칭한다.

[0409] 본원에 사용된 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 그의 문법적 변형)는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 개입을 지칭하고, 임상 병리상태의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 감소, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 접합체 또는 본 발명의 항체 접합체를 포함하는 다른 조성물 (예를 들어, 제약 제제)은 질환의 발생을 지연시키거나 질환의 진행을 늦추기 위해 사용된다.

[0410] 용어 "개재된"은 모이어티가 2개의 탄소 원자 사이에 삽입되거나 또는 삽입이 모이어티 말단 중 하나에 - 탄소 또는 헤테로원자와 수소 원자 사이에, 바람직하게는 탄소와 수소 원자 사이에 존재하는 경우를 의미한다. 이러한 원자 및 모이어티의 비제한적 예는 -O-, -S-, -N(H)-, -N(치환된)-, -NC(O)- 및 -OC(O)-를 포함한다.

[0411] 본원에 사용된 용어 " C_{1-4} 알킬"은 단독으로 또는 조합되어 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지형 알킬 모이어티를 의미한다. 분자의 말단에 존재하는 경우에, 직쇄 또는 분지형 C_{1-4} 알킬의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸 및 tert-부틸이다. 2개의 분자 모이어티가 C_{1-4} 알킬에 의해 연결되는 경우에, 이때 이러한 C_{1-4} 알킬 기에 대한 예는 $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$ 이다. C_{1-4} 알킬 탄소의 각각의 수소는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 임의로 대체될 수 있다. 임의로, C_{1-4} 알킬에는 하기 정의된 바와 같은 1개 이상의 모이어티가 개재될 수 있다.

[0412] 본원에 사용된 용어 " C_{1-6} 알킬"은 단독으로 또는 조합되어 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지형 알킬 모이어티를 의미한다. 분자의 말단에 존재하는 경우에, 직쇄 및 분지형 C_{1-6} 알킬 기의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 2-메틸부틸, 2,2-디메틸프로필, n-헥실, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 2,2-디메틸부틸, 2,3-디메틸부틸 및 3,3-디메틸프로필이다. 2개의 분자 모이어티가

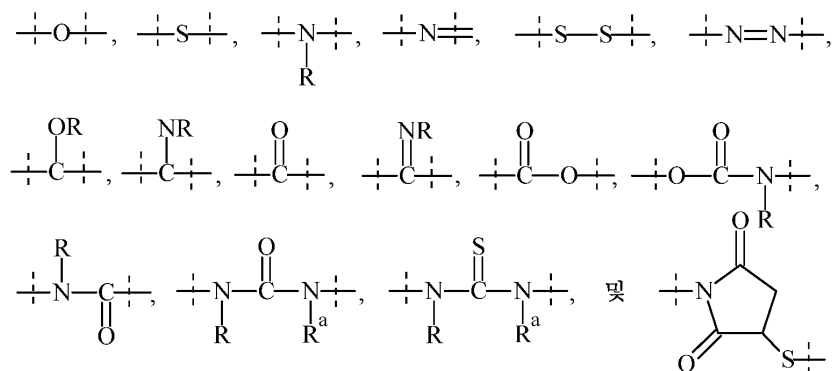
C_{1-6} 알킬 기에 의해 연결되는 경우에, 이때 이러한 C_{1-6} 알킬 기에 대한 예는 $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$ 및 $-C(CH_3)_2-$ 이다. C_{1-6} 탄소의 각각의 수소 원자는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 임의로 대체될 수 있다. 임의로, C_{1-6} 알킬에는 하기 정의된 바와 같은 1개 이상의 모이어티가 개재될 수 있다. 따라서, " C_{1-10} 알킬", " C_{1-20} 알킬" 또는 " C_{1-50} 알킬"은 각각 1 내지 10개, 1 내지 20개 또는 1 내지 50개의 탄소 원자를 갖는 알킬 쇄를 의미하며, 여기서 C_{1-10} , C_{1-20} 또는 C_{1-50} 탄소의 각각의 수소 원자는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 임의로 대체될 수 있다. 임의로, C_{1-10} 또는 C_{1-50} 알킬에는 하기 정의된 바와 같은 1개 이상의 모이어티가 개재될 수 있다.

[0413] 본원에 사용된 용어 "알킬렌"은 2가 포화 지방족 라디칼, 예컨대 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌 등을 지칭한다.

[0414] 본원에 사용된 용어 " C_{2-6} 알케닐"은 단독으로 또는 조합되어 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 모이어티를 의미한다. 분자의 말단에 존재하는 경우에, 예는 $-CH=CH_2$, $-CH=CH-CH_3$, $-CH_2-CH=CH_2$, $-CH=CHCH_2-CH_3$ 및 $-CH=CH-CH=CH_2$ 이다. 2개의 분자 모이어티가 C_{2-6} 알케닐 기에 의해 연결되는 경우에, 이때 이러한 C_{2-6} 알케닐에 대한 예는 $-CH=CH-$ 이다. C_{2-6} 알케닐 모이어티의 각각의 수소 원자는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 임의로 대체될 수 있다. 임의로, C_{2-6} 알케닐에는 하기 정의된 바와 같은 1개 이상의 모이어티가 개재될 수 있다. 따라서, 용어 " C_{2-10} 알케닐", " C_{2-20} 알케닐" 또는 " C_{2-50} 알케닐"은 단독으로 또는 조합되어 2 내지 10개, 2 내지 20개 또는 2 내지 50개의 탄소 원자를 갖는 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 모이어티를 의미한다. C_{2-10} 알케닐, C_{2-20} 알케닐 또는 C_{2-50} 알케닐 기의 각각의 수소 원자는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 임의로 대체될 수 있다. 임의로, C_{2-10} 알케닐, C_{2-20} 알케닐 또는 C_{2-50} 알케닐에는 하기 정의된 바와 같은 1개 이상의 모이어티가 개재될 수 있다.

[0415] 본원에 사용된 용어 " C_{2-6} 알키닐"은 단독으로 또는 조합되어 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 적어도 1개의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 모이어티를 의미한다. 분자의 말단에 존재하는 경우에, 예는 $-C\equiv CH$, $-CH_2-C\equiv CH$, $CH_2-CH_2-C\equiv CH$ 및 $CH_2-C\equiv C-CH_3$ 이다. 2개의 분자 모이어티가 알키닐 기에 의해 연결되는 경우에, 이때 예는 $-C\equiv C-$ 이다. C_{2-6} 알키닐 기의 각각의 수소 원자는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 임의로 대체될 수 있다. 임의로, 1개 이상의 이중 결합(들)이 발생할 수 있다. 임의로, C_{2-6} 알키닐에는 하기 정의된 바와 같은 1개 이상의 모이어티가 개재될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 용어 " C_{2-10} 알키닐", " C_{2-20} 알키닐" 및 " C_{2-50} 알키닐"은 단독으로 또는 조합되어 각각 2 내지 10개, 2 내지 20개 또는 2 내지 50개의 탄소 원자를 갖는 적어도 1개의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 모이어티를 의미한다. C_{2-10} 알키닐, C_{2-20} 알키닐 또는 C_{2-50} 알키닐 기의 각각의 수소 원자는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 임의로 대체될 수 있다. 임의로, 1개 이상의 이중 결합(들)이 발생할 수 있다. 임의로, C_{2-10} 알키닐, C_{2-20} 알키닐 또는 C_{2-50} 알키닐에는 하기 정의된 바와 같은 1개 이상의 모이어티가 개재될 수 있다.

[0416] 상기 언급된 바와 같이, C_{1-4} 알킬, C_{1-6} 알킬, C_{1-10} 알킬, C_{1-20} 알킬, C_{1-50} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-10} 알케닐, C_{2-20} 알케닐, C_{2-50} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{2-10} 알키닐, C_{2-20} 알케닐 또는 C_{2-50} 알키닐에는 바람직하게는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 모이어티가 임의로 개재될 수 있다:



[0417]

[0418]

여기서

[0419]

파선은 모이어티 또는 시약의 나머지 부분에 대한 부착을 나타내고;

[0420]

-R 및 -R^a는 서로 독립적으로 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 및 헥실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0421]

본원에 사용된 용어 "C₃₋₁₀ 시클로알킬"은 포화 또는 불포화일 수 있는 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 시클릭 알킬쇄, 예를 들어 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 시클로노닐 또는 시클로데실을 의미한다. C₃₋₁₀ 시클로알킬 탄소의 각각의 수소 원자는 상기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 대체될 수 있다. 용어 "C₃₋₁₀ 시클로알킬"은 또한 노르보르난 또는 노르보르넨과 같은 가교된 비사이클을 포함한다.

[0422]

용어 "8- 내지 30-원 카르보폴리시클릴" 또는 "8- 내지 30-원 카르보폴리사이클"은 8 내지 30개의 고리 원자를 갖는 2개 이상의 고리의 시클릭 모이어티이며, 여기서 2개의 이웃 고리는 적어도 1개의 고리 원자를 공유하고, 최대 개수까지의 이중 결합을 함유할 수 있는 것인 (완전, 부분 또는 불-포화인 방향족 또는 비-방향족 고리) 모이어티를 의미한다. 바람직하게는 8- 내지 30-원 카르보시클릴은 2, 3, 4 또는 5개의 고리, 보다 바람직하게는 2, 3 또는 4개의 고리의 시클릭 모이어티를 의미한다.

[0423]

본원에 사용된 용어 "3- 내지 10-원 헤테로시클릴" 또는 "3- 내지 10-원 헤테로사이클"은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 고리 원자를 갖고 최대 개수까지의 이중 결합을 함유할 수 있는 고리 (완전, 부분 또는 불-포화인 방향족 또는 비-방향족 고리)이며, 여기서 적어도 1개의 고리 원자 내지 4개 이하의 고리 원자는 황 (-S(O)-, -S(O)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(O)- 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자에 의해 대체되고, 고리는 탄소 또는 질소 원자를 통해 분자의 나머지에 연결된 것인 고리를 의미한다. 3- 내지 10-원 헤테로사이클에 대한 예는 아지리딘, 옥시란, 티이란, 아지린, 옥시렌, 티이렌, 아제티딘, 옥세탄, 티에탄, 푸란, 티오펜, 피롤, 피롤린, 이미다졸, 이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 옥사졸, 옥사졸린, 이속사졸, 이속사졸린, 티아졸, 티아졸린, 이소티아졸, 이소티아졸린, 티아디아졸, 티아디아졸린, 테트라히드로푸란, 테트라히드로티오펜, 피롤리딘, 이미다졸리딘, 피라졸리딘, 옥사졸리딘, 이속사졸리딘, 티아졸리딘, 이소티아졸리딘, 티아디아졸리딘, 술폴란, 피란, 디히드로피란, 테트라히드로피란, 이미다졸리딘, 피리딘, 피리다진, 피라진, 피리미딘, 피페라진, 피페리딘, 모르폴린, 테트라졸, 트리아졸, 트리아졸린, 테트라졸리딘, 디아제판, 아제핀 및 호모피페라진을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 3- 내지 10-원 헤테로시클릴 또는 3- 내지 10-원 헤테로시클릭 기의 각각의 수소 원자는 하기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 대체될 수 있다.

[0424]

본원에 사용된 용어 "8- 내지 11-원 헤테로비시클릴" 또는 "8- 내지 11-원 헤테로비사이클"은 8 내지 11개의 고리 원자를 갖는 2개 고리의 헤테로시클릭 모이어티이며, 여기서 적어도 1개의 고리 원자가 두 고리에 의해 공유되고, 최대 개수까지의 이중 결합을 함유할 수 있고 (완전, 부분 또는 불-포화인 방향족 또는 비-방향족 고리), 여기서 적어도 1개의 고리 원자 내지 6개 이하의 고리 원자는 황 (-S(O)-, -S(O)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(O)- 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자에 의해 대체되고, 여기서 고리는 탄소 또는 질소 원자를 통해 분자의 나머지에 연결된 것인 모이어티를 의미한다. 8- 내지 11-원 헤테로비사이클에 대한 예는 인돌, 인돌린, 벤조푸란, 벤조티오펜, 벤족사졸, 벤즈이속사졸, 벤조티아졸, 벤즈이소티아졸, 벤즈이미다졸, 벤즈이미다졸린, 퀴놀린, 퀴나졸린, 디히드로퀴나졸린, 퀴놀린, 디히드로퀴놀린, 테트라히드로퀴놀린, 데카히드로퀴놀린, 이소퀴놀린, 데카히드로이소퀴놀린, 테트라히드로이소퀴놀린, 디히드로이소퀴놀린, 벤즈아제

핀, 퓨린 및 프테리딘이다. 용어 8- 내지 11-원 헤테로비사이클은 또한 2개의 고리의 스피로 구조, 예컨대 1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 또는 가교된 헤테로사이클, 예컨대 8-아자-비시클로[3.2.1]옥탄을 포함한다. 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴 또는 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴 탄소의 각각의 수소 원자는 하기 정의된 바와 같은 치환기에 의해 대체될 수 있다.

[0425] 유사하게, 용어 "8- 내지 30-원 헤테로시클릴" 또는 "8- 내지 30-원 헤테로폴리사이클"은 8 내지 30개의 고리 원자를 갖는 2개 초과와 고리, 바람직하게는 3, 4 또는 5개의 고리의 헤테로시클릭 모이어티이며, 여기서 2개의 이웃 고리는 적어도 1개의 고리 원자를 공유하고, 최대 개수까지의 이중 결합을 함유할 수 있고 (완전, 부분 또는 불포화인 방향족 또는 비-방향족 고리), 여기서 적어도 1개의 고리 원자 내지 10개 이하의 고리 원자는 황 (-S(O)-, -S(O)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(O)- 포함)의 군으로부터 선택된 헤테로원자에 의해 대체되고, 고리는 탄소 또는 질소 원자를 통해 분자의 나머지에 연결된 것인 모이어티를 의미한다.

[0426] 본원에 사용된 용어 "할로젠"은 플루오로, 클로로, 브로모 또는 아이오도를 의미한다. 할로젠은 플루오로 또는 클로로인 것이 일반적으로 바람직하다.

[0427] 본원에 사용된 용어 "부분 불포화"는 고리 원자 사이에 적어도 1개의 이중 또는 삼중 결합을 포함하지만 방향족이 아닌 고리 모이어티를 지칭한다. 용어 "부분 불포화"는 다수의 불포화 부위를 갖는 고리를 포괄하도록 의도되지만, 본원에 정의된 바와 같은 아릴 또는 헤테로아릴 모이어티를 포함하는 것으로 의도되지는 않는다.

[0428] 스페이서 모이어티 또는 다른 화학 종과 관련하여 본원에 사용된 용어 "생분해성"은 스페이서 모이어티 또는 화학 종이 생물학적 또는 생리학적 조건 하에 분해 또는 결합 절단을 겪을 수 있다는 것을 의미한다. 생분해는 가수분해, 효소적 절단 또는 다른 메커니즘을 통해 일어날 수 있다. 본원에 기재된 스페이서 모이어티는 일반적으로 유리체내로의 주사 또는 유리체에의 노출의 12개월 이하의 반감기, 일부 실시양태에서는 6개월 이하의 반감기로 일어나는 결합 절단 반응에 의해 유리체액에서의 분해를 겪을 것이다. 스페이서 모이어티의 생분해는 스페이서 모이어티를 다른 기에 부착시키는 화학 결합에서 뿐만 아니라 스페이서 모이어티 내의 화학 결합에서 일어날 수 있다.

[0429] 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "임의로 치환된"은 기가 그러한 기에 대해 열거된 치환기 중 1개 이상 (예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개) (여기서 상기 치환기는 동일하거나 상이할 수 있음)에 의해 치환될 수 있다는 것을 의미한다. 일부 측면에서, 임의로 치환된 기는 1개의 치환기를 갖는다. 또 다른 측면에서, 임의로 치환된 기는 2개의 치환기를 갖는다. 또 다른 측면에서, 임의로 치환된 기는 3개의 치환기를 갖는다.

[0430] 알킬, 알케닐, 알킬닐 또는 알킬렌과 함께 본원에 사용된 용어 "개재된"은 1개 이상의 탄소 원자가 관능기 또는 헤테로원자로 대체되어 알킬, 알케닐, 알킬닐 또는 알킬렌에 개재된다는 것을 의미한다. 알킬, 알케닐, 알킬닐 또는 알킬렌에 개재될 수 있는 예시적인 기는, 달리 본원에 명시되지 않는 한, T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹⁷)-; -S(O)₂N(R¹⁷)-; -S(O)N(R¹⁷)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹⁷)S(O)₂N(R^{17a})-; -S-; -N(R¹⁷)-; -OC(O)R¹⁷; -N(R¹⁷)C(O)-; -N(R¹⁷)S(O)₂-; -N(R¹⁷)S(O)-; -N(R¹⁷)C(O)O-; -N(R¹⁷)C(O)N(R^{17a})-; 및 -OC(O)N(R¹⁷R^{17a})-을 포함하며, 여기서 R¹⁷은 각 경우에 독립적으로 H 또는 C₁₋₅₀ 알킬이다.

[0431] 용어 "치환된"은 분자의 1개 이상의 -H 원자(들)가 "치환기" 또는 "치환기들"로 지칭되는 상이한 원자 또는 원자단에 의해 대체된다는 것을 의미한다. 적합한 치환기는 할로젠; CN; COOR¹⁵; OR¹⁵; C(O)R¹⁵; C(O)N(R¹⁵R^{15a}); S(O)₂N(R¹⁵R^{15a}); S(O)N(R¹⁵R^{15a}); S(O)₂R¹⁵; S(O)R¹⁵; N(R¹⁵)S(O)₂N(R^{15a}R^{15b}); SR¹⁵; N(R¹⁵R^{15a}); NO₂; OC(O)R¹⁵; N(R¹⁵)C(O)R^{15a}; N(R¹⁵)S(O)₂R^{15a}; N(R¹⁵)S(O)R^{15a}; N(R¹⁵)C(O)OR^{15a}; N(R¹⁵)C(O)N(R^{15a}R^{15b}); OC(O)N(R¹⁵R^{15a}); T; C₁₋₅₀ 알킬; C₂₋₅₀ 알케닐; 또는 C₂₋₅₀ 알킬닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 T; C₁₋₅₀ 알킬; C₂₋₅₀ 알케닐; 및 C₂₋₅₀ 알킬닐은 동일하거나 상이한 1개 이상의 R¹⁶으로 임의로 치환되고, 여기서 C₁₋₅₀ 알킬; C₂₋₅₀ 알케닐; 및 C₂₋₅₀ 알킬닐에는 T, -C(O)O-; -O-; -C(O)-; -C(O)N(R¹⁷)-; -S(O)₂N(R¹⁷)-; -S(O)N(R¹⁷)-; -S(O)₂-; -S(O)-; -N(R¹⁷)S(O)₂N(R^{17a})-; -S-; -N(R¹⁷)-; -OC(O)R¹⁷; -N(R¹⁷)C(O)-; -N(R¹⁷)S(O)₂-; -N(R¹⁷)S(O)-; -N(R¹⁷)C(O)O-; -N(R¹⁷)C(O)N(R^{17a})-; 및 -OC(O)N(R¹⁷R^{17a})-로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 기(들)가 임의로 개재된다.

일부 이러한 측면에서, R^{15} , R^{15a} , R^{15b} 는 독립적으로 H; T; 및 C_{1-50} 알킬; C_{2-50} 알케닐; 또는 C_{2-50} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 T; C_{1-50} 알킬; C_{2-50} 알케닐; 및 C_{2-50} 알키닐은 동일하거나 상이한 1개 이상의 R^{16} 으로 임의로 치환되고, 여기서 C_{1-50} 알킬; C_{2-50} 알케닐; 및 C_{2-50} 알키닐에는 T, $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $-C(O)N(R^{17})-$; $-S(O)_2N(R^{17})-$; $-S(O)N(R^{17})-$; $-S(O)_2-$; $-S(O)-$; $-N(R^{17})S(O)_2N(R^{17a})-$; $-S-$; $-N(R^{17})-$; $-OC(O)R^{17}$; $-N(R^{17})C(O)-$; $-N(R^{17})S(O)_2-$; $-N(R^{17})S(O)-$; $-N(R^{17})C(O)O-$; $-N(R^{17})C(O)N(R^{17a})-$; 및 $-OC(O)N(R^{17}R^{17a})$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 기(들)가 임의로 개재된다. 일부 이러한 측면에서, T는 페닐; 나프틸; 인데닐; 인다닐; 테트라리닐; C_{3-10} 시클로알킬; 4 내지 7원 헤테로시클릴; 또는 8- 내지 11-원 헤테로비시클릴로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 T는 동일하거나 상이한 1개 이상의 R^{16} 으로 임의로 치환된다. 일부 이러한 측면에서, R^{16} 은 할로젠; CN; 옥소 ($=O$); $COOR^{18}$; OR^{18} ; $C(O)R^{18}$; $C(O)N(R^{18}R^{18a})$; $S(O)_2N(R^{18}R^{18a})$; $S(O)N(R^{18}R^{18a})$; $S(O)_2R^{18}$; $S(O)R^{18}$; $N(R^{18})S(O)_2N(R^{18a}R^{18b})$; SR^{18} ; $N(R^{18}R^{18a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{18}$; $N(R^{18})C(O)R^{18a}$; $N(R^{18})S(O)_2R^{18a}$; $N(R^{18})S(O)R^{18a}$; $N(R^{18})C(O)OR^{18a}$; $N(R^{18})C(O)N(R^{18a}R^{18b})$; $OC(O)N(R^{18}R^{18a})$; 또는 C_{1-6} 알킬이고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 1개 이상의 할로젠으로 임의로 치환된다. 일부 이러한 측면에서, R^{17} , R^{17a} , R^{18} , R^{18a} , R^{18b} 는 독립적으로 H; 또는 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 1개 이상의 할로젠으로 임의로 치환된다.

- [0432] 본원에 사용된 "알칼리 금속 반대이온"은 Na^+ , K^+ 및 Li^+ 을 지칭한다.
- [0433] 본원에 사용된 용어 "히드로겔"은 공유 화학적 가교의 존재로 인해 불용성인, 단독중합체 또는 공중합체로 구성된 친수성 또는 친양쪽성 중합체 네트워크를 의미한다.
- [0434] 본원에 사용된 용어 "수 평균 분자량"은 개별 중합체의 분자량의 통상적인 산술 평균을 의미한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 중합 반응으로부터 수득된 중합 생성물이 모두 동일한 분자량을 갖는 것이 아니라 분자량 분포를 나타낸다는 것을 이해한다. 결과적으로, 본원에 사용된 바와 같은 분자량 범위, 분자량, 중합체 내 단량체의 수의 범위 및 중합체 내 단량체의 수는 수 평균 분자량 및 단량체의 수 평균을 지칭한다.
- [0435] 본원에 사용된 용어 "제약 조성물"은 1종 이상의 활성 성분(들) 및 1종 이상의 불활성 성분(들)을 포함하는 조성물 뿐만 아니라, 성분들 중 임의의 2종 이상의 조합, 복합체화 또는 응집으로부터, 또는 성분(들) 중 1종 이상의 해리로부터, 또는 성분들 중 1종 이상의 다른 유형의 반응 또는 상호작용으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 생성되는 임의의 생성물을 지칭한다.
- [0436] 본원에 사용된 용어 "부형제"는 치료제, 즉 VEGF 중화 전구약물, 예컨대 항-VEGF 항체와 함께 투여되는 희석제, 아조반트 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 제약 부형제는 물; 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일 및 석유, 예를 들어 비제한적으로 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등; 전분; 글루코스; 락토스; 수크로스; 만니톨; 트레할로스; 젤라틴; 맥아; 쌀; 소맥분; 백악; 실리카 겔; 스테아르산나트륨; 글리세롤 모노스테아레이트; 활석; 염화나트륨; 건조 탈지유; 글리세롤; 프로필렌; 글리콜; 에탄올; 아세테이트; 숙시네이트; 트리스; 카르보네이트; 포스페이트; HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술포산); MES (2-(N-모르폴리노)에탄술포산); 트윈(Tween)®; 폴록사머; 폴록사민; CHAPS; 이게팔(Igepal)®; 예를 들어 글리신, 리신 또는 히스티딘과 같은 아미노산; 트리글리세리드; 만니톨; 락토스; 전분; 스테아르산마그네슘; 소듐 사카린; 셀룰로스; 및 탄산마그네슘일 수 있다. 적합한 제약 부형제의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin]에 기재되어 있다. 제제는 투여 방식에 적합해야 한다.
- [0437] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는"은 분자 또는 시약이 동물, 바람직하게는 인간에서 사용하기 위해 규제 기관, 예컨대 EMA (유럽) 및/또는 FDA (미국) 및/또는 임의의 다른 국가 규제 기관에 의해 승인된 것을 의미한다.
- [0438] 본원의 목적상 "수용자 인간 프레임워크"는 하기 정의되는 바와 같은, 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산

서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

[0439] "친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)에 의해 나타내어질 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것들을 포함하여 관련 기술분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적인 설명적 및 예시적 실시양태가 하기에 기재된다.

[0440] "친화도 성숙" 항체는 1개 이상의 초가변 영역 (HVR) 및/또는 프레임워크 영역 (FR)에 1개 이상의 변형을 가지며, 이러한 변형을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화도에서의 개선을 가져오는 상기 변형을 갖는 항체를 지칭한다.

[0441] 용어 "혈관 내피 성장 인자" 또는 "VEGF"는 서열식별번호: 47에 의해 예시된 바와 같은 혈관 내피 성장 인자 단백질 A를 지칭한다 (또한 스위스 프룻 수탁 번호 P15692, 유전자 ID (NCBI): 7422 참조). 용어 "VEGF"는 서열식별번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 단백질, 뿐만 아니라 그의 상동체 및 이소형을 포괄한다. 용어 "VEGF"는 또한 VEGF의 공지된 이소형, 예를 들어 스플라이스 이소형, 예를 들어 VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, 및 VEGF₂₀₆을 그의 자연-발생 대립유전자 및 프로세싱된 형태, 예를 들어 문헌 [Ferrara Mol. Biol. Cell. 21:687 (2010), Leung et al., Science, 246:1306 (1989), 및 Houck et al., Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)]에 기재된 바와 같은 VEGF₁₆₅의 플라스민 절단에 의해 생성된 110-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자와 함께 포괄한다. 용어 "VEGF"는 또한 비-인간 종, 예컨대 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 지칭한다. 때때로 특정 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF에 대한 hVEGF, 뮤린 VEGF에 대한 mVEGF 등과 같은 용어로 나타낸다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 아미노산 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단된 형태를 지칭하는데 사용된다. VEGF의 임의의 이러한 형태에 대한 언급은 본 출원에서, 예를 들어 "VEGF₁₀₉," "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF₁₆₅"에 의해 확인될 수 있다. "말단절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 나타난 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 말단절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단된 천연 VEGF는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대해 천연 VEGF와 대등한 결합 친화도를 갖는다. 본원에 사용된 용어 "VEGF 변이체"는 천연 VEGF 서열에 1개 이상의 아미노산 돌연변이를 포함하는 VEGF 폴리펩티드를 지칭한다. 임의로, 1개 이상의 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환(들)을 포함한다. 본원에 기재된 VEGF 변이체의 약칭의 목적상, 숫자는 추정 천연 VEGF ([Leung et al., 상기 문헌] 및 [Houck et al., 상기 문헌]에 제공됨)의 아미노산 서열을 따른 아미노산 잔기 위치를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "VEGF"는 VEGF-A를 나타낸다.

[0442] 용어 "항-VEGF 항체", "VEGF에 결합하는 항체" 및 "VEGF에 특이적으로 결합하는 항체"는 충분한 친화도로 VEGF에 결합할 수 있는 항체를 지칭하며, 이러한 항체는 VEGF를 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하다. 한 실시양태에서, 관련되지 않은 비-VEGF에 대한 항-VEGF 항체의 결합의 정도는, 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의해 측정 시에 VEGF에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, VEGF에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (K_d)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 상이한 종으로부터의 VEGF 사이에 보존된 VEGF의 에피토프에 결합한다.

[0443] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.

[0444] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 한 부분을 포함하는, 무손상 항체가 아닌 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항

체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0445] 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편이라고 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편을 생산하며, 이 명칭은 용이하게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. Fab 단편은 전체 경쇄 (L)와 함께 중쇄 (H)의 가변 영역 도메인 (VH) 및 하나의 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)으로 이루어진다. 항체의 캡신 처리는, 2가 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디설피드 연결된 Fab 단편에 대략적으로 상응하고 항원과 여전히 가교할 수 있는 단일의 큰 F(ab')₂ 단편을 생성한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 CH1 도메인의 카르복시 말단에 추가 몇개의 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab-C 분자는 서열이 제1 힌지 시스테인에서 말단절단되어, 발현 시에 유리 시스테인을 갖는 Fab 분자가 직접 생성되도록 발현되는 Fab 분자이다 (예를 들어, 문헌 [Shatz et al. Mol. Pharmaceutics 2016; PubMed identifier (PMID) 27244474] 참조). 예를 들어, Fab-C 분자는 중쇄의 위치 Cys227에 유리 시스테인을 가질 수 있다. 다른 경우에, Fab-C 분자는 중쇄의 위치 Cys229에 유리 시스테인을 가질 수 있다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하고 있는 Fab'에 대한 본원의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0446] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 한 부분을 함유하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실-말단으로 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 기재된 바와 같은, EU 인덱스로도 불리는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0447] "Fv"는 강한 비-공유 회합 상태의 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다. 이들 2개의 도메인의 폴딩으로부터 6개의 초가변 루프 (H 및 L 쇠로부터 각각 3개의 루프)가 나오며, 이는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도, 종종 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만, 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0448] "sFv" 또는 "scFv"로도 약기되는 "단일-쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 쇠에 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv의 검토에 대해, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0449] 용어 "디아바디"는 VH와 VL 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)로 sFv 단편 (이전 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 쇠내가 아닌 쇠간 쌍형성을 달성하여 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 VH 및 VL 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠에 존재하는 2개의 "가교" sFv 단편으로 이루어진 이중이량체이다. 디아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0450] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 또는 감소시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0451] 참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 참조 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 지칭하고, 반대로 참조 항체는 경쟁 검정에서 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.

[0452] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 한 부분이 특정한 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분은 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 것인 항체를 지칭한다.

[0453] 항체의 "부류"는 그의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5가지 주요 부류의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇가지는 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂,

IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다.

- [0454] "모 항체"는 그로부터 1개 이상의 아미노산 잔기가 1개 이상의 잔기에 의해 대체된 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 모 항체는 천연 또는 야생형 서열을 포함할 수 있다. 모 항체는 다른 천연, 야생형 또는 변형된 형태의 항체에 비해 기존 아미노산 서열에 변형 (예를 들어, 부가, 결실 및/또는 치환)을 가질 수 있다. 모 항체는 관심 표적 항원, 예를 들어 생물학상 중요한 폴리펩티드, 예컨대 VEGF에 대해 지시될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체)는 모 항체일 수 있다.
- [0455] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에서 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B-세포 수용체)의 하향-조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.
- [0456] "프레임워크" 또는 "프레임워크 영역" 또는 "FR"은 추가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진다.
- [0457] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0458] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택에서 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 이루어진다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우에 하위군은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우에 하위군은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 III이다.
- [0459] 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우에, 인간화 항체는 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기가 목적하는 항체 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 중 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역으로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 FR 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 게다가, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정밀화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 한 부분을 포함할 것이다. 추가의 세부사항에 대해서는, 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.
- [0460] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편의 서열이 항체마다 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. 가변 또는 "V" 도메인은 항원 결합을 매개하고 특정한 항체의 그의 특정한 항원에 대한 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신, V 영역은 길이가 각각 9-12개 아미노산이며 가변성이 극도로 높아 "추가변 영역"으로 불리는 보다 짧은 영역에 의해 분리되어 있는, 15-30개 아미노산으로 이루어진 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 상대적으로 불변성인 스트레치로 이루어진다. 본원에 사용되는 경우에 용어 "추가변 영역" 또는 "HVR"은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 추가변 영역은 일반적으로 아미노산 잔기, 예를 들어 VL에서 대략 약 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에서 대략 약 잔기 26-35 (H1), 49-65 (H2) 및 95-102 (H3) (한 실시양태에서, H1은 대략 약 잔기 31-35임); 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 및/또는 "추가변 루프"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, VL에서 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 VH에서 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); 문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각, 베타-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성하는, 3개

의 초가변 영역에 의해 연결된, 베타-시트 배위를 주로 채택하는 4개의 FR을 포함한다. 각 쇠 내의 초가변 영역은 FR에 의해 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇠로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 서열로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 수반되지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0461] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 그의 변형은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서 항체 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 그 내로의 삽입에 상응하게 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따라 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따라 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬함으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0462] 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 언급하는 경우에 사용된다 (예를 들어, 상기 문헌 [Kabat et al.]에 보고된 EU 인덱스). "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다 (예를 들어, 미국 가출원 번호 60/640,323에서 EU 넘버링에 대한 도면 참조).

[0463] 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인 내의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 상기 문헌 [Kabat et al.]에 따라 본원에서 넘버링된다.

[0464] 본원에 개시된 다양한 항체를 기재하는데 사용되는 경우 용어 "단리된"은 항체를 발현하는 세포 또는 세포 배양물로부터 확인 및 분리되고/되거나 회수된 항체를 의미한다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 전형적으로 폴리펩티드의 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의한 결정 시 95% 또는 99% 초과 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법의 검토에 대해, 예를 들어 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 스피닝 캡 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도까지, 또는 (2) 쿠마시블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 비-환원 또는 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질해질 때까지 정제될 것이다. 폴리펩티드 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이므로, 단리된 항체는 제조할 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0465] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 상기 집단을 구성하는 개개의 항체는, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 함유하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체 (이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재함)를 제외하고, 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득된 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 제조할 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 모두 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있고, 이러한 방법 및 모노클로날 항체를 제조하는 다른 예시적

인 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0466]

용어 "다중특이적 항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항체를 포괄하며, 여기서 VH-VL 단위는 폴리에피토프 특이성을 갖는다 (즉, 하나의 생물학적 분자 상의 2개의 상이한 에피토프 또는 상이한 생물학적 분자 상의 각 에피토프에 결합할 수 있음). 이러한 다중특이적 항체는 전장 항체, 2개 이상의 VL 및 VH 도메인을 갖는 항체, 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab', Fab-C, Fv, dsFv, scFv, 디아바디, 이중특이적 디아바디 및 트리아바디, 공유 또는 비-공유 연결된 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. "폴리에피토프 특이성"은 동일하거나 상이한 표적(들) 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 지칭한다. "이중 특이성" 또는 "이중특이성"은 동일하거나 상이한 표적(들) 상의 2개의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 지칭한다. 그러나, 이중특이적 항체와 달리, 이중-특이적 항체는 아미노산 서열이 동일한 2개의 항원-결합 아암을 갖고 각각의 Fab 아암은 2개의 항원을 인식할 수 있다. 이중-특이성은 항체가 단일 Fab 또는 IgG 분자로서 2개의 상이한 항원과 고친화도로 상호작용하는 것을 가능하게 한다. 한 실시양태에 따르면, 다중특이적 항체는 각각의 에피토프에 5 μ M 내지 0.001 pM, 3 μ M 내지 0.001 pM, 1 μ M 내지 0.001 pM, 0.5 μ M 내지 0.001 pM 또는 0.1 μ M 내지 0.001 pM의 친화도로 결합하는 IgG1 형태이다. "단일특이적"은 1개의 에피토프에만 결합하는 능력을 지칭한다.

[0467]

"천연 항체"는 다양한 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VH)에 이어서 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VL)에 이어서 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2가지 유형 중 1가지로 배정될 수 있다.

[0468]

표적 분자에 대한 항체의 결합과 관련해서, 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 표적 상의 에피토프와의 "특이적 결합" 또는 "그에 특이적으로 결합한다" 또는 "그에 대해 특이적"이라는 용어는 비-특이적 상호작용과 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은, 예를 들어 분자의 결합을 대조군 분자의 결합과 비교하여 결정함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조군 분자, 예를 들어 과량의 비-표지 표적과의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이러한 경우에, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비-표지 표적에 의해 경쟁적으로 억제되는 경우 특이적 결합이라고 나타낸다. 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 표적 상의 에피토프와의 "특이적 결합" 또는 "그에 특이적으로 결합한다" 또는 "그에 대해 특이적"이라는 용어는, 예를 들어 표적에 대한 10^{-4} M 이하, 대안적으로 10^{-5} M 이하, 대안적으로 10^{-6} M 이하, 대안적으로 10^{-7} M 이하, 대안적으로 10^{-8} M 이하, 대안적으로 10^{-9} M 이하, 대안적으로 10^{-10} M 이하, 대안적으로 10^{-11} M 이하, 대안적으로 10^{-12} M 이하의 Kd 또는 10^{-4} M 내지 10^{-6} M 또는 10^{-6} M 내지 10^{-10} M 또는 10^{-7} M 내지 10^{-9} M의 범위의 Kd를 갖는 분자에서 나타날 수 있다. 통상의 기술자에 의해 인지될 바와 같이, 친화도 및 Kd 값은 반비례 관계에 있다. 항원에 대한 고친화도는 낮은 Kd 값에 의해 측정된다. 한 실시양태에서, 용어 "특이적 결합"은 분자가 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 결합을 지칭한다.

[0469]

참조 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우에 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭을 도입한 후 임의의 보존적 치환은 서열 동일성 부분으로 간주하지 않으면서 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은 관련 기술분야 기술 내의 다양한 방식으로, 예를 들어 공중 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비교할 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함한, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네테크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공중 이용가능하거나 또는 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함한 UNIX 운영 시스템에서의 사용을 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 달라

지지 않는다.

[0470] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 경우에, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, B와의, 또는 B 대비 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, B와의, 또는 B 대비 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 또는 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)은 하기와 같이 계산된다: X/Y 의 분율 $\times 100$, 여기서 X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 프로그램 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 개수이고, Y는 B 내의 아미노산 잔기의 총 개수임. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않은 경우에, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성이 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동등하지 않을 것이 인지될 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 직접 단락에 기재된 바와 같이 취득된다.

[0471] 본원에 사용된 "투여하는"은 대상체에게 소정 투여량의 화합물 (예를 들어, 본 발명의 항체-히드로겔 집합체) 또는 조성물 (예를 들어, 제약 조성물, 예를 들어 본 발명의 항체-히드로겔 집합체를 포함하는 제약 조성물)을 제공하는 방법을 의미한다. 본원에 기재된 방법에 이용된 조성물은, 예를 들어 유리체내로 (예를 들어, 유리체 내 주사에 의해), 점안제에 의해, 근육내로, 국소로, 결막하로, 소포내로, 안구내로, 안와내로, 주사에 의해, 이식에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 지질 조성물로 투여될 수 있다.

[0472] "혈관신생"은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정을 지칭한다. 혈관신생은, 중배엽 세포 전구체로부터의 내피 세포의 신생 형성인 혈관생성과는 상이하다. 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 본 발명의 조성물 및 방법에 의해 치료될 수 있다. 이들 장애는 비-신생물성 장애 및 세포 증식성 장애 둘 다를 포함한다. 세포 증식성 장애는 하기 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비-신생물성 장애는 안구 상태 (비제한적 안구 상태는, 예를 들어 증식성 당뇨병성 망막병증, 맥락막 신생혈관화 (CNV), 연령-관련 황반 변성 (AMD), 당뇨병성 및 다른 허혈-관련 망막병증을 포함한 망막병증, 당뇨병성 황반 부종 (DME), 병리학적 근시, 폰 히켈-윈다우병, 눈의 히스토플라스마증, 망막 정맥 폐쇄 (중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태 포함), 각막 신생혈관화, 망막 신생혈관화, 미숙아 망막병증 (ROP), 가족성 삼출성 유리체망막병증 (FEVR), 코우츠병, 노리병, 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG), 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 및 고혈압성 망막병증을 포함함), 자가면역 질환 (예를 들어, 류마티스 관절염 (RA), 건선, 강직성 척추염, 및 염증성 장 질환 (예를 들어, 크론병 및 궤양성 결장염)), 바람직하지 않은 또는 이상 비대, 관절염, 건선성 관절염, 판상 건선, 사르코이드증, 아테롬성동맥경화증, 아테롬성동맥경화관, 동맥 동맥경화증, 혈관 재협착, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 증식증 (그레이브스병 포함), 각막 및 다른 조직 이식, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 졸중/폐쇄성 두부 손상/외상과 연관된 것), 활막 염증, RA에서의 판누스 형성, 골화성 근염, 비대성 골 형성, 골관절염 (OA), 불응성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 제3강 유체 질환 (체장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 만성 천식, 자궁 유섬유종, 조속 산통, 만성 염증, 예컨대 IBD (크론병 및 궤양성 결장염), 염증성 신질환 (사구체신염, 특히 사구체간질증식성 사구체신염, 용혈성 요독성 증후군, 당뇨병성 신병증 및 고혈압성 신경화증 포함), 이식 후 발생 질환, 신장 동종이식편 거부, 염증성 질환, 신증후군, 바람직하지 않은 또는 이상 조직 덩어리 성장 (비-암), 혈우병성 관절, 비대성 반흔, 모발 성장 억제, 오슬러-웨버 증후군, 화농성 육아종 수정체후 섬유증식증, 경피증, 트라코마, 혈관 부착, 활막염, 피부염, 전자간증, 복수, 심막 삼출 (예컨대 심막염과 연관된 것), 및 흉막 삼출을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가의 안구 장애는 하기에 기재된다.

[0473] 병리학적 혈관신생과 연관될 수 있는 다른 장애는 불유합 골절 (치유되지 않을 골절), 화농성 육아종, 트라코마, 혈우병성 관절, 혈관 부착 및 비대성 반흔, 이식편 거부, 섬유혈관 조직, 여드름 장미증, 후천성 면역 결핍 증후군, 동맥 폐쇄, 아토피성 각막염, 박테리아성 궤양, 베체트병, 경동맥 폐쇄성 질환, 만성 염증, 만성 망막 박리, 만성 포도막염, 만성 유리체염, 콘택트 렌즈 과도착용, 각막 이식편 거부, 각막 이식 신생혈관화, 일스병, 유행성 각결막염, 진균 궤양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 고점도 증후군, 카포시 육종, 백혈병, 지질 변성, 라임병, 변연 각질용해, 무륜 궤양, 나병 이외의 미코박테리아 감염, 근시, 시신경 유두소와, 골관절염, 파제트병, 주변부 포도막염, 유천포창, 플릭텐증, 다발동맥염, 레이저-후 합병증, 원충 감염, 탄성섬유 가성황색증, 건성 익상편 각막염, 방사상 각막절개술, 수정체후 섬유증식증, 사르코이드, 공막염, 겸상 적혈구성 빈혈, 쇼그렌 증후군, 스타르가르트병, 스티븐 존슨병, 상운부 각막염, 매독, 전신 루푸스, 테리엔 변연 각막변성, 독소플라스마증, 외상, 정맥 폐쇄, 비타민 A 결핍 및 베게너 사르코이드증, 당뇨병과 연관된 바람직하지 않은 혈관신생, 기생충성 질환, 비정상적 상처 치유, 수술 후 비대, 손상 또는 외상, 모발 성장 억제, 배란 및 황체 형성 억제, 자궁 내 착상 및 배아 발생의 억제를 포함한다.

- [0474] 본원에 사용된 용어 "안구 장애"는 병리학적 혈관신생과 연관된 임의의 안구 장애 (또한 "안구 상태"로 본원에서 상호교환가능하게 지칭됨)를 포함한다. 안구 장애는 안구 조직의 구조, 예컨대 망막 또는 각막 내로의 새로운 혈관의 변경된 또는 비조절된 증식 및/또는 침습을 특징으로 할 수 있다. 비제한적 안구 장애는, 예를 들어 AMD (예를 들어, 습성 AMD, 건성 AMD, 중기 AMD, 진행성 AMD, 및 지도형 위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예를 들어, 초점성, 비-중심 DME 및 미만성, 중심-침범 DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증 (DR) (예를 들어, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR) 및 높은-고도 DR), 다른 허혈-관련 망막병증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예를 들어, 중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태), CNV (예를 들어, 근시성 CNV), 각막 신생혈관화, 각막 신생혈관화와 연관된 질환, 망막 신생혈관화, 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 질환, 병리학적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠병, 노리병, OPPG, 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압성 망막병증, 망막 혈관종성 증식, 황반 모세혈관확장증, 홍채 신생혈관화, 안내 신생혈관화, 망막 변성, 낭포양 황반 부종 (CME), 혈관염, 유두부종, 망막염, 결막염 (예를 들어, 감염성 결막염 및 비-감염성 (예를 들어, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑암시 (또한 레베르 선천성 흑암시 또는 LCA로도 공지됨), 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예를 들어, 다초점성 맥락막염), 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조, 외상성 눈 손상, 쇼그렌병, 및 다른 안과 질환을 포함하며, 여기서 질환 또는 장애는 안구 신생혈관화, 혈관 누출, 및/또는 망막 부종과 연관된다. 추가의 예시적인 안구 장애는 피부홍조와 연관된 질환 (각 신생혈관화) 및 모든 형태의 증식성 유리체망막병증을 포함한, 섬유혈관 또는 섬유성 조직의 비정상적 증식에 의해 야기된 질환을 포함한다.
- [0475] 각막 신생혈관화와 연관된 예시적인 질환은 유행성 각결막염, 비타민 A 결핍, 콘택트 렌즈 과도착용, 아토피성 각막염, 상윤부 각막염, 건성 익상편 각막염, 쇼그렌 증후군, 여드름 장미증, 플릭텐증, 매독, 미코박테리움 감염, 지질 변성, 화학 화상, 박테리아성 궤양, 진균 궤양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 원충 감염, 카포시 육종, 무릎 궤양, 테리엔 변연 각막변성, 변연 각질용해, 류마티스 관절염, 전신 루푸스, 다발동맥염, 외상, 베게너 사르코이드증, 공막염, 스티븐스-존슨 증후군, 유천포창 방사상 각막절개술 및 각막 이식편 거부를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0476] 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 예시적인 질환은 당뇨병성 망막병증, 황반 변성, 겸상 적혈구성 빈혈, 사르코이드, 매독, 탄성섬유 가성황색증, 파제트병, 정맥 폐쇄, 동맥 폐쇄, 경동맥 폐쇄성 질환, 만성 포도막염/유리체염, 미코박테리아 감염, 라임병, 전신 홍반성 루푸스, 미숙아 망막병증, 색소성 망막염, 망막 부종 (황반 부종 포함), 일스병, 베체트병, 망막염 또는 맥락막염 (예를 들어, 다초점성 맥락막염)을 야기하는 감염, 추정 안구 히스토플라스마증, 베스트병 (난황상 황반 변성), 근시, 시신경 유두소와, 스타르가르트병, 주변부 포도막염, 망막 박리 (예를 들어, 만성 망막 박리), 고점도 증후군, 특소플라스마증, 외상, 및 레이저후 합병증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0477] 본원에 사용된 "바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애"는, 예를 들어 뇌 종양과 연관된 부종, 악성종양과 연관된 복수, 메이그스 증후군, 폐 염증, 신증후군, 심막 삼출, 흉막 삼출, 심혈관 질환과 연관된 투과성, 예컨대 심근경색 및 졸중 후 상태 등을 포함한다.
- [0478] 출발 또는 참조 폴리펩티드 (예를 들어, 참조 항체 또는 그의 가변 도메인(들)/HVR(들))의 "변이체" 또는 "돌연변이체"는 (1) 출발 또는 참조 폴리펩티드의 경우와 상이한 아미노산 서열을 갖고 (2) 천연 또는 인공 (인간-제조) 돌연변이유발을 통해 출발 또는 참조 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드이다. 이러한 변이체는, 예를 들어 관심 폴리펩티드의 아미노산 서열로부터의 잔기의 결실 및/또는 그 내로의 잔기의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함하며, 이는 본원에서 "아미노산 잔기 변경"으로 지칭된다. 따라서, 변이체 HVR은 출발 또는 참조 폴리펩티드 서열 (예컨대, 공급원 항체 또는 항원 결합 단편의 것)에 대한 변이체 서열을 포함하는 HVR을 지칭한다. 이와 관련하여, 아미노산 잔기 변경은 출발 또는 참조 폴리펩티드 서열 (예컨대 참조 항체 또는 그의 단편의 것) 내의 상응하는 위치에서의 아미노산과 상이한 아미노산을 지칭한다. 최종 구축물이 목적하는 기능적 특징을 보유하는 한, 최종 변이체 또는 돌연변이체 구축물에 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다. 아미노산 변화는 또한 폴리펩티드의 번역-후 과정을 변경시킬 수 있으며, 예컨대 글리코실화 부위의 개수 또는 위치를 변화시킬 수 있다.
- [0479] "야생형 (WT)" 또는 "참조" 서열 또는 "야생형" 또는 "참조" 단백질/폴리펩티드, 예컨대 참조 항체의 HVR 또는 가변 도메인의 서열은 돌연변이의 도입을 통해 변이체 폴리펩티드가 유도되는 참조 서열일 수 있다. 일반적으로, 주어진 단백질에 대한 "야생형" 서열은 자연에서 가장 흔한 서열이다. 유사하게, "야생형" 유전자 서열은 자연에서 가장 흔히 발견되는 그 유전자에 대한 서열이다. 돌연변이는 자연 과정을 통해 또는 인간-유도된 수단을 통해 "야생형" 유전자 (및 이에 따라 그것이 코딩하는 단백질) 내로 도입될 수 있다. 이러한 과정의 생성

물은 원래 "야생형" 단백질 또는 유전자의 "변이체" 또는 "돌연변이체" 형태이다.

[0480] 본원에 사용된 용어 "클리어런스"는 단위 시간당 구획 (예를 들어, 눈 (예를 들어, 유리체))으로부터 클리어링 된 물질 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 항체 접합체, 융합 단백질 (예를 들어, Fab 융합 단백질) 또는 중합체 제제)의 부피를 지칭한다.

[0481] 용어 "반감기"는 물질 (예를 들어, 항-VEGF 항체, 항체 접합체, 융합 단백질 (예를 들어, Fab 융합 단백질) 또는 중합체 제제)의 농도가 생체내에서 (예를 들어, 눈 (유리체)에서) 또는 시험관내에서 절반으로 감소하는데 필요한 시간을 지칭한다.

[0482] 용어 "유효 반감기"는 접합체, 예를 들어 히드로겔-링커-항체 접합체의 농도가 생체내에서 (예를 들어, 눈에서, 예를 들어, 유리체에서) 또는 시험관내에서 절반으로 감소하는데 필요한 시간을 지칭한다. 접합체의 각각의 성분, 예를 들어 히드로겔, 링커 및 항체는 접합체의 유효 반감기에 기여할 수 있는 것으로 이해된다.

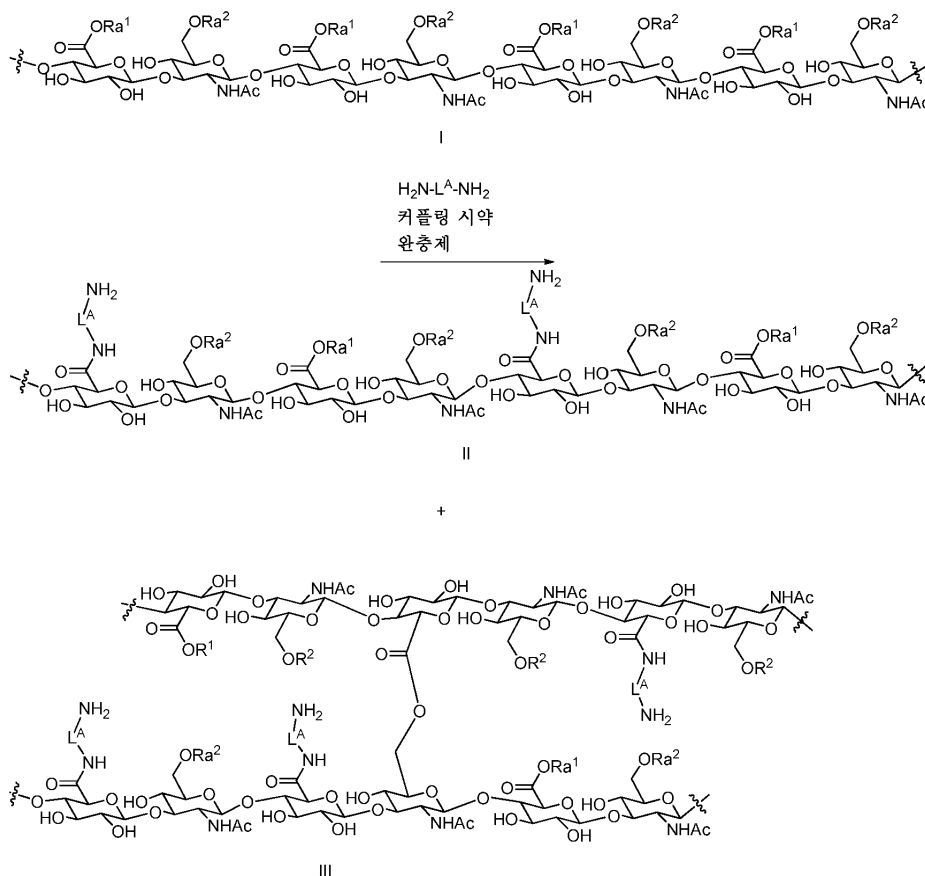
[0483] HA 정제

[0484] HA는 본 개시내용의 방법에 따라 유도체화 전에 임의로 정제될 수 있다. 일부 이러한 측면에서, HA 및 약 0.5 내지 약 1 mol/L의 아세트산나트륨을 포함하는 수용액이 형성된다. 에탄올을 약 80% 에탄올 v/v로 첨가하여 용액으로부터 HA가 침전된다. 침전된 HA는 수집되고, 약 80% v/v 에탄올에 이어서 무수 에탄올로 세척된다. 목적하는 순도가 달성될 때까지 필요에 따라 용해/침전/세척 절차가 반복될 수 있다.

[0485] 아민-관능화된 히알루론산의 제조

[0486] 일부 측면에서, 하기 반응식 1에 따라 히알루론산은 화학식 I의 HA, 1급 아민 ($H_2N-L^A-NH_2$) 및 카르복실-활성화 커플링 시약을 포함하는 반응 혼합물을 반응시킴으로써 아민으로 관능화되어 화학식 II의 아민-HA 및 화학식 III의 부분적으로 가교된 아민-HA를 형성한다.

[0487] 반응식 1



[0488]

[0489] 반응식 1에 제시된 바와 같은 아민 시약 $H_2N-L^A-NH_2$ 에 의한 HA II 및 III의 관능화도는 본원 다른 곳에 기재된

바와 같다.

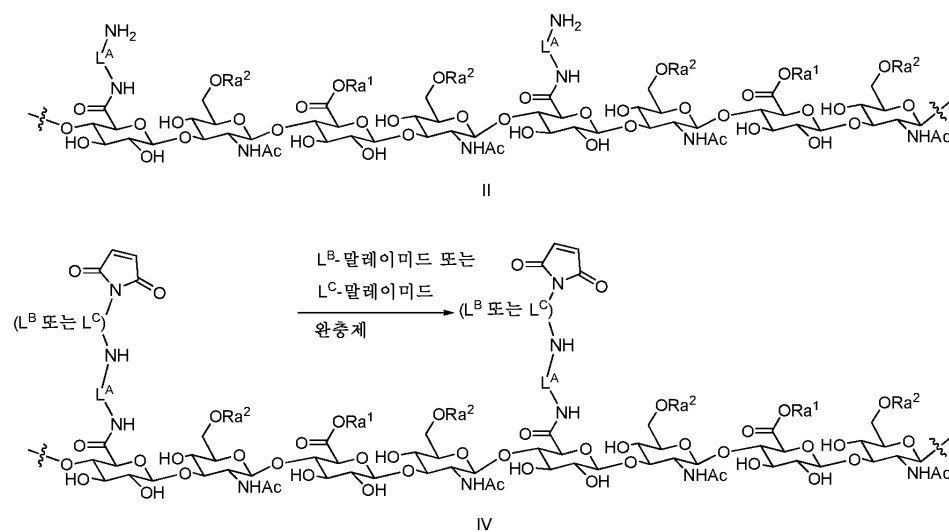
- [0490] 반응식 1에서, 각각의 Ra^1 은 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬, 알칼리 금속 반대-이온, 암모늄 반대-이온, 또는 알칼리 토금속 반대-이온으로부터 선택된다. 각각의 Ra^2 는 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬 및 알칼리 금속 반대-이온으로부터 선택된다. 후속적으로 화학식 III에서의 가교 에스테르 결합은 하기에 추가로 기재된 바와 같이 가수분해되어, 화학식 II의 추가의 물질을 제공하고, 반응식 1의 반응 생성물을 평균 여과에 적용할 수 있게 한다.
- [0491] 일부 이러한 측면에서, L^A 는 스페이서이다. 일부 다른 측면에서, L^A 는 임의로 치환되고/거나 임의로 개재된 C_{1-10} 알킬렌이다. 일부 이러한 측면에서, L^A 는 선형 C_{2-4} 알킬렌이거나, 또는 n-프로필렌이다. 다른 측면에서, L^A 는 옥시알킬렌 올리고머 또는 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다.
- [0492] 반응식 1에서의 아미드 형성은 커플링 시약을 이용하며, 이는 특정 실시양태에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보다이미드 (EDC), 디시클로헥실카르보다이미드 (DCC), 디이소프로필카르보다이미드 (DIC), 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드 (DMTMM) 및 2-클로로-4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진 (CDMT)으로부터 선택될 수 있다. 일부 특정 측면에서, 커플링 시약은 EDC이다.
- [0493] 일부 측면에서, 반응 혼합물은 커플링 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 이러한 측면에서, 커플링 첨가제는 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt), 1-히드록시-7-아자-1H-벤조트리아졸 (HOAt), N-히드록시숙신이미드 (HOSu), 및 에틸 2-시아노-2-(히드록시이미노)아세테이트 (옥시마 퓨어(Oxyma pure)®)로부터 선택될 수 있다. 일부 특정한 측면에서, 커플링 첨가제는 HOBt이다. 다른 실시양태에서 커플링 시약은 1-시아노-2-에톡시-2-옥소에틸리덴아미노옥시)디메틸아미노-모르폴리노-카르베늄 헥사플루오로포스페이트 (COMU)일 수 있다. 약 50 mM 내지 150 mM의 농도에서 약 5 내지 약 6의 pH를 갖는 완충제가 아민-관능화된 히알루론산을 형성하기 위한 반응 혼합물에 일반적으로 적합하다. 일부 이러한 측면에서, 완충제는 2-(N-모르폴리노)에탄술포산 (MES)이다.
- [0494] 반응 혼합물은 일부 실시양태에서 반응물의 용해도를 개선시키기 위해 극성 비양성자성 용매를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 측면에서, 완충제 대 극성 비양성자성 용매의 적합한 비는 약 1:3 v/v, 약 1:2 v/v, 약 1:1.5 v/v, 약 1:1 v/v, 약 1.5:1 v/v, 약 2:1 v/v, 약 3:1 v/v, 약 5:1 v/v 또는 약 10:1 v/v이다. 일부 이러한 측면에서, 극성 비양성자성 용매는 아세톤, N,N-디메틸 포름아미드 (DMF), 아세토니트릴 (ACN), 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 그의 조합으로부터 선택될 수 있다. 한 측면에서, 용매는 아세토니트릴이다.
- [0495] 아민 관능화는 약 10°C, 약 15°C, 약 20°C, 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C 또는 약 40°C의 온도에서, 본질적으로 완전한 커플링을 달성하기에 적합한 시간, 예컨대 약 2시간, 약 4시간, 약 6시간, 약 8시간, 약 10시간, 약 12시간 또는 그 초과 시간 동안 수행될 수 있다.
- [0496] 본 개시내용의 다양한 측면 중 임의의 측면에서, 카르복실기의 당량은 상기 기재된 바와 같이 형성된 관능화된 HA에서의 1급 아민의 당량을 초과하여, 반응식 I에 도시된 바와 같이 HA 카르복실기 모두가 관능화되지는 않는다. 보다 구체적으로, 아민 관능기가 도입되어 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14% 또는 약 15% 및 그의 범위 또는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 HA (또는 그의 유도체 또는 알칼리 금속 염)의 관능화도를 제공한다. 히알루로네이트, 1급 아민 및 커플링 첨가제의 농도는 일정하게 유지될 수 있고, 상기 농도는 형성된 아민-관능화된 히알루론산의 목적하는 아민 로드와 무관하다.
- [0497] 적합한 히알루로네이트 농도의 예는, 예를 들어 2 g/L 내지 16 g/L 범위일 수 있다. HA I 상의 카르복실레이트기의 당량에 대한 아민 시약 및 아미드 커플링 첨가제의 당량수는 목적하는 관능화도를 제공하기 위해 필요한 만큼 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서 관능화도는 과량의 아민 시약의 존재 하에 아미드 커플링 시약의 당량을 기준으로 제어될 수 있다.
- [0498] 반응식 1에 도시된 바와 같이, HA의 한 부분은 에스테르 결합에 의해 가교되어 부분적으로 가교된 아민-HA를 형성할 수 있다. 이러한 부분적으로 가교된 HA는 수성 시스템에서 가용성이지만, 대부분의 경우에는 평균 여과가 능하지 않다. 가교된 HA는 염기의 존재 하에 인큐베이션되어 에스테르 결합을 가수분해하고 선형 아민-HA를 제공할 수 있다. 적합한 염기는 알칼리 금속 염기, 예컨대 NaOH, KOH 및 LiOH를 포함한다. 가수분해는 염기 농도, 예컨대 약 0.1 M, 약 0.5 M, 약 1 M, 약 1.5 M 또는 약 2 M에서, 약 12 내지 약 14, 약 13 내지 약 14, 또는 약 14의 pH에서, 약 10°C, 약 15°C, 약 20°C, 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C, 또는 약 40°C의 온도에서, 본질

적으로 완전한 가수분해를 달성하는데 적합한 시간, 예컨대 약 0.5시간, 약 1시간, 약 1.5시간, 약 2시간 또는 그 초과 시간 동안 수행될 수 있다. 이러한 가수분해된 아민-HA는 본질적으로 천연 HA 출발 물질과 동일한 수 평균 분자량을 갖고, 수성 시스템에서 가용성이고, 멸균 여과가능하다. 가수분해 후, pH는 무기산 또는 유기산을 사용하여 약 6 내지 약 8.5, 약 6.5 내지 약 8, 또는 약 7.5로 조정될 수 있다. 일부 측면에서, 산은 아세트산이다.

[0499] 말레이미도-관능화된 HA의 제조

[0500] 본 개시내용의 일부 측면에서, 본원 다른 곳에 기재된 아민-관능화된 HA는 -N-히드록시숙신이미드 (NHS)-L^A-말레이미드 또는 NHS-L^C-말레이미드와 반응하여 말레이미도-관능화된 HA를 형성한다. 일부 이러한 측면에서, 하기 반응식 2에 따라 화학식 II의 HA 유도체는 NHS-L^B-말레이미드 또는 NHS-L^C-말레이미드 (여기서 NHS는 N-히드록시숙신이미드이고, L^B 또는 L^C의 활성화된 에스테르 형태임)와 반응하여 화학식 IV의 말레이미도-관능화된 HA를 형성한다.

[0501] 반응식 2



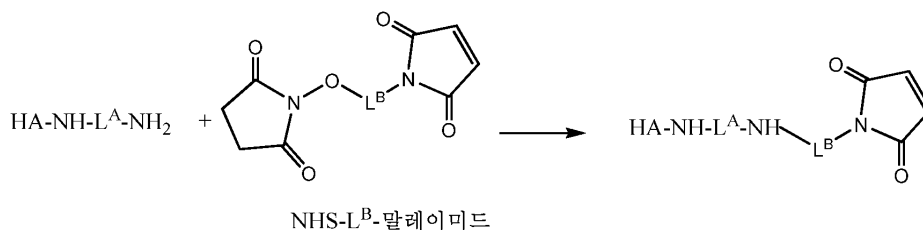
[0502]

[0503] 여기서 Ra¹, Ra² 및 L^A는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같다. 일부 특정한 측면에서, 말레이미드 스페이서는 L^B이다. 다른 측면에서, 말레이미드 스페이서는 L^C이다. 반응식 2에 제시된 바와 같이, 각각 아민 시약 H₂N-L^A-NH₂ 및 L^B-말레이미드 또는 L^C-말레이미드에 의한 HA II 및 IV의 관능화도는 임의적이고, 관능화도는 본 발명의 다양한 실시양태에서 요구되는 바에 따라 달라질 수 있고 말레이미드 관능화도는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같을 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 많은 실시양태에서, HA II 상의 아민 관능기 대부분 또는 모두가 L^B-말레이미드 또는 L^C-말레이미드와 반응하지만, 특정 실시양태에서는 잔류 아민 관능기가 존재할 수 있다.

[0504] 일부 측면에서, L^B는 본원에 기재된 바와 같은 스페이서 모이어티이다. 일부 측면에서, L^B는 임의로 치환되고/거나 임의로 개재된 C₁₋₁₀ 알킬렌이다. 일부 측면에서, L^B는 -C(O)-C₁₋₅ 알킬렌이다. 일부 이러한 측면에서, L^B는 선형 -(O)-C₂₋₃ 알킬렌이거나, 또는 -C(O)-에틸렌이다.

[0505] 일부 측면에서, L^C는 본원에 기재된 바와 같은 생분해성 스페이서 모이어티이다. 일부 측면에서, L^C는 적어도 1개의 에스테르 모이어티, 적어도 1개의 카르보네이트 연결 또는 그의 조합을 포함할 수 있다.

[0516] 반응식 3

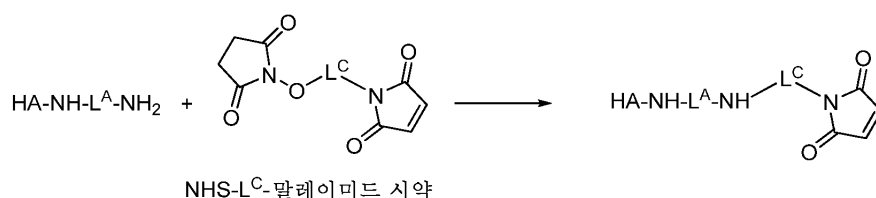


[0517]

[0518] 일부 특정한 측면에서, L^A는 n-프로필렌이고, L^B는 -C(O)-(CH₂)₂-이다. 일부 측면에서, 완충제는 HEPES이고, 반응 pH는 약 7 내지 약 8, 또는 약 7.4이고, 완충제는 ACN을 약 2:1의 완충제 대 ACN의 부피비로 포함하고, 반응 온도는 약 20℃ 내지 약 30℃이고, 반응 시간은 약 0.5시간 내지 약 2시간이다.

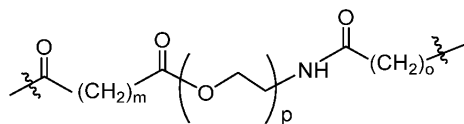
[0519] 일부 다른 반응식 2 측면에서, 하기 반응식 4에 따라 말레이미도-관능화된 HA는 아민-관능화된 HA의 1급 아민을 NHS-L^C-말레이미드 시약과 반응시킴으로써 수득된다.

[0520] 반응식 4



[0521]

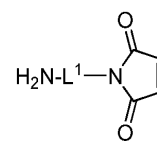
[0522] 일부 특정한 측면에서, L^A는 n-프로필렌이고, L^C는 하기 구조를 갖는다:



[0523]

[0524] 여기서 m은 7이고, p는 2이고, o는 2이다. 일부 측면에서, 완충제는 HEPES이고, 반응 pH는 약 8 내지 약 9, 또는 약 7.4이고, 완충제는 ACN을 약 2:1의 완충제 대 ACN의 부피비로 포함하고, 반응 온도는 약 20℃ 내지 약 30℃이고, 반응 시간은 약 1시간 내지 약 3시간이다.

[0525] 말레이미도-관능화된 HA의 직접적 제조



[0526] 일부 측면에서, 도 2에 도시된 바와 같이, HA (또는 그의 유도체 또는 염), 구조 2 및 카르복실-활성화 커플링 시약을 포함하는 반응 혼합물을 반응시킴으로써 말레이미드 기가 HA에 직접 접합되어 접합된 말레이미드 기를 갖는 화합물 4를 형성할 수 있다.

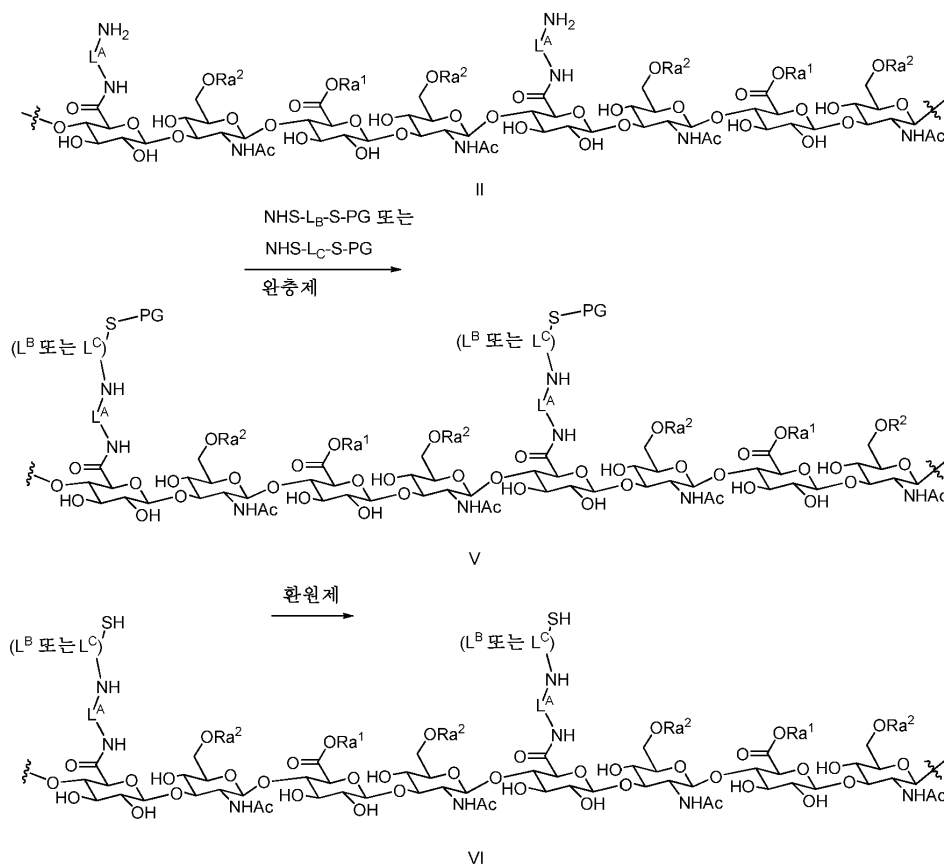
[0527] L¹은 본원에 기재된 바와 같은 스페이서 모이어티이다. 일부 측면에서, L¹은 C₁₋₁₂ 알킬, C₂₋₁₀ 알킬 또는 C₃₋₈ 알킬이다. L¹은 본원 다른 곳에 기재된 바와 같이 임의로 치환되고/거나 임의로 개재될 수 있다. 예를 들어, L¹에는 아마이드 또는 아민 중 1개 이상이 임의로 개재될 수 있다.

[0528] 티올-관능화된 HA의 제조

[0529] 본 개시내용의 일부 측면에서, 본원 다른 곳에 기재된 아민-관능화된 HA는 NHS-L^B-S-보호기 또는 NHS-L^C-S-보호기와 반응한 후 탈보호되어 티올-관능화된 HA를 형성한다. 일부 이러한 측면에서, 하기 반응식 5에 따라 화학

식 II 또는 화학식 IIa는 NHS-L^B-S-보호기 또는 NHS-L^C-S-보호기와 반응하여 화학식 V를 형성한 후 탈보호되어 화학식 VI의 티올-관능화된 HA를 형성한다.

[0530] 반응식 5



[0531]

[0532] 여기서 Ra¹, Ra², L^A, L^B 및 L^C는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같다. 일부 특정한 측면에서, 반응식 5의 화합물 V에서의 -S-PG 및 화합물 VI에서의 -SH에 연결된 스페이서는 L^C이다.

[0533] 상기 반응식 5에서와 같이, 반응식 5에 제시된 NHS-L^B-S-보호기 또는 NHS-L^C-S-보호기에 의한 HA V 및 VI의 관능화도는 임의적이고, 관능화도는 본 발명의 다양한 실시양태에서 요구되는 바에 따라 달라질 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 보호된 티올 (및 궁극적으로 티올) 관능화도는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같다. 많은 실시양태에서, HA II 상의 아민 관능기 대부분 또는 모두가 NHS-L^B-S-보호기 또는 NHS-L^C-S-보호기와 반응하지만, 특정 실시양태에서는 잔류 아민 관능기가 존재할 수 있다.

[0534] 반응식 5에 대한 집합 반응 pH는 적합하게는 약 7.5 내지 약 9.5, 또는 약 8 내지 약 9, 예컨대 약 8.5이다. 약 50 mM 내지 약 150 mM의 농도에서의 적합한 완충제는 본원 다른 곳에 기재된다. 일부 측면에서, 완충제는 HEPES이다. 반응 혼합물은 반응물의 용해도를 개선시키기 위해 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 극성 비양성자성 용매를 추가로 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 용매는 ACN이다. 완충제 대 극성 비양성자성 용매의 비는 적합하게는 약 1:2 v/v 내지 약 4:1, 또는 약 3:1 내지 약 1:1, 예컨대 약 2:1이다. 반응 온도는 약 10℃, 약 15℃, 약 20℃, 약 25℃, 약 30℃, 약 35℃ 또는 약 40℃이고, 반응 시간은 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간 또는 그 초과이다.

[0535] 화학식 V의 HA 유도체는 환원제와 접촉되어 디설피드 결합에서의 보호기를 절단하여 티올로 종결된 L^B 또는 L^C를 생성한다 (화학식 VI). 절단가능한 보호기는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 비제한적 예는 피리딜-티올 및 페닐-티올을 포함하고, 이는 NO₂, Cl, F, CN, CO₂H, 및 Br로부터 독립적으로 선택된 적어도 1개의 치환기로 임의로 치환될 수 있다. 하나의 이러한 측면에서, 이탈기는 2-메르캅토피리딜이다. 환원제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, (트리스(2-카르복시에틸)포스핀) HCl 염 (TCEP), 2-메르캅토포에탄올 및 디티오프레톨을 포함한

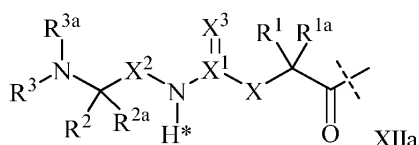
다.

[0536] 티올-관능화된 HA의 직접적 제조

[0537] 일부 측면에서, 도 3에 도시된 바와 같이, HA (또는 그의 유도체 또는 염), 구조 H_2N-L^3-S-PG 의 보호된 디설피드 화합물 6 및 카르복실-활성화 커플링 시약을 포함하는 반응 혼합물을 반응시킴으로써 보호된 디설피드 기가 HA에 직접 접합되어 접합된 보호된 디설피드 기를 갖는 화합물 8을 형성할 수 있다. 보호기는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같이 절단되어 티올-관능화된 HA를 생성할 수 있다.

[0538] 약물-링커 접합체

[0539] 약물-링커 접합체, 예컨대 도 2에서의 시약 5, 도 5에서의 시약 14 및 도 7에서의 시약 5는 본 발명에 따른 가교된 HA 약물 접합체의 제조에 사용된다. 많은 실시양태에서, 약물 링커 접합체는 상기 기재된 바와 같은 화학식 II의 가역적 전구약물 링커 L^2 를 이용할 수 있다. 일부 다른 측면에서, 이러한 약물 단일접합체에 사용되는 가역적 전구약물 링커 모이어티 L^2 는 화학식 XIIa에 의해 나타내어질 수 있다:



[0540]

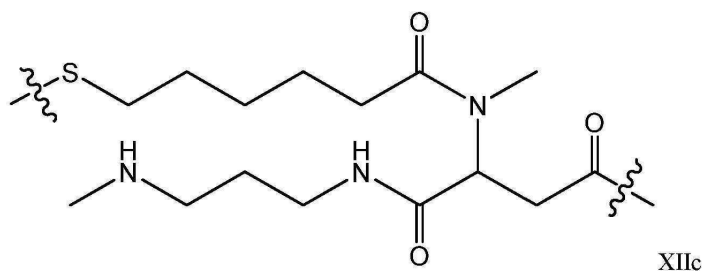
[0541] 여기서

[0542] 파선은 아마이드 결합 형성에 의한 약물 화합물 (나타내지 않음)의 질소에 대한 부착을 나타내고;

[0543] X , X^1 , X^2 , X^3 , R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , R^3 및 R^{3a} 는 상기와 같이 정의된다.

[0544] 많은 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 는, 합성 편의를 위해, 스페이서 L^4 또는 스페이서 L^4 의 한 부분과 함께 제조될 수 있다.

[0545] 일부 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 모이어티 L^2 는 스페이서 L^4 의 한 부분과 함께 화학식 XIIc를 포함하는 스페이서-링커 화합물에 의해 나타내어질 수 있다:

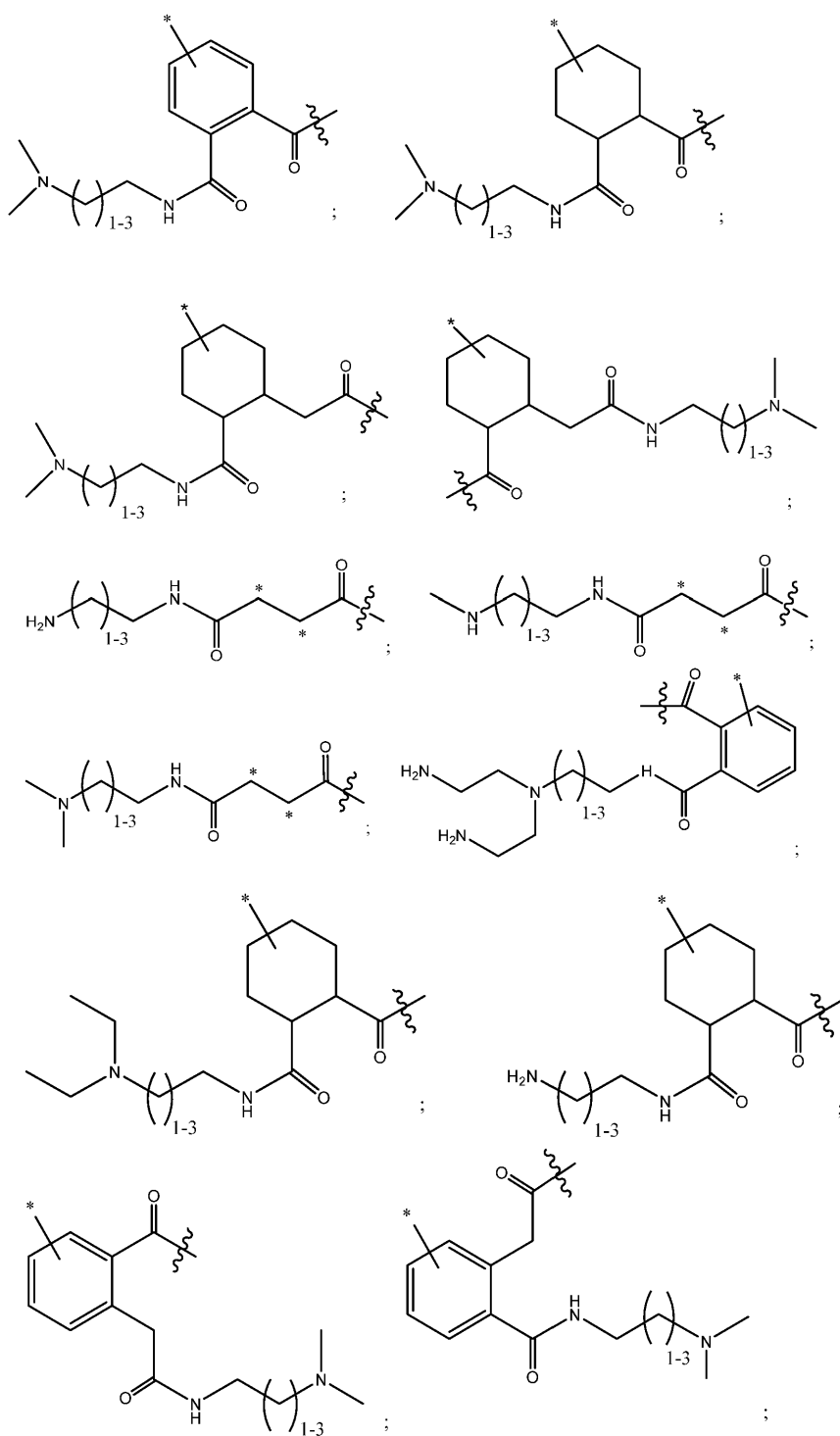


[0546]

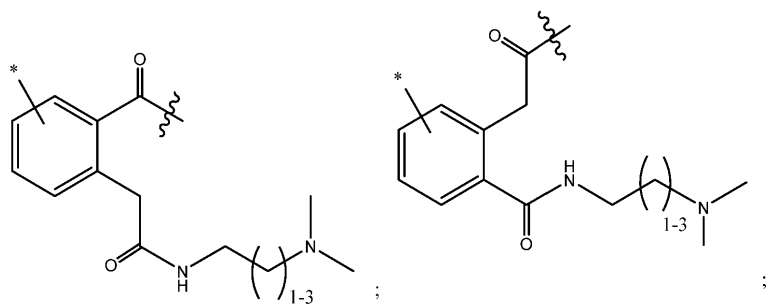
[0547] 여기서 최우측 파상선은 아마이드 결합을 통한 약물의 질소 원자에 대한 부착 지점을 나타내고, 최좌측 파상선은 설파이드 결합을 통한 본 명세서에 개시된 바와 같은 가교된 HA 히드로겔 또는 그의 전구체 (나타내지 않음)에 대한 부착 지점을 나타낸다. 링커 스페이서 모이어티 XIIcd는, 본 발명의 특정한 실시양태에서 사용하기 위해 하기 기재된 바와 같이 편리하게 함께 합성될 수 있는, 가역적 전구약물 링커 모이어티 L^2 와 스페이서 L^4 의 한 부분과의 특정한 조합을 나타낸다.

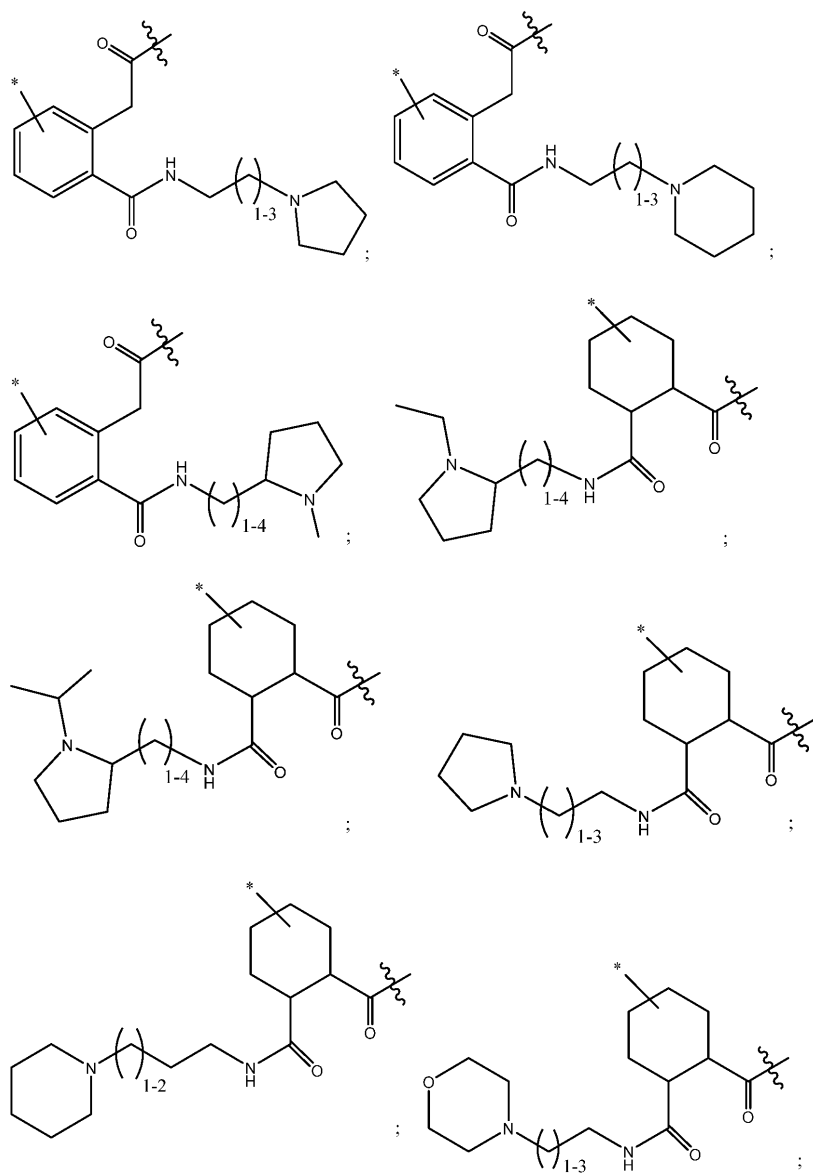
[0548] 일부 측면에서, 가역적 전구약물 링커 모이어티 L^2 모이어티는 하기로부터 선택될 수 있으며, 여기서 파상선은 약물의 질소에 대한 부착 부위를 나타내고, 각각의 L^2 는 1개의 모이어티 L^4 로 치환되며, 단 별표로 표시된 수소는 대체되지 않는다:

[0549]

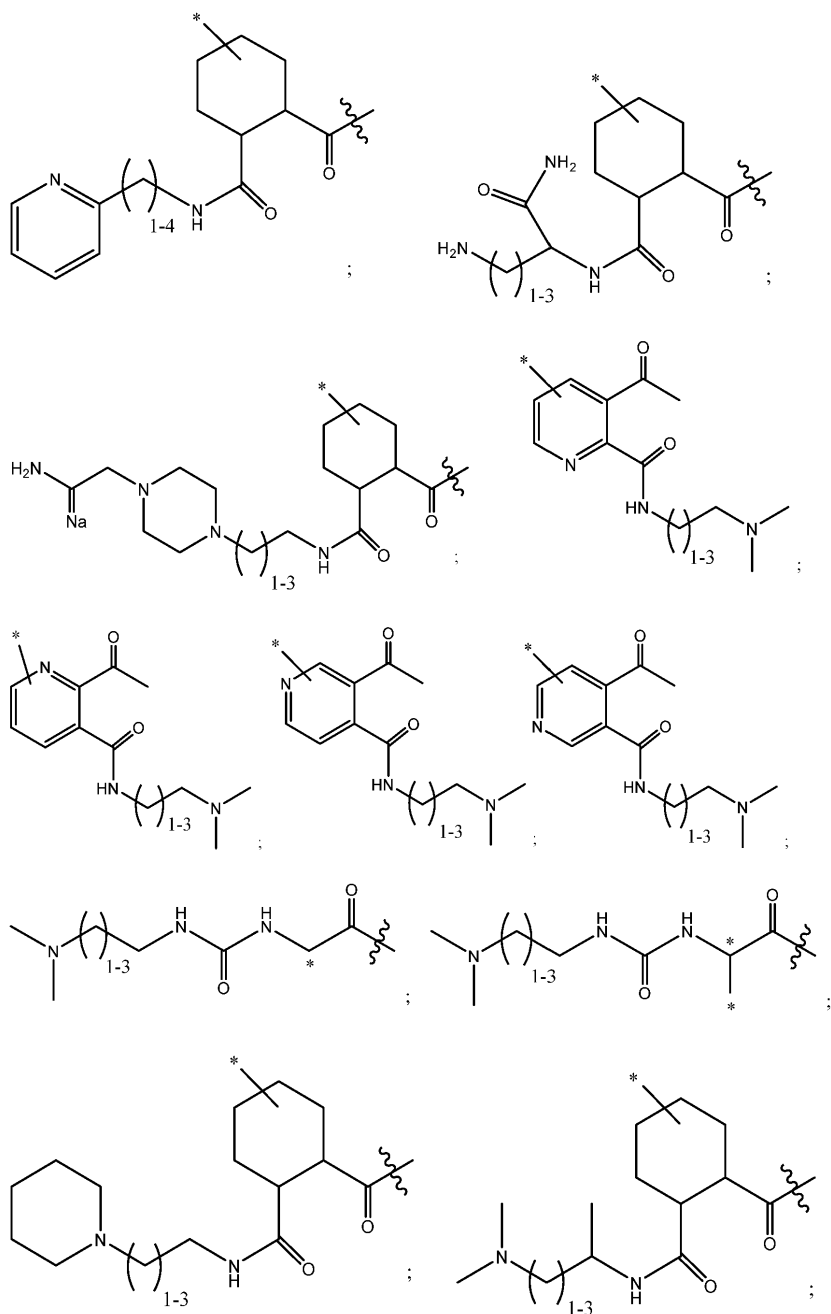


[0550]

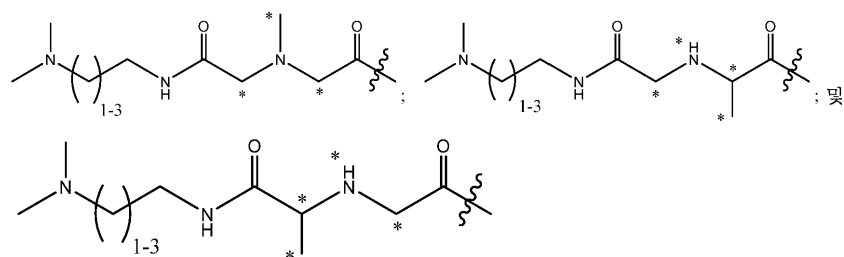
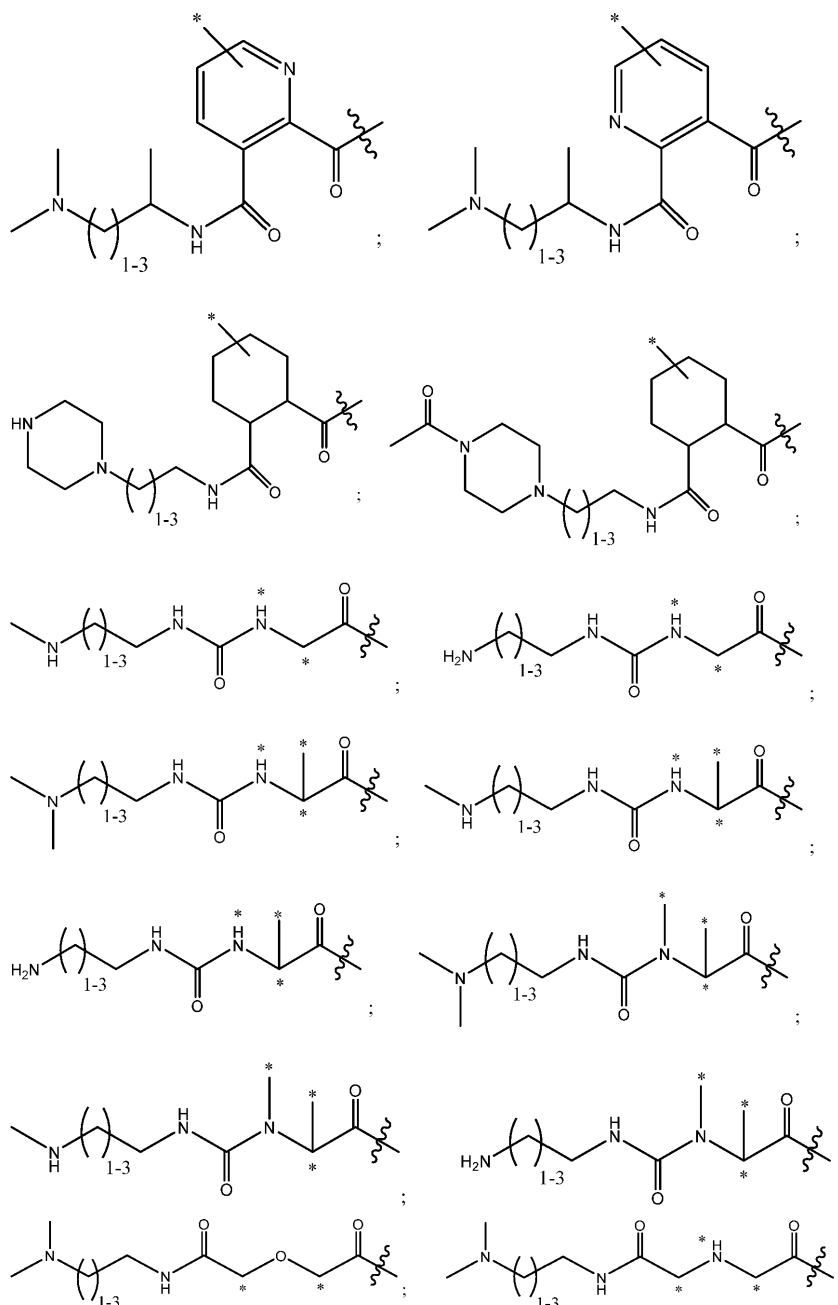




[0551]



[0552]

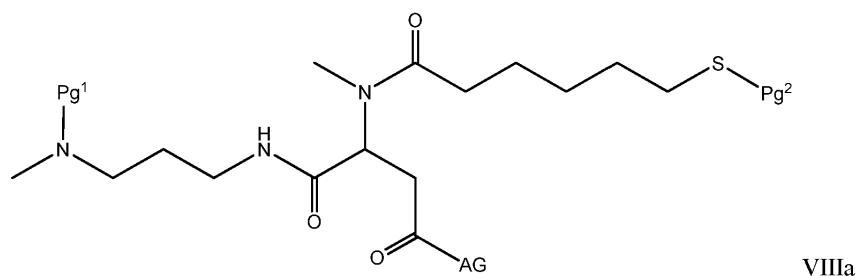


[0555] 약물-스페이스-링커 집합체의 제조 및 정제

[0556] 본 개시내용의 임의의 다양한 측면에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 를 사용하는 약물-링커 집합체는 다음과 같이 제조될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 많은 실시양태에서, 가역적 전구약물 링커 L^2 는 합성 편의를 위해 스페이스 L^4 또는 스페이스 L^4 의 한 부분과 함께 제조될 수 있다. 화학식 XIIb의 모이어티는 예시적인 목적을 위

해 사용되지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명에 따른 링커 L^2 및 스페이서 L^4 의 다른 실시양태에 하기 절차의 변형이 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

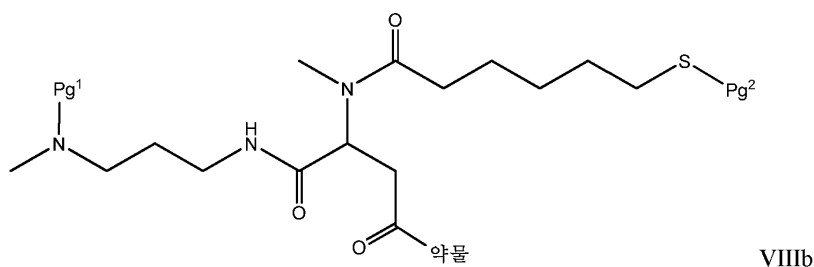
[0557] 화학식 VIIIa의 화합물



[0558]

[0559] 는 아민 보호기 Pg^1 을 갖는 가역적 전구약물 링커 L^2 , 티올 보호기 Pg^2 를 갖는 스페이서 L^4 의 한 부분, 및 활성화 기 AG를 포함하는 모이어티를 나타낸다. 도 2 내지 9에 제시된 바와 같이 티올 보호기는 가교된 HA 집합체 10, 16 및 26, 또는 상응하는 전구체 HA 부분 5, 14 및 19에 대한 부착 지점을 나타낸다. 활성화 기 AG는 반응 동안 약물 기, 예컨대 라니비주맙 또는 유리 아미노 기를 갖는 다른 펩티드 치료제로 대체되어 아미드 결합을 형성하는 기이다. 기 Pg^1 에 의해 보호된 아민 기는 약물을 링커 L^2 에 연결시키는 아미드 결합의 절단에 참여하는 촉매 기이다.

[0560] 화학식 VIIIa의 화합물의 함해진 링커 L^2 및 스페이서 L^4 의 부분은, 활성화 기 AG를 대체하여 약물과 아미드 결합을 형성함으로써 화학식 VIIIb의 화합물을 제조하는데 사용될 수 있다:

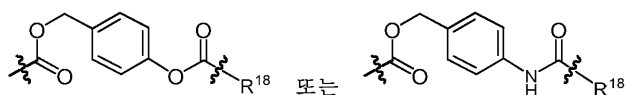


[0561]

[0562] 약물은, 예를 들어 링커와 반응하여 아미드 결합을 통해 링커 약물 집합체를 형성하는데 이용가능한 1개 이상의 이용가능한 유리 아미노 기를 갖는 본원에 기재된 바와 같은 치료 단백질, 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

[0563] 보호기 (PG)는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 범주 내의 일부 보호기는 국제 공개 번호 WO 2015/052155에 기재되어 있으며, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 다양한 상이한 보호 및 탈보호 반응식, 예컨대 본원에 또한 참조로 포함된 문헌 ["Greene's Protective Groups in Organic Synthesis," Fifth Edition, 2014 by John Wiley & Sons, Inc.]에 기재된 것들이 본원에 제시된 구체적인 실시예에 대한 대안으로서 본 발명과 함께 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

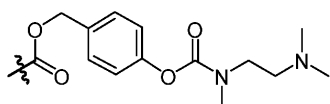
[0564] 일부 측면에서, 아민 보호기 Pg^1 은 하기 모이어티 중 1개를 포함할 수 있는 자기 희생적 보호기이다:



[0565]

[0566] 여기서 R^{18} 은 임의로 치환되고/거나 임의로 개재된 C_{1-10} 알킬이다. 일부 측면에서, R^{18} 은 C_{1-6} 아민이다. 다른 측면에서, R^{18} 은 C_{1-6} 디아민이다.

[0567] 아민 보호기 Pg^1 기의 한 예는 하기와 같다:



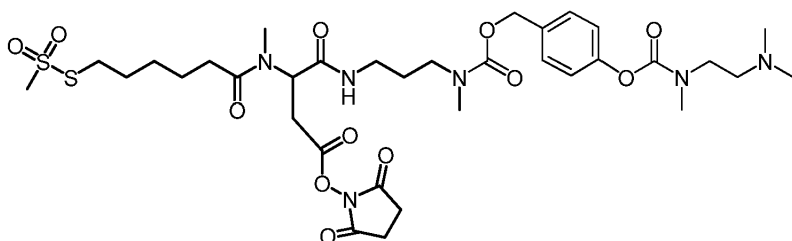
[0568]

[0569] 여기서 파상선은 링커 L^2 상의 아민기에 대한 부착 지점을 나타낸다.

[0570] 티올 보호기의 한 예는 메탄 티오술포네이트 MTS가 형성되도록 하는 화학식 $-SO_2CH_3$ 의 메탄술포닐이다.

[0571] 활성화 기는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 특정 실시양태에서, 활성화 기 AG는 에스테르 형태의 N-히드록시숙신이미드 (NHS)일 수 있다. 다른 이러한 활성화된 에스테르 기는 4-니트로페놀 및 펜타플루오로페놀 에스테르를 포함한다.

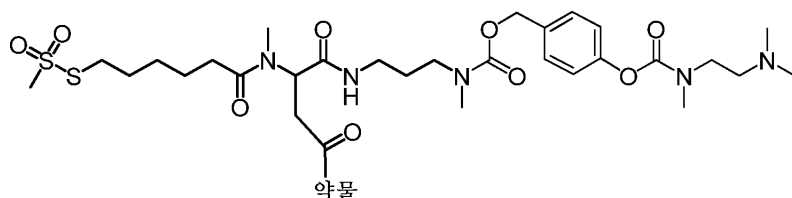
[0572] 하나의 특정한 측면에서, 상기 화학식 VIIIa의 모이어티는 구조 VIIIC의 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 에스테르 메탄 티오술포네이트 화합물일 수 있다:



VIIIc

[0573]

[0574] 화합물 VIIIC는 보다 구체적으로 Pg^2 로서 메탄술포닐 기, AG로서 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 에스테르, 및 Pg^1 로서 상기 아민 보호기를 갖는 화합물 VIIIB를 나타낸다. 이어서 화합물 VIIIC와 약물과의 반응은 화학식 VIIID의 스페이서-링커-약물 접합체 화합물을 제공한다:



VIIID

[0575]

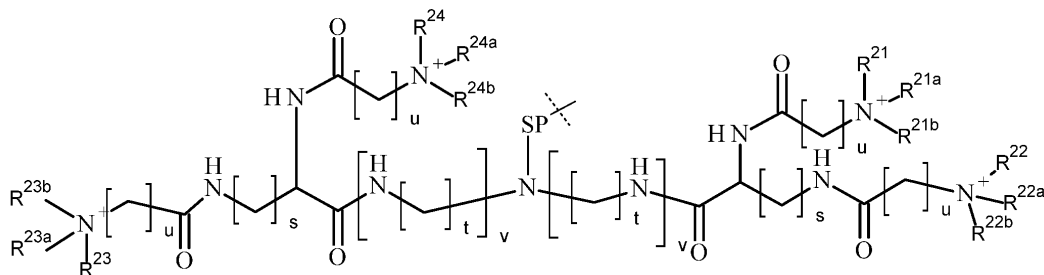
[0576] 약물 스페이서 링커 이중접합체 및 삼중접합체 (나타내지 않음)는 또한 일부 실시양태에서 단일접합체 VIIID와 함께 형성될 수 있고, 단일접합체는 하기 실험 실시예에 기재된 바와 같이 칼럼 분리에 의해 더 다중의 접합체로부터 분리될 수 있다. 단일접합체 VIIID의 비보호 티올 기는 상기 기재된 바와 같은 HA 모이어티 상의 말레이미드 기와 반응하고, 비보호 아미노 기는 약물-아미드 결합의 촉매적 절단에 참여하여 약물의 시간-제어 방출을 제공한다.

[0577] NHS 기를 대체하는 약물 (예를 들어, 라니비주맙 또는 다른 치료제)은 약 6 내지 약 9, 또는 약 7 내지 약 8, 예컨대 약 7.4의 pH에서 약 20 mg/mL 내지 약 100 mg/mL, 약 30 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 또는 약 40 mg/mL의 농도로 완충제 중에 적합하게 가용화될 수 있다. 일부 측면에서, 완충제는 약 30 mM 인산나트륨을 포함한다. 링커 N-히드록시숙신이미드 에스테르는 적합하게는 극성 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO 중에 가용화될 수 있다.

[0578] 링커 N-히드록시숙신이미드 에스테르 및 약물의 용액은 약 5°C에서 약 7 내지 약 8, 예컨대 약 7.4의 pH에서 혼합되고, 약 10분 이하, 예컨대 약 5분 동안 반응하여 링커-약물 접합체의 용액을 형성한다. 링커 N-히드록시숙신이미드 에스테르 대 약물의 당량 비는 약 1:1, 약 5:1, 약 10:1, 약 15:1 또는 약 20:1, 예컨대 약 5:1, 약 10:1 또는 약 15:1이다. 링커-약물 접합체는 전형적으로 비접합 약물, 약물 단일접합체, 약물 이중접합체, 약물 삼중접합체 및 더 다중의 접합체의 혼합물을 포함한다. 보다 긴 반응 시간 및 보다 많은 양의 당량 뿐만 아니라 보다 높은 반응 온도가 필요에 따라 사용된다.

[0579] 약물 접합체 용액의 pH는 특정한 보호기의 사용을 위해 필요에 따라 조정될 수 있다. 상기 나타난 N-히드록시 숙신이미드 (NHS) 에스테르 메탄 티오술폰네이트 화합물과 함께 사용하기 위해, pH는 약 4로 조정될 수 있다. 일부 측면에서, pH는 약 2 내지 약 3.5의 pH를 갖는 완충제로 조정된다. 일부 이러한 측면에서, 완충제는 pH 3 숙신산 (예를 들어, 약 3 M 숙신산)이다. 일부 측면에서, pH 조정 후에, 링커-약물 접합체의 용액을 약 4의 pH를 갖는 완충제로 완충제 교환하는 것이 수행될 수 있다. 일부 이러한 측면에서, 완충제 교환은 약 5 mM, pH 4.0, 숙신산으로 수행될 수 있다.

[0580] 정제 태그 모이어티는 본 발명에 따른 약물 링커 단일접합체의 제조 및 정제에 사용될 수 있다. 태그화 단계에서, 정제 태그는 메탄술폰닐 기를 대체하여 도입됨으로써 정제 태그가 디설피드 결합을 통해 접합체에 연결된다. 본 개시내용의 범주 내의 정제 태그는 국제 공개 번호 WO 2015/052155에 기재되어 있다. 일부 측면에서, 정제 태그는 하기 화학식 IX의 모이어티를 포함한다:



IX

[0581]

여기서

[0582]

SP는 스페이서 모이어티이고;

[0583]

파선은 나머지 부분에 대한 태그의 부착 또는 대안적으로 약물 링커 접합체에 대한 태그의 부착 지점 (예를 들어, 4-메르캅토-3-니코틴산이 스페이서인 경우 디설피드 결합의 형성을 통해)을 나타내고;

[0585] R^{21} , R^{21a} , R^{21b} , R^{22} , R^{22a} , R^{22b} , R^{23} , R^{23a} , R^{23b} , R^{24} , R^{24a} 및 R^{24b} 는 각각 독립적으로 H 또는 메틸이고;

[0586] 각각의 s는 서로 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이고;

[0587] 각각의 t는 서로 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이고;

[0588] 각각의 u는 서로 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이고;

[0589] 각각의 v는 서로 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이다.

[0590] 일부 측면에서, R^{21} , R^{21a} 및 R^{21b} 는 각각 메틸이다. 일부 다른 측면에서, R^{21} 은 H이고, R^{21a} 및 R^{21b} 는 메틸이다. 일부 측면에서, R^{22} , R^{22a} 및 R^{22b} 는 각각 메틸이다. 일부 다른 측면에서, R^{22} 은 H이고, R^{22a} 및 R^{22b} 는 메틸이다. 일부 측면에서, R^{23} , R^{23a} 및 R^{23b} 는 각각 메틸이다. 일부 다른 측면에서, R^{23} 은 H이고, R^{23a} 및 R^{23b} 는 메틸이다. 일부 측면에서, R^{24} , R^{24a} 및 R^{24b} 는 각각 메틸이다. 일부 다른 측면에서, R^{24} 은 H이고, R^{24a} 및 R^{24b} 는 메틸이다.

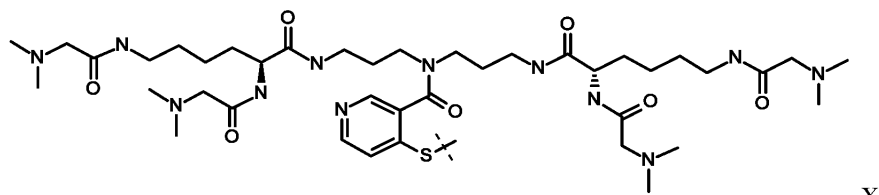
[0591] 일부 측면에서, s는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6; 2, 3, 4 또는 5; 3, 4 또는 5; 또는 4이다. 일부 측면에서, t는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6; 2, 3, 4 또는 5; 2, 3 또는 4; 또는 3이다. 일부 측면에서, u는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6; 1, 2, 3 또는 4; 1, 2 또는 3; 또는 1이다. 일부 측면에서, v는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6; 1, 2, 3 또는 4; 1, 2 또는 3; 또는 1이다.

[0592] 일부 측면에서, R^{21} , R^{21a} , R^{21b} , R^{22} , R^{22a} , R^{22b} , R^{23} , R^{23a} , R^{23b} , R^{24} , R^{24a} 및 R^{24b} 는 각각 메틸이고, s는 4이고, t는 3이고, u는 1이고, v는 1이다. 일부 다른 측면에서, R^{21} , R^{22} , R^{23} 및 R^{24} 는 각각 H이고; R^{21a} , R^{21b} , R^{22a} , R^{22b} , R^{23a} , R^{23b} , R^{24a} 및 R^{24b} 는 각각 메틸이고, s는 4이고, t는 3이고, u는 1이고, v는 1이다.

[0593] 본 개시내용의 범주 내의 화학식 IX에 대한 반대이온은 Cl^- , TFA^- , HSO_4^- 및 SO_4^{2-} 를 포함한다.

[0594] 화학식 IX에서의 파선은 화학식 IX의 화합물이 시약인 경우, 나머지에 대한 태그의 부착을 나타내고, 바람직하게는 수소이고, 대안적으로는 상기 약물 링커 접합체에의 접합 후 약물 링커 접합체에 대한 부착을 나타내는 것으로 이해된다.

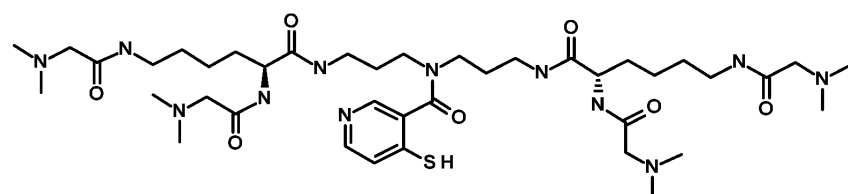
[0595] 일부 특정한 측면에서, 정제 태그는 화학식 X를 갖는다:



X

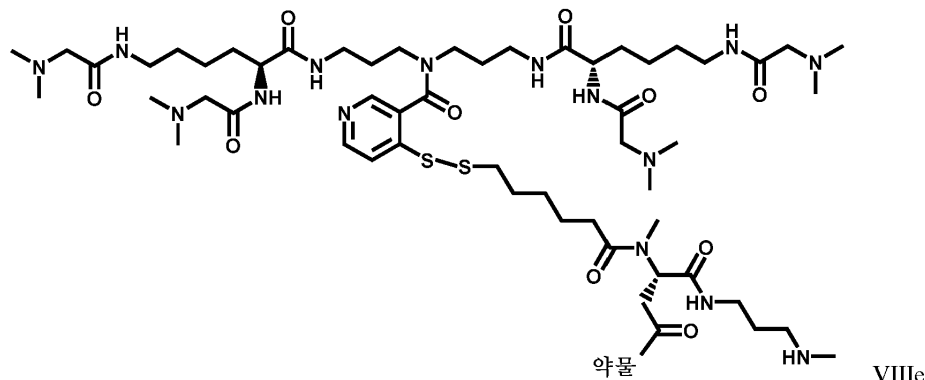
[0596] 여기서 파선은 화학식 X의 티올의 모이어티에 대한 부착을 나타낸다.

[0598] 일부 특정한 측면에서, 정제 태그 시약은 화학식 Xa를 갖는다:



Xa

[0599] 일부 특정한 측면에서, 태그-스페이스-링커-약물 탈보호된 단일접합체는 화학식 VIIIe를 갖는다:



VIIIe

[0601] 태그-스페이스-링커-약물 탈보호된 단일접합체 VIIIe는 메탄술포닐 보호기 대신에 정제 태그 Xa와 함께 접합체 VIIIId를 나타낸다. 태그-스페이스-링커-약물 탈보호된 단일접합체 VIIIe는 상기 기재된 바와 같은 더 다중의 접합체 (나타내지 않음)로 존재할 수 있다.

[0603] 하기 섹션에서 언급된 모이어티 VIIIe 및 다른 화합물은 또한 L⁴의 부분을 포함하는 것으로 이해된다. 편의상 및 보다 용이한 명명을 위해, 스페이스 부분은 하기 기재된 화합물의 명칭으로부터 생략된다.

[0604] 태그화 및 아민 탈보호는 하기와 같이 수행될 수 있다. 정제 태그의 도입은 링커-약물 접합체에 대한 화학량론적 과량의 정제 태그, 예컨대 약 1.5, 2, 2.5 또는 3 또는 훨씬 더 많은 당량의 정제 태그를 함유하는 용액을 링커-약물 접합체의 용액과 합하여 수행된다. 용액 중 링커-약물 접합체의 농도는 적합하게는 약 5 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 15 mg/mL, 약 20 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL 또는 약 40 mg/mL, 예컨대 약 10 mg/mL 내지 약 20 mg/mL 또는 약 10 mg/mL 내지 약 40 mg/mL이다. 약물 링커 접합체와의 반응에 사용되는 용액 중 태그의 농도는 적합하게는 약 0.1 mM 내지 약 1 mM, 약 0.2 mM 내지 약 0.8 mM, 약 0.3 mM 내지 약 0.7 mM, 약 0.4 mM 내지 약 0.6 mM이다. 특정 실시양태에서, 태그 농도는 약 0.5 mM이다. 일부 측면에서 태그 용액은 수용액이다. 반응을 위한 pH는 적합하게는 약 3 내지 약 5, 약 3.5 내지 약 4.5, 또는 약 4이다. 반응 온도는 적합하게는 약 10℃ 내지 약 40℃, 예컨대 약 25℃이다. 반응 시간은 적합하게는 적어도 5분, 또는 적

어도 10분, 또는 적어도 30분, 예컨대 약 15분 또는 약 35분이다.

[0605] 탈보호는 약 7 내지 약 8, 예컨대 약 7.4의 pH에서의 인큐베이션에 의해 수행할 수 있다. 일부 측면에서, pH는 N,N,N'-트리메틸렌-1,3-디아민 (TriMED)을 함유하는 포스페이트 완충제에 의해 약 7에서 약 8로 조정된다. 인큐베이션은 적합하게는 약 10℃ 내지 약 40℃, 예컨대 약 25℃의 온도에서, 및 적어도 8시간, 예컨대 약 16시간의 시간 동안 수행될 수 있다.

[0606] 탈보호 후, 태그-링커-약물 탈보호된 접합체의 용액의 pH는 후속 정제를 위해 약 3.5 내지 약 4.5, 또는 약 4.0으로 조정된다. 일부 측면에서, pH 조정은 약 2.5 내지 약 3.5의 pH를 갖는 완충제, 예컨대 pH 3.0 숙신산 완충제로 수행될 수 있다. pH 조정된 용액은 임의로 후속 정제 전에 완충제로 희석될 수 있다. 일부 측면에서, 희석은 pH 4.0 숙신산 완충제, 예를 들어 20 mM 숙신산 완충제로 수행될 수 있다.

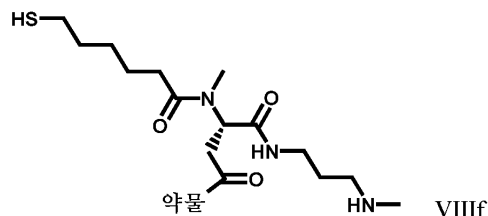
[0607] 탈보호 후, 태그-링커-약물 탈보호된 접합체의 단일접합체 종은 분리된다. 일부 측면에서, 단일접합체는 양이온 교환 크로마토그래피 (CIEC)에 의해 분리될 수 있다. 일부 다른 측면에서, 단일접합체는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. 일부 다른 측면에서, 단일접합체는 친화도 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. CIEC 측면에서, 적합한 수지는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 바이오-라드 래보러토리즈 (Bio-Rad Laboratories) 및 지이 헬스케어 (GE Healthcare)로부터 상업적으로 입수가능하며, 예를 들어 및 비제한적으로, AG® 50W, AG® MP-50, 바이오-렉스 (Bio-Rex) 70, 켈렉스 (Chelex)® 100, AG® 50W, 마크로-프렙 (Macro-Prep)® 시리즈, 우노스피어 (UNOsphere)™ 시리즈, 소스 15S, 소스 30S 및 누비아 (Nuvia)™ S를 포함한다. 제2 단계에서의 희석을 위해 사용된 동일한 완충제가 CIEC 완충제에 사용될 수 있다. 예를 들어, 완충제 A는 20 mM 숙신산 (pH 4.0)이고, 완충제 B (용리용)는 20 mM 숙신산, 1 M NaCl (pH 4.0)일 수 있다. CIEC 분리에서 먼저 비접합 약물이 용리되고, 이어서 약물 단일접합체가 용리되고, 이어서 더 다중의 접합체 (이중- 및 삼중-) 등이 용리된다.

[0608] 태그-링커-약물 탈보호된 단일접합체의 분리 후, 단일접합체는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예컨대 접선 흐름 여과 (TFF)에 의해 또는 막을 통한 원심분리에 의해 농축될 수 있다. 농축된 단일접합체는 임의로 여과될 수 있다. 농축 후, 최종 농도는 적합하게는 약 0.2 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 약 0.2 mg/mL 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 5 mg/mL일 수 있다.

[0609] 이어서, 정제 태그는 분리된 및 잠재적으로 농축된 태그-링커-약물 탈보호된 단일접합체로부터 환원제의 존재 하에 디설피드 결합의 절단에 의해 절단되어 절단된 태그 및 링커-약물 단일접합체를 포함하는 혼합물을 형성한다.

[0610] 환원제는 전형적으로 소분자이고, 예를 들어 β-메르캅토에탄올, 글루타티온, 디티오프레이톨 (DTT) 및 TCEP로부터 선택될 수 있다. 일부 측면에서, 환원제는 DTT이다. 태그 절단은 적합하게는 약 3.5 내지 약 5.5, 예컨대 약 4 또는 약 4.5의 pH에서 수행될 수 있다. 일부 측면에서, DTT는 약 15℃ 미만, 예컨대 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 약 0.1 mM 내지 약 20 mM, 예컨대 약 1 mM의 농도로 태그-링커-약물 탈보호된 단일접합체의 용액에 첨가된다. 인큐베이션은 적합하게는 적어도 2시간, 적어도 4시간, 적어도 8시간 동안 수행될 수 있다.

[0611] 일부 측면에서, 정제 태그의 탈보호 및 제거 후 링커-약물 단일접합체는 화학식 VIIIf를 갖는다:



[0612]

[0613] 링커-약물 단일접합체는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같이 크로마토그래피를 통해 절단된 태그를 함유하는 혼합물로부터 분리될 수 있다. CIEC 측면에서, 적합한 수지는 본원 다른 곳에 기재되어 있다. 일반적으로 링커-약물 단일접합체의 분리를 위한 CIEC는 약 4 내지 약 7, 예컨대 약 5.5의 pH를 갖는 완충제 시스템으로 수행된다. 예를 들어, 완충제 A는 10 mM 히스티딘 (pH 5.5)이고, 완충제 B (용리용)는 10 mM 히스티딘, 500 mM NaCl (pH 5.5)일 수 있다. CIEC 분리에서 먼저 링커-약물 단일접합체가 용리되고, 이어서 잠재적 디설피드-연결된 이량체 및 절단된 태그가 용리된다.

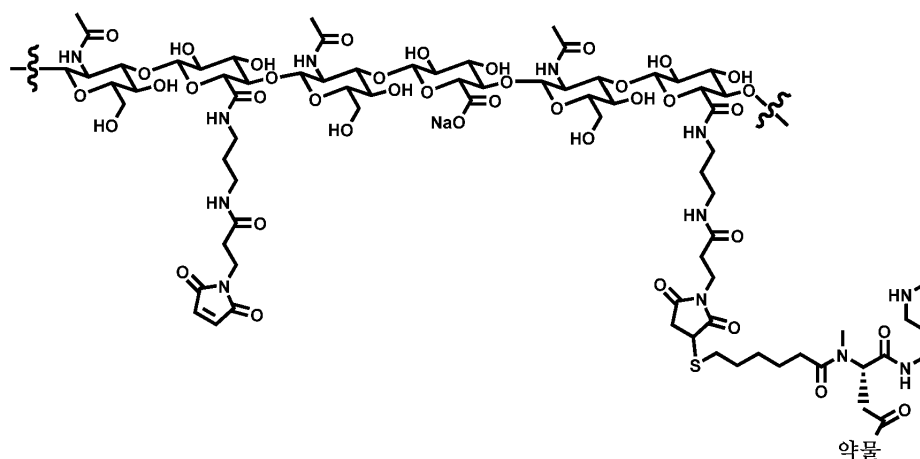
[0614] 추가의 완충제 B가 임의로 첨가되어 단백질 용액의 오스몰랄농도를 조정할 수 있다. 분리된 링커-약물 단일접

합체는 임의로, 본 개시내용의 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물의 제조에서의 후속 사용을 위해 50 mg/mL 초과 또는 60 mg/mL 초과 농도로 농축될 수 있다. 농도는 TFF에 의해 또는 막을 통한 원심분리에 의해 수행될 수 있다.

[0615] 약물-링커 단일접합체와 말레이미도-관능화된 HA와의 접합

[0616] 도 2 및 3 및 도 6 내지 도 9를 다시 참조하면, 링커-약물 단일접합체 VIIIIf는 링커 약물 접합체 시약 5로서 사용될 수 있다. 말레이미도 기는 시약 5에 비해 과량의 당량으로 존재하여 일부 비율의 말레이미도 기가 약물-링커 단일접합체와 접합되지 않고 따라서 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 티올-관능화된 HA와의 가교에 이용 가능하다. 일부 측면에서, 말레이미도-관능화된 HA 대 약물-링커 단일접합체의 당량 비는 1.1:1 내지 약 2:1, 예컨대 약 1.2:1, 약 1.3:1, 약 1.4:1, 약 1.5:1, 약 1.6:1, 약 1.7:1, 또는 약 1.8:1이다. 일부 측면에서, 반응 혼합물은 약 25 mg/mL 내지 약 100 mg/mL (단백질 기준으로), 약 35 mg/mL 내지 약 55 mg/mL, 또는 약 55 mg/mL의 약물-링커 단일접합체 농도를 포함한다. 접합은 약 4.5 내지 약 6.5 또는 약 5 내지 약 6, 예컨대 약 5.5의 pH를 갖는 완충제 시스템에서 수행된다. 일부 측면에서, 완충제는 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl 및 0.01% 트윈 20이다. 반응 온도는 약 0°C, 약 5°C, 10°C, 약 15°C, 약 20°C, 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C 또는 약 40°C이고, 반응 혼합물은 실질적으로 완전한 접합을 달성하기에 적합한 시간, 예컨대 약 1시간 내지 약 12시간 또는 그 이상, 예컨대 약 2시간, 약 4시간 또는 약 6시간 동안 인큐베이션된다.

[0617] 일부 측면에서, 약물-링커-말레이미도-관능화된 HA는 구조 XII를 갖는다:



XII

[0618]

[0619] HA 화합물 XII의 관능화도는 상기 기재된 바와 같이 달라질 수 있고, 구조 XII에서의 상대 관능화도는 단지 예시적이다. 일부 실시양태에서, XII의 HA 쇄 상의 약 0.5% 내지 약 6%, 약 1% 내지 약 5%, 약 1.5% 내지 약 4%, 약 2% 내지 3%, 또는 약 2% 내지 약 2.5%의 카르복실레이트 부위는 미반응 말레이미드에 의해 점유되고 (따라서 후속 가교 반응에 이용가능함), 한편 약 3% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 9%, 약 6% 내지 약 8%, 또는 약 7% 내지 약 8%의 카르복실레이트 부위는 링커 약물 접합체에 의해 점유된다. 특정 실시양태에서, XII의 HA 쇄 상의 약 4%의 카르복실레이트 부위는 미반응 말레이미드에 의해 점유되고, 약 6%의 카르복실레이트 부위는 링커 약물 접합체에 의해 점유된다. 특정 실시양태에서, XII의 HA 쇄 상의 약 2.3%의 카르복실레이트 부위는 미반응 말레이미드에 의해 점유되고, 약 7.7%의 카르복실레이트 부위는 링커 약물 접합체에 의해 점유된다. 약물 링커 접합체는 본원에 기재된 바와 같은 HA 쇄 상의 말레이미드 기와 반응하는 약물 링커 접합체의 티올 기의 반응을 통해 HA 쇄에 결합한다. 미반응 말레이미드 및 링커 약물 접합체에 의해 점유된 부위의 백분율은 최종 히드로겔 접합체의 가교 및 약물 로딩 정도를 제어하기 위해 달라질 수 있다.

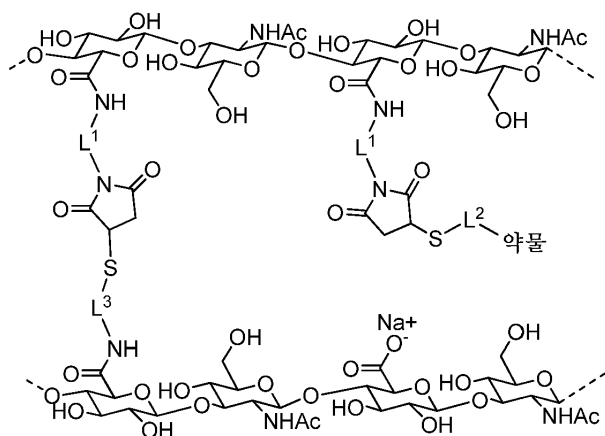
[0620] 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물의 제조

[0621] 일부 측면에서, 본 개시내용의 전구약물 조성물은 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 약물-링커-말레이미도-관능화된 HA의 용액 및 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 티올-관능화된 HA의 용액을 포함하는 반응 혼합물을 형성하고, 반응 혼합물을 HA 가교 달성에 충분한 pH 및 시간 및 온도에서 인큐베이션하여 제조될 수 있다. 반응은 일반적으로 도 9에 도시된 반응식의 단계 7에 따라 진행되며, 여기서 L^A , L^B , L^C , L^2 및 약물은 본원 다른 곳에 기재된 바와 같다. 일부 측면에서, pH는 약 4.5 내지 약 6.5 또는 약 5 내지 약 6, 예컨대 약 5.5이다. 반응 온도는 약 0°C, 약 5°C, 약 10°C, 약 15°C, 약 20°C, 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C, 또는 약 40°C이다.

[0622] 일부 측면에서, 반응 혼합물을 완전히 혼합되고 그 직후 시린지 내로 충전된다. 이어서, 사전-충전된 시린지는 주위 온도에서 약 8시간 내지 약 4주 동안 인큐베이션되어, 가교 및 본 개시내용의 가교된 HA 전구약물 조성물의 형성을 완료할 수 있다. 사전-충전된 시린지는 또한 주위 온도에서의 추가의 저장 없이 2-8℃에서 직접 저장될 수 있다. 한 실시양태에서, 약물-링커-말레이미도-관능화된 HA 및 티올-관능화된 HA의 개별 용액은 각각 사전-충전 시린지 장치 내로 직접 도입되고, 그 안에서 혼합되고, 사전-충전 시린지 장치 내에서 가교가 일어나게 되고 그 안에서 가교 반응을 겪게 되어, 사전-충전 시린지 장치 내에서 계내 가교된 HA 전구약물 조성물을 형성한다. 가교 반응을 위해 적합한 시간 (이는 온도 및 다른 조건에 따라 달라질 수 있음)이 허용된 후에, 가교된 HA 전구약물 조성물은 추가의 혼합 또는 전달 없이 환자 내로의 주사를 위해 제조된다.

[0623] 다른 실시양태에서, 가교 반응을 수행하기 위해 회분식 중합이 수행될 수 있다. 이어서, 생성된 겔을 메쉬에 통과시켜 세절함으로써 시린지화가능하게 만들고 후속적으로 시린지 장치 내로 전달한다.

[0624] 일부 측면에서, 본 개시내용의 전구약물 조성물은 화학식 10을 갖는다:

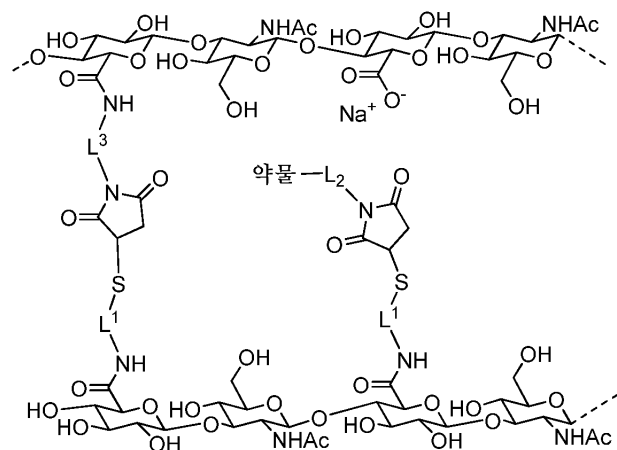


10

[0625]

[0626] 여기서 L^1 , L^2 , L^3 , 관능화도 및 약물은 본원 다른 곳에 정의된 바와 같다. 일부 다른 측면에서, HA는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 Ra^1 및/또는 Ra^2 로 치환될 수 있다.

[0627] 일부 다른 측면에서, 본 개시내용의 전구약물 조성물은 화학식 16을 갖는다:

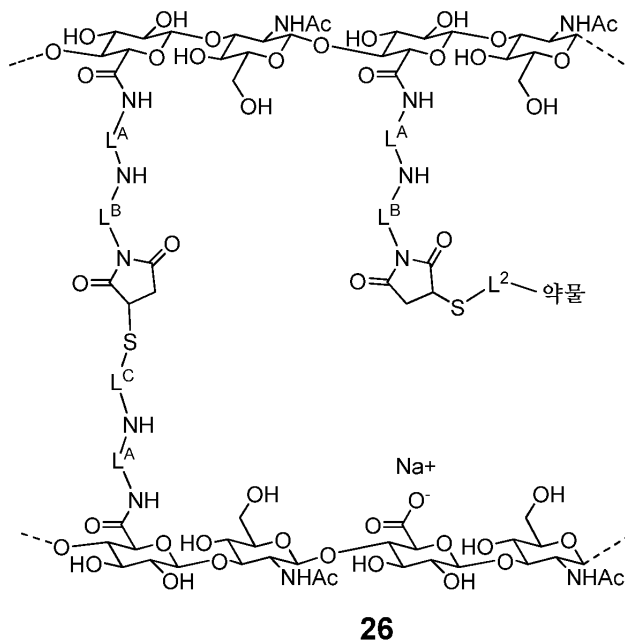


16

[0628]

[0629] 여기서 L^1 , L^2 , L^3 , 관능화도 및 약물은 본원 다른 곳에 정의된 바와 같다. 일부 다른 측면에서, HA는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 Ra^1 및/또는 Ra^2 로 치환될 수 있다.

[0630] 일부 다른 측면에서, 본 개시내용의 전구약물 조성물은 화학식 26을 갖는다:



[0631]

[0632] 여기서 L^A , L^B , L^C , L^2 , 관능화도 및 약물은 본원 다른 곳에 정의된 바와 같다. 일부 다른 측면에서, HA는 Ra^1 및/또는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같이 치환될 수 있다.

[0633] 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물의 전체 제조 방법

[0634] 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물의 전체 제조 방법이 도 10 및 도 11에 도시되어 있다.

[0635] 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물을 제조하는 한 방법은 도 10에 도시되어 있다. 단계 1에서, 아민-HA 1은 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 바와 같은 아민-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 제조된다. 단계 2에서, 영구적 스페이서를 갖는 말레이미드-HA는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 말레이미도-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 아민-HA 1로부터 제조된다. 단계 3에서, 아민-HA 2는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 아민-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 제조된다. 단계 4에서, 분해가능하게-연결된 티올 기를 포함하는 티올-HA 2는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 티올-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 제조된다. 단계 5에서, 약물-링커-티올 단일접합체는 본원 다른 곳에 기재된 방법에 따라 제조된다. 단계 6에서, 약물-링커-티올 단일접합체는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 바와 같이 스페이서를 갖는 말레이미드-HA에 접합된다. 단계 7에서, 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물은 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 바와 같은 약물-링커-말레이미드-HA 및 분해가능한 티올-HA로부터 제조된다. 단계 7은 단계 6의 약물-말레이미드-HA 및 단계 4의 분해가능한 티올 HA를 가교가 수행되는 사전-충전 시린지 장치 내로 직접 멸균 여과하는 것을 포함할 수 있다.

[0636] 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물의 또 다른 제조 방법이 도 11에 도시되어 있다. 단계 1에서, 아민-HA 1은 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 바와 같은 아민-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 제조된다. 단계 2에서, 스페이서를 갖는 말레이미드-HA는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 말레이미도-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 아민-HA 1로부터 제조된다. 단계 3에서, 아민-HA 2는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 아민-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 제조된다. 단계 4에서, 분해가능하게-연결된 티올 기를 포함하는 티올-HA 2는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 티올-관능화된 HA의 제조 방법에 따라 제조된다. 단계 5에서, 약물-링커-티올 단일접합체는 본원 다른 곳에 기재된 방법에 따라 제조된다. 단계 6에서, 약물-링커-티올 단일접합체, 영구적 링커를 갖는 말레이미드-HA, 및 분해가능한 링커를 갖는 티올-HA는 합해지고 접합되어 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물을 형성한다. 말레이미드 HA, 약물 링커 티올 단일접합체 및 티올 HA는 각각 멸균 여과되고 사전충전 시린지 장치 내로 전달될 수 있으며, 여기서 이들은 반응을 겪어 최종 가교된 HA 전구약물을 형성한다. 도 11, 단계 6에 대한 반응 조건은 일반적으로 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 약물-링커-말레이미드-HA 및 분해가능한 티올-HA로부터 가교된 HA를 포함하는 전구약물 조성물을 제조하기 위한 조건에 대한 반응 조건과 일치한다.

[0637] 제약 조성물

- [0638] 본 발명의 제약 조성물은 완충제, 등장성 개질제, 보존제/항미생물제, 안정화제, 항-흡착제, 항산화제, 증점제/점도 증진제, 및/또는 다른 보조제를 포함한 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제(들)를 포함한다.
- [0639] 완충제는 조성물 pH를 목적하는 범위로 유지하는데 사용될 수 있다. 완충제의 비제한적 예는 인산나트륨, 비카르보네이트, 숙시네이트, 히스티딘, 시트레이트 및 아세테이트, 술페이트, 니트레이트, 클로라이드, 및 피루베이트를 포함한다.
- [0640] 등장성 개질제는 주사 측에서 삼투압차로 인한 세포 손상으로부터 조래될 수 있는 통증을 최소화하는데 사용될 수 있다. 등장화제의 비제한적 예는 글리세린 및 염화나트륨을 포함한다.
- [0641] 보존제/항미생물제는 감염 위험을 최소화하는데 사용될 수 있다. 보존제의 비제한적 예는 m-크레졸, 페놀, 메틸파라벤, 에틸파라벤, 프로필파라벤, 부틸파라벤, 클로로부탄올, 벤질 알콜, 질산페닐제2수은, 티메로솔, 소르브산, 소르브산칼륨, 벤조산, 클로로크레졸, 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함한다.
- [0642] 안정화제는 히드로겔 및 약물의 분해를 억제하는데 사용될 수 있다. 안정화제의 비제한적 예는 아미노산, 예컨대 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 글리신, 히스티딘, 리신, 프롤린; 당, 예컨대 글루코스, 수크로스, 트레할로스; 폴리올, 예컨대 글리세롤, 만니톨, 소르비톨; 염, 예컨대 인산칼륨, 황산나트륨; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA, 헥사포스페이트; 리간드, 예컨대 2가 금속 이온 (아연, 칼슘 등); 올리고머 또는 중합체, 예컨대 시클로텍스트린, 텍스트란, 덴드리머, PEG 또는 PVP 또는 프로타민 또는 HAS; 및/또는 다른 염 또는 유기 분자, 예컨대 페놀계 유도체를 포함한다.
- [0643] 흡착방지제는, 예를 들어 제약 조성물이 함유된 용기, 예컨대 시린지의 표면에 대해 경쟁적으로 코팅 또는 흡착하는데 사용될 수 있다. 흡착방지제는 이온성 또는 비이온성 계면활성제, 단백질 또는 가용성 중합체일 수 있다. 계면활성제의 비제한적 예는 알킬 술페이트, 예컨대 암모늄 라우릴 술페이트 및 소듐 라우릴 술페이트; 알킬 에테르 술페이트, 예컨대 소듐 라우레이트 술페이트 및 소듐 미레이트 술페이트; 술포네이트, 예컨대 디옥틸 소듐 술포숙시네이트, 퍼플루오로옥탄술포네이트, 퍼플루오로부탄술포네이트, 알킬 벤젠 술포네이트; 포스페이트, 예컨대 알킬 아릴 에테르 포스페이트 및 알킬 에테르 포스페이트; 카르복실레이트, 예컨대 지방산 염 (비누) 또는 스테아르산나트륨, 소듐 라우로일 사르코시네이트, 퍼플루오로노나노에이트, 퍼플루오로옥타노에이트; 옥테닐딘 디히드로클로라이드; 4급 암모늄 양이온, 예컨대 세틸 트리메틸암모늄 브로마이드, 세틸 트리메틸암모늄 클로라이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 폴리에톡실화 탈로우 아민, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 5-브로모-5-니트로-1,3-디옥산, 디메틸디옥타데실암모늄 클로라이드, 디옥타데실디메틸암모늄 브로마이드; 쓰비터이온성, 예컨대 3-[(3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판술포네이트, 코카미도프로필 히드록시술포네이트, 아미노산, 이미노산, 코카미도프로필 베타인, 레시틴; 지방 알콜, 예컨대 세틸 알콜, 스테아릴 알콜, 세토스테아릴 알콜, 올레일 알콜; 폴리옥시에틸렌 글리콜 알킬 에테르, 예컨대 옥타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르, 펜타에틸렌 글리콜 모노도데실 에테르; 폴리옥시프로필렌 글리콜 알킬 에테르; 글루코시드 알킬 에테르, 예컨대 데실 글루코시드, 라우릴 글루코시드, 옥틸 글루코시드; 폴리옥시에틸렌 글리콜 옥틸페놀 에테르, 예컨대 트리톤 X-100; 폴리옥시에틸렌 글리콜 알킬페놀 에테르, 예컨대 노녹시놀-9; 글리세롤 알킬 에스테르, 예컨대 글리세릴 라우레이트; 폴리옥시에틸렌 글리콜 소르비탄 알킬 에스테르, 예컨대 폴리소르베이트; 소르비탄 알킬 에스테르; 코카미드 MEA 및 코카미드 DEA; 도데실 디메틸아민 옥시드; 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜의 블록 공중합체, 예컨대 폴록사머 (플루로닉 F-68), PEG 도데실 에테르 (브리즈 35), 폴리소르베이트 20 및 80; 다른 흡착방지제, 예컨대 텍스트란, 폴리에틸렌 글리콜, PEG-폴리히스티딘, BSA 및 HSA 및 젤라틴을 포함한다.
- [0644] 항산화제의 비제한적 예는 아스코르브산, 엑토인, 메티오닌, 글루타티온, 모노티오글리세롤, 모린, 폴리에틸렌 이민 (PEI), 프로필 갈레이트, 비타민 E, 킬레이화제, 예컨대 시트르산, EDTA, 헥사포스페이트 및 티오글리콜산을 포함한다.
- [0645] 가교된 HA 히드로겔 전구약물 제약 조성물은 다중 용량의 제약 조성물을 포함하는 용기에 제공될 수 있다. 이러한 다중 용량 제약 조성물은 그를 필요로 하는 상이한 환자를 위해 사용될 수 있거나 또는 1명의 환자를 위해 사용될 수 있으며, 여기서 나머지 용량은 제1 용량의 적용 후 필요할 때까지 저장된다. 일부 이러한 측면에서, 용기는 사전-충전 시린지이다.
- [0646] 가교된 HA 히드로겔 전구약물 제약 조성물은 사전-충전 시린지 내 단일 또는 다중 용량 제약 조성물로서 제공될 수 있다.
- [0647] 본 개시내용의 가교된 HA 히드로겔 전구약물 제약 조성물은 적합하게는 약 10℃ 미만의 온도에서 시린지에 저장

될 수 있다.

- [0648] 치료량의 가교된 HA 히드로겔 전구약물 제약 조성물은 안내 주사에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 또는 32의 게이지를 갖는 바늘을 사용하여 그를 필요로 하는 대상체의 유리체 내로 주사될 수 있다.
- [0649] 일부 측면에서, 가교된 HA 히드로겔 전구약물 제약 조성물은 키트에 제공될 수 있다. 이러한 측면에서, 키트는 가교된 HA 히드로겔 전구약물 제약 조성물로 사전충전된 시린지, 피하 바늘, 및 사용 지침서를 포함할 수 있다.
- [0650] 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 가교된 HA 히드로겔 조성물에 공유 연결된 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체)를 포함하는 항체 접합체를 제공한다.
- [0651] 본 발명의 가교된 HA 히드로겔 접합체 조성물에 사용하기 위한 예시적인 항체
- [0652] 임의의 적합한 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체)가 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 VEGF; 인터류킨-1 베타 (IL-1 β); 인터류킨-6 (IL-6); 인터류킨-6 수용체 (IL-6R); 인터류킨-13 (IL-13); IL-13 수용체 (IL-13R); PDGF (예를 들어, PDGF-BB); 안지오프이오테틴; 안지오프이오테틴 2 (Ang2); Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ 및 $\alpha 5\beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체 (예를 들어, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, 막-결합 VEGF-수용체 (mbVEGFR) 또는 가용성 VEGF 수용체 (sVEGFR)); ST-2 수용체; 및 연령-관련 황반 변성 (AMD) 위험과 유전적으로 연관된 단백질 (예를 들어, 보체 경로 성분 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터류킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 및 TNFRSF10A)로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어 혈관신생을 감소시키고/거나 병리학적 혈관신생과 연관된 장애 (예를 들어, 안구 장애 또는 세포 증식성 장애)의 진행을 치료하거나 지연시키는데 유용할 수 있다. 본 발명의 항체 접합체에 사용될 수 있는 예시적인 비제한적 항-VEGF 항체는 하기에 추가로 기재된다.
- [0653] 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함할 수 있다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GX₁TPX₂GGX₃X₄YX₅DSVX₇X₈ (서열식별번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 (여기서 X₁은 Ile 또는 His이고, X₂는 Ala 또는 Arg이고, X₃은 Tyr 또는 Lys이고, X₄는 Thr 또는 Glu이고, X₅는 Arg, Tyr, Gln, 또는 Glu이고, X₆는 Ala 또는 Glu이고, X₇은 Lys 또는 Glu이고, X₈은 Gly 또는 Glu임); (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQX₁VSTAVA (서열식별번호: 4)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1 (여기서 X₁은 Asp 또는 Arg임); (e) X₁ASFLYS (서열식별번호: 5)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 (여기서 X₁은 Ser 또는 Met임); 및 (f) X₁QGYGX₂PFT (서열식별번호: 6)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3 (여기서 X₁은 Gln, Asn, 또는 Thr이고, X₂는 Ala, Asn, Gln, 또는 Arg임), 또는 상기 HVR 중 1개 이상의 조합 및 서열식별번호: 1-6 중 어느 하나에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 그의 1개 이상의 변이체.
- [0654] 예를 들어, 항-VEGF 항체는 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함할 수 있다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYTRYADSVKG (서열식별번호: 7), GITPAGGYEYYADSVKG (서열식별번호: 21) 또는 GITPAGGYEYYADSVKG (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10) 또는 QQGYGNPFT (서열식별번호: 23)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 또는 상기 HVR 중 1개 이상의 조합 및 서열식별번호: 1, 3, 7-10 또는 21-23 중 어느 하나에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 그의 1개 이상의 변이체.
- [0655] 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함할 수 있다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYTRYADSVKG (서열식별번호: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 또는 상기 HVR 중 1개 이상의 조합 및 서열식별번호: 1, 3 또는 7-10 중 어느 하나에 대해 적어도 약

80% 서열 동일성 (예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 그의 1개 이상의 변이체. 특정한 예에서, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYTRYADSVKG (서열식별번호: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0656] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 (FR) 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열식별번호: 13)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQAPGKGLEWVA (서열식별번호: 14)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 15)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLTVTVSS (서열식별번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.

[0657] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 경쇄 가변 도메인 FR 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.

[0658] 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYTRYADSVKG (서열식별번호: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열식별번호: 13)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQAPGKGLEWVA (서열식별번호: 14)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 15)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLTVTVSS (서열식별번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0659] 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함할 수 있다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVKG (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGNPFT (서열식별번호: 23)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 또는 상기 HVR 중 1개 이상의 조합 및 서열식별번호: 1, 3, 8, 9, 22 또는 23 중 어느 하나에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 그의 1개 이상의 변이체. 특정한 예에서, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVKG (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGNPFT (서열식별번호: 23)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0660] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 (FR) 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSNTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR

(서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGELVTSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.

[0661] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 경쇄 가변 도메인 FR 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 24)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.

[0662] 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGNPFT (서열식별번호: 23)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열식별번호: 29)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGELVTSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 24)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0663] 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGNPFT (서열식별번호: 23)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGELVTSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 24)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0664] 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함할 수 있다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 또는 상기 HVR 중 1개 이상의 조합 및 서열식별번호: 1, 3, 8-10 또는 22 중 어느 하나에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 그의 1개 이상의 변이체. 특정한 예에서, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3.

[0665] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 (FR) 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) EEQLVEEGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열식별번호: 29) 또는 EEQLVEEGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSNTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.

[0666] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 경쇄 가변 도메인 FR 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 17), DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 25) 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 26)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18) 또는 WYQQKPGEAPKLLIY (서열식별번호: 27)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19) 또는 GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 28)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.

[0667] 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열식별번호: 29)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSNTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPESLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 25)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0668] 예를 들어, 다른 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열식별번호: 29)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSNTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 26)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGEAPKLLIY (서열식별번호: 27)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 28)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0669] 예를 들어, 다른 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의

중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 26)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGAPKLLIY (서열식별번호: 27)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTIESLQPEDAATYYC (서열식별번호: 28)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0670] 예를 들어, 또 다른 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 29)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 25)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGAPKLLIY (서열식별번호: 27)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0671] 예를 들어, 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 29)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 26)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0672] 다른 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITC (서열식별번호: 26)의 아미노산 서열을 포함하

는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0673] 예를 들어, 다른 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLELSAASGFEIS (서열식별번호: 29)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0674] 다른 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: (a) DYWIH (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYEYADSVGE (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 중쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 추가 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 4개의 경쇄 가변 도메인 FR을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0675] 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 11, 40 또는 42 중 어느 하나의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인; (b) 서열식별번호: 12, 41 또는 46 중 어느 하나의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 46의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0676] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 (FR) 중 1, 2, 3 또는

4개를 포함할 수 있다: (a) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열식별번호: 13)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQAPGKGLEWVA (서열식별번호: 14) 또는 WVRQEPGKGLEWVA (서열식별번호: 39)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSKNTAYLQMRSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 15)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGTLLTVSS (서열식별번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.

[0677] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 경쇄 가변 도메인 FR 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 17) 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIDC (서열식별번호: 45)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSTRFSGSGTDFLTITSSLPEDAATYYC (서열식별번호: 19), GVPSTRFSGSGTDFLTITSSLPEDSATYYC (서열식별번호: 44), 또는 GVPSTRFSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYC (서열식별번호: 54)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20) 또는 FGQGTKVEVK (서열식별번호: 55)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.

[0678] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 59)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0679] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 59)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0680] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 59)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0681] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 59)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0682] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGNPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 59)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0683] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 60)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0684] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 60)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0685] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 60)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0686] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 60)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0687] 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQGYGAPFTFGQGTKVEIK (서열식별번호: 60)의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 11의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 서열식별번호: 11의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) DYWIH (서열식별

번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GITPAGGYTRYADSVKG (서열식별번호: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) FVFFLPYAMDY (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVSTAVA (서열식별번호: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열식별번호: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQGYGAPFT (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 중쇄 프레임워크 영역을 포함한다: (a) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTIS (서열식별번호: 13)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQAPGKGLEWVA (서열식별번호: 14)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSKNTAYLQMRLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 15)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGTLLVTSS (서열식별번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 하기 경쇄 프레임워크 영역을 포함한다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 17)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSPRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 (b) 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 결합 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 예시적인 항-VEGF는 N94A.F83A.N82aR.Y58R (또한 G6.31.AARR로도 지칭됨)이다.

[0688]

일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33 또는 51의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37 또는 38의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0689]

일부 경우에, 항-VEGF 항체는 (a) 서열식별번호: 33 또는 51의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; (b) 서열식별번호: 12, 34, 35, 36, 37 또는 38의 서열 또는 그에 대해 적어도 90% 서열 동일성 (예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 도메인 및 (b)에서와 같은 VL 도메인을 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 38의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 항체는 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0690] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 중쇄 가변 도메인 프레임워크 영역 (FR) 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 29) 또는 EEQLVEEGGGLVQPGESLRLSCAASGFEIS (서열식별번호: 52)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H1; (b) WVRQEPGEGLEWVA (서열식별번호: 30) 또는 WVRQEPGKLEWVA (서열식별번호: 39)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H2; (c) RFTISADTSENTAYLQMNELRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 31)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H3; 및 (d) WGQGLVTVSS (서열식별번호: 32)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-H4.

[0691] 일부 경우에, 상기 항-VEGF 항체 중 임의의 것은 하기 경쇄 가변 도메인 FR 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함할 수 있다: (a) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열식별번호: 17), DIQMTQSPESLSASVGDRTITC (서열식별번호: 25) 또는 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열식별번호: 26)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L1; (b) WYQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 18) 또는 WYQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 27)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L2; (c) GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 19), GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 24), 또는 GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDAATYYC (서열식별번호: 28)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L3; 및 (d) FGQGTKVEIK (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 FR-L4.

[0692] 일부 경우에, 본 발명은 (a) 서열식별번호: 48의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 (b) 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 Fab 포맷으로 발현된 G6.31 AARR이다.

[0693] 일부 경우에, 본 발명은 (a) 서열식별번호: 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 (b) 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항-인간 IgG에 대한 반응성이 결여된 G6.31 AARR의 변이체 버전이다.

[0694] 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체)는 하기 섹션 1-7에 기재된 바와 같은 임의의 특색을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다:

[0695] 섹션 1: 항체 친화도

[0696] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 미만, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (K_d)를 갖는다. 예를 들어, 일부 경우에, 본원에 제공된 항체는 항원 (예를 들어, 인간 VEGF (hVEGF))에 약 10 nM 이하의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 본원에 제공된 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 5 nM 이하의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 본원에 제공된 항체는 hVEGF에 약 2 nM 이하의 K_d 로 결합한다. 예를 들어, 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 25 pM 내지 약 2 nM (예를 들어, 약 25 pM , 약 50 pM , 약 75 pM , 약 100 pM , 약 125 pM , 약 150 pM , 약 175 pM , 약 200 pM , 약 225 pM , 약 250 pM , 약 275 pM , 약 300 pM , 약 325 pM , 약 350 pM , 약 375 pM , 약 400 pM , 약 425 pM , 약 450 pM , 약 475 pM , 약 500 pM , 약 525 pM , 약 550 pM , 약 575 pM , 약 600 pM , 약 625 pM , 약 650 pM , 약 675 pM , 약 700 pM , 약 725 pM , 약 750 pM , 약 775 pM , 약 800 pM , 약 825 pM , 약 850 pM , 약 875 pM , 약 900 pM , 약 925 pM , 약 950 pM , 약 975 pM , 약 1 nM , 약 1.1 nM , 약 1.2 nM , 약 1.3 nM , 약 1.4 nM , 약 1.5 nM , 약 1.6 nM , 약 1.7 nM , 약 1.8 nM , 약 1.9 nM , 또는 약 2 nM)의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 600 pM (예를 들어, 약 75 pM , 약 100 pM , 약 125 pM , 약 150 pM , 약 175 pM , 약 200 pM , 약 225 pM , 약 250 pM , 약 275 pM , 약 300 pM , 약 325 pM , 약 350 pM , 약 375 pM , 약 400 pM , 약 425 pM , 약 450 pM , 약 475 pM , 약 500 pM , 약 525 pM , 약 550 pM , 약 575 pM , 약 600 pM)의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 500 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 400 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 300 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 200 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 150 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 125 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 75 pM 내지 약 100 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 80 pM 의 K_d 로 결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 60 pM 의 K_d 로

결합한다. 일부 경우에, 항체는 항원 (예를 들어, hVEGF)에 약 40 pM의 Kd로 결합한다.

[0697]

한 실시양태에서, Kd는 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 한 실시양태에서, RIA는 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 (125I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정된다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)® 멀티-웰 플레이트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 µg/ml 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, 포스페이트 완충 염수 (PBS) 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA)으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단한다. 비-흡착 플레이트 (네크(Nunc) #269620)에서는 100 pM 또는 26 pM [125I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체인 Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 기간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (트윈(TWEEN)-20®)으로 8회 세척한다. 플레이트가 건조된 경우에, 150 µl/웰의 섬광제 (마이크로신티(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다.

[0698]

또 다른 실시양태에 따르면, Kd는 비아코어(BIACORE)® 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 예를 들어, 비아코어®-2000 또는 비아코어®-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 검정은 ~10 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 수행된다. 한 실시양태에서, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8을 사용하여 5 µg/ml (~0.2 µM)로 희석한 후에 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 µl/분의 유량으로 주입한다. 항원의 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응기를 차단한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2-배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 µl/분의 유량으로 25°C에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주입한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 회합 및 해리 센스그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (kon) 및 해리율 (koff)을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 koff/kon의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우에, 온-레이트는 분광계, 예컨대 정지-유동 설비 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-AMINCO™ 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정 시 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS, pH 7.2 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 쉐칭 기술을 사용하는 것에 의해 결정될 수 있다.

[0699]

섹션 2: 항체 안정성

[0700]

일부 경우에, 본 발명의 항체 접합체 또는 그의 조성물에 사용되는 항체는, 예를 들어 항-VEGF 항체, 예를 들어 G6.31과 비교하여 증진된 안정성을 갖는다 (미국 특허 번호 7,758,859 및 국제 출원 공개 번호 WO 2005/012359 (이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨 참조). 항체의 안정성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 시차 주사 형광측정법 (DSF), 원형 이색성 (CD), 고유 단백질 형광, 시차 주사 열량측정, 분광분석법, 광산란 (예를 들어, 동적 광 산란 (DLS) 및 정적 광산란 (SLS), 자기-상호작용 크로마토그래피 (SIC)를 사용하여 결정될 수 있다. 항-VEGF 항체는, 예를 들어 항-VEGF 항체, 예를 들어 G6.31과 비교하여 증진된 융점 (Tm), 응집 온도 (Tagg), 또는 다른 안정성 척도를 가질 수 있다.

[0701]

특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 약 80°C 이상 (예를 들어, 약 81°C, 약 82°C, 약 83°C, 약 84°C, 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 약 92°C, 또는 약 93°C)인 Tm을 갖는다. 예를 들어, 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 약 83.5°C 이상 (예를 들어, 약 83.5°C, 약 84°C, 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 약 92°C, 또는 약 93°C)인 Tm을 갖는다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 약 82°C 내지 약 92°C (예를 들어, 약 82°C, 약 83°C, 약 84°C, 약 85°C, 약 86°C, 약 87°C, 약 88°C, 약 89°C, 약 90°C, 약 91°C, 또는 약 92°C)의 Tm을 갖는다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 약 82°C의 Tm을 갖는

다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체의 상기 T_m 값 중 임의의 것은 DSF를 사용하여 결정된다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체의 T_m 값은, 예를 들어 전문이 본원에 참조로 포함된 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/053454의 실시예 1에 기재된 바와 같이 결정된다.

[0702] 섹션 3: 항체 단편

[0703] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab-C, Fab'-SH, F(ab')₂, Fv 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 다른 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)]을 참조하고; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의에 대해서는, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0704] 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]; 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0705] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 모두 또는 한 부분 또는 경쇄 가변 도메인의 모두 또는 한 부분을 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 월섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조).

[0706] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이, 무손상 항체의 단백질분해적 소화 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 파지)에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0707] 섹션 4: 키메라 및 인간화 항체

[0708] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 도메인) 및 인간 불변 도메인을 포함한다. 추가 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 교체된" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0709] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서 인간에 대한 면역원성이 감소되도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 부분)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 부분)이 인간 항체 서열로부터 유래된 1개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 한 부분을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 내의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 개선시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0710] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은, 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에서 검토되고, 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 미국 특허 번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (특이성 결정 영역 (SDR) 그래프팅 기재); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) ("재표면화" 기재); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) ("FR 서플링 기재"); 및 Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FR 서플링에 대한 "유도 선택" 접근법 기재)]에 추가로 기재되어 있다.

[0711] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front.

Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0712] 섹션 5: 라이브러리-유래 항체

[0713] 본 발명의 항체는 목적 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 이러한 라이브러리를 목적하는 결합 특징을 보유하는 항체에 대해 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에서 검토되고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에서 추가로 기재된다.

[0714] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위로 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을, 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 대한 높은 친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열을 달성하도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 공개는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360을 포함한다.

[0715] 항체 또는 항체 단편은 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/053454에 기재된 바와 같은 파지 라이브러리로부터 유래될 수 있다.

[0716] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.

[0717] 섹션 6: 다중특이적 항체

[0718] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 VEGF에 대한 것이고, 다른 것은 임의의 다른 항원 (예를 들어, 제2 생물학적 분자, 예를 들어 인터류킨-1 베타 (IL-1 β); 인터류킨-6 (IL-6); 인터류킨-6 수용체 (IL-6R); 인터류킨-13 (IL-13); IL-13 수용체 (IL-13R); PDGF (예를 들어, PDGF-BB); 안지오프이에틴; 안지오프이에틴 2 (Ang2); Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 및 $\alpha 5\beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체 (예를 들어, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, 막-결합 VEGF-수용체 (mbVEGFR) 또는 가용성 VEGF 수용체 (sVEGFR)); ST-2 수용체; 및 연령-관련 황반 변성 (AMD) 위험과 유전적으로 연관된 단백질, 예컨대 보체 경로 성분 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터류킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 및 TNFRSF10A에 대한 것이다. 따라서, 이중특이적 항체는 VEGF 및 IL-1 β ; VEGF 및 IL-6; VEGF 및 IL-6R; VEGF 및 IL-13; VEGF 및 IL-13R; VEGF 및 PDGF (예를 들어, PDGF-BB); VEGF 및 안지오프이에틴; VEGF 및 Ang2; VEGF 및 Tie2; VEGF 및 S1P; VEGF 및 인테그린 $\alpha\beta$ 3; VEGF 및 인테그린 $\alpha\beta$ 5; VEGF 및 인테그린 $\alpha 5\beta 1$; VEGF 및 베타셀룰린; VEGF 및 아펠린/APJ; VEGF 및 에리트로포이에틴; VEGF 및 보체 인자 D; VEGF 및 TNF α ; VEGF 및 HtrA1; VEGF 및 VEGF 수용체 (예를 들어, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR); VEGF 및 ST-2 수용체; VEGF 및 C2; VEGF 및 인자 B; VEGF 및 인자 H; VEGF 및 CFHR3; VEGF 및 C3b; VEGF 및 C5; VEGF 및 C5a; VEGF 및 C3a; VEGF 및 ARMS2; VEGF 및 TIMP3; VEGF 및 HLA; VEGF 및 IL-8;

VEGF 및 CX3CR1; VEGF 및 TLR3; VEGF 및 TLR4; VEGF 및 CETP; VEGF 및 LIPC; VEGF 및 COL10A1; 또는 VEGF 및 TNFRSF10A에 대한 결합 특이성을 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 VEGF의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 VEGF를 발현하는 세포에 국재화시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, Fab, Fab' 또는 Fab-C 단편)으로서 제조될 수 있다.

[0719] 일부 경우에, 이중특이적 항체는 미국 특허 출원 번호 US 2014/0017244 (이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 이중특이적 항-VEGF/항-안지오프로틴 2 (Ang2) 항체이다. 예를 들어, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 VEGF에 결합하는 제1 결합 도메인 (예컨대 본원에 기재된 임의의 항-VEGF 항체), 및 (a) GYYMH (서열식별번호: 61)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) WINPNSGGTNYAQKFQG (서열식별번호: 62)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) SPNPYYDSSGYYPGAFDI (서열식별번호: 63)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) GGNNGSKSVH (서열식별번호: 64)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) DDSRPS (서열식별번호: 65)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QVWDSSDHV (서열식별번호: 66)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 또는 상기 HVR 중 1개 이상의 조합 및 서열식별번호: 61-66 중 어느 하나에 대해 적어도 약 80% 서열 동일성 (예를 들어, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 그의 1개 이상의 변이체를 포함하는, Ang2에 결합하는 제2 도메인을 포함할 수 있다.

[0720] 일부 경우에, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 VEGF에 결합하는 제1 결합 도메인 (예컨대 본원에 기재된 임의의 항-VEGF 항체), 및 Ang-2에 결합하는 제2 결합 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 VEGF에 결합하는 제1 결합 도메인 (예컨대 본원에 기재된 임의의 항-VEGF 항체) 및 Ang2에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 제2 결합 도메인은 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2010/069532 (이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 임의의 항체 결합 도메인 또는 그의 변이체이다.

[0721] 다른 경우에, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/073157에 기재된 임의의 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체이다.

[0722] 일부 경우에, 이중특이적 항체는 이중특이적 항-VEGF/항-IL-6 항체이다. 일부 경우에, 항-VEGF/항-IL-6 이중특이적 항체는 VEGF에 결합하는 제1 결합 도메인 (예컨대 본원에 기재된 임의의 항-VEGF 항체) 및 IL-6에 결합하는 제2 결합 도메인을 포함할 수 있다. 제2 결합 도메인은 관련 기술분야에 공지된 임의의 항-IL-6 항체의 결합 도메인, 예를 들어, EBI-031 (일레븐 바이오테라퓨틱스(Eleven Biotherapeutics)); 예를 들어, WO 2016/073890 (이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 참조), 신평시맙 (실반트(SYLVANT)®), 올로키주맙, 클라키주맙, 시루쿠맙, 엘실리모맙, 게릴럼주맙, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 그의 변이체일 수 있다.

[0723] 일부 경우에, 이중특이적 항체는 이중특이적 항-VEGF/항-IL-6R 항체이다. 일부 경우에, 항-VEGF/항-IL-6R 이중특이적 항체는 VEGF에 결합하는 제1 결합 도메인 (예컨대 본원에 기재된 임의의 항-VEGF 항체) 및 IL-6R에 결합하는 제2 결합 도메인을 포함할 수 있다. 제2 결합 도메인은 관련 기술분야에 공지된 임의의 항-IL-6R 항체의 결합 도메인, 예를 들어 토실리주맙 (악템라(ACTEMRA)®) (예를 들어, WO 1992/019579 (이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 참조), 사릴루맙, 보바릴리주맙 (ALX-0061), SA-237, 또는 그의 변이체일 수 있다.

[0724] 다중특이적 항체를 제조하는 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)], WO 93/08829, 및 Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "노브-인-홀" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스테어링 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생산하기 위한 류신 지퍼의 사용 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 "디아바디" 기술의 사용 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용 (예를 들어, 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)]에 기재된 바와 같은 삼중특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다.

[0725] "옥토퍼스 항체"를 포함한 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0726] 본원의 항체 또는 단편은 또한 VEGF 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0727] 섹션 7: 항체 변이체

[0728] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체 (예를 들어, 1개 이상의 아미노산 잔기 변경을 포함하는 항체 변이체)가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 성질을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 적절한 변형을 도입함으로써 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 목적하는 특징, 예를 들어 항원 결합을 보유하는 한, 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다.

[0729] (a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0730] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 표 1에 "바람직한 치환"의 제목 하에 제시된다. 보다 실질적인 변화는 표 1에 "예시적인 치환"의 제목 하에 제시되고, 아미노산 측쇄 부류에 관하여 하기에 추가로 기재된다. 아미노산 치환은 관심 항체 내로 도입될 수 있고, 생성물은 목적하는 활성, 예를 들어 보유/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 다른 기능적 특색, 예를 들어 안정성 또는 이펙터 기능에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0731] 표 1

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

[0732]

[0733] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 그룹화될 수 있다: (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe; 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을

또 다른 부류의 구성원으로 교환하는 것을 수반할 것이다.

- [0734] 치환 변이체의 한 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기 및/또는 FR 잔기를 치환하는 것을 수반한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 증가된 친화도, 증가된 안정성, 증가된 발현, 변경된 pI 및/또는 감소된 면역원성)에 있어서 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는, 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.
- [0735] 변경 (예를 들어, 치환)이 HVR에서 이루어져, 예를 들어 항체 친화도를 개선시킬 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟", 즉 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 코딩된 잔기 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)] 참조) 및/또는 항원과 접촉하는 잔기에서 이루어질 수 있으며, 생성된 변이체 VH 또는 VL이 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터 구축 및 재선택에 의한 친화도 성숙은, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 쉐 셔플링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내로 도입된다. 이어서 2차 라이브러리가 생성된다. 이어서 라이브러리는 스크리닝되어 목적하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개의 잔기)가 무작위화된 HVR-지시된 접근법을 수반한다. 항원 결합에 수반되는 HVR 잔기는, 예를 들어 알려진 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히 CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.
- [0736] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 1개 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 예를 들어 HVR 내의 항원 접촉 잔기의 외부일 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.
- [0737] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 1개 이상의 FR 내에서 일어날 수 있다. 이러한 변경은, 예를 들어 항체 친화도 및/또는 안정성을 개선시킬 수 있다 (예를 들어, 증가된 용융 온도에 의해 평가된 바와 같이).
- [0738] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군 (예를 들어, 하전된 잔기 예컨대 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)이 확인되고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체되어 항체의 항원과의 상호작용에 영향을 미치는지 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조가 사용된다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체는 스크리닝되어 이들이 목적하는 특성을 함유하는지 여부를 결정할 수 있다.
- [0739] 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드의 길이의 범위인 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 효소 (예를 들어 ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드의 융합체를 포함한다.
- [0740] (b) 등전점 변이체
- [0741] 본 발명은 변경된 등전점을 갖는 항체 변이체를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은, 예를 들어 항-VEGF 항체, 예를 들어 G6.31과 비교하여 감소된 등전점 (pI)을 갖는 항체 변이체를 제공한다. 일부 경우에, 표면 전하는 생리학적 pH에서 감소된다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 약 8 이하 (예를 들어, 약 8, 약 7, 약 6, 약 5 또는 약 4)의 pI를 갖는다. 일부 경우에, 항체는 약 4 내지 약 8 (예를 들어, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7 또는 약 8)의 pI를 갖는다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 약 5 내지 약 7 (예를 들어, 약 5, 약 6 또는 약 7)의 pI를

갖는다. 일부 경우에, 항-VEGF 항체는 약 5 내지 약 6 (예를 들어, 약 5.1, 약 5.2, 약 5.3, 약 5.4, 약 5.5, 약 5.6, 약 5.7, 약 5.8, 약 5.9 또는 약 6)의 pI를 갖는다.

[0742] 본 발명의 항체는, 예를 들어 소정의 위치에서의 야생형 아미노산 잔기를 더 낮은 pI를 갖는 아미노산으로 치환함으로써 감소된 pI를 갖도록 조작될 수 있다. 아미노산의 pI는 관련 기술분야에 공지된 아미노산의 아민 (-NH₂), 카르복실산 (-COOH) 및 측쇄의 pKa 값을 기준으로 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표면-노출된 아미노산 잔기는 항체의 pI를 감소시키기 위해 치환될 수 있다. 한 실시양태에서, 표면-노출된 아미노산 잔기는 글루타메이트 (E)로 치환될 수 있다. 한 실시양태에서, 표면-노출된 아미노산 잔기는 아스파르트레이트 (D)로 치환될 수 있다.

[0743] 제조합 방법 및 조성물

[0744] 본원에 기재된 임의의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체)는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같은 제조합 방법 및 조성물을 사용하여 생산될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-VEGF 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 1개 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 하나의 이러한 실시양태에서, 숙주 세포는 하기를 포함한다 (예를 들어, 하기로 형질감염된다): (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 상기 제공된 바와 같은 항-VEGF 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 것, 및 임의로 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 항체를 임의로 회수하는 것을 포함하는, 항-VEGF 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

[0745] 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체)의 제조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 1개 이상의 벡터 내로 삽입한다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 사용하여 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것에 의함).

[0746] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우에, 항체를 박테리아에서 생산할 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199 및 5,840,523을 참조한다. 또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254]을 참조한다. 발현 후에, 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 항체를 단리할 수 있고, 추가로 정제할 수 있다.

[0747] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분 또는 전체 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체가 생산되게 하는 진균 및 효모 균주를 포함한 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 숙주 발현에 적합하다. 문헌 [Gerengross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.

[0748] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바콜로바이러스 균주가 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 것으로 확인되었다.

[0749] 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술 기재)를 참조한다.

[0750] 척추동물 세포가 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합화된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는, SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]

에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK; 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR-CHO 세포 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))를 포함한 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포; 및 골수종 세포주, 예컨대 YO, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토에 대해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

- [0751] 검정
- [0752] 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 항-VEGF 항체), 뿐만 아니라 항체 접합체 (예를 들어, 항-VEGF 항체 (예를 들어, 본원에 제공된 임의의 항-VEGF 항체)를 포함하는 항체 접합체)는 관련 기술분야에 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 스크리닝되거나 특정화될 수 있다.
- [0753] (a) 결합 검정 및 다른 검정
- [0754] 한 측면에서, 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체), 또는 그의 항체 접합체는, 예를 들어 공지된 방법, 예컨대 ELISA, 웨스턴 블롯 등에 의해 그의 항원 결합 활성에 대해 시험된다.
- [0755] 또 다른 측면에서, 경쟁 검정은 항원 (예를 들어, VEGF)에의 결합에 대해 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항체 접합체와 경쟁하는 항체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 본원에 기재된 바와 같은 항체가 결합된 것과 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형대적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 상세한 예시적인 방법이 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에서 제공된다.
- [0756] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정화된 VEGF를, VEGF에 결합하는 제1 표지된 항체, 및 VEGF에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 능력에 대해 시험될 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하 이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정화된 VEGF를, 제1 표지된 항체는 포함하지만 제2 비 표지된 항체는 포함하지 않는 용액 중에서 인큐베이션한다. VEGF에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후에, 과량의 미결합 항체를 제거하고, 고정화된 VEGF와 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정화된 VEGF와 회합된 표지의 양이 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 그것은 제2 항체가 VEGF에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것을 나타낸다. 유사한 검정이 다른 항원에 대해 수행될 수 있다. 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.
- [0757] (b) 활성 검정
- [0758] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 그의 항체 접합체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은, 예를 들어 항원 (예를 들어, VEGF (예를 들어, 혈류 중 VEGF)) 또는 그의 펩티드 단편에 생체내에서, 시험관내에서 또는 생체외에서 결합하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 생물학적 활성은 항원을 차단 또는 중화시키는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 생물학적 활성은 VEGF를 차단 또는 중화시키거나, 또는 VEGF가 리간드, 예를 들어 수용체, 예컨대 KDR 또는 Flt-1에 결합하는 것을 방지하는 것을 포함할 수 있다. 생체내에서 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체 또는 그의 항체 접합체가 또한 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 항체 접합체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다.
- [0759] (c) 안정성 검정
- [0760] 한 측면에서, 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 그의 항체 접합체의 안정성 (예를 들어, 열안정성)을 결정하기 위한 검정이 제공된다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항체 접합체의 안정성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 시차 주사 형광측정법 (DSF), 원형 이색성 (CD), 고유 단백질 형광, 시차 주사 열량측정, 분광분석법, 광 산란 (예를 들어, 동적 광 산란 (DLS) 및 정적 광산란 (SLS)), 자기-상호작용 크로마토그래피 (SIC)를 사용하여 결정될 수 있다. 항체 또는 그의 항체 접합체의 안정성은, 예를 들어 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/053454의 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이, 예를 들어 DSF를 사용하여, 본원에 기재된 바와 같이

결정될 수 있다. 일부 경우에, 항체 접합체의 안정성은 굴절률 및 다중-각도 광 산란 검출기를 동반한 크기 배제 크로마토그래피 (SEC-RI-MALS)에 의해 결정될 수 있다.

[0761] 치료 방법 및 조성물

[0762] 본원에 제공된 임의의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 그의 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0763] 한 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한 항-VEGF 항체가 제공된다. 또 다른 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)가 제공된다. 추가 측면에서, 본 발명은 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는데 사용하기 위한 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애 또는 세포 증식성 장애이다. 일부 경우에, 안구 장애는 AMD (예를 들어, 습성 AMD, 건성 AMD, 중기 AMD, 진행성 AMD, 또는 지도형 위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예를 들어, 초점성, 비-중심 DME 또는 미만성, 중심-침범 DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증 (DR) (예를 들어, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR) 또는 높은-고도 DR), 다른 허혈-관련 망막병증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예를 들어, 중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태), CNV (예를 들어, 근시성 CNV), 각막 신생혈관화, 각막 신생혈관화와 연관된 질환, 망막 신생혈관화, 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 질환, 병리학적인 근시, 폰 히켈-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠병, 노리병, OPPG, 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압성 망막병증, 망막 혈관종성 증식, 황반 모세혈관확장증, 홍채 신생혈관화, 안내 신생혈관화, 망막 변성, 낭포양 황반 부종 (CME), 혈관염, 유두부종, 망막염, 결막염 (예를 들어, 감염성 결막염 및 비-감염성 (예를 들어, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑암시, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예를 들어, 다초점성 맥락막염), 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조, 외상성 눈 손상, 또는 쇼그렌병이다. 일부 경우에, 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에, 암은 유방암, 결장직장암, 비소세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다. 또 다른 측면에서, 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 치료하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체가 제공된다. 일부 경우에, 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애는 뇌 종양과 연관된 부종, 악성종양과 연관된 복수, 메이그스 증후군, 폐 염증, 신증후군, 심막 삼출, 흉막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연관된 투과성이다.

[0764] 또 다른 측면에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-VEGF 항체가 제공된다. 또 다른 측면에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)가 제공된다. 특정 예에서, 본 발명은 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-VEGF 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체)를 제공한다. 본 발명은 또한 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 상기 항체 접합체를 제공한다. 일부 경우에, 병리학적인 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애이다. 일부 경우에, 안구 장애는 AMD (예를 들어, 습성 AMD, 건성 AMD, 중기 AMD, 진행성 AMD, 또는 지도형 위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예를 들어, 초점성, 비-중심 DME 또는 미만성, 중심-침범 DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증 (DR) (예를 들어, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 다른 허혈-관련 망막병증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예를 들어, 중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태), CNV (예를 들어, 근시성 CNV), 각막 신생혈관화, 각막 신생혈관화와 연관된 질환, 망막 신생혈관화, 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 질환, 병리학적인 근시, 폰 히켈-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠병, 노리병, OPPG, 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압성 망막병증, 망막 혈관종성 증식, 황반 모세혈관확장증, 홍채 신생혈관화, 안내 신생혈관화, 망막 변성, 낭포양 황반 부종 (CME), 혈관염, 유두부종, 망막염, 결막염 (예를 들어, 감염성 결막염 및 비-감염성 (예를 들어, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑암시, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예를 들어, 다초점성 맥락막염), 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조, 외상성 눈 손상, 또는 쇼그렌병이다. 일부 경우에, 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에, 암은 유방암, 결장직장암, 비소세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다.

[0765] 다른 경우에, 본 발명은 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 갖는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공한다. 다른 예에서, 본 발명은 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 갖는 개체의 치료 방법에 사용하기 위한 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 제공한다. 일부 경

우에, 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애는 뇌 종양과 연관된 부종, 악성종양과 연관된 복수, 메이그스 증후군, 폐 염증, 신증후군, 심막 삼출, 흉막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연관된 투과성이다. 임의의 상기 용도는 개체에게 유효량의, 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0766] 일부 경우에, 본 발명은 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는데 사용하기 위한 항-VEGF를 제공한다. 또 다른 측면에서, 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는데 사용하기 위한 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하여 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 것을 포함하는, 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 방법에 사용하기 위한 항-VEGF 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 개체에게 유효량의 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 방법에 사용하기 위한 상기 항체 접합체를 제공한다. 다른 경우에, 본 발명은 대상체에서 혈관 투과성을 감소시키거나 억제하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체 또는 그의 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-VEGF 항체 또는 그의 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 투여하여 혈관 투과성을 감소시키거나 억제하는 것을 포함하는, 대상체에서 혈관 투과성을 감소시키거나 억제하는데 사용하기 위한 항-VEGF 항체 또는 상기 항체 접합체를 제공한다. 상기 중 임의의 것에 따른 "대상체"는 인간일 수 있다.

[0767] 본 발명은 의약의 생산 또는 제조에 있어서 항-VEGF 항체의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 의약의 생산 또는 제조에 있어서 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)의 용도를 제공한다. 예를 들어, 한 경우에, 의약은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애의 치료를 위한 것이다. 추가 경우에, 의약은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 대상체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 경우에, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애이다. 일부 경우에, 안구 장애는 AMD (예를 들어, 습성 AMD, 건성 AMD, 중기 AMD, 진행성 AMD, 또는 지도형 위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예를 들어, 초점성, 비-중심 DME 또는 미만성, 중심-침범 DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증 (DR) (예를 들어, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 다른 허혈-관련 망막병증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예를 들어, 중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태), CNV (예를 들어, 근시성 CNV), 각막 신생혈관화, 각막 신생혈관화와 연관된 질환, 망막 신생혈관화, 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 질환, 병리학적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우츠병, 노리병, OPG, 결막하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압성 망막병증, 망막 혈관종성 증식, 황반 모세혈관확장증, 홍채 신생혈관화, 안내 신생혈관화, 망막 변성, 낭포양 황반 부종 (CME), 혈관염, 유두부종, 망막염, 결막염 (예를 들어, 감염성 결막염 및 비-감염성 (예를 들어, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑암시, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예를 들어, 다초점성 맥락막염), 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조, 외상성 눈 손상, 또는 쇼그렌병이다. 일부 경우에, 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에, 암은 유방암, 결장직장암, 비소세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다. 추가 경우에, 의약은 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하기 위한 것이다. 추가 경우에, 의약은 대상체에게 유효량의 의약을 투여하여 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 것을 포함하는, 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 임의의 상기 의약 용도에서, 방법은 개체에게 유효량의, 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0768] 또 다른 경우에, 의약은 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애의 치료를 위한 것이다. 일부 경우에, 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애는 뇌 종양과 연관된 부종, 악성종양과 연관된 복수, 메이그스 증후군, 폐 염증, 신증후군, 심막 삼출, 흉막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연관된 투과성이다. 추가 경우에, 의약은 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 갖는 대상체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는, 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 또 다른 경우에, 의약은 대상체에서 혈관 투과성을 감소시키거나 억제하기 위한 것이다. 추가 경우에, 의약은 대상체에게 유효량의 의약을 투여하여 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 것을 포함하는, 대상체에서 혈관 투과성을 감소시키거나 억제하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 임의의 상기 의약 용도에서, 방법은 대상체에게 유효량의, 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 중 임의의 것에 따른 "대상체"는 인간일 수 있다.

[0769] 본 발명은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 병리학적

혈관신생과 연관된 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 예에서, 방법은 병리학적 혈관신생과 연관된 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 병리학적 혈관신생과 연관된 장애는 안구 장애이다. 일부 경우에, 안구 장애는 AMD (예를 들어, 습성 AMD, 건성 AMD, 중기 AMD, 진행성 AMD, 또는 지도형 위축 (GA)), 황반 변성, 황반 부종, DME (예를 들어, 초점성, 비-중심 DME 또는 미만성, 중심-침범 DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증 (DR) (예를 들어, 증식성 DR (PDR), 비-증식성 DR (NPDR), 또는 높은-고도 DR), 다른 허혈-관련 망막병증, ROP, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (예를 들어, 중심 (CRVO) 및 분지 (BRVO) 형태), CNV (예를 들어, 근시성 CNV), 각막 신생혈관화, 각막 신생혈관화와 연관된 질환, 망막 신생혈관화, 망막/맥락막 신생혈관화와 연관된 질환, 병리학적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, FEVR, 코우즈병, 노리병, OPG, 결막 하 출혈, 피부홍조, 안구 신생혈관 질환, 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염 (RP), 고혈압성 망막병증, 망막 혈관 종성 증식, 황반 모세혈관확장증, 홍채 신생혈관화, 안내 신생혈관화, 망막 변성, 낭포양 황반 부종 (CME), 혈관염, 유두부종, 망막염, 결막염 (예를 들어, 감염성 결막염 및 비-감염성 (예를 들어, 알레르기성) 결막염), 레베르 선천성 흑암시, 포도막염 (감염성 및 비-감염성 포도막염 포함), 맥락막염 (예를 들어, 다초점성 맥락막염), 안구 히스토플라스마증, 안검염, 안구 건조, 외상성 눈 손상, 또는 쇼그렌병이다. 일부 경우에, 세포 증식성 장애는 암이다. 일부 경우에, 암은 유방암, 결장직장암, 비소세포 폐암, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신암, 전립선암, 간암, 두경부암, 흑색종, 난소암, 중피종, 또는 다발성 골수종이다. 추가 경우에, 방법은 개체에게 유효량의, 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 방법에 따른 "대상체"는 인간일 수 있다.

[0770] 본 발명은 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항-VEGF 항체를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애를 갖는 개체에게 유효량의 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 바람직하지 않은 혈관 투과성과 연관된 장애는 뇌 종양과 연관된 부종, 악성종양과 연관된 복수, 메이그스 증후군, 폐염증, 신증후군, 심막 삼출, 홍막 삼출, 또는 심혈관 질환과 연관된 투과성이다. 추가 경우에, 방법은 개체에게 유효량의, 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 1종의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 방법에 따른 "대상체"는 인간일 수 있다.

[0771] 본 발명의 항체 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 포유동물을 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 한 실시양태에서, 항체 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는, 예를 들어 전임상 데이터를 얻기 위한 목적으로 비인간 포유동물에게 투여된다. 치료될 예시적인 비인간 포유동물은 비인간 영장류, 개, 고양이, 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트) 및 전임상 연구가 수행되는 다른 포유동물을 포함한다. 이러한 포유동물은 항체를 사용하여 치료될 질환에 대해 확립된 동물 모델일 수 있거나 또는 관심 항체의 독성 또는 약동학을 연구하는데 사용될 수 있다. 각각의 이들 실시양태에서, 용량 상승 연구가 포유동물에서 수행될 수 있다. 항체 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는, 예를 들어 고형 종양 모델에서 숙주 설치류에게 투여될 수 있다. 항체 또는 항체 접합체는 안구 약동학 연구를 위해 숙주 (예를 들어, 설치류, 예를 들어 토끼)에게, 예를 들어 유리체내 투여 (예를 들어, 유리체내 주사)에 의해 투여될 수 있다.

[0772] 추가 측면에서, 본 발명은, 예를 들어 임의의 상기 치료 방법에 사용하기 위한 본원에 제공된 임의의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)를 포함하는 제약 체제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 체제는 본원에 제공된 임의의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체) 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 체제는 본원에 제공된 임의의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체) 및 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 1종의 추가의 치료제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약 체제는 1종 이상의 추가의 화합물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 추가의 화합물은 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 안지오프로틴; Ang2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ 및 $\alpha 5 \beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 및 연령-관련 황반 변성 (AMD) 위험과 유전적으로 연관된 단백질, 예컨대 보체 경로 성분 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터류킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LPC, COL10A1; 및 TNFRSF10A로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 생물학적 분자에 결합한다. 특정 실시양태에서, 추가의 화합물은 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 예를 들어, 일부 경우에, 추가의 화합물은 이중특이적 항체 (예를 들어, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 예컨대 RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에 개시된 임의의

이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 그의 변이체)이다. 또 다른 예에서, 일부 경우에, 추가의 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들어, EBI-031 (일레븐 바이오테라퓨틱스; 예를 들어 WO 2016/073890 참조), 신틱시맵 (실반트®), 올로키주맵, 클라자키주맵, 시루쿠맵, 엘실리모맵, 게릴림주맵, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 그의 변이체이다. 또 다른 추가 예에서, 일부 경우에, 추가의 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들어 토실리주맵 (악템라®) (예를 들어, WO 1992/019579 참조), 사릴루맵, 보바릴리주맵 (ALX-0061), SA-237, 또는 그의 변이체이다.

[0773] 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 요법에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 적어도 1종의 추가의 치료제와 공-투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 또 다른 항체, 화학요법제, 세포독성제, 항혈관신생제, 면역억제제, 전구약물, 시토키인, 시토키인 길항제, 세포독성 방사선요법, 코르티코스테로이드, 항구토제, 암 백신, 진통제, 성장-억제제, 또는 그의 조합이다.

[0774] 예를 들어, 특정 실시양태에서, 임의의 상기 방법은 1종 이상의 추가의 화합물을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 추가의 화합물(들)과 동시에 투여된다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 항체 접합체는 추가의 화합물(들) 전 또는 후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 추가의 화합물은 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; IL-13; IL-13R; PDGF; 안지오프이테틴; Ang2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ 및 $\alpha 5\beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이에틴; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체; ST-2 수용체; 및 AMD 위험과 유전적으로 연관된 단백질, 예컨대 보체 경로 성분 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; 인터류킨-8 (IL-8); CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 및 TNFRSF10A로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 생물학적 분자에 결합한다. 특정 실시양태에서, 추가의 화합물은 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 임의의 상기 실시양태에 따른 (또는 그에 적용된 바와 같은) 특정 실시양태에서, 안구 장애는 증식성 망막병증, 맥락막 신생혈관화 (CNV), 연령-관련 황반 변성 (AMD), 당뇨병성 및 다른 허혈-관련 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 병리학적인 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, 망막 정맥 폐쇄 (RVO) (CRVO 및 BRVO 포함), 각막 신생혈관화, 망막 신생혈관화, 및 미숙아 망막병증 (ROP)으로 이루어진 군으로부터 선택된 안내 신생혈관 질환이다. 예를 들어, 일부 경우에, 추가의 화합물은 이중특이적 항체 (예를 들어, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 예컨대 RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에 개시된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 그의 변이체)이다. 또 다른 예에서, 일부 경우에, 추가의 화합물은 항-IL-6 항체, 예를 들어, EBI-031 (일레븐 바이오테라퓨틱스; 예를 들어 WO 2016/073890 참조), 신틱시맵 (실반트®), 올로키주맵, 클라자키주맵, 시루쿠맵, 엘실리모맵, 게릴림주맵, OPR-003, MEDI-5117, PF-04236921, 또는 그의 변이체이다. 또 다른 추가 예에서, 일부 경우에, 추가의 화합물은 항-IL-6R 항체, 예를 들어 토실리주맵 (악템라®) (예를 들어, WO 1992/019579 참조), 사릴루맵, 보바릴리주맵 (ALX-0061), SA-237, 또는 그의 변이체이다.

[0775] 일부 경우에, 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 안구 장애, 예를 들어 본원에 기재된 안구 장애 (예를 들어, AMD (예를 들어, 습성 AMD), DME, DR 또는 RVO)의 치료를 위한 적어도 1종의 추가의 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 안구 장애의 치료를 위한 조합 요법을 위한 예시적인 추가의 치료제는, 비제한적으로, 항혈관신생제, 예컨대 VEGF 길항제, 예를 들어, 항-VEGF 항체 (예를 들어, 항-VEGF Fab 루센티스® (라니비주맵)), 가용성 수용체 융합 단백질 (예를 들어, 재조합 가용성 수용체 융합 단백질 아일리아® (아플리베르셉트, VEGF 트랩 아이로도 공지됨; 레게네론/아벤티스 (Regeneron/Aventis))), 압타머 (예를 들어, 항-VEGF PEG화 압타머 마큐젠® (폐갑타닙 소듐; 넥스타 파마슈티칼스/OSI 파마슈티칼스(NeXstar Pharmaceuticals/OSI Pharmaceuticals))), 및 VEGFR 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, 4-(4-브로모-2-플루오로아닐리노)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라닙 (PTK787), 세막사닙 (SU5416; 수젠(SUGEN)) 및 수텐트® (수니티닙)); 트립토판닐-tRNA 신테타제 (TrpRS); 스쿠알라민; 레타안(RETAAINE)® (테포 현탁액용 아네코르타브 아세테이트; 알콘, 인크.(Alcon, Inc.)); 콤프레타스타틴 A4 전구약물 (CA4P); 미페프렉스(MIFEPREX)® (미페프리스톤-ru486); 테논냥하 트리암시놀론 아세토니드; 유리체내 결정질 트리암시놀론 아세토니드; 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제 (예를 들어, 프리노마스타트 (AG3340; 화이자(Pfizer))); 플루오시놀론 아세토니드 (플루오시놀론 안내 이식물; 바슈 앤 롬/컨트롤 딜리버리 시스템즈(Bausch & Lomb/Control Delivery Systems)); 리노미드; 인테그린 $\beta 3$ 기능의 억제제; 안지오프이테틴, 및 그의 조합을 포함한다. 본 발명의 항체 접합체와 조합되어 투여될 수 있는 이들 및 다른 치료

제는, 예를 들어 미국 특허 출원 번호 US 2014/0017244 (이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된다.

[0776]

안구 장애 (예를 들어, AMD, DME, DR 또는 RVO)의 치료를 위한 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)와 조합되어 사용될 수 있는 추가의 치료제의 추가 예는 비수다인(VISUDYNE)® (베르테포르핀; 비-열 레이저에 의한 광역학 요법과 함께 전형적으로 사용되는 광-활성화된 약물), PKC412, 엔도비온 (NS 3728; 뉴로서치 A/S(NeuroSearch A/S)), 신경영양 인자 (예를 들어, 신경교세포 유래 신경영양 인자 (GDNF) 및 섬모 신경영양 인자 (CNTF)), 델타아젠, 도르줄아미드, 포토트로프 (PHOTOTROP)®, 9-시스-레티날, 눈 의약 (예를 들어, 포스포린 아이오다이드, 에코티오페이트, 또는 탄산 안히드라제 억제제), 네오바스타트 (AE-941; 아에테르나 래보러토리즈, 인크.(Aeterna Laboratories, Inc.)), Sirna-027 (AGF-745; 시마 테라퓨틱스, 인크.(Sima Therapeutics, Inc.)), 뉴로트로핀 (단지 예로서, NT-4/5 (제넨텍) 포함), Cand5 (엑퀴티 파마슈티칼스(Acuity Pharmaceuticals)), INS-37217 (인스파이어 파마슈티칼스(Inspire Pharmaceuticals)), 인테그린 길항제 (제리니 아게(Jerini AG) 및 애보트 래보러토리즈(Abbott Laboratories)로부터의 것들 포함), EG-3306 (아크 테라퓨틱스 리미티드(Ark Therapeutics Ltd.)), BDM-E (바 이오디엠 리미티드(BioDiem Ltd.)), 탈리도미드 (예를 들어, 엔터메드, 인크.(EntreMed, Inc.)에 의해 사용됨), 카디오트로핀-1 (제넨텍), 2-메톡시에스트라디올 (앨러간/오쿨렉스(Allergan/Oculex)), DL-8234 (도레이 인더스트리즈(Toray Industries)), NTC-200 (뉴로테크(Neurotech)), 테트라티오몰리브데이트 (미시간 대학교), LYN-002 (린케우스 바이오테크(Lynkeus Biotech)), 미세조류 화합물 (아쿠아서치/알바니, 메라 파마슈티칼스(Mera Pharmaceuticals)), D-9120 (셀테크 그룹 피엘씨(Celltech Group plc)), ATX-S10 (하마마츠 포토닉스(Hamamatsu Photonics)), TGF-베타 2 (젠자임/셀트릭스(Genzyme/Celtrix)), 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, 앨러간, 수젠, 또는 화이자로부터의 것들), NX-278-L (넥스타 파마슈티칼스/길리아드 사이언시스(NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences)), Opt-24 (옵티스 프랑스 에스에이(OPTIS France SA)), 망막 세포 신경절 신경보호제 (코젠트 뉴로사이언시스(Cogent Neurosciences)), N-니트로피라졸 유도체 (텍사스 A&M 유니버시티 시스템(Texas A&M University System)), KP-102 (크레니츠키 파마슈티칼스(Krenitsky Pharmaceuticals)), 광역학 요법에 사용된 치료제인 시클로스포린 A (예를 들어, 비수다인®; 수용체-표적화 PDT, 브리스톨-마이어스 스 퀴브 캄파니(Bristol-Myers Squibb, Co.); PDT와 함께 주사하기 위한 포르피머 소듐; 베르테포르핀, 큐엘티 인크.(QLT Inc.); PDT와 함께 로스타포르핀, 미라벤트 메디칼 테크놀로지스(Miravent Medical Technologies); PDT와 함께 탈라포르핀, 니폰 페트롤륨(Nippon Petroleum); 및 모텍사핀 루테튬, 파마사이클릭스, 인크.(Pharmacyclics, Inc.)), 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (예로서, 노바갈리 파마 에스에이(Novagali Pharma SA)에 의해 시험된 제품 및 ISIS-13650, 아이시스 파마슈티칼스(Isis Pharmaceuticals) 포함), 및 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0777]

본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 안구 장애 (예를 들어, AMD, DME, DR 또는 RVO)의 치료를 위한 요법 또는 외과적 절차, 예를 들어 레이저 광응고 (예를 들어, 범망막 광응고 (PRP)), 드루젠 레이저링, 황반 원공 수술, 황반 전위 수술, 이식가능한 소형 망원경, PHI-운동 혈관조영 (또한 마이크로-레이저 요법 및 피더 베슬 치료로도 공지됨), 양성자 빔 요법, 마이크로자극 요법, 망막 박리 및 유리체 수술, 공막점조각, 황반하 수술, 경동공 열요법, 광화학제 I 요법, RNA 간섭 (RNAi) 사용, 체외 혈액분리반출술 (또한 막 차등 여과 및 레오테라피로도 공지됨), 마이크로칩 이식, 줄기 세포 요법, 유전자 대체 요법, 리보자임 유전자 요법 (저산소증 반응 요소를 위한 유전자 요법, 옥스포드 바이오메디카 (Oxford Biomedica) 포함; 렌티팍, 제네틱스(Genetix); 및 PDEF 유전자 요법, 젠벡(GenVec)), 광수용체/망막 세포 이식 (이식가능한 망막 상피 세포, 디아크린, 인크.(Diacrin, Inc.); 망막 세포 이식물, 셀 제네시스, 인크.(Cell Genesys, Inc.) 포함), 침술, 및 그의 조합과 조합되어 투여될 수 있다.

[0778]

일부 경우에, 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 안구 장애 (예를 들어, AMD, DME, DR 또는 RVO)의 치료를 위한 항혈관신생제와 조합되어 투여될 수 있다. 임의의 적합한 항혈관신생제는 문헌 [Carmeliet et al. Nature 407:249-257, 2000]에 열거된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체와 조합되어 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항혈관신생제는 VEGF 길항제, 예를 들어, 비제한적으로, 항-VEGF 항체 (예를 들어, 항-VEGF Fab 루센티스® (라니비주맙), RTH-258 (이전에 ESBA-1008, 항-VEGF 단일쇄 항체 단편; 노파르티스(Novartis)), 또는 이중특이적 항-VEGF 항체 (예를 들어, 항-VEGF/항-안지오프이에틴 2 이중특이적 항체, 예컨대 RG-7716; 로슈(Roche))), 가용성 재조합 수용체 융합 단백질 (예를 들어, 아일리아® (아플리베르셉트)), VEGF 변이체, 가용성 VEGFR 단편, VEGF 또는 VEGFR을 차단할 수 있는 압타머 (예를 들어, 폐갑타닙), 중화 항-VEGFR 항체, VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제, 항-VEGF DARP인® (예를 들어, 아비시파르 페글), VEGF 또는 VEGFR의 발현을 억제하는 소형 간섭 RNA, VEGFR 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, 4-(4-브로모-2-플루오로

아닐리노)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로폭시)퀴나졸린 (AZD2171), 바탈라닙 (PTK787), 세막사닙 (SU5416; 수젠) 및 수텐트® (수니티닙)), 및 그의 조합이다. 일부 경우에, 이중특이적 항-VEGF 항체는 IL-1 β ; IL-6; IL-6R; PDGF (예를 들어, PDGF-BB); 안지오프로이오텐; 안지오프로이오텐 2; Tie2; S1P; 인테그린 $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$ 및 $\alpha 5 \beta 1$; 베타셀룰린; 아펠린/APJ; 에리트로포이오텐; 보체 인자 D; TNF α ; HtrA1; VEGF 수용체 (예를 들어, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, mbVEGFR, 또는 sVEGFR); ST-2 수용체; 및 연령-관련 황반 변성 (AMD) 위험과 유전적으로 연관된 단백질, 예컨대 보체 경로 성분 C2, 인자 B, 인자 H, CFHR3, C3b, C5, C5a 및 C3a; HtrA1; ARMS2; TIMP3; HLA; IL-8; CX3CR1; TLR3; TLR4; CETP; LIPC; COL10A1; 및 TNFRSF10A를 포함하나 이에 제한되지는 않는 제2 생물학적 분자에 결합한다. 예를 들어, 일부 경우에, 추가의 화합물은 이중특이적 항체 (예를 들어, 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체, 예컨대 RG-7716 또는 WO 2010/069532 또는 WO 2016/073157에 개시된 임의의 이중특이적 항-VEGF/항-Ang2 이중특이적 항체 또는 그의 변이체)이다.

[0779] 안구 장애 (예를 들어, AMD, DME, DR 또는 RVO)의 치료를 위해 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)와 조합되어 투여될 수 있는 다른 적합한 항혈관신생제는 코르티코스테로이드, 혈관신생억제 스테로이드, 아네코르타브 아세테이트, 안지오스타틴, 엔도스타틴, 티로신 키나제 억제제, 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP) 억제제, 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 3 (IGFBP3), 기질 유래 인자 (SDF-1) 길항제 (예를 들어, 항-SDF-1 항체), 색소 상피-유래 인자 (PEDF), 감마-세크레타제, 델타-유사 리간드 4, 인테그린 길항제, 저산소증-유도성 인자 (HIF)-1 α 길항제, 단백질 키나제 CK2 길항제, 신생혈관화 부위로 줄기 세포 (예를 들어, 내피 전구 세포) 키소를 억제하는 작용제 (예를 들어, 항-혈관 내피 카드헤린 (CD-144) 항체 및/또는 항-SDF-1 항체), 및 그의 조합을 포함한다.

[0780] 추가 예에서, 일부 경우에, 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 안구 장애 (예를 들어, AMD, DME, DR 또는 RVO)의 치료를 위해 신생혈관화에 대한 활성을 갖는 작용제, 예컨대 항염증 약물, 포유동물 라파마이신 표적 (mTOR) 억제제 (예를 들어, 라파마이신, 아피니토르(AFINITOR)® (에베롤리무스), 및 토리셀(TORISEL)® (템시롤리무스)), 시클로스포린, 종양 괴사 인자 (TNF) 길항제 (예를 들어, 항-TNF α 항체 또는 그의 항원 결합 단편 (예를 들어, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골, 및 골리무맵) 또는 가용성 수용체 융합 단백질 (예를 들어, 에타네르셉트)), 항-보체 작용제, 비스테로이드성 항염증제 (NSAID), 또는 그의 조합과 조합되어 투여될 수 있다.

[0781] 또 다른 추가 예에서, 일부 경우에, 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)는 신경보호성이며 건성 AMD에서 습성 AMD로의 진행을 잠재적으로 감소시킬 수 있는 작용제, 예컨대 데히드로에피안드로스테론 (DHEA) (상표명: 프라스테라(PRASTERA)™ 및 피델린(FIDELIN)®), 데히드로에피안드로스테론 술페이트 및 프레네네는 술페이트와 같은 약물을 포함하는, "신경스테로이드"로 불리는 약물 부류와 조합되어 투여될 수 있다.

[0782] 임의의 적합한 AMD 치료제는 안구 장애 (예를 들어, AMD, DME, DR 또는 RVO)의 치료를 위해 본 발명의 항체 (예를 들어, 항-VEGF 항체) 또는 항체 접합체 (예를 들어, 가교된 HA 히드로겔 접합체)와 조합되는 추가의 치료제, 예를 들어, 비제한적으로, VEGF 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체 (예를 들어, 루센티스® (라니비주맵), RTH-258 (이전에 ESBA-1008, 항-VEGF 단일쇄 항체 단편; 노파르티스), 또는 이중특이적 항-VEGF 항체 (예를 들어, 항-VEGF/항-안지오프로이오텐 2 이중특이적 항체, 예컨대 RG-7716; 로슈)), 가용성 VEGF 수용체 융합 단백질 (예를 들어, 아일리아® (아플리베르셉트)), 항-VEGF DARP인® (예를 들어, 아비시파르 페골; 몰레큘라 파트너스 아게/엘러간(Molecular Partners AG/Allergan)), 또는 항-VEGF 압타머 (예를 들어, 마큐젠® (페갑타닙 소듐)); 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF) 길항제, 예를 들어, 항-PDGF 항체, 항-PDGFR 항체 (예를 들어, REGN2176-3), 항-PDGF-BB PEG화 압타머 (예를 들어, 포비스타(FOVISTA)®; 옵토테크/노파르티스(Ophthotech/Novartis)), 가용성 PDGFR 수용체 융합 단백질, 또는 이중 PDGF/VEGF 길항제 (예를 들어, 소분자 억제제 (예를 들어, DE-120 (산텐(Santen)) 또는 X-82 (티로젠엑스(TyrogeneX))) 또는 이중특이적 항-PDGF/항-VEGF 항체)); 광역학 요법과 조합되는 비수다인® (베르테포르핀); 항산화제; 보체계 길항제, 예를 들어 보체 인자 C5 길항제 (예를 들어, 소분자 억제제 (예를 들어, ARC-1905; 옵토테크) 또는 항-C5 항체 (예를 들어, LFG-316; 노파르티스), 프로페르딘 길항제 (예를 들어, 항-프로페르딘 항체, 예를 들어, CLG-561; 알콘), 또는 보체 인자 D 길항제 (예를 들어, 항-보체 인자 D 항체, 예를 들어, 람팔리주맵; 로슈)); 시각 회로 조절제 (예를 들어, 에믹수스타트 히드로클로라이드); 스쿠알라민 (예를 들어, OHR-102; 오에이치알 파마슈티칼(Ohr Pharmaceutical)); 비타민 및 미네랄 보충제 (예를 들어, 연령-관련 안질환 연구 1에 기재된 것 (AREDS1; 아연 및/또는 항산화제) 및 연령-관련 안질환 연구 2에 기재된 것 (AREDS2; 아연, 항산화제, 루테인, 제아크산틴, 및/또는 오메가-3 지방산)); 세포-기반

요법, 예를 들어 NT-501 (레넥수스(Renexus)); PH-05206388 (화이자), huCNS-SC 세포 이식 (스템셀즈 (StemCells)), CNT0-2476 (얀센(Janssen)), 오프레겐 (셀 큐어 뉴로사이언시스(Cell Cure Neurosciences)), 또는 MA09-hRPE 세포 이식 (오카타 테라퓨틱스(Ocata Therapeutics)); 조직 인자 길항제 (예를 들어, hI-con1; 아이코닉 테라퓨틱스(Iconic Therapeutics)); 알파-아드레날린성 수용체 효능제 (예를 들어, 브리모니딘 타르트레이트); 캡티드 백신 (예를 들어, S-646240; 시오노기(Shionogi)); 아밀로이드 베타 길항제 (예를 들어, 항-베타 타 아밀로이드 모노클로날 항체, 예를 들어, GSK-933776); S1P 길항제 (예를 들어, 항-S1P 항체, 예를 들어, 아이소넵(iSONEP)TM; 엘파스 인크(Lpath Inc)); ROB04 길항제 (예를 들어, 항-ROB04 항체, 예를 들어, DS-7080a; 다이이치 산쿄(Daiichi Sankyo)); 엔도스타틴 및 안지오테나틴 발현 렌티바이러스 벡터 (예를 들어, 레티노스타트(RetinoStat)); 및 그의 임의의 조합으로서 투여될 수 있다. 일부 경우에, AMD 치료제 (임의의 상기 AMD 치료제 포함)는 공동-제제화될 수 있다. 예를 들어, 항-PDGFR 항체 REGN2176-3은 아플리베르셉트 (아일리아®)와 함께 공동-제제화될 수 있다. 일부 경우에, 이러한 공동-제제는 본 발명의 항체와 조합되어 투여될 수 있다. 일부 경우에, 안구 장애는 AMD (예를 들어, 습성 AMD)이다.

[0783] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제는 동일한 또는 별개의 제제에 포함됨) 및 개별 투여를 포괄하며, 이 경우에 본 발명의 항체 또는 항체 접합체의 투여는 추가의 치료제 또는 치료제들의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 항체 또는 항체 접합체의 투여 및 추가의 치료제의 투여는 서로 약 1, 2, 3, 4 또는 5개월 내에, 또는 약 1, 2 또는 3주 내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 내에 이루어진다.

[0784] 실시예

[0785] 하기 약어가 하기 실시예 및 본원 다른 곳에서 사용될 수 있다.

약어	완전한 표현 및/또는 정의
CIEC	양이온-교환 크로마토그래피
CV	칼럼 부피
BHT	3,5-디- <i>tert</i> -부틸-4-히드록시톨루올
DBU	1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데스-7-엔
DCC	디시클로헥실카르보디이미드
DCM	디클로로메탄
DIPEA	N,N-디이소프로필에틸아민
DMAP	4-(디메틸아미노)-피리딘
DTT	디티오프레이톨
EDC	1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드
Fab	항원-결합 단편
Fmoc-Ado-OH	Fmoc-8-아미노-3,6-디옥사옥탄산
HA	히알루론산
HEPES	4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산
HOBt	히드록시벤조트리아졸
HOSu	히드록시숙신이미드
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
IPC	공정중 품질관리
LCMS	질량 분광계 커플링된 액체 크로마토그래피
LPLC	저압 액체 크로마토그래피
MES	2-(N-모르폴리노)에탄술폰산
MS	질량 분광측정법
MTBE	메틸 <i>tert</i> -부틸 에테르
MTS	메탄에티오술폰닐
NHS	N-히드록시숙신이미드
PFP	펜타플루오로페놀
PTSA	파라-톨루엔 술폰산
PyBOP	벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트
QC	품질 관리
Rbz	라니비주맙
RP-HPLC	역상 고성능 액체 크로마토그래피
RP-LPLC	역상 저압 액체 크로마토그래피

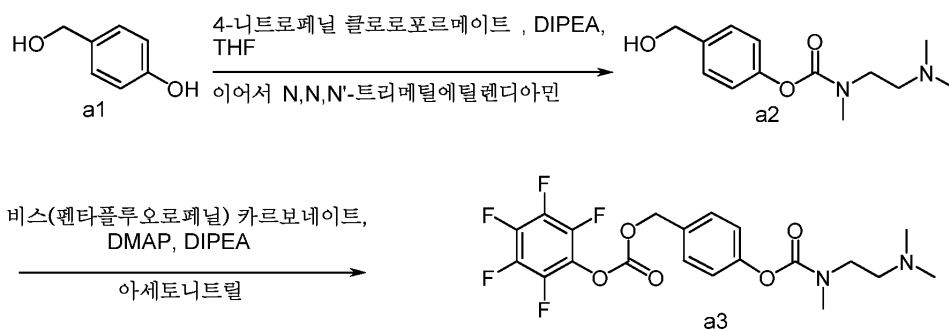
[0786]

약어	완전한 표현 및/또는 정의
SEC	크기 배제 크로마토그래피
Su	숙신이미드
TCEP	트리스(2-카르복시에틸)포스핀 히드로클로라이드
TFA	트리플루오로아세트산
TFF	접선 흐름 여과
TLC	박층 크로마토그래피
t _R	체류 시간
TransCon	일시적으로 접합된
TriMED	N,N,N'-트리메틸 에틸렌디아민
UPLC	초고성능 액체 크로마토그래피
wt%	중량 퍼센트

[0787]

[0788]

실시에 1A 자기-희생적 보호기 4-(((퍼플루오로페녹시)카르보닐옥시)메틸)페닐 2-(디메틸아미노)에틸(메틸)카르바메이트 a3의 합성



[0789]

[0790]

반응식 1A

[0791]

4-(((퍼플루오로페녹시)카르보닐옥시)메틸)페닐 2-(디메틸아미노)에틸(메틸)카르바메이트 a3의 합성은 반응식 1A에 예시되어 있다.

[0792]

단계 1 4-(히드록시메틸)페닐 2-(디메틸아미노)에틸 (메틸)카르바메이트 a2의 제조

[0793]

4-히드록시벤질 알콜 a1 (1.70 g; 13.69 mmol; 1.00 당량)을 THF (20.5 ml) 중에 용해시키고, DIPEA (4.8 ml; 27.39 mmol; 2.00 당량)를 교반하면서 첨가하였다. THF (5 ml) 중 4-니트로페닐 클로로포름에이트 (2.90 g; 14.38 mmol; 1.05 당량)를 25분에 걸쳐 적가하였다. 반응물을 실온에서 추가로 20분 동안 교반하였다. LCMS에 의한 IPC로 목적 중간체의 형성을 확인하였다. N,N,N'-트리메틸에틸렌디아민 (2.21 ml; 17.12 mmol; 1.25 당량)을 용액에 천천히 첨가하고, 반응 혼합물을 추가로 20분 동안 교반하였다. LCMS에 의한 IPC로 카르보네이트의 완전한 전환을 확인하였다. 반응물을 빙조에서 냉각시키고, TFA (3.17 ml; 41.08 mmol; 3.00 당량)로 토크닝하고, 물로 희석하였다. pH는 pH 시험지에 의해 나타난대로 2 이하이어야 한다. 수성 상을 에틸 아세테이트 (3x 100 ml)로 세척하였으며, 이 후에 수성 상의 pH는 약 pH 4.5로 상승하였다. 수성 상을 동결건조시켜 유성 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트 (3x)와 함께 공증발시키고, DCM 중에 용해시키고, 건조시켰다 (Na₂SO₄). 여과한 후, 용매를 증발시키고, 유성 잔류물을 고진공 하에 건조시켰다 (2 h). LCMS에 의한 QC는 93%의 순도를 나타냈다. 생성된 조 4-(히드록시메틸)페닐 2-(디메틸아미노) 에틸(메틸)카르바메이트 a2를 후속 단계에 정제 없이 사용하였다.

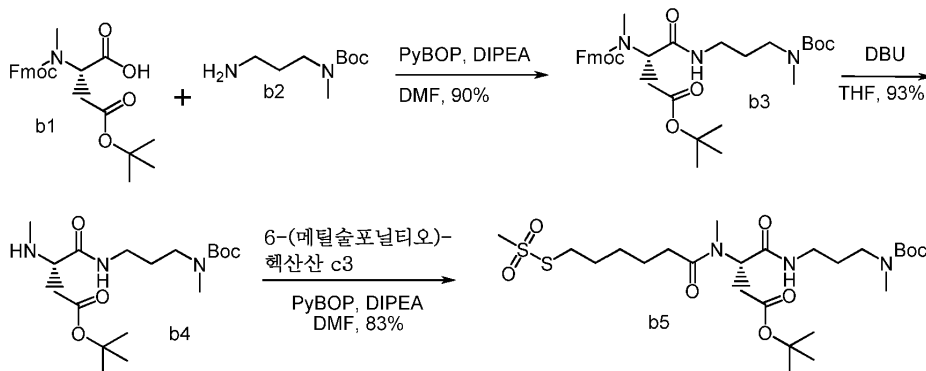
[0794]

단계 2 4-(((퍼플루오로페녹시)카르보닐옥시)메틸)페닐 2-(디메틸아미노) 에틸(메틸)카르바메이트 a3의 제조

[0795]

단계 1로부터의 조 4-(히드록시메틸)페닐 2-(디메틸아미노) 에틸(메틸)카르바메이트 a2 (11.76 g; 최대 13.69 mmol; 1.00 당량; 최대 40 wt%의 순도)를 아세토니트릴 (24 ml) 중에 용해시키고, 용액을 빙조에서 냉각시켰다. 비스(펜타플루오로페닐) 카르보네이트 (10.15 g; 25.75 mmol; 1.88 당량), DMAP (315 mg; 2.58 mmol; 0.19 당량) 및 DIPEA (9.0 ml; 51.53 mmol; 3.76 당량)를 교반하면서 첨가하였다. 용액은 오렌지색에서 녹색으로, 이어서 회색으로 변하였다. 반응 혼합물을 15분 동안 교반하였다. 생성물의 형성을 LCMS에 의해 확인하였다. 반응 혼합물을 -15℃로 냉각시키고, 0.1% TFA 함유 물 (12.38 ml) 및 순 TFA (3.9 ml; 51.48 mmol; 3.76 당량)의 혼합물로 토크닝하였다. 황색 용액을 RP-LPLC에 의해 4회 실행으로 정제하였다. 순수한 분획을 합하고, 동결시키고, 동결건조시켜 4-(((퍼플루오로페녹시)카르보닐옥시)메틸)페닐 2-(디메틸아미노) 에틸(메틸)카르바메이트 a3을 황색 오일, 4.73 g TFA 염 (2 단계에 걸쳐 8.21 mmol, 60%)으로서 수득하였다.

[0796] 실시예 1B 보호된 링커 b5의 합성



[0797]

[0798] 반응식 1B

[0799] 링커 b5의 합성은 반응식 1B에 제시된다.

[0800] 단계 1 아미드 화합물 b3의 제조

[0801] Fmoc-N-Me-Asp(tBu)-OH b1 (6.96 g; 16.36 mmol; 1.00 당량)을 DMF (139 ml) 중에 용해시켰다. PyBOP (12.77 g; 24.54 mmol; 1.50 당량) 및 DIPEA (14.25 ml; 81.79 mmol; 5.00 당량)를 첨가하고, 완전히 용해될 때까지 교반하였다. N-Boc-N-메틸-1,3-디아미노프로판 히드로클로라이드 b2 (4.04 g; 17.99 mmol; 1.10 당량)를 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 생성물로의 완전한 전환을 LCMS에 의해 관찰하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄 400 ml로 희석하고, 0.1 N HCl 400 ml로 3회 세척하였다. 유기 층을 포화 NaHCO₃ 용액 400 ml로 3회, 염수 200 ml로 1회 세척하였다. 유기 층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 조 물질을 디클로로메탄 14 ml 중에 용해시키고, 정상 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물을 풀링하고, 용매를 증발시켰다. 최종 물질을 고진공 하에 건조시켜 아미드 화합물 b3을 백색 발포체로서 수득하였다. 수율: 8.81 g (14.79 mmol, 90%).

[0802] 단계 2 아미드 화합물 b4의 제조

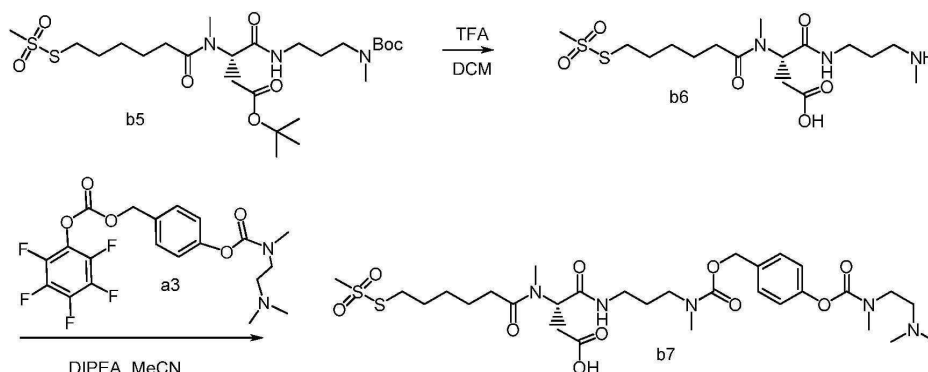
[0803] 아미드 화합물 b3 (8.81 g; 14.79 mmol; 1.00 당량)을 THF (130 ml) 중에 용해시켰다. DBU (2.56 ml; 17.15 mmol; 1.16 당량)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하였다. LCMS 크로마토그램은 출발 물질의 완전한 전환을 나타냈다. 추가적으로, TLC를 준비하였다 (에틸 아세테이트/메탄올 9:1, KMnO₄ 염색, R_f(Pdt) = 0.48). 조 반응 혼합물의 용매를 증발시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트 중에 용해시켜 최종 부피 20 ml에 이르게 하고, 용액을 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물을 풀링하고, 용매를 증발시켰다. 최종 물질을 고진공 하에 밤새 건조시켜 아미드 화합물 b4를 황색빛 오일로서 수득하였다. 수율: 5.13 g (13.74 mmol, 87% 수율, 215 nm에서 94% 순도)

[0804] 단계 3 링커 화합물 b5의 제조

[0805] DIPEA (7.19 ml; 41.21 mmol; 3.00 당량)를 디클로로메탄 (35 ml) 중 실시예 1E로부터의 카르복실산 c3 (3.42 g; 15.11 mmol; 1.10 당량) 및 PyBOP (7.86 g; 15.11 mmol; 1.10 당량)의 용액에 첨가하였으며, 이때 혼합물은 상당히 가운뎃고 황색빛에서 암황색으로 변화하였다. 혼합물을 실온에서 5분 동안 교반하여 산을 예비-활성화시켰다. 활성화된 산 용액에 디클로로메탄 (35 ml) 중 아미드 화합물 b4 (5.13 g; 13.74 mmol; 1.00 당량)의 새로 제조된 용액을 한 번에 첨가하였으며, 이때 혼합물은 담갈색으로 변화하였다. 커플링 용액을 실온에서 100분 동안 교반하였다. LCMS에 의한 IPC는 출발 물질의 거의 완전한 전환을 나타냈다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 500 ml로 희석하고, 0.2 N HCl (4x 300 ml), 염수 (1x 100 ml), 포화 NaHCO₃ (50, 25, 160 ml), 5% 시트르산 (1x 100 ml) 및 염수 (1x 100 ml)로 세척하였다. 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 잔류물을 고진공 하에 주말 동안 건조시켰다 (13.59 g 조 물질). 잔류물을 에틸 아세테이트 중에 용해시켜 최종 부피 약 22 ml에 이르게 하였다. 조 물질을 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물 (TLC: 에틸 아세테이트, KMnO₄ 염색, R_f(Pdt) = 0.54)을 풀링하고, 용매를 증발시켜 점착성의 갈색 검-유사 잔류물을 수득하였다. 최종 물질을 고진공 하에 밤새 건조시켜 링커 화합물 b5를 발포체로서 수

특하였다. 수율: 6.61 g (11.36 mmol, 83% 수율, 96% 순도).

[0806] 실시예 1C 링커 (S)-4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부탄산 b7의 합성



[0807]

[0808] 반응식 1C

[0809] (S)-4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부탄산 b7의 합성은 반응식 1C에 예시된다.

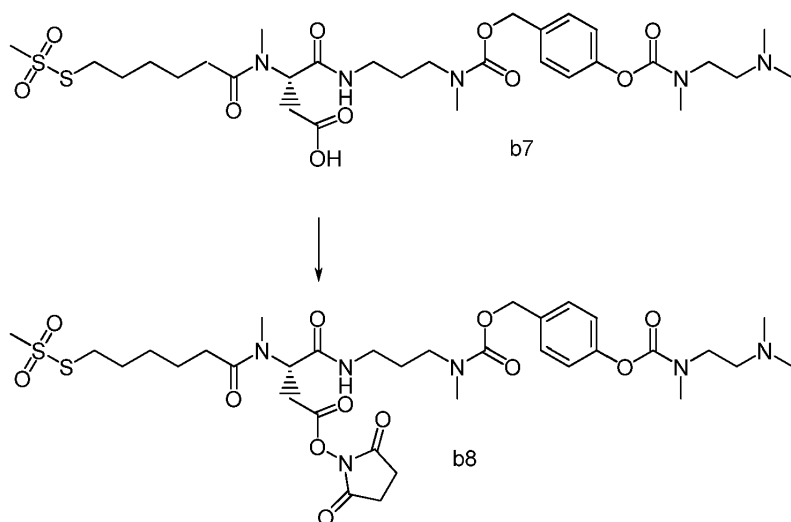
[0810] 단계 1 (S)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-(3-(메틸아미노)프로필아미노)-4-옥소부탄산 b6의 제조

[0811] 아미드 화합물 b5 (3.40 g; 5.84 mmol; 1.00 당량)를 디클로로메탄 (19 ml) 중에 용해시키고, TFA (19 ml)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 개방 플라스크 내에서 실온에서 75분 동안 교반하였다. LCMS에 의한 IPC는 생성물로의 우수한 전환을 나타냈다. 휘발물의 제거를 제어된 방식으로 수행하였다 (25℃ 및 12 mbar에서의 회전 증발기, 이어서 60분 동안 실온에서 고진공). 생성된 조 (S)-4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부탄산 b6을 즉시 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0812] 단계 2 (S)-4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부탄산 b7의 제조

[0813] 아세트니트릴 (35.00 ml) 중 실시예 1로부터의 4-(((퍼플루오로페녹시)카르보닐옥시)메틸)페닐 2-(디메틸아미노)에틸(메틸)카르바메이트 a3 (4.38 g; 7.60 mmol; 1.30 당량)의 용액을 빙중에서 0℃로 냉각시켰다. DIPEA (10.19 ml; 58.44 mmol; 10.00 당량)를 첨가하고, 혼합물을 이 온도에서 1분 동안 교반한 후, 아세트니트릴 중 조 화합물 b6의 용액 (35.00 ml)을 10분 이내에 적가하였다. 첨가를 완료한 후, 혼합물을 0℃에서 추가로 5분 동안 교반한 다음, 반응 혼합물을 분석하였다. 쯔비터이온 b6의 완전한 전환이 관찰되었다. 반응물을 0℃에서 TFA (4.00 ml; 51.92 mmol; 8.88 당량)의 첨가에 의해 켄칭하였다. 모든 휘발물을 제거하고, 잔류물을 회전 증발기 상에서 10분 동안 <10 mbar 및 40℃에서 건조시켰다. 조 잔류물을 6 ml H₂O/MeCN/TFA 1:1:0.002 및 12 ml 0.1% TFA의 혼합물 중에 용해시켰다. 담갈색 용액을 RP-플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 용액을 주입시까지 얼음 상에 보관하였다. 분획을 함유하는 생성물을 합하고, 동결시키고, 동결건조시켜 (S)-4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부탄산 b7을 수득하였다. 수율: TFA 염으로서 3.25 g (68% 수율).

[0814] 실시예 1D NHS-활성화된 링커 (S)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일 4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸)카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부타노에이트 b8의 합성



[0815]

[0816] 반응식 1D

[0817]

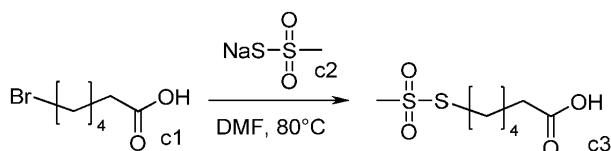
(S)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일 4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸) 카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부타노에이트 b8의 제조는 반응식 1D에 제시된다.

[0818]

실시에 1C로부터의 링커 b7 (2.02 g; 2.47 mmol; 1.00 당량)을 디클로로메탄 (20 ml) 중에 용해시켰다. HOSu (852.72 mg; 7.41 mmol; 3.00 당량) 및 EDC (1.42 g; 7.41 mmol; 3.00 당량)를 첨가하고, 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 교반하였다. 첨가된 시약의 용해시에, 혼합물은 미황색으로 변하였다. 1시간 후, LCMS에 의한 IPC는 생성물로의 우수한 전환을 나타냈다. 75분 후, 반응 혼합물을 DCM (75 ml)으로 희석하고, 산성 염수 75 ml (250 ml 염수를 2.5 ml 1 M HCl과 혼합하고, 생성된 용액을 추가의 NaCl로 포화시켰음)로 1회 세척하였다. 수성 층 (pH 약 6.5)을 DCM 50 ml로 추출하였다. 합한 유기 상을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하였다. TFA (190 μ L; 2.47 mmol; 1.00 당량)를 첨가한 후, 휘발물을 증발시켰다. 유성 잔류물을 고진공 하에 30분 동안 건조시켜 조 (S)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일 4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸) 카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부타노에이트 b8 (약 2.4 g)을 백색 발포체로서 수득하였다. 조 생성물을 무수 아세트니트릴 5 ml 중에 용해시키고 (총 부피 ~ 6 ml), RP-LPLC에 의해 정제하였다. 크로마토그래피를 위한 용리액을 냉각시킨 다음, 동결시키고, 동결건조시켰다. 동결건조된 건조 물질을 무수 아세트니트릴과 합하였다 (총 약 20 ml). 용매를 제거하고 (회전 증발기, 40 $^{\circ}$ C), 고진공 하에 건조시켜 (S)-2,5-디옥소피롤리딘-1-일 4-(3-(((4-((2-(디메틸아미노)에틸)(메틸) 카르바모일옥시)벤질옥시)카르보닐)(메틸)아미노)프로필아미노)-3-(N-메틸-6-(메틸술폰닐티오)헥산아미도)-4-옥소부타노에이트 b8 2.05 g (91% 수율)을 무색 발포체로서 수득하였다. 물질을 무수 DMSO 22.37 ml 중에 용해시켰다. 투명한 무색 용액을 멸균 여과하여 (멸균 PTFE 시린지 필터, 밀리포어 밀렉스-LG, 25 mm, 0.2 μ m) 약 23.5 ml의 투명한 무색 용액을 수득하였다. 물질을 분취물로 아르곤 하에 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. LCMS 분석에 의해 79%의 NHS 활성을 결정하였다.

[0819]

실시에 1E 6-(메틸술폰닐티오)헥산산 c3의 합성



[0820]

[0821] 반응식 1E

[0822]

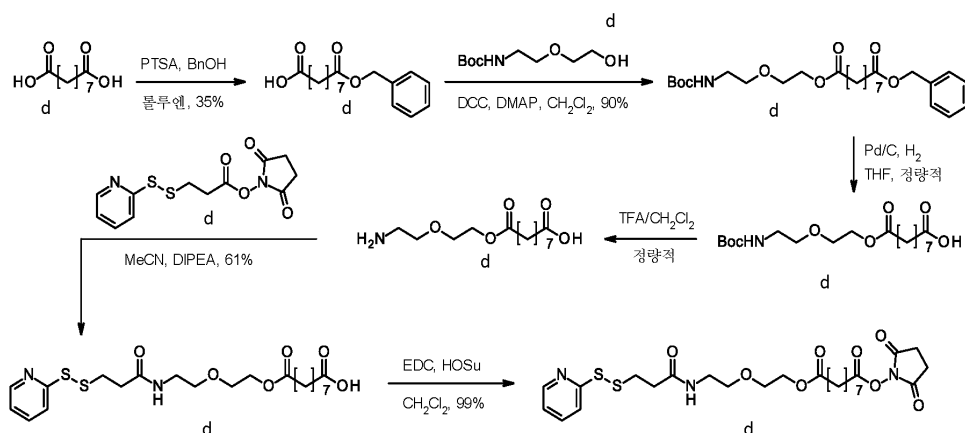
6-(메틸술폰닐티오)헥산산 c3의 제조는 반응식 1E에 제시된다.

[0823]

6-브로모헥산산 (5.89 g; 30.19 mmol; 1.00 당량) 및 소듐 메탄티오술포네이트 (4.05 g; 30.19 mmol; 1.00 당량)를 무수 N,N-디메틸포름아미드 (47.10 ml) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물을 80 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 교반한 다

음, 실온으로 냉각되도록 두었다. LCMS 분석으로 생성물 c3의 형성을 확인하였다. 반응 혼합물을 물 116 ml로 희석하고, 디에틸 에테르 233 ml로 3회 세척하였다. 유기 상을 염수 (350 ml)로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 40 ml의 부피로 농축시켰다. 생성된 용액을 밤새 -18℃에서 차가운 n-헥탄 2x 1000 ml 중에서 침전시켰다. 상청액을 가만히 따르고, 침전물을 디에틸에테르 80 ml (40℃) 중에 용해시켰다. 생성된 용액을 3시간 동안 -18℃에서 차가운 n-헥탄 2x 1000 ml 중에서 침전시켰다. 침전물을 여과하고, 백색 고체를 고진공 하에 밤새 건조시켜 6-(메틸술폰닐티오)헥산산 c3을 수득하였다. 수율: 5.72 g; 84%.

[0824] 실시예 1F 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 9-(2-(2-(3-(피리딘-2-일디술폰닐)프로판아미도)에톡시)에틸) 노난디오에이트 d9의 합성



[0825]

[0826] 반응식 1F

[0827] 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 9-(2-(2-(3-(피리딘-2-일디술폰닐)프로판아미도)에톡시)에틸) 노난디오에이트 d9의 제조는 반응식 1F에 제시된다.

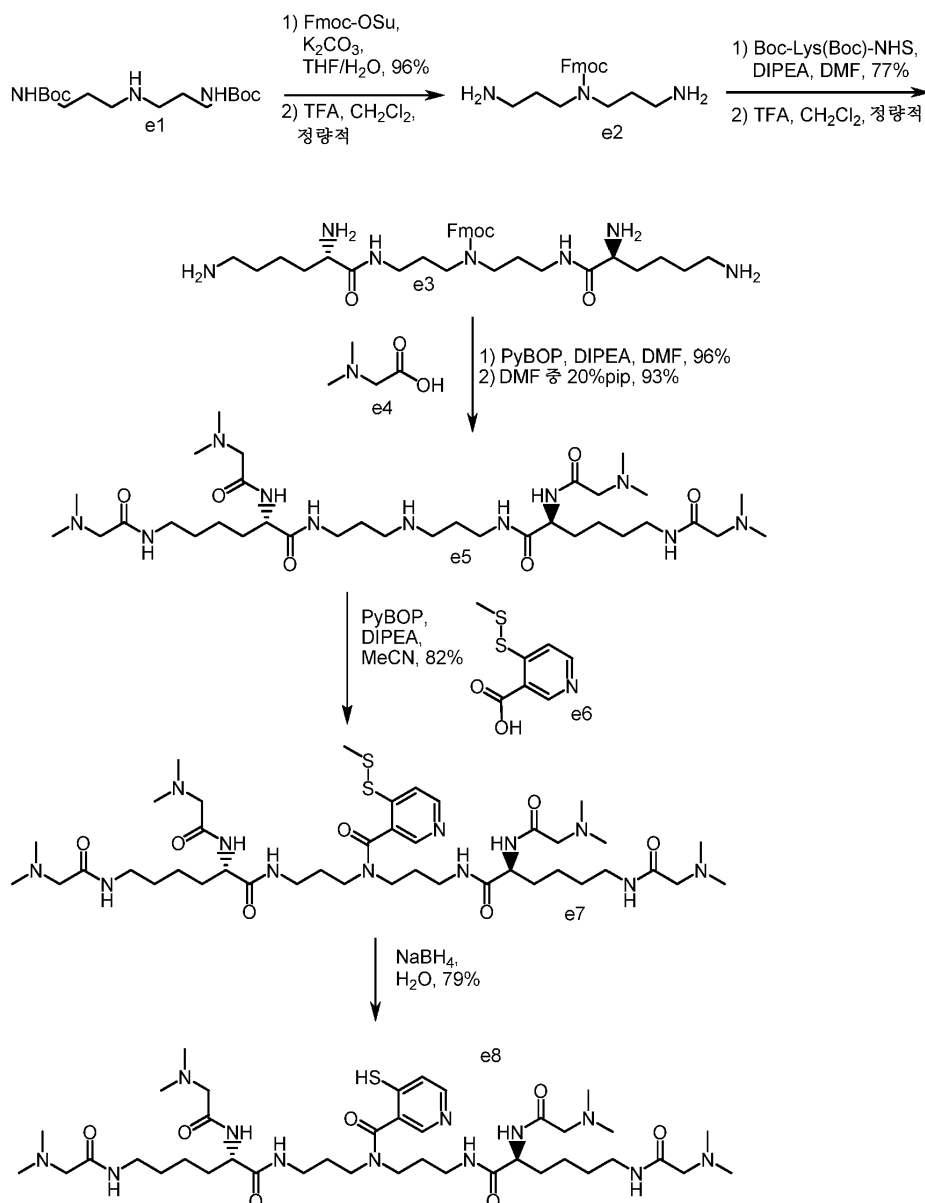
[0828] 단계 1 9-(벤질옥시)-9-옥소노난산 d2의 합성

[0829] 톨루엔 (561.82 ml) 중 아젤라산 d1 (103.00 g; 547.23 mmol; 1.10 당량), 벤질 알콜 (51.73 ml; 497.48 mmol; 1.00 당량) 및 p-톨루엔술포나 1수화물 (1.99 g; 10.45 mmol; 0.02 당량)의 혼합물을 딘-스타크 장치에서 5시간 동안 환류시켰다. 이어서 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 이 온도에서 1시간 동안 저장하였다. 이어서, 고체를 여과하고, 톨루엔 50 ml로 세척하였다. 잔류물을 0.4 M NaOH 용액 대략 800 ml로 처리하고, pH를 4 M NaOH 대략 30 ml를 사용하여 pH = 9로 조정하였다. 수성 상을 분리하고, 유기 상에 물 100 ml 및 0.4 M NaOH 80 ml를 첨가하여, pH를 9로 조정하였다. 합한 수성 상을 1 M 황산 50 ml를 사용하여 pH = 5로 산성화시키고, MTBE 200 ml로 2회 추출하였다. 합한 유기 상을 염수 200 ml로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 용매를 진공 하에 증발시켰다. 조 생성물 (62 g)을 헥탄 40 ml 및 THF 20 ml 중에 용해시키고 (총 부피 120 ml), 자동화 플래쉬 크로마토그래피에 의해 2회 실행으로 정제하였다. 용리액을 증발시키고, 잔류물을 오일 (55.00 g; 39.72%)로서 수득하였다. 잔류물을 MTBE 80 ml 중에 용해시키고, 30℃로 가열된 헥탄 2000 ml를 첨가하였다. 결정화를 위해, 용액을 -20℃에서 밤새 저장하였다. 생성물을 유리 필터 (Por. 3)를 통한 여과에 의해 수집하고, 헥탄 500 ml로 세척하였다. 백색 결정을 <1 mbar에서 4시간 동안 건조시켜 9-(벤질옥시)-9-옥소노난산 d2를 수득하였다. 수율: 48.02 g; 35%.

[0830] 단계 2 Boc-보호된 1-(2-(2-아미노에톡시)에틸) 9-벤질 노난디오에이트 d4의 합성

[0831] DCC (3.32 g; 16.08 mmol; 1.10 당량)를 DCM (50.00 ml) 중 Boc-2-(2-아미노에톡시)에탄올 d3 (3.00 g; 14.62 mmol; 1.00 당량), 화합물 d2 (4.07 g; 14.62 mmol; 1.00 당량) 및 DMAP (446.41 mg; 3.65 mmol; 0.25 당량)의 용액에 첨가하였다. 형성된 현탁액을 실온에서 밤새 교반하였다. 백색 현탁액을 20 ml-시린지 프릿을 통해 여과하고, 필터 케이크를 DCM 약 50 ml로 세척하였다. 생성물을 LCMS에 의해 검출하였다. 모든 휘발물을 제거하였다. 그리고 잔류물을 DCM 중에 용해시켰다 (총 부피 20 ml). 생성된 약간 혼탁한 현탁액을 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물을 합하고, 모든 휘발물을 증발시켜 Boc-보호된 1-(2-(2-아미노에톡시)에틸) 9-벤질 노난디오에이트 d4를 무색 오일로서 수득하였다. 수율: 6.11 g; 90%.

- [0832] 단계 3 Boc 보호된 9-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-9-옥소노난산 d5의 합성
- [0833] 10% Pd/C (348.58 mg; 0.33 mmol; 0.03 당량)를 THF (75.00 ml) 중 Boc-보호된 1-(2-(2-아미노에톡시)에틸) 9-벤질 노난디오에이트 d4 (6.10 g; 13.10 mmol; 1.00 당량)의 용액에 첨가하고, 플라스크 내의 공기 층을 질소로 교환하였다. 이어서, 플라스크를 50℃ 수조에 넣고, 수소의 스트림을 풍선 및 20G 캐놀라를 사용하여 흑색 현탁액에 통과시켰다. 5분 후, 수소 스트림을 멈추고, 혼합물을 탈보호 반응의 완료시까지 50℃에서 수소 분위기 하에 격렬히 교반하였다. 생성된 현탁액을 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 필터 케이크를 추가의 EtOAc (25 ml)로 세척하였다. 합한 여과물의 휘발물을 증발시키고, 조 물질을 EtOAc (30 ml) 중에 용해시켰다. 용액을 0.22 μ m-RC 시린지 필터를 통해 여과하고, 휘발물을 제거하여 Boc 보호된 9-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-9-옥소노난산 d5를 미황색 오일로서 수득하였다. 수율: 5.09 g, 정량적.
- [0834] 단계 4 9-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-9-옥소노난산 d6의 합성
- [0835] TFA (5.00 ml; 64.90 mmol; 4.79 당량)를 디클로로메탄 (10.00 ml) 중 Boc 보호된 9-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-9-옥소노난산 d5 (5.09 g; 13.55 mmol; 1.00 당량)의 용액에 첨가하였다. 40분 후, 추가 분취량의 TFA (5.00 ml; 64.90 mmol; 4.79 당량)를 혼합물에 첨가하고, 질소의 스트림을 반응 혼합물에 통과시켰다. 70분 후 LCMS는 출발 물질의 완전한 전환을 나타냈다. 휘발물을 제거하고, 갈색의 유성 잔류물을 디에틸에테르 (50 ml)로 희석하였으며, 이때 2-상 시스템이 형성되었다. 에멀전을 회전증발기 상에서 모든 휘발물로부터 다시 제거하고, 갈색의 유성 잔류물을 고진공 하에 밤새 건조시켰다. 톨루엔 (30 ml)을 잔류물에 첨가하고, 혼합물을 회전증발기 상에서 모든 휘발물로부터 다시 제거하였다 (60℃ 수조). 물질을 회전증발기 상에서 <9 mbar 및 60℃ 수조 온도에서 건조시켜 9-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-9-옥소노난산 d6을 갈색 오일로서 수득하였다. 수율: 6.04 g; 97%.
- [0836] 단계 5 9-옥소-9-(2-(2-(3-(피리딘-2-일디술팜닐)프로판아미도)에톡시)에톡시)노난산 d8의 합성
- [0837] DIPEA (951.90 μ L; 5.46 mmol; 5.00 당량)를 아세트니트릴 (5.00 ml) 중 9-(2-(2-아미노에톡시)에톡시)-9-옥소노난산 d6 (500.00 mg; 1.09 mmol; 1.00 당량) 및 숙신이미딜 3-[[2-(피리딘)티오]티오]프로피오네이트 d7 (375.05 mg; 1.20 mmol; 1.10 당량)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 반응물을 아세트산 (1.00 ml; 17.48 mmol; 16.02 당량)의 첨가에 의해 켄칭하였다. 혼합물을 아세트니트릴 6.5 ml 및 물 14.5 ml로 희석하고, 생성된 용액을 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물을 합하고, 액체 질소 중에서 동결시키고, 밤새 동결건조시켰다. 생성물 배치를 DCM과 합하였다. 휘발물을 제거하고, 유성 잔류물을 고진공 하에 건조시켜 9-옥소-9-(2-(2-(3-(피리딘-2-일디술팜닐)프로판아미도)에톡시)에톡시)노난산 d8을 미황색 오일; 392.00 mg; 61%로서 수득하였다.
- [0838] 단계 6 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 9-(2-(2-(3-(피리딘-2-일디술팜닐) 프로판아미도)에톡시)에틸) 노난디오에이트 d9의 합성
- [0839] 디클로로메탄 (5.00 ml) 중 9-옥소-9-(2-(2-(3-(피리딘-2-일디술팜닐)프로판아미도)에톡시)에톡시)노난산 d8 (392.00 mg; 0.67 mmol; 1.00 당량)의 용액에, HOSu (153.81 mg; 1.34 mmol; 2.00 당량) 및 EDC*HCl (256.19 mg; 1.34 mmol; 2.00 당량)을 연속적으로 첨가하였다. 현탁액을 실온에서 교반하였으며, 이때 고체 내용물은 시간 경과에 따라 천천히 용해되고, 담황색 투명한 용액이 형성되었다. 80분 후, 추가의 HOSu (50.00 mg; 0.43 mmol; 0.65 당량) 및 EDC*HCl (50.00 mg; 0.26 mmol; 0.39 당량)을 첨가하였다. 120분 후, LCMS에 의한 분석은 반응의 완료를 나타냈다. 휘발물을 제거하고, 잔류물을 아세트니트릴 (5 ml) 중에 용해시켰다. 물 (5 ml) 및 H₂O/MeCN/TFA 1:1:0.002 (4 ml)를 첨가하였다. 아세트니트릴을 혼합한 에멀전에 투명한 용액이 얻어질 때까지 첨가하였다. 생성된 용액을 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 모든 생성물을 합하고, 동결시키고, 동결건조시킬 때까지 얼음 상에서 보관하였다. 생성물 배치를 디클로로메탄과 합하고, 모든 휘발물을 제거하였다. 생성물을 고진공 하에 건조시켜 1-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)9-(2-(2-(3-(피리딘-2-일디술팜닐)프로판아미도)에톡시)에틸) 노난디오에이트 d9를 무색 오일로서 수득하였다; 455.00 mg; 정량적 수율.
- [0840] 실시예 1G 정제 태그 N,N'-((10S,22S)-10-(2-(디메틸아미노)아세트아미도)-16-(4-메르캅토니코티노일)-2-메틸-4,11,21-트리옥소-2,5,12,16,20-펜타아자헥사코산-22,26-디일)비스(2-(디메틸아미노)아세트아미드) e8의 합성



[0841]

[0842]

반응식 1G

[0843]

정제 태그 N,N'-((10S,22S)-10-(2-(디메틸아미노)아세트아미도)-16-(4-메르캅토니코티노일)-2-메틸-4,11,21-트리옥소-2,5,12,16,20-펜타아자헥사코산-22,26-디일)비스(2-(디메틸아미노)아세트아미드) e8의 제조는 반응식 1G에 제시된다.

[0844]

단계 1 (9H-플루오렌-9-일)메틸 비스(3-아미노프로필)카르바메이트 e2의 합성

[0845]

Fmoc-OSu (9.77 g; 28.96 mmol; 1.20 당량)를 THF (80.00 ml) 중 1,9-비스-Boc-1,5,9-트리아자노난 e1 (8.00 g; 24.14 mmol; 1.00 당량)의 용액에 첨가하였다. 이 혼합물에 물 (80.00 ml) 중 K₂CO₃ (5.00 g; 36.20 mmol; 1.50 당량)의 용액을 실온에서 10분에 걸쳐 적가하였다. 첨가 동안 백색 에멀전이 형성되었다. 실온에서 50분 교반한 후, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (600 ml)로 희석하였다. 유기 층을 염산 (0.1 M, 3 x 200 ml), 포화 NaHCO₃ 용액 (200 ml) 및 염수 (100 ml)로 세척하였다. MgSO₄ 상에서 건조시키고 여과한 후, 모든 휘발물을 제거하였다. 조 잔류물을 고진공 하에 20분 동안 건조시켜 백색 발포체를 수득하였다. 이 발포체를 디클로로메탄 중에 용해시키고, 플래쉬 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물을 합하고, 농축시켜 9H-플루오렌-9-일메틸 N,N-비스[3-(tert-부톡시카르보닐아미노)프로필]카르바메이트 중간체 (반응식 1G에 나타내지 않음)를 무색의 유리질 고체로서 수득하였다; 12.81 g; 96%.

[0846]

이 중간체 생성물 (12.78 g; 23.08 mmol; 1.00 당량)을 실온에서 TFA (30.00 ml; 389.39 mmol; 16.87 당량) 중

에 용해시켰다. 완전한 용해 후, 황색 용액을 실온에서 35분 동안 교반하였다. 생성물을 50 ml 팔콘 튜브에서 디에틸 에테르 내로의 반응 혼합물의 적가 (40 ml 디에틸에테르 중 2 ml 반응 용액)에 의해 침전시켰다. 팔콘 튜브를 7000xG 및 0°C에서 3분 동안 원심분리하였다. 에테르 상청액을 버리고, 잔류물을 메탄올 (1 ml 각각의 튜브) 중에 용해시켰다. 합한 메탄올성 용액을 500 ml 둥근-바닥 플라스크 내의 디에틸 에테르 (200 ml)에 적가하였다. 모든 튜브를 메탄올 (총 ~150 ml)로 세척하고, 세척 용액을 에테르/침전물 혼합물에 첨가하였으며, 이때 무색의 투명한 용액이 형성되었다. 이 용액을 농축시키고, 유성 잔류물을 고진공 하에 밤새 건조시켜 (9H-플루오렌-9-일)메틸 비스(3-((S)-2,6-디아미노헥산아미도)프로필)카르바메이트 e2를 백색 발포체로서 수득하였다: 13.68 g; 정량적 수율.

[0847] 단계 2 (9H-플루오렌-9-일)메틸 비스(3-((S)-2,6-디아미노헥산아미도)프로필)카르바메이트 e3의 합성.

[0848] DIPEA (20.44 ml; 117.20 mmol; 5.00 당량)를 DMF (250.00 ml) 중 화합물 e2 (13.63 g; 23.44 mmol; 1.00 당량) 및 Boc-Lys(Boc)-OSu (24.95 g; 56.25 mmol; 2.40 당량)의 용액에 첨가하고, 담황색 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (1200 ml)로 희석하고, 유기 층을 염산 (0.1 M, 4 x 500 ml), 포화 NaHCO₃ 용액 (3 x 250 ml) 및 염수 (200 ml)로 세척하였다. MgSO₄ 상에서 건조시키고 여과한 후, 모든 휘발물을 제거하여 Boc-보호된 중간체 (반응식 1G에 나타내지 않음)를 백색 발포체로서 수득하였다. 조 잔류물을 디클로로메탄 (30 ml) 중에 용해시키고, 플래쉬 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물을 합하고, 모든 휘발물을 진공 하에 제거하였다. 순수한 생성물이 차가운 에틸 아세테이트 용액으로부터 침전되었다. 메탄올을 첨가하여 생성물을 완전히 용해시켰다. 합한 분획의 증발로 무색 오일을 수득하였으며, 이를 고진공 하에 밤새 건조시켜 Boc 보호된 중간체를 수득하였다: 18.27 g; 77%.

[0849] 이 중간체 (18.12 g; 17.94 mmol; 1.00 당량)를 TFA (40.00 ml; 519.19 mmol; 28.95 당량) 중에 용해시켰다. 용해 동안 많은 기체가 증발하고, 혼합물은 약 45°C로 가온되고 황색으로 변하였다. 무색의 점성 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디에틸 에테르에 첨가하였다 (50 ml 팔콘 튜브 내의 40 ml 에테르 중 2 ml 반응 용액). 격렬한 진탕 후, 2상 시스템은 산성 디에틸 에테르 중 백색의 분말성 침전물의 현탁액으로 전환되었다. 혼합물을 팔콘 튜브로 옮기고, 모든 팔콘을 0°C 및 7000xG에서 3분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 모든 침전물을 각각 40 ml 디에틸 에테르로 세척하고, 원심분리를 반복하였다. 상청액을 다시 버린 후, 모든 침전물을 회전증발기 상에서 예비-건조시켜 건조 분말을 형성하였다. 모든 분취물을 합하고, 고진공 하에 밤새 건조시켜 (9H-플루오렌-9-일)메틸 비스(3-((S)-2,6-디아미노헥산아미도)프로필)카르바메이트 e3을 수득하였다: 19.52 g; 정량적 수율.

[0850] 단계 3 화합물 e5의 합성

[0851] DIPEA (18.02 ml; 103.29 mmol; 6.00 당량)를 DMF (180.00 ml) 중 N,N-디메틸글리신 e4 (8.88 g; 86.08 mmol; 5.00 당량) 및 PyBOP (44.79 g; 86.08 mmol; 5.00 당량)의 현탁액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반하였으며, 이때 투명한 용액이 형성되었다. 이 용액을 DMF (180.00 ml) 중 (9H-플루오렌-9-일)메틸 비스(3-((S)-2,6-디아미노헥산아미도)프로필)카르바메이트 e3 (18.35 g; 17.22 mmol; 1.00 당량) 및 DIPEA (15.01 ml; 86.08 mmol; 5.00 당량)의 용액에 한 번에 첨가하였다. 황색 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 35분 후, 반응 혼합물을 TFA (22.02 ml; 285.82 mmol; 16.60 당량)의 첨가에 의해 켄칭하였다. 용액을 농축시켜 황색 오일을 수득하였으며, 이를 후속적으로 메탄올 (450 ml) 중에 용해시켜 암황색 용액 600 ml를 수득하였다. 이 중간체 생성물 (반응식 1G에 나타내지 않음)을 디에틸 에테르로 2회 침전시켰다. 침전물을 디에틸 에테르로 세척한 후, 생성물 슬러리를 농축시키고, 생성물을 72시간 동안 진공 하에 건조시켰다: 23.17 g; 96%. 피페리딘 (17.50 ml; 0.18 mol; 10.83 당량)을 DMF (69.00 ml) 중 중간체 생성물 (23.00 g; 0.02 mol; 1.00 당량)의 용액에 한 번에 첨가하고, 오렌지색 용액을 실온에서 35분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, TFA (200 ml)를 잔류물에 첨가하였다. 슬러리를 PE 프릿을 통해 여과하였다. 생성물을 디에틸 에테르로부터 침전시키고, 생성물을 디에틸 에테르로 세척한 후, 이를 진공 하에 건조시켜 화합물 e5를 회백색 분말: 19.82 g; 93%로서 수득하였다.

[0852] 단계 4 N,N'-((10S,22S)-10-(2-(디메틸아미노)아세트아미도)-2-메틸-16-(4-(메틸디술팜닐)니코티노일)-4,11,21-트리옥소-2,5,12,16,20-펜타아자헥사코산-22,26-디일)비스(2-(디메틸아미노)아세트아미드) e7의 합성

[0853] PyBOP (528.17 mg; 1.01 mmol; 1.00 당량), 및 4-메르캅토니코틴산을 S-메틸 메탄티오술포네이트와 반응시킴으로써 제조된 4-(메틸디술팜닐)니코틴산 e6 (320.00 mg; 1.01 mmol; 1.00 당량)을 아세트니트릴 (10.00 ml) 중에 현탁시켰다. DIPEA (1.59 ml; 9.13 mmol; 9.00 당량)를 첨가하였으며, 이때 투명한 암황색 용액이 형성되었다. 실온에서 2분 후, 혼합물을 아세트니트릴 (10.00 ml) 중 화합물 e5 (1 317.49 mg; 1.01 mmol; 1.00 당

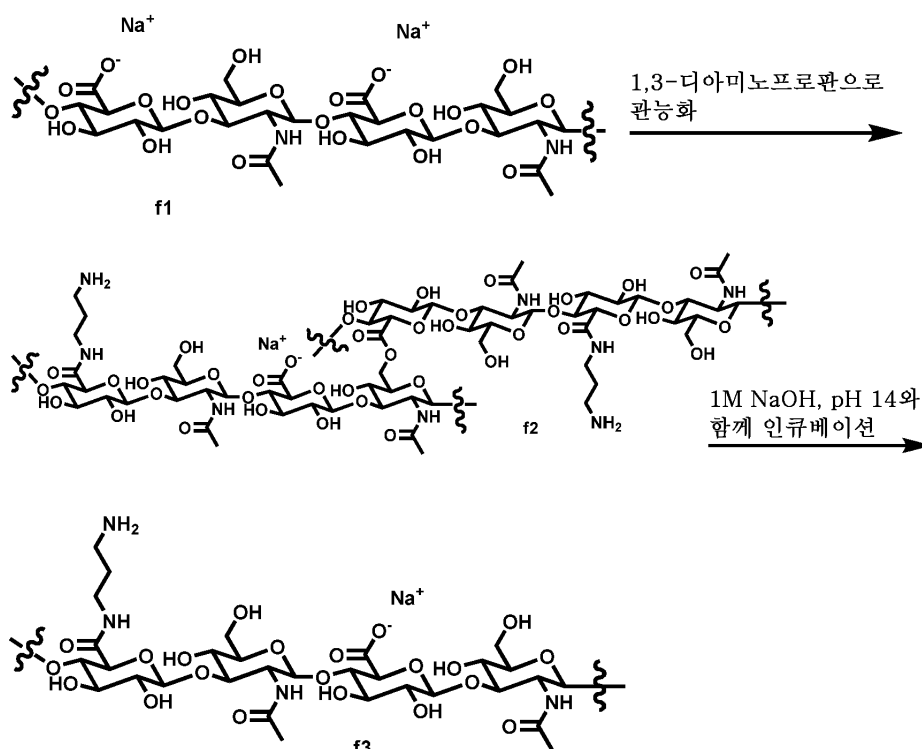
량)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. TFA (1.59 ml; 20.64 mmol; 20.33 당량)를 첨가하고, 생성물을 디에틸에테르 (140 ml)로부터 침전시켰다. 침전물을 디에틸에테르 (100 ml)로 세척하였다. 침전물을 메탄올 (8 ml) 중에 용해시키고, 디에틸 에테르 (140 ml)로부터 재차 침전시켰다. 생성물을 고진공 하에 밤새 건조시켜 N,N'-((10S,22S)-10-(2-(디메틸아미노)아세트아미도)-2-메틸-16-(4-(메틸디술피닐)니코티노일)-4,11,21-트리옥소-2,5,12,16,20-펜타아자헥사코산-22,26-디일)비스(2-(디메틸아미노)아세트아미드) e7을 분말로서 수득하였다: 1. 231 g; 82%.

[0854] 단계 5 N,N'-((10S,22S)-10-(2-(디메틸아미노)아세트아미도)-16-(4-메르캅토니코티노일)-2-메틸-4,11,21-트리옥소-2,5,12,16,20-펜타아자헥사코산-22,26-디일)비스(2-(디메틸아미노)아세트아미드) e8의 합성

[0855] NaBH₄ (220.07 mg; 5.82 mmol; 7.00 당량)를 4 부분으로 물 (15.00 ml) 중 N,N'-((10S,22S)-10-(2-(디메틸아미노)아세트아미도)-2-메틸-16-(4-(메틸디술피닐)니코티노일)-4,11,21-트리옥소-2,5,12,16,20-펜타아자헥사코산-22,26-디일)비스(2-(디메틸아미노)아세트아미드) e7 (1.231 g; 0.83 mmol; 1.00 당량)의 용액에 첨가하였다. 마지막 첨가 후 혼합물을 실온에서 60분 동안 교반하였다. TFA (1.00 ml; 12.98 mmol; 15.62 당량)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 물에 의해 최종 부피 25 ml로 희석하였다. 용액을 정제용 HPLC에 의해 정제하였다. 분획을 함유하는 생성물을 합하고, 동결시키고, 동결건조시켜 N,N'-((10S,22S)-10-(2-(디메틸아미노)아세트아미도)-16-(4-메르캅토니코티노일)-2-메틸-4,11,21-트리옥소-2,5,12,16,20-펜타아자헥사코산-22,26-디일)비스(2-(디메틸아미노)아세트아미드) e8의 TFA 염을 수득하였다; 942.00 mg; 79%.

[0856] 실시예 2A: 아민 관능화 히알루론산 (HA)의 제조

[0857] 아민 관능기를 HA 상에 도입하였다. 일부 측면에서, 후속 말레이미드 관능화된 HA 및 말레이미드에 대한 약물 부착을 위해 약 11% 이하의 관능화도를 도입하고, 후속 티올 관능화된 HA를 위해 약 5% 이하의 관능화도를 도입하였다.



[0858]

[0859] 반응식 2A

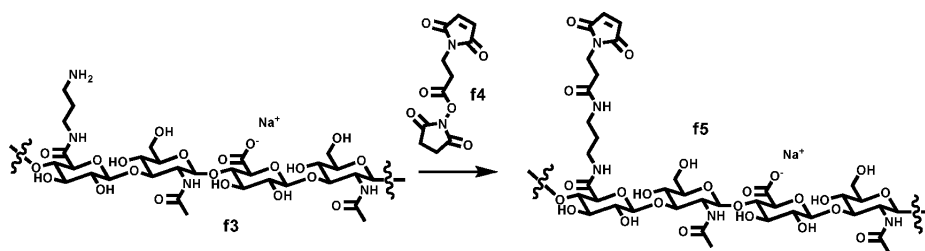
[0860] HA의 아민 관능화는 반응식 2A에 따라 진행된다:

[0861] 116 kDa 히알루론산 나트륨 염 f1 200 mg을 완충 용액 (100 mM MES, 0.4 M 1,3-디아미노프로판, pH 5.5) 25 mL 중에 격렬한 교반 하에 용해시켰다. HA에서의 카르복실산 관능기에 대해 3.00 당량 (229.14 mg; 1.50 mmol) HOBt를 첨가하였다. 0.93 당량 (88.92 mg; 0.46 mmol) EDC·HCl을 첨가하였으며, 이 후에 현탁액은 천천히 용

액으로 변화였다. 용액을 주위 온도에서 밤새 교반하고, 이후 현탁액이 형성되었다. 현탁액에, 50.00 당량 (3.39 g; 24.94 mmol) 아세트산나트륨을 첨가하여 용액을 형성하였다. 개질된 HA f2를 무수 에탄올의 첨가에 의해 침전시키고, 에탄올로 세척하고, 밤새 고진공 하에 건조시켰다. 펠릿을 16 mL 물 중에 용해시켜 투명한 용액을 형성하였다. 4 M NaOH 5.40 mL를 첨가하고, 용액을 주위 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 아세트산 1.24 mL를 첨가하였다. 아미노-관능화된 HA f3를 무수 에탄올의 첨가에 의해 침전시키고, 80 v/v% 에탄올 및 무수 에탄올로 세척하고, 고진공 하에 건조시켜 백색 펠릿을 수득하였다. 0.93 당량의 EDC는 HA 상의 대략 11%의 카르복실레이트 기의 아민 관능화를 생성하였다. 대략 5% 아민 관능화에 의한 아민 관능화된 HA의 제조를 위해, 0.40 당량 (38.63 mg; 0.20 mmol) EDC·HCl을 사용하였다.

[0862] 실시예 2B 말레이미드 관능화된 HA의 제조

[0863] 하기 반응식에 따라 아민 관능화된 HA f3를 말레이미도프로피온산 NHS 에스테르 f4와 반응시킴으로써 말레이미드 관능화된 HA를 수득하였다:



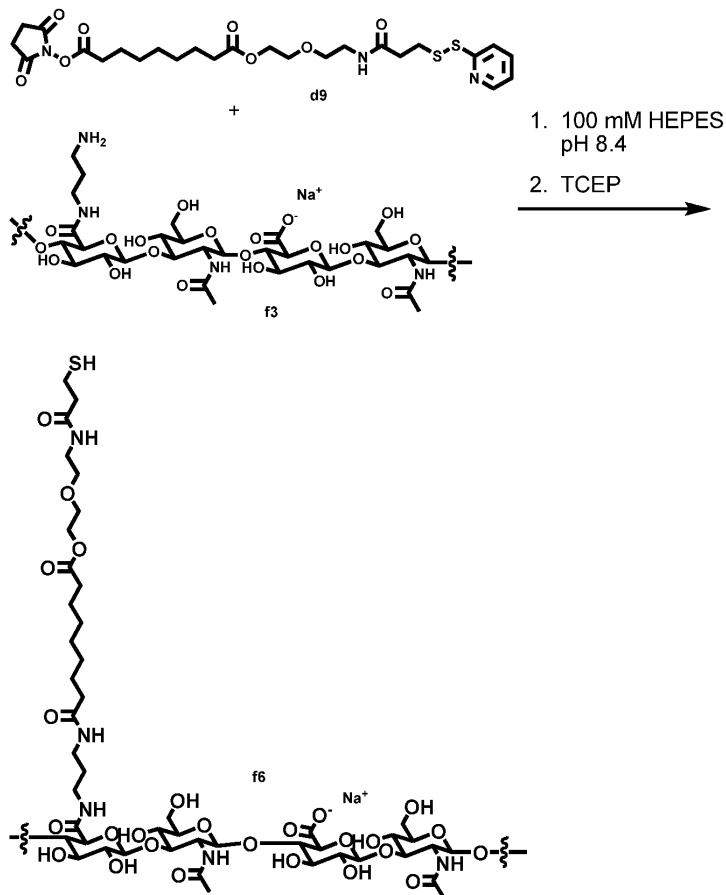
[0864]

[0865] 반응식 2B

[0866] 아민 관능화된 HA f3 176.1 mg (0.252 mmol/g 아민)을 100 mM HEPES 완충제 pH 7.4 17.6 mL 중에 용해시켰다. 9.50 mL 아세트니트릴 중 3-말레이미도프로피온산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 f4 150.48 mg (0.57 mmol; 10.00 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 정확히 60분 동안 교반하였다. 1 M 아세트산나트륨 용액 pH 5.5 27.1 mL를 용액에 교반 하에 첨가하였다. 무수 에탄올을 첨가하여 HA를 침전시켰다. 수득된 펠릿을 연속적으로 80 v/v% 에탄올 및 무수 에탄올로 세척하였다. 펠릿을 합하고, 물질을 고진공에서 3시간 동안 건조시키고, 후속적으로 -20℃에서 저장하였다. 수득된 펠릿을 1% 아세트산 17.6 mL 중에 용해시켰다. 1 M 아세트산나트륨 용액 pH 5.5 17.6 mL를 용액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 33 mm 직경 0.22 μm PES 시린지 필터를 통해 여과하고, 말레이미드 관능화된 HA f5를 무수 EtOH의 첨가에 의해 침전시켰다. 펠릿을 연속적으로 80% v/v 에탄올 및 무수 에탄올로 세척하였다. 펠릿을 합하고, 고진공 하에 3시간 동안 건조시켜 159.50 mg을 백색 펠릿으로서 수득하였다. 말레이미드 함량 결정을 2-메르캅토에탄올의 첨가 및 미반응 잔류 2-메르캅토에탄올의 검출에 의한 역 엘만 검정을 통해 수행하였다. 천연 HA에서 초기에 이용가능한 카르복실레이트 기에 대해 대략 10%의 말레이미드 관능화도가 검출되었다.

[0867] 실시예 2C: 티올 관능화된 HA의 제조

[0868] 티올 관능화된 HA를 생리학적 조건 하에 가교된 HA 겔의 인큐베이션 후 HA 겔의 분해가 가능하도록 설계하였다. 본 실시예에서, 아젤라산을 사용하여 에스테르 결합을 도입하였다.



[0869]

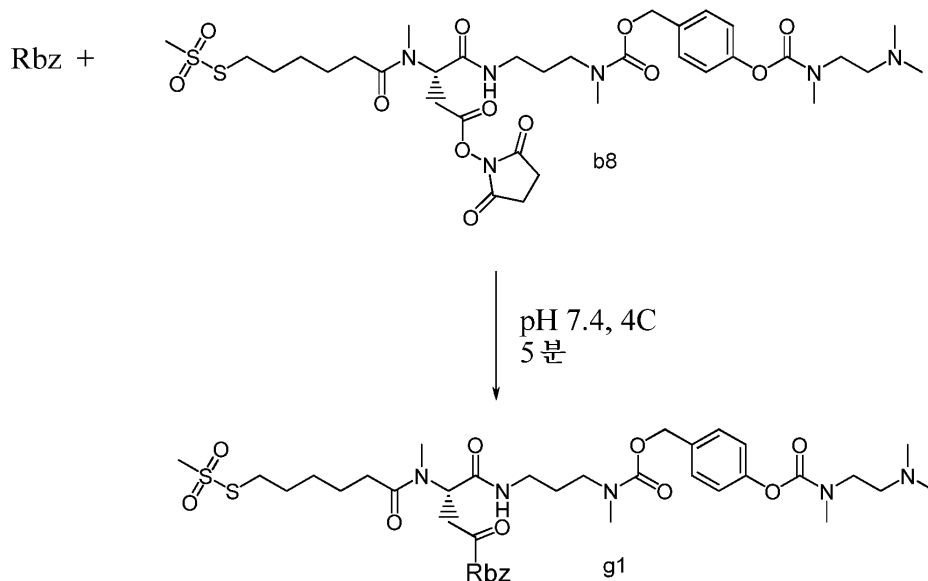
[0870]

[0871]

반응식 2C

아민 관능화된 HA f3 166.90 mg (0.104 mmol/g 아민 관능기)을 13.9 mL 100 mM HEPES 완충제 pH 8.40 중에 용해시켰다. 7.5 mL 아세토니트릴 중 NHS 에스테르 d9 (반응식 1F 참조) 75.3 mg (0.11 mmol; 5.00 당량)의 새로 제조된 용액을 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 주위 온도에서 120분 동안 교반하여 디설피드 관능화된 HA (나타내지 않음)를 제조하였다. 2.1 mL 물 중 63.2 mg 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 HCl-염 (TCEP) (0.22 mmol; 10.00 당량)의 새로 제조된 용액을 반응 혼합물에 첨가하였다. 용액을 주위 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 1 M 아세트산나트륨 용액 pH 5.5 22.9 mL를 반응 혼합물에 첨가하였다. 생성된 용액을 팔콘 튜브 사이에 분배하였다. HA 함량을 침전시키기 위해, 무수 에탄올을 첨가하였다. 튜브를 막고, 진탕시키고, 원심분리하였다. 수득된 펠릿을 80 v/v% 에탄올 및 무수 에탄올로 연속적으로 세척하였다. 펠릿을 합하고, 3시간 동안 고진공 하에 건조시키고, 후속적으로 추가 사용시까지 아르곤 분위기 하에 -20℃에서 저장하였다. 펠릿을 아르곤 분위기 하에 격렬히 교반하면서 1% 아세트산 16.7 mL 중에 용해시켰다. 1 M 아세트산나트륨 용액 pH 5.5 16.7 mL를 용액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 33 mm 직경 0.22 μm PES 시린지 필터를 통해 팔콘 튜브 내로 여과하고, 무수 에탄올의 첨가에 의해 침전시켰다. 튜브를 막고, 진탕시키고, 원심분리하였다. 펠릿을 80% v/v 에탄올 및 무수 에탄올로 연속적으로 세척하였다. 펠릿을 합하고, 고진공 하에 3시간 동안 건조시켜 티올-관능화된 HA f6 150.10 mg을 백색 펠릿으로서 수득하였다. 티올 함량 결정을 엘만 검정을 통해 수행하였다. 천연 HA에서 초기에 이용가능한 카르복실레이트 기에 대해 대략 4%의 티올 관능화도가 검출되었다.

[0872] 실시예 3A: 링커-라니비주맙 접합체의 제조



[0873]

[0874] 반응식 3A

[0875] 실시예 1D로부터의 링커 b8에 대한 Rbz의 접합을 반응식 3A에 따라 수행하였다.

[0876] 완충제 교환 및 농축은 하이프랩 칼럼에 이어서 원심분리 필터를 통한 농축 (소규모) 또는 접선 흐름 여과 (TFF) 시스템 (보다 큰 규모)을 사용하여 수행할 수 있다.

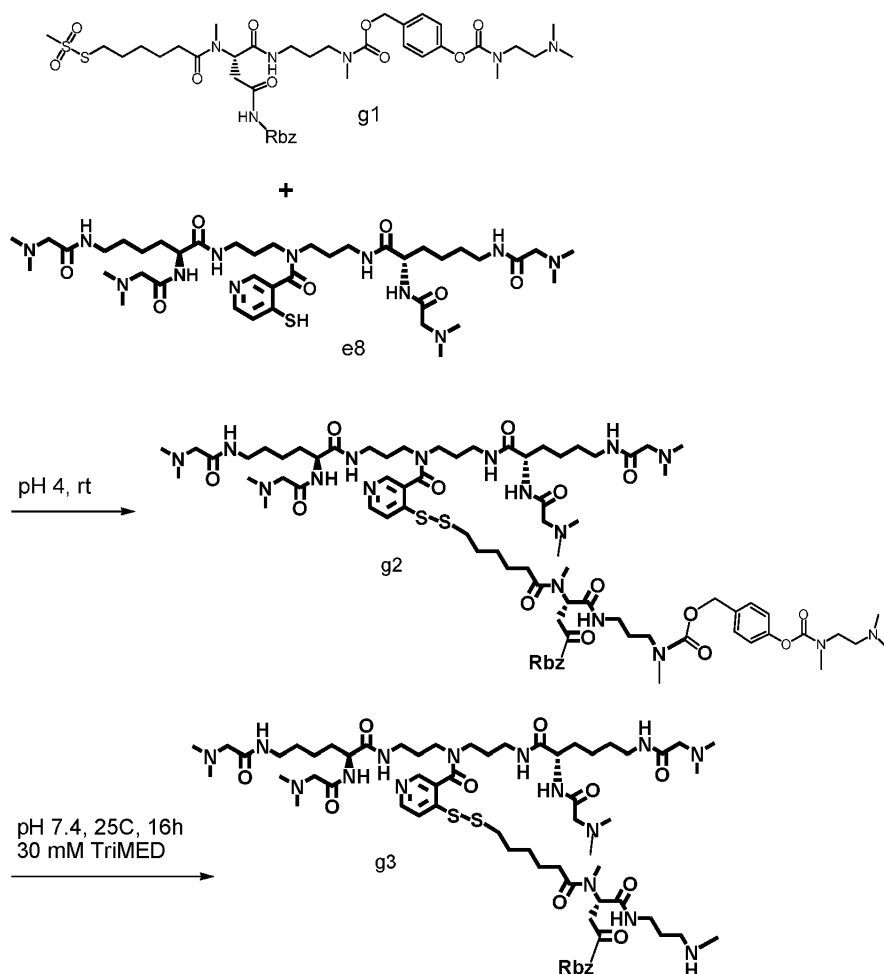
[0877] 10 mM 히스티딘, 10 wt% α, α -D-트레할로스, 0.01% 트윈 20, pH 5.5 중에 제제화된 40 mg/mL의 Rbz 62 mL를 본 실시예에서 사용하였다. 30 mM 포스페이트 pH 7.4로의 완충제 교환 및 농축 후, Rbz 용액을 0.22 μm 의 세공 크기를 갖는 밀렉스 GV 33 mm 필터를 사용하여 여과하였다. 단백질을 용액 약 50 g을 회수하였다. 농도 결정 후, 샘플을 포스페이트 완충제의 첨가에 의해 40 mg/mL로 희석하여 최종 부피 53.1493 g을 수득하였다. Rbz 2118.5 mg (85%)을 39.8 mg/mL의 농도 및 약 53 mL 부피의 총 부피로 회수하였다.

[0878] 30 mM 인산나트륨, pH 7.4 중 1990 mg Rbz (39.8 mg/mL의 50 mL)를 얼음 상에서 냉각시켰다. 15 당량 (8.0 mL)의 화합물 b8 (실시예 1D) (NHS 함량에 대해 보정됨, DMSO 중 100 mM 용액)을 첨가하고, 용액을 조심스럽게 진탕시켰다 (교반기는 사용하지 않음).

[0879] 용액을 얼음 상에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 즉시 pH 이동 및 완충제 교환을 수행하여 Rbz 링커 접합체 용액으로부터 과량의 링커 종을 제거하였다. 0.12 부피 당량 (6 mL)의 0.5 M 숙신산 pH 3.0을 첨가하여 완충제 이동을 수행하고, 용액을 조심스럽게 진탕시켰다. 용액의 pH를 약 pH 4.0으로 이동시켰다. 지이 하이프랩 칼럼이 구비된 아크타 P-900을 사용하여 완충제 교환을 수행하였다. 완충제는 8.0 mL/분의 유량으로 도입되고 실행당 5 mL 주입 부피로 13회 실행된 5 mM 숙신산 pH 4.0이었다. 14.5 mg/mL의 농도 (천연 약물의 흡광 계수를 기준으로 계산)를 갖는 134 mL 생성물 용액을 수집하였다.

[0880] 접합 전 및 후 샘플을 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 접합 전 디컨볼루션된 MS 스펙트럼은 48381에서의 Rbz 단일 피크를 나타냈다. 접합 후 스펙트럼은 48382에서의 Rbz 피크, 49066에서의 단일접합체 g1 피크, 497543에서의 이중접합체, 및 50437에서의 삼중접합체를 나타냈다. 단지 주요 생성물 단일접합체 g1만이 명료성을 위해 반응식 3A에 나타나 있으며, 단일접합체를 하기 기재된 바와 같이 더 다중의 접합체로부터 분리하였다.

[0881] 실시예 3B: Rbz 링커 접합체에 대한 정제 태그의 도입



[0883]

[0884] 반응식 3B

[0885] Rbz 링커 접합체 **g1**에 대한 정제 태그 **e8**의 도입을 반응식 3B에 따라 수행하였다.

[0886] 단일접합체 **g1** (및 더 다중의 접합체는 나타내지 않음)을 포함하는 125 mL 링커 접합체 혼합물의 용액 (14.53 mg/mL, 1824 mg 단백질, 37.7 μ mol)에, 단백질 함량에 대해 2.5 몰 당량의 정제-태그 **e8** (반응식 1G)을 주위 온도에서 첨가하고 (1886 μ L의 50 mM **e8**, 94.3 μ mol, 물 중), 용액을 조심스럽게 진탕시켜 태그화된 Rbz 링커 단일접합체 **g2** 및 더 다중의 접합체 (나타내지 않음)를 수득하였다. 35분 후에, pH 7.4로의 pH 이동 및 아민 탈보호를 0.170 부피 당량 (21.4 mL)의 0.5 M 포스페이트, 200 mM TriMED, pH 7.8의 첨가에 의해 수행하고 (태그화 용액의 부피는 고려하지 않음), 이 동안 보호기를 절단하여 태그화된 Rbz 링커 단일접합체 **g3** 및 더 다중의 접합체 (나타내지 않음)를 수득하였다. 용액을 인큐베이터에서 25°C의 제어된 온도에서 밤새 저장하였다.

[0887] 약 148 mL의 단백질 용액을 25°C 인큐베이터로부터 제거하고, 0.419 부피 당량 (초기 125 mL 단백질 부피를 기준으로 52.4 mL, 실제로는 52.7 mL 첨가됨)의 0.5 M 숙신산, pH 3.0을 **g3** 및 더 다중의 접합체의 용액에 첨가하여 pH를 대략 pH 4.0으로 수득하였다.

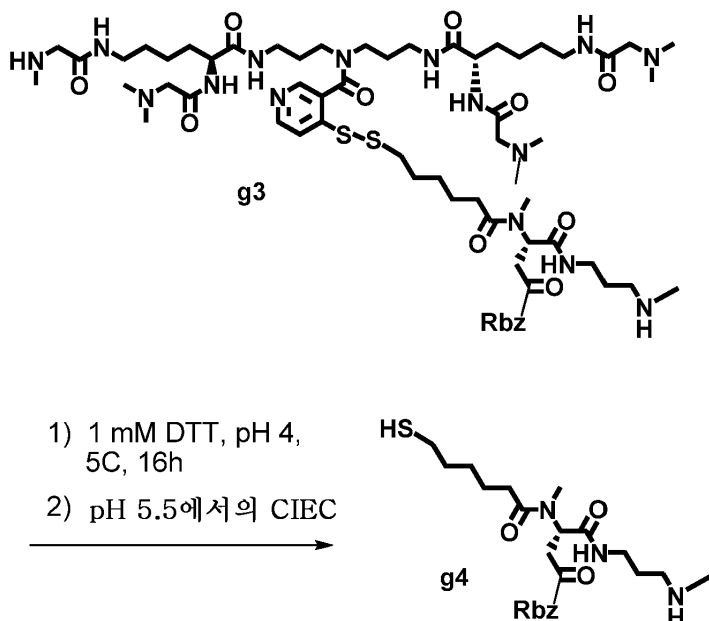
[0888] 실시예 3C: Rbz 링커 단일접합체의 분리

[0889] CIEC 정제를 위해, 비접합 Rbz의 혼합물 및 태그화된 Rbz-링커 단일접합체 **g3** 및 더 다중의 접합체의 혼합물을 함유하는 단백질 용액을 20 mM 숙신산, pH 4.0에 의해 최종 부피 약 660 mL로 3.3배 희석하였다. 지이 헬스케어 소스 칼럼 15S (칼럼 XK26, 5.2 cm 높이)를 하기 완충제와 함께 사용하였다: 20 mM 숙신산, pH 4.0 (완충제 A); 및 20 mM 숙신산, 1 M NaCl, pH 4.0 (완충제 B). 구배는 선형, 10%-50% B, 32 CV (20 mL/분 유량)였다. 로드는 대략 300 mg이었다. 접합체 혼합물을 CIEC 전 MS에 의해 분석하고, 디컨볼루션된 MS 스펙트럼에서 48380 m/z 피크 (천연 Rbz), 49573 피크 (단일접합체 **g3**), 50766 피크 (이중접합체), 및 51958 피크 (삼중접합체)가 나타났다. CIEC 분획 1은 천연 Rbz (48380의 m/z 피크)를 우세하게 함유하였고, CIEC 분획 2는 단일접합

체 g3 (49573의 m/z 피크)을 우세하게 함유하였고, CIEC 분획 3은 이중접합체 (50766의 m/z 피크)를 우세하게 함유하였다.

[0890] Rbz-링커 단일접합체 g3의 분리 후에, 단백질 용액을 접선 흐름 여과를 사용하여 약 5 mg/mL로 농축시켰다. 출발 물질은 숙시네이트 완충제 pH 4.0 중에 제제화된 약 0.85 mg/mL의 Rbz-링커 단일접합체 g3 약 450 mL를 함유하였다. 샘플을 0.22 μ m의 세공 크기를 갖는 1개의 밀렉스 GV 33 mm 필터를 사용하여 여과하였다. 4.82 mg/mL 농도의 Rbz-링커 단일접합체 용액 68 mL를 수득하였다.

[0891] 실시예 3D: 정제 태그 절단



[0892]

[0893] 반응식 3D

[0894] 정제 태그 e8을 반응식 3C에 제시된 절차에 의해 제거하였다.

[0895] Rbz-링커 단일접합체 g3 (68 mL, 4.82 mg/mL)을 2-8°C에서 밤새 DTT와 함께 1 mM의 DTT 농도로 인큐베이션하여 정제 태그 e8의 절단 (탈태그화)을 얻었다. DTT 0.0161 g을 숙시네이트 완충제 4.175 mL 중에 용해시켜 20 mM 숙신산, pH 4.0 중 25 mM DTT 원액을 제조하였다. 용액을 밀렉스-GV 13 mm 필터 (세공 크기 0.22 μ m)를 통해 여과하였다. Rbz-링커 단일접합체 용액 및 25 mM DTT 원액을 얼음 상에서 4°C로 냉각시켰다. 25 mM DTT 용액 2.838 mL를 단백질 용액에 첨가하여 최종 DTT 농도 1 mM을 얻었다. 인큐베이션을 2-8°C에서 밤새 수행하였다. 정제 태그 제거를 MS에 의해 모니터링하였다. 절단 전 Rbz-스페이스-링커-정제 태그는 49573에서의 피크를 가졌으며, 이는 정제 태그 단일접합체 g3을 나타낸다. 절단 후 Rbz-링커 접합체 g4는 48709에서의 피크를 가졌으며, 이는 정제 태그의 절단 후 Rbz-링커 단일접합체를 나타낸다.

[0896] Rbz-링커 접합체 g4를 CIEC에 의해 정제하였다. DTT 매개된 탈보호 후 Rbz-링커 단일접합체 70.9 mL를 10 mM 히스티딘 pH 5.5에 의해 최종 부피 약 850 mL로 12배 희석하였다. 칼럼은 지이 헬스케어 소스 15S XK26 칼럼 (5.2 cm 높이)이었다. 완충제 시스템은 다음과 같았다: 10 mM 히스티딘, pH 5.5 (완충제 A); 및 10 mM 히스티딘, 500 mM NaCl, pH 5.5 (완충제 B). 구배는 다음과 같았다: 선형, 0%-50% B, 25 CV (17.5 mL/분 유량). 로드는 약 300 mg이었다.

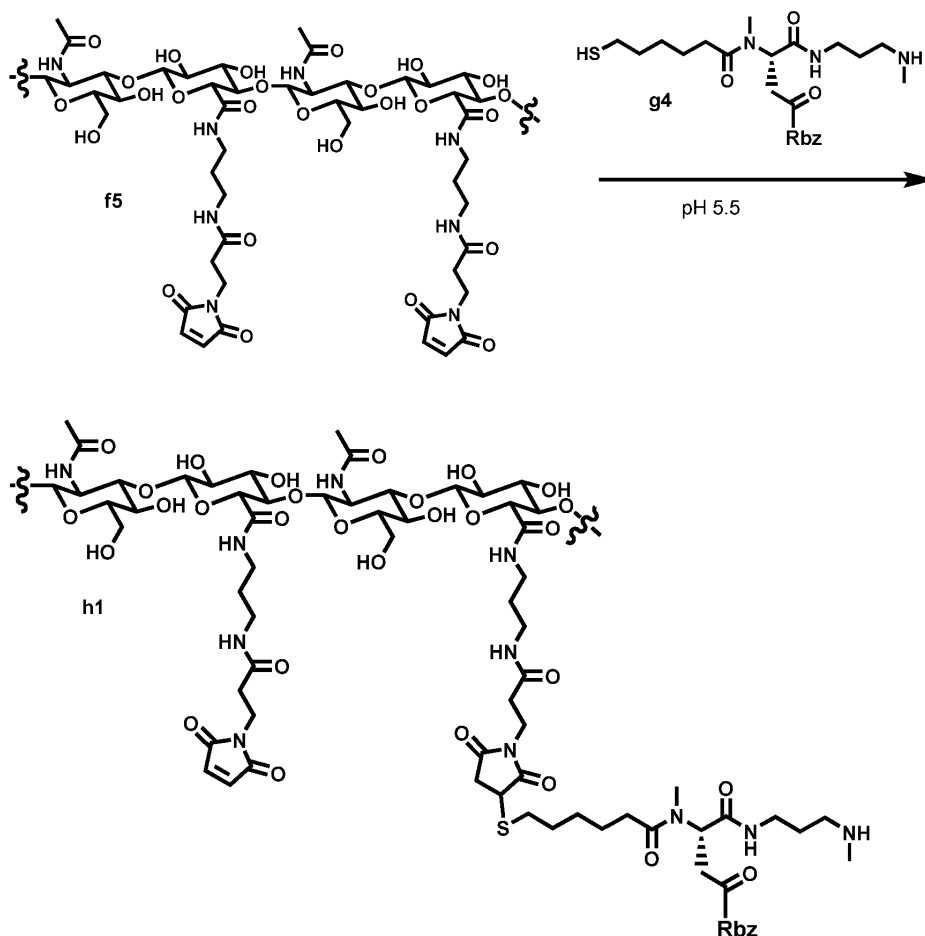
[0897] CIEC 단계 후, 단백질 용액의 오스몰랄농도를 완충제 B (10 mM 히스티딘, 500 mM NaCl, pH 5.5)를 사용하는 추가의 희석에 의해 조정하여 약 150 mM의 NaCl 농도를 얻었다. Rbz-링커 단일접합체 63 mL를 CIEC 실행 동안 수집하였다. 15.6 mL의 10 mM 히스티딘, 500 mM NaCl, pH 5.5를 샘플에 첨가하여 전체 부피 78.6 mL의 Rbz-스페이스-링커 단일접합체 g4를 수득하였다.

[0898] 실시예 3E: Rbz-링커 농도

[0899] 40 mg/mL의 단백질 로드를 갖는 HA-링커-Rbz h1의 제조를 위해, Rbz-링커 단일접합체 g4를 60 mg/mL 초과로 농축시켰다. 2개의 아미콘 울트라 15 PLCG 울트라셀 멤브레인 MWCO 10 kDa을 3000 g에서의 원심분리에 의한 단백

질 용액의 농축에 사용하였다. 64.6 mg/mL (293.8 mg)의 단백질 함량을 갖는 Rbz-링커 단일접합체 g4의 용액 약 4.5 g을 수득하였다. Rbz-링커 단일접합체 g4를 MS에 의해 분석하고, 48710에서의 피크를 발견하였으며, 이는 Rbz-링커 단일접합체를 나타낸다.

[0900] 실시예 4A: 말레이미드 관능화된 HA에 대한 링커-Rbz 접합체의 접합



[0901]

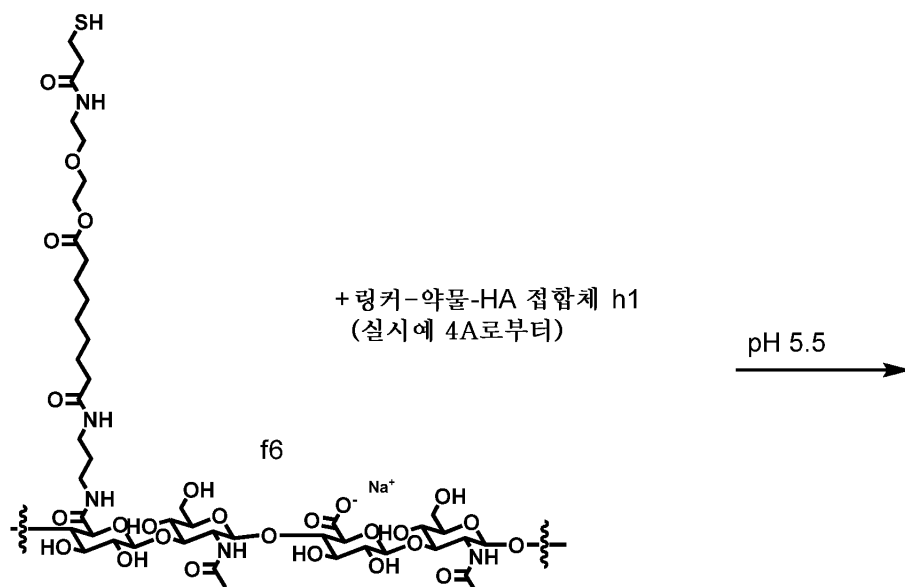
[0902] 반응식 4A

[0903] 말레이미드 관능화된 HA f5에 대한 Rbz 링커 단일접합체 g4의 접합을 반응식 4A에 제시된 바와 같이 수행하였다.

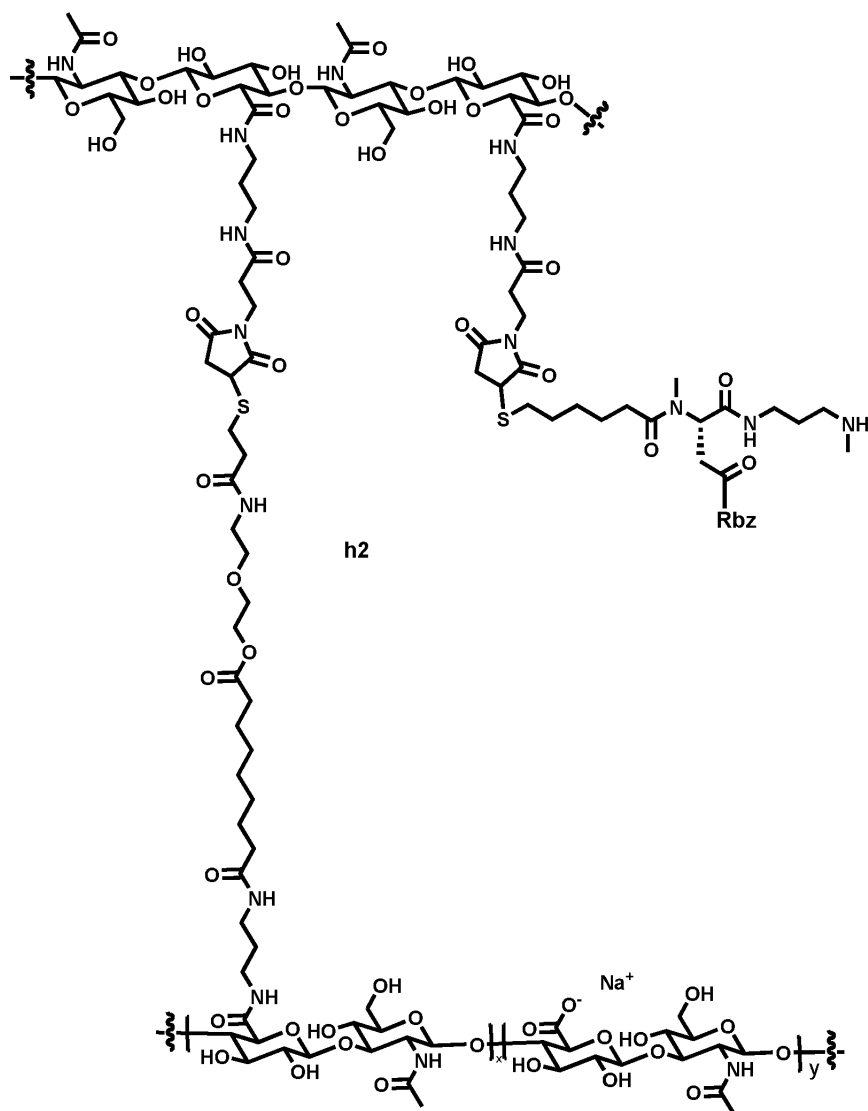
[0904] 말레이미드 관능화된 HA f5에 대한 Rbz-링커 단일접합체 g4의 접합을, 티올 함량에 대해 1.3 당량의 말레이미드 관능화된 HA f5에 Rbz 링커 단일접합체 g4의 농축된 용액을 첨가함으로써 수행하여, 44 mg/mL의 단백질 (Rbz) 농도 (티올 함량 기준) 및 약 0.49%의 HA 함량을 생성하였다. 실시예 3C에 따라 제조된 Rbz-링커 단일접합체 샘플 (10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, pH 5.5 중에 제제화된 64.6 mg/mL의 단백질 용액)을 주위 온도로 가온하였다. 0.22 μ m의 세공 크기를 갖는 GV 밀렉스 필터 33 mm를 통해 샘플을 여과하였다. Rbz 링커 단일접합체 g4 용액의 티올 함량은 69.0 mg/mL인 것으로 결정되었다. 1300 μ L의 Rbz 링커 단일접합체 g4 용액을 5 mL 에 펜도르프 튜브 내로 옮겼다. 336 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 5.5 완충제를 첨가하였다. 68 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% 트윈 20 pH 5.5를 첨가하였다. 335 μ L의 HA-말레이미드 f5 용액 (0.24 mmol/g의 말레이미드 함량을 갖는 30 mg/mL 함량의 116 kDa HA)을 첨가하였다. 생성된 용액을 잘 혼합하고, 주위 온도에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간의 반응 시간 후, 25 μ L의 샘플을 회수하고, SEC를 통해 분석하였다. 92%의 Rbz 링커 단일접합체는 이미 말레이미드 관능화된 HA에 결합하였다.

[0905] 실시예 4B: 링커-약물 가교된 HA 겔을 형성하기 위한 티올-말레이미드 가교

[0906] 가교를 반응식 4B에 따라 수행하였다:



[0907]



[0908]

[0909] 반응식 4B

[0910] 2014 μL 의 링커-Rbz HA-접합체 h1을 4시간 동안 인큐베이션하였다. 201 μL 의 HA-티올 f6 용액 (0.098 mmol/g의 티올 함량을 갖는 27.8 mg/mL 함량의 116 kDa HA)을 첨가하여, 생성된 용액 중 최종 단백질 함량 40 mg/mL (티올 함량 기준) 및 최종 HA 함량 7.01 mg/mL를 생성하였다. 용액을 잘 혼합하고, 18 G 블런트 캐놀라가 구비된 2 mL 시린지 내에 채웠다. 충전을 위해 시린지 팁을 사용하여 8개의 1 mL 루어 락 시린지 내에 용액을 신속하게 충전하였다. 스크류 캡을 시린지 상에 탑재하고, 이들을 주위 온도에서 입위로 약 24시간 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 시린지를 5°C에서 3주 동안 인큐베이션하였다. 시린지에서 가교 반응을 완료하여 가교된 HA 겔 Rbz 접합체 h2를 수득하였다.

[0911] 실시예 4C 가교된 HA Rbz 겔로부터의 Rbz의 방출

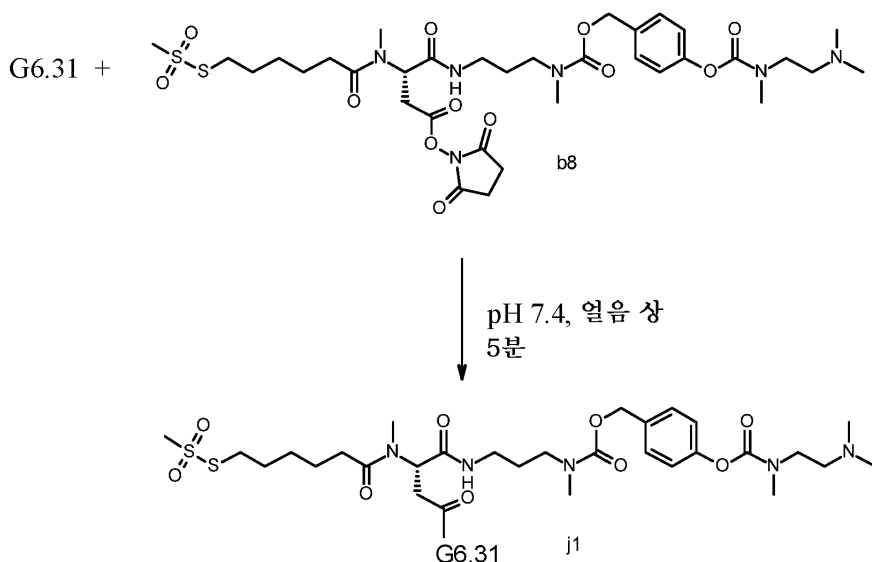
[0912] 실시예 4B를 약간 조정하면서 그에 따라 제조된 물질을 사용하여 시험관내에서 가교된 HA Rbz 겔로부터의 Rbz의 방출을 분석하였다. 13-17 mg의 Rbz HA 겔 h2를 멸균 발열원 무함유 에펜도르프 튜브 내로 옮겼다. 방출 완충제 (60 mM 인산나트륨, 3 mM EDTA, 0.01% 트윈, pH 7.4)를 HA 25 mg에 대해 완충제 975 μL 의 비에 따라 첨가하였다. 튜브를 뒤집거나 진탕시키지 않았다. 모든 튜브를 인큐베이터에서 37°C의 제어된 온도에서 저장하였다. 상이한 시점에서, 튜브를 인큐베이터로부터 제거하고 원심분리하였다 (9300 rcf, 3분). 상청액을 새로운 에펜도르프 튜브 내로 옮기고, 1.9 mL/cm.mg의 Rbz의 흡광 계수를 사용하여 338 nm의 참조 파장으로 280 nm에서의 흡광도 측정에 의해 상청액의 단백질 농도를 측정하였다. 각각의 샘플에 대해, 옮겨진 질량 및 겔의 단백질 함량을 사용하여 % 단위의 방출을 계산하였다 (표 4c).

[0913] 표 4C 라니비주맙 방출

시간/일	방출 % (이중으로 수행)
7	27.0; 27.0
21	41.0; 42.5
41	54.3; 57.7
63	68.7; 70.9

[0914]

[0915] 실시예 5A: 링커-G6.31 AARR 접합체의 제조



[0916]

[0917] 반응식 5A

[0918] 실시예 1D로부터의 링커 b8에 대한 G6.31 AARR의 접합을 반응식: 5A에 따라 수행하였다.

[0919] 완충제 교환 및 농축은 하이프랩 칼럼에 이어서 원심분리 필터를 통한 농축 (소규모) 또는 접선 흐름 여과 (TFF) 시스템 (보다 큰 규모)을 사용하여 수행할 수 있다.

[0920] 20 mM 히스티딘, 240 mM 수크로스, 0.01% 트윈 20, pH 5.5 중에서 제제화된 40 mg/mL의 31 mL G6.31 AARR (반응식 5A 및 하기 반응식에서 "G6.31"으로 나타냄)을 본 실시예에서 사용하였다. 30 mM 포스페이트 pH 7.4로의

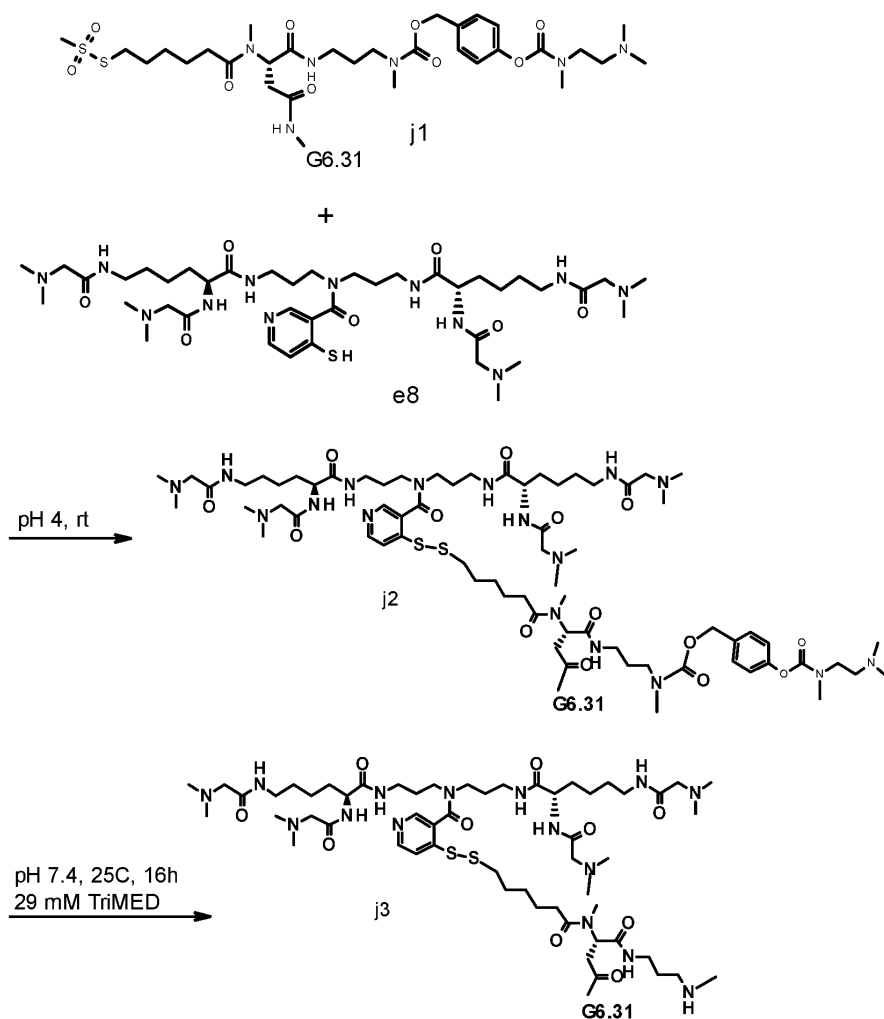
완충제 교환 및 농축 후, 약 23 g의 단백질 용액을 회수하고, 농도를 결정하였다. 샘플을 포스페이트 완충제의 첨가에 의해 40 mg/mL로 희석하였다. 39.9 mg/mL의 농도의 1277 mg G6.31을 함유하는 총 부피 32.0 g의 단백질 용액을 수득하였다.

[0921] 30 mM 인산나트륨, pH 7.4 중 1277 mg G6.31 AARR (39.9 mg/mL의 32.0 mL)을 얼음 상에서 냉각시켰다. 15 당량 (4.6 mL)의 화합물 b8 (실시예 1D) (NHS 함량에 대해 보정됨, DMSO 중 100 mM 용액)을 첨가하고, 용액을 수회 뒤집었다.

[0922] 용액을 즉시 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 5분 후, pH를 약 pH 4.0으로 이동시킴으로써 접합 반응을 중지시켰다. 따라서, 0.12 부피 당량 (3.8 mL)의 0.5 M 숙신산 pH 3.0을 첨가하고, 용액을 수회 뒤집었다. 5 mM 숙신산 pH 4.0으로의 완충제 교환을 지이 하이프랩 칼럼이 구비된 아크타 베이직 10을 사용하여 8 mL/분의 유량으로 10회 실행으로 수행하였다. 실행당 4 mL의 용액을 주입하였다. 총 12.9 mg/mL 농도의 생성물 용액 93.1 g을 수집하였다.

[0923] 접합 전 및 후 샘플을 질량 분광측정법에 의해 분석하였다. 접합 전 디컨볼루션된 MS 스펙트럼은 47390에서의 G6.31 단일 피크를 나타냈다. 접합 후 스펙트럼은 47392에서의 G6.31 AARR 피크, 48077에서의 단일접합체 j1 피크, 48766에서의 이중접합체, 49452에서의 삼중접합체 및 50147에서의 사중접합체를 나타냈다. 단지 주요 생성물 단일접합체 j1만이 명료성을 위해 반응식 3A에 나타나 있으며, 단일접합체를 하기 기재된 바와 같이 더 다중의 접합체로부터 분리하였다.

[0924] 실시예 5B: G6.31 AARR 링커 접합체에 대한 정제 태그의 도입



[0925]

[0926] 반응식 5B

[0927] G6.31 AARR 링커 접합체 j1에 대한 정제 태그 e8의 도입을 반응식 5B에 따라 수행하였다.

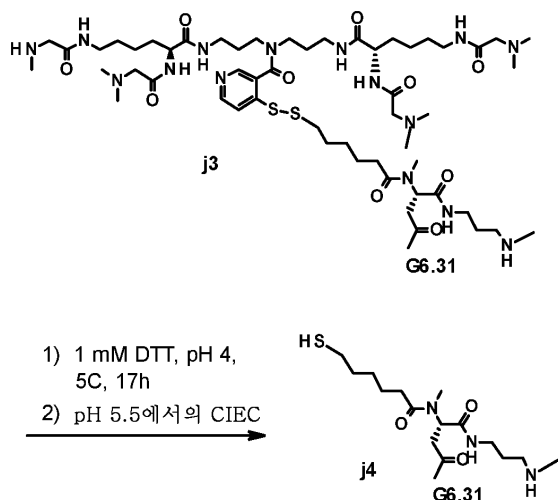
[0928] 단일접합체 j1을 포함하는 93.1 mL 링커 접합체 혼합물의 용액 (천연 G6.31 AARR 및 더 다중의 접합체는 나타내지 않음) (12.9 mg/mL, 1203 mg 단백질, 25.4 μ mol (G6.31 AARR의 흡광 계수 및 분자량을 단순화 목적으로 사용함))에, 단백질 함량에 대해 2.5 mol 당량의 정제-태그 e8 (반응식 1G)을 주위 온도에서 첨가하고 (20 mM 숙신산, pH 4.0 중 50 mM e8 1270 μ L, 63.5 μ mol), 용액을 조심스럽게 진탕시켜 태그화된 G6.31 링커 단일 접합체 j2 및 더 다중의 접합체 (나타내지 않음)를 수득하였다. 50분 후, pH 7.4로의 pH 이동 및 아민 탈보호를 0.170 부피 당량 (15.8 mL)의 0.5 M 포스페이트, 200 mM TriMED, pH 7.8의 첨가에 의해 수행하였다 (첨가된 정제-태그 용액의 부피는 고려하지 않음). 단일-태그화된 이중-접합체가 pH 이동 후에도 혼합물에서 여전히 검출되었기 때문에, 단백질 함량에 대한 추가의 0.2 당량의 정제-태그 e8 (반응식 1G) (20 mM 숙신산, pH 4.0 중 50 mM e8 100 μ L, 5 μ mol)을 혼합물에 첨가하였다. 용액을 인큐베이터에서 25°C의 제어된 온도에서 밤새 저장하고, 이 동안 태그화된 링커 단일접합체 j2 (및 더 다중의 접합체)의 링커의 보호기를 절단하여 j3을 생성하였다.

[0929] 약 110 mL의 단백질 용액을 25°C 인큐베이터로부터 제거하고, 0.419 부피 당량 (초기 93.1 mL 단백질 부피를 기준으로 39.0 mL)의 0.5 M 숙신산, pH 3.0을 j3 및 더 다중의 접합체의 용액에 첨가하여 pH를 대략 pH 4.0으로 수득하였다.

[0930] 실시예 5C: G6.31 AARR 링커 단일접합체의 단리

[0931] CIEC (양이온 교환 크로마토그래피) 정제를 위해, 비접합 G6.31의 혼합물 및 태그화된 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j3 및 더 다중의 접합체의 혼합물을 함유하는 단백질을 20 mM 숙신산, pH 4.0에 의해 최종 부피 약 500 mL로 3.3배 희석하였다. 지이 헬스케어 소스 15S 칼럼 (칼럼 하이스케일26, 9.8 cm 높이)을 하기 완충제와 함께 사용하였다: 20 mM 숙신산, pH 4.0 (완충제 A); 및 20 mM 숙신산, 1 M NaCl, pH 4.0 (완충제 B). 구배는 20 mL/분 유량으로 40 CV 중 0%-50% B 또는 32 CV 중 10%-50% B로 선형이었다. 로드는 실행당 대략 600 mg이었다. 접합체 혼합물을 CIEC 전 MS에 의해 분석하고, 디컨볼루션된 MS 스펙트럼에서 47395에서의 피크 (천연 G6.31 AARR), 48584에서의 피크 (단일접합체 j3), 49782에서의 피크 (이중접합체), 50986에서의 피크 (삼중접합체) 및 52174에서의 피크 (사중접합체)가 관찰되었다. CIEC의 모든 피크를 수집하였다. 단일접합체 j3을 우선하게 함유하는 분획을 풀링하고 (534.2 mL; 0.67 mg/mL), 다음 단계에 사용하였다.

[0932] 실시예 5D: 정제 태그 절단



[0933]

[0934] 반응식 5D

[0935] 정제 태그 e8을 반응식 5D에 제시된 절차에 의해 제거하였다.

[0936] DTT의 존재 하에 단리된 태그화된 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j3 (534.2 mL, 0.67 mg/mL)의 인큐베이션에 의해 정제 태그 e8의 절단 (탈태그화)을 얻었다. 20 mM 숙신산 pH 4.0 35.4 mL 중에 DTT 0.1364 g을 용해시킴으로써 25 mM DTT 원액을 제조하였다. G6.31-링커 단일접합체 용액 및 25 mM DTT 원액을 4°C로 냉각시켰다. 25 mM DTT 원액 22.3 mL를 단백질 용액에 첨가하여 최종 DTT 농도 1 mM을 얻었다. 생성된 용액을 인큐베이터에서 5°C의 제어된 온도에서 밤새 저장하였다. 정제 태그 제거를 MS에 의해 모니터링하였다. 절단 전, 48585에서의 피크가 검출되었으며, 이는 태그화된 단일접합체 j3을 나타낸다. 절단 후, 47720에서의 피크가 검출되었으며,

이는 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4의 탈태그화 및 생성을 확인시켜준다.

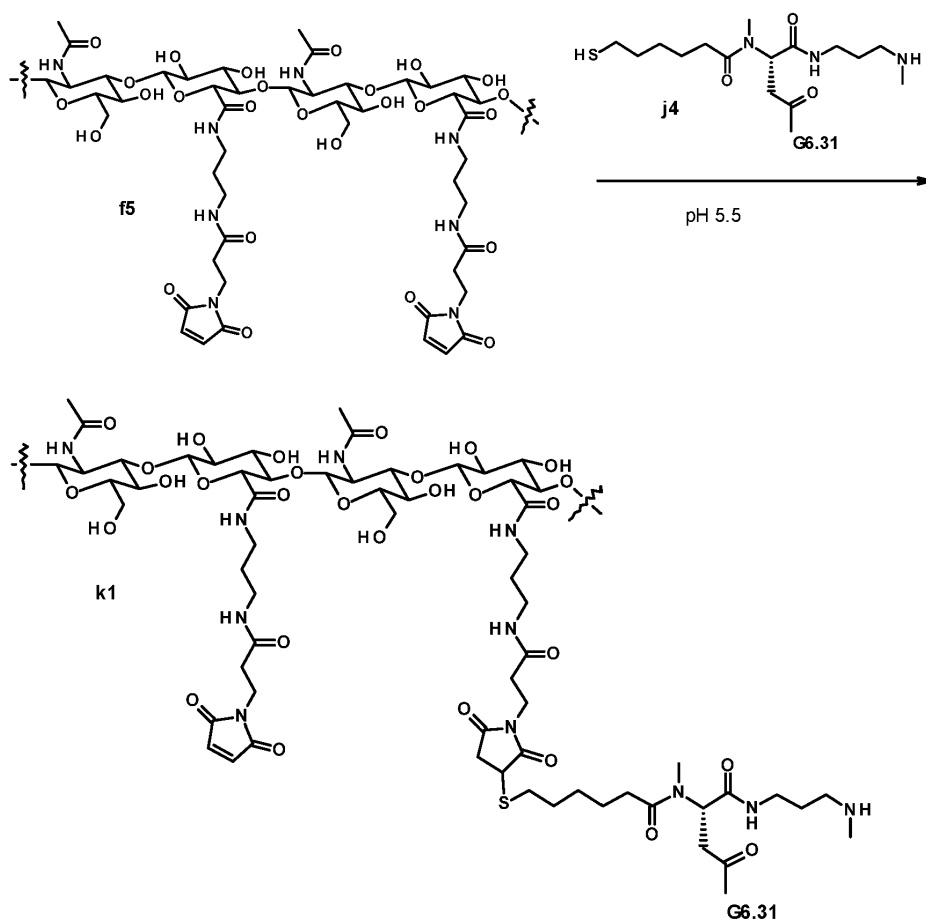
[0937] G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4를 CIEC에 의해 정제하였다. DTT 매개된 탈보호 후 G6.31-링커 단일접합체 556.5 mL를 20 mM 숙신산 pH 4.0에 의해 최종 부피 약 1660 mL로 3배 희석하였다. 지이 헬스케어 소스 15S 하이스케일26 칼럼 (9.8 cm 높이)을 사용하였다. 완충제 시스템은 다음과 같았다: 10 mM 히스티딘, pH 5.5 (완충제 A); 20 mM 숙신산, pH 4.0 (A2); 및 10 mM 히스티딘, 500 mM NaCl, pH 5.5 (완충제 B). 칼럼 로딩 후 칼럼을 2 CV의 완충제 A2로 세척한 후 2 CV A1로 칼럼 세척하였다. 후속적으로, 하기 선형 구배를 적용하였다: 0%-50% B, 25 CV (20 mL/분 유량). 로드는 약 300 mg이었다.

[0938] CIEC 단계 후, 단백질 용액의 오스몰랄농도를 완충제 B (10 mM 히스티딘, 500 mM NaCl, pH 5.5)를 사용하는 추가의 희석에 의해 조정하여 약 150 mM의 NaCl 농도를 얻었다. G6.31-링커 단일접합체 130 mL를 CIEC 실행 동안 수집하였다. 28 mL의 10 mM 히스티딘, 500 mM NaCl, pH 5.5를 샘플에 첨가하여 총 부피 158 mL의 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4를 수득하였다.

[0939] 실시예 5E: G6.31 AARR-링커 농도

[0940] 40 mg/mL의 단백질 로드를 갖는 HA-링커-G6.31 AARR k1 (하기 실시예 6A)의 제조를 위해, G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4를 60 mg/mL 초과로 농축시켰다. 4개의 아미콘 울트라 15 PLGC 울트라셀 멤브레인 MWCO 10 kDa를 3000 g에서의 원심분리에 의한 단백질 용액의 농축에 사용하였다. 76.5 mg/mL (298 mg)의 단백질 함량을 갖는 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4의 용액 약 3.9 g을 수득하였다. 농축된 용액을 MS에 의해 분석하고, G6.31-링커 단일접합체 j4에 상응하는 47723에서의 피크를 검출하였다. 689 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, pH 5.5를 첨가하여 샘플을 65 mg/mL로 희석하였다.

[0941] 실시예 6A: 말레이미드 관능화된 HA에 대한 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4의 접합.



[0942]

[0943] 반응식 6A

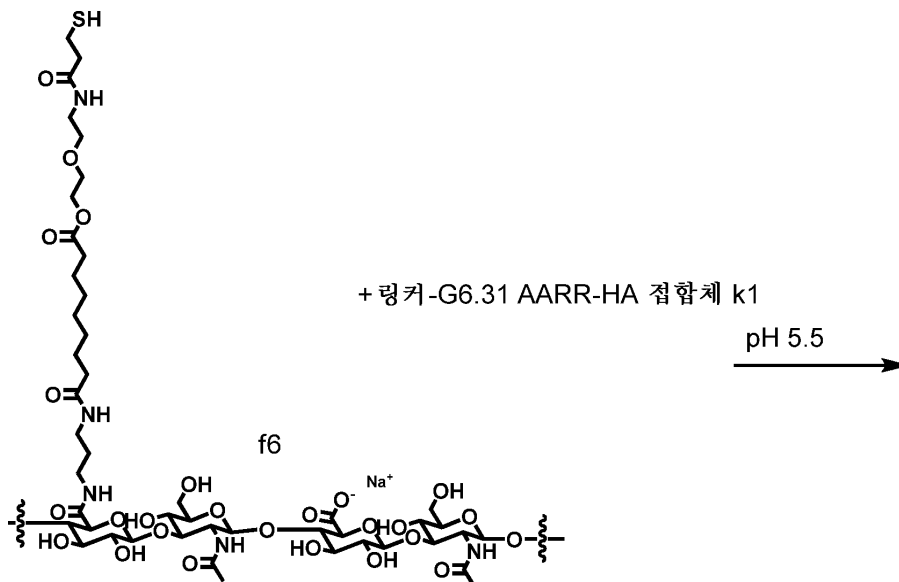
[0944] G6.31 링커 단일접합체 j4를 말레이미드 관능화된 HA f5에 접합시켜 링커-G6.31 AARR-HA 접합체 k1을 제조하는

것을 반응식 6A에 제시된 바와 같이 수행하였다.

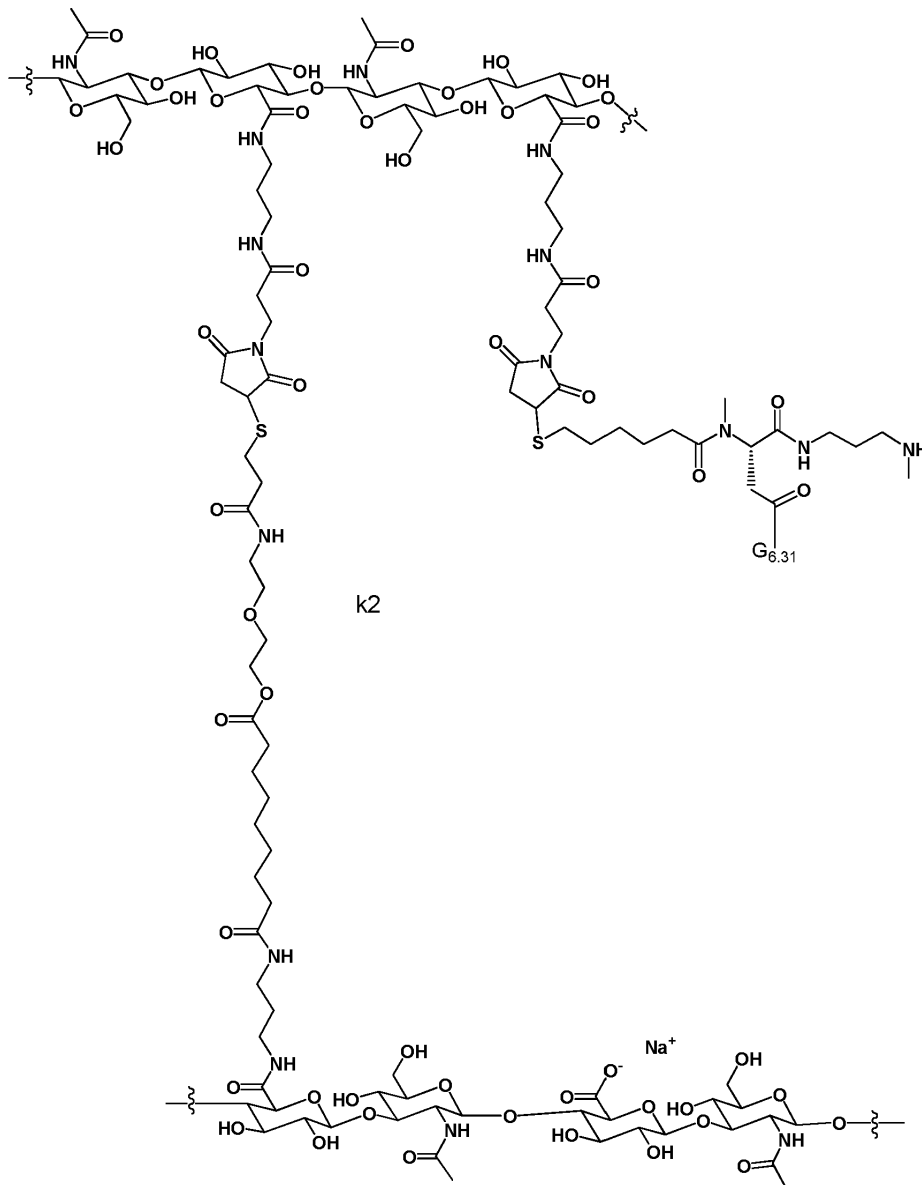
[0945] 말레이미드 관능화된 HA f5 (실시예 2B)에 대한 G6.31-링커 단일접합체 j4의 접합을, 티올 함량에 대해 1.3 당량의 말레이미드 관능화된 HA f5에 G6.31 링커 단일접합체 j4의 농축된 용액을 첨가함으로써 수행하여, 44 mg/mL의 단백질 (G6.31 AARR) 농도 (티올 함량 기준) 및 약 0.49%의 HA 함량을 생성하였다. 실시예 5D에 따라 제조된 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4 샘플 (10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, pH 5.5 중에 제제화된 64.7 mg/mL의 단백질 용액)을 주위 온도로 가온시켰다. 0.22 μ m의 세공 크기를 갖는 GV 밀렉스 필터 33 mm를 통해 샘플을 여과하였다. G6.31 링커 단일접합체 j4 용액의 티올 함량은 73.4 mg/mL인 것으로 결정되었다. 2190 μ L의 G6.31 링커 단일접합체 j4 용액을 50 mL 팔콘 튜브 내로 옮겼다. 735.5 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 5.5 완충제를 첨가하였다. 115.3 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% 트윈 20 pH 5.5를 첨가하였다. 612.5 μ L의 멸균 여과된 (밀렉스 GP, 25 mm 직경, 0.22 μ m) HA-말레이미드 f5 용액 (0.24 mmol/g의 말레이미드 함량을 갖는 30 mg/mL 함량의 116 kDa HA)을 첨가하였다. 생성된 용액을 잘 혼합하고, 주위 온도에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간의 반응 시간 후, 25 μ L의 샘플을 회수하고, SEC를 통해 분석하였다. 95%의 G6.31 AARR-링커 단일접합체 j4를 말레이미드 관능화된 HA f5에 접합시켜 링커-G6.31 AARR-HA 접합체 k1을 수득하였다.

[0946] 실시예 6B: 링커-G6.31 AARR 가교된 HA 겔을 형성하기 위한 티올-말레이미드 가교

[0947] 링커-G6.31 AARR 가교된 HA 히드로겔 k2를 수득하기 위한 티올 HA f6과 링커-G6.31 AARR-HA 접합체 k1의 가교를 반응식 6B에 따라 수행하였다.



[0948]



[0949]

[0950]

반응식 6B

[0951]

3628 μ L의 링커-G6.31 HA-접합체 k1을 4시간 동안 인큐베이션하였다. 363 μ L의 멸균 여과된 (밀렉스 GP, 25 mm 직경, 0.22 μ m) HA-티올 f6 (실시예 2C) 용액 (0.098 mmol/g의 티올 함량을 갖는 28.4 mg/mL 함량의 116 kDa HA)을 첨가하여, 생성된 용액 중 최종 단백질 함량 40 mg/mL (티올 함량 기준) 및 최종 HA 함량 7.16 mg/mL를 생성하였다. 용액을 잘 혼합하고, 18 G 블린트 캐놀라가 구비된 5 mL 시린지 내에 채웠다. 충전을 위해 시린지 팁을 사용하여 18개의 1 mL 루어 락 시린지 내에 용액을 신속하게 충전하였다. 스크류 캡을 시린지 상에 탑재하고, 이들을 주위 온도에서 입위로 약 24시간 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 시린지를 5°C에서 3주 동안 인큐베이션하였다. 시린지에서 가교 반응을 완료하여 가교된 HA 겔 G6.31 접합체 k2를 수득하였다.

[0952]

실시예 6C 가교된 HA G6.31 겔로부터의 G6.31 AARR의 방출

[0953]

가교된 HA G6.31 AARR 겔 k2로부터의 G6.31 AARR의 방출을 실시예 6B로부터의 물질을 사용하여 시험관내에서 분석하였다. 11-16 mg의 G6.31 HA 겔을 멸균 발열원 무함유 에펜도르프 튜브 내로 옮겼다. 방출 완충제 (60 mM 인산나트륨, 3 mM EDTA, 0.01% 트윈, pH 7.4)를 HA 25 mg에 대해 완충제 975 μ L의 비에 따라 첨가하였다. 튜브를 뒤집거나 진탕시키지 않았다. 모든 튜브를 인큐베이터에서 37°C의 제어된 온도에서 저장하였다. 상이한 시점에서, 튜브를 인큐베이터로부터 제거하고 원심분리하였다 (9300 rcf, 3분). 상청액을 새로운 에펜도르프 튜브 내로 옮기고, 1.38 mL/cm.mg의 G6.31의 흡광 계수를 사용하여 338 nm의 참조 파장으로 280 nm에서의 흡광도 측정에 의해 상청액의 단백질 농도를 측정하였다. 각각의 샘플에 대해, 옮겨진 질량 및 겔의 단백질 함량을

사용하여 % 단위의 방출을 계산하였다 (표 6C).

[0954] 표 6C G6.31 방출

시간/일	방출/%
7	14.67
14	21.08
21	27.58
33	35.79
62	53.98
70	58.42
125	75.87
186	93.18

[0955]

실시에 7A 가교된 HA RabFab 겔의 제조

[0956]

실시에 3A, 3B, 3C 및 3D에 기재된 절차에 따라 RabFab-링커 접합체의 제조를 수행하였다. 실시에 3E에 기재된 절차에 따라 RabFab-링커 단일접합체의 농축을 수행하되, 예외로 최종 겔 내의 단백질 함량이 대략 30 mg/mL이도록 접합체를 46 mg/mL의 농도로 농축시켰다.

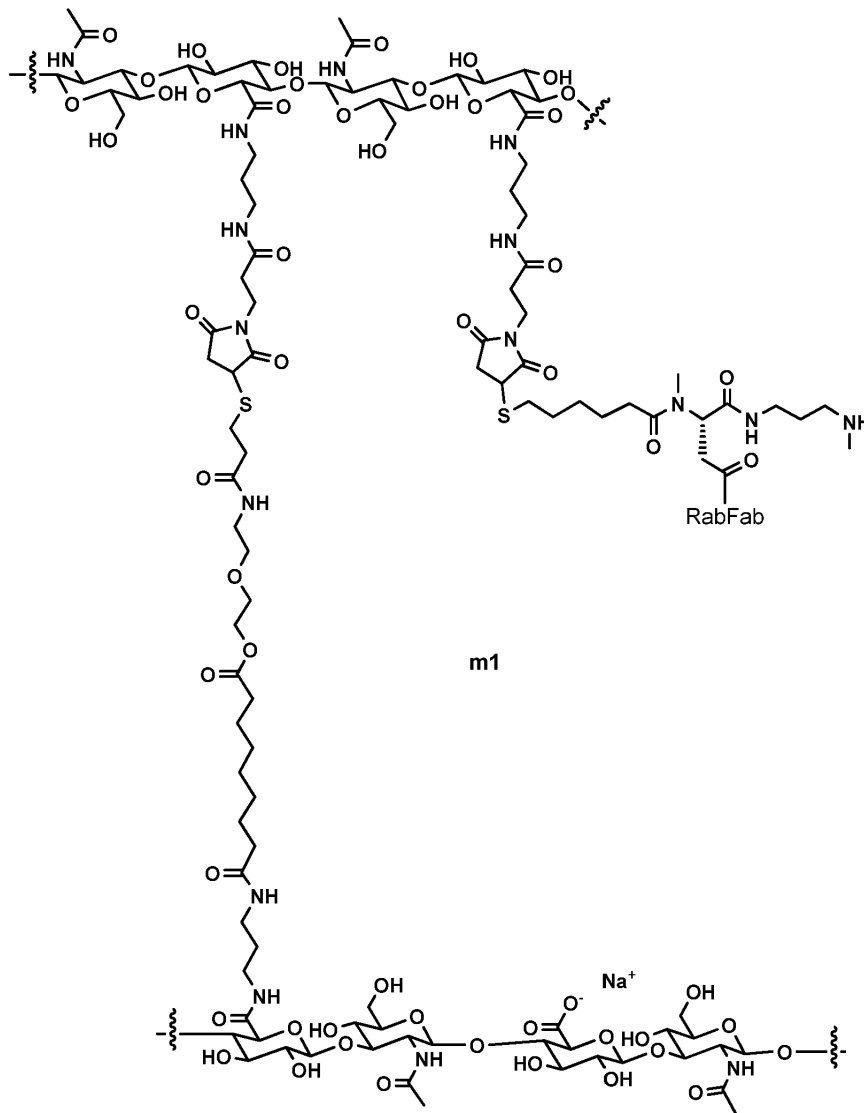
[0957]

말레이미드 관능화된 HA에 대한 RabFab-링커 접합체의 접합을 실시에 4A에 기재된 절차에 따라 수행하였다. 5502 μ L의 RabFab-링커 접합체를 1804 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 5.5 완충제와 혼합하였다. 289 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% 트윈 20 pH 5.5를 첨가하였다. 1124 μ L의 HA-말레이미드 f5 용액 (0.24 mmol/g의 말레이미드 함량을 갖는 30 mg/mL 함량의 116 kDa HA)을 첨가하였다. 생성된 용액을 잘 혼합하고, 주위 온도에서 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0958]

가교된 HA RabFab 겔의 제제를 실시에 4B에 기재된 절차에 따라 수득하였다. 8691 μ L의 RabFab-링커-HA 접합체에 869 μ L의 HA-티올 f6 용액 (0.096 mmol/g의 티올 함량을 갖는 22.6 mg/ml 함량의 116 kDa HA)을 첨가하였다. 용액을 잘 혼합하고, 18 G 블런트 캐놀라가 구비된 10 mL 시린지 내에 채웠다. 충전을 위해 시린지 팁을 사용하여 48개의 1 mL 루어 락 시린지 내에 용액을 신속하게 충전하였다. 스크류 캡을 시린지 상에 탑재하고, 이들을 주위 온도에서 입위로 약 24시간 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 시린지를 5°C에서 3주 동안 인큐베이션하였다. 시린지에서 가교 반응을 완료하여 가교된 HA 겔 RabFab 접합체 m1을 수득하였다.

[0959]



[0960]

[0961]

[0962]

실시에 7B 카르복시플루오레세인 표지된 HA 위약 겔의 제조

아민 관능화된 HA의 제조를 실시예 2A에 기재된 절차에 따라 수득하였다. 더 높은 아민 관능화도를 갖는 HA 변이체를 수득하기 위해, 1.00 g의 116 kDa HA를 125 mL의 100 MES, 0.4 M 1,3-디아미노프로판 완충제 pH 5.5 중에 용해시키고, 1.15 g (7.48 mmol)의 HOBt 및 444.6 mg (2.32 mmol)의 EDC를 사용하였다. 후속 카르복시플루오레세인 및 말레이미드 표지를, 463 mg의 상기 언급된 아민 관능화된 HA를 46 mL의 100 mM HEPES 완충제 pH 7.4 중에 용해시킨 후, 1.5 mL의 5(6)-카르복시플루오레세인 N-숙신이미딜 에스테르 용액 (아세트오니트릴 중 5.28 mg/mL)을 첨가함으로써 수득하였다. 주위 온도에서 교반 하에 1시간 인큐베이션한 후, 24 mL 아세트오니트릴 중 396 mg의 3-말레이미도프로피온산 NHS 에스테르의 새로 제조된 용액을 상기 용액에 첨가하였다. 주위 온도에서 교반 하에 추가로 1시간 인큐베이션한 후, 반응 혼합물의 후처리를 실시예 2B에 기재된 절차에 따라 수행하였다.

[0963]

카르복시플루오레세인 표지된 HA 겔의 제조를 하기 절차에 따라 수득하였다: 140.6 mg의 카르복시플루오레세인 표지된 말레이미드 관능화된 HA를 6580 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 5.5 완충제 중에 용해시켰다. 82.8 mg의 티올 관능화된 HA를 2946 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 5.5 완충제 중에 용해시켰다. 57.6 mg의 2-메르캅토에탄올을 6216 μ L의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 5.5 완충제 중에 용해시켰다. 500 μ L의 상기 2-메르캅토에탄올 용액을 새로운 바이알 내로 옮기고, 49.5 mL의 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.01% 트윈 20 pH 5.5 완충제로 희석하였다. 121.5 mg의 천연 116 kDa HA를 8433 μ L의 희석된 2-메르캅토에탄올 용액 중에 용해시켰다. 8433 μ L의 상기 용액을 새로운 바이알 내로 옮기고, 2568 μ L의 말레이미드 HA 용액을 첨가하였다. 생성된 용액을 잠시 진탕시키고, 원심분리하고, 주위 온도에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 10 mL의 상기 용액을 새로운 바이알 내로 옮기고, 1 mL의

실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 검정 회색제 중 1/4,000 회색 후 웰당 100 μ l의 검출 항체 (마우스 항-토끼 경쇄-HRP, 알라바마주 버밍햄 소재 서던바이오테크(SouthernBiotech))를 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 완만하게 교반하면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 추가로 세척한 후, 100 μ l의 HRP 기질 (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘인 TMB, 메릴랜드주 게이더스버그 소재 키르케가드 앤 페리 레보러토리(Kirkegard & Perry Laboratory))을 각각의 웰에 첨가한 후, 완만하게 교반하면서 실온에서 15분 인큐베이션하였다. 100 μ l의 1M 인산으로 반응을 중지시켰다. 플레이트를 검출을 위해 450 nm 및 참조 파장에 대해 630 nm에서 판독하였다 (스펙트라맥스 384-플러스; 캘리포니아주 서니베일 소재 몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices)). 표준물질의 광학 밀도 값을 4-파라미터 로지스틱 곡선-피팅 소프트웨어 (소프트맥스, 몰레큘라 디바이시스)를 사용하여 플롯팅하고, 이로부터 대조군 및 시험 샘플에 대한 농도 값을 외삽에 의해 유도하였다.

[0970] 유리체 내의 농도를 상기 기재된 바와 같이 항원-결합 ELISA에 의해 결정하고, 시간의 함수로서 플롯팅하였다. 도 12는 주사 후 시간의 함수로서 유리체 농도를 요약한 그래프를 보여준다. IVT 투여 후 유리 RabFab는 청색으로 제시되어 있고, 반면 가교된-HA로부터의 방출로부터의 것은 적색으로 제시되어 있다. 점은 개별 관찰 데이터이고, 반면 선은 유리체 내 유리 Fab에 대한 공지된 PK 파라미터, 가역적 전구약물 링커의 시험관내 방출, 및 토끼 유리체의 pH 및 온도에 기초하여 예상된 유리체 농도의 모델 예측이다. 이들 데이터를 비-구획 분석에 적용하여 약동학적 (PK) 파라미터를 수득하였다.

[0971] 약동학적 파라미터를 공칭 시간 및 용량을 사용한 비-구획 분석에 의해 결정하였다 (포에닉스 윈론린, 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재 파르사이트 코포레이션(Pharsight Corp)). 비-구획 분석을 사용하여 계산된 PK 파라미터가 표 2에 요약되어 있다.

[0972] 표 1: NZW 토끼 PK 연구로부터의 PK 파라미터 추정치

	Cmax (μg/mL)	AUC₀₋₁₂ (일*μg/mL)	CL (mL/일)	V_{ss} (mL)
유리체	1030	5360	0.271	0.812
방수	4.50	148	5.16	403
혈청	0.147	2.32	1260	19000

[0973]

[0974] NZW 토끼에서 가교된 HA RabFab로부터의 방출 후 RabFab 유리체 PK는 시험관내 방출에 기초한 예측과 일치한다. 초기 보다 높은 농도는 ~3.6% 유리 Fab 및 ~4.9% 유리 Fab-HA 종을 함유하는 용량 용액으로 인한 것이다. 토끼 유리체액에서의 방출 반감기는 53일인 것으로 추정된다.

[0975] 유리체에서의 유리 Fab의 말기 반감기는 가역적 전구약물 링커의 반감기와 동일하다. 이는 HA로부터의 약물 방출 및 후속 유리체로부터의 제거의 역학이 평형에 도달하였을 때, 유리체에서의 활성 약물의 유효 제거 반감기가 유리 Fab의 IVT 주사 후 전형적으로 관찰되는 반감기와 비교하여 $53/3.2 = 16.5$ 배 더 길 것임을 의미한다.

[0976] 실시예 5E NHP 눈에서 유의한 단편화 또는 입자 이동의 부재

[0977] 2마리의 시노몰구스 원숭이에게 하측두 4분면에 위약 가교된 HA 겔-플루오레세인 (50 μ L/눈)을 단일 ITV 투여로 양측으로 투여하였다. 동물을 30일 동안 임상 관찰, 체중 변화, 음식물 소비 및 안구 관찰 (IOP, 생체현미경 (슬릿 램프) 및 안저 검사)에 대해 관찰하였다. 추가로, 전방각경검사, 전방각영상화, 공초점 스캐닝 레이저 검안경을 사용하는 안저 영상화 및 플루오로톤을 사용하는 형광측정법을 사용하여 동일한 기간에 걸쳐 상기 물질의 위치 및 응집성을 모니터링하였다.

[0978] 도 13A는 제15일에 취한 대표적인 cSLO 영상이다. TA (화살표)는 하유리체(inferior vitreous)에 남아있고, 망막중심와 (F) 또는 시신경 유두 (ON)를 흐릿하게 하지 않는다. 도 13B는 전안부 및 수정체의 제거 후 코발트 블루 광을 사용하여 부검시에 취한 영상이다. TA (화살표)는 응집성으로 남아있음을 주목한다. 볼 수 있는 바와 같이, 위약 가교된 HA 겔 m2는 30일 후 최소 단편화 및 이동을 보였다.

[0979] 실시예 7F 토끼에서의 가교된 HA RabFab 겔 내약성 연구

[0980] 3마리의 뉴질랜드 화이트 토끼에게 하측두 4분면에 가교된-HA-RabFab 겔 (50 μ L/눈)을 단일 ITV 투여로 양측으로

로 투여하였다. 동물을 60일 동안 임상 관찰, 체중 변화, 음식물 소비 및 안구 관찰 (IOP, 생체현미경 (슬릿 램프) 및 안저 검사)에 대해 관찰하였다. ADA 및 TK를 위해 혈청 샘플을 취하였다. 부검시, 조직병리학을 위해 눈을 제거하고 처리하였다. 도 14는 조직학 절편을 보여준다. 볼 수 있는 바와 같이, 가교된-HA-RabFab 겔은 2-개월 연구에서 내약성이 우수하였다. 세포 침윤, 염증 반응 및 이물 반응은 관찰되지 않았다 (6개의 눈).

[0981] 실시예 7G 시노물구스 마카크에서의 가교된 HA G6.31 AARR 겔 내약성 연구

[0982] 2마리의 시노물구스 마카크에게 하측두 4분면에 항-VEGF Fab인 G6.31 AARR에 접합된 가교된 HA 겔을 단일 ITV 주사로 양측으로 투여하였다 (50 μ L/눈; 1.92 mg Fab/눈). 동물을 3개월 (92일) 동안 임상 관찰, 체중 변화, 음식물 소비 및 안구 관찰 (IOP, 생체현미경 (슬릿 램프) 및 안저 검사)에 대해 관찰하였다. 전방각경검사 및 전방각영상화를 사용하여 동일한 기간에 걸쳐 물질의 위치 및 응집성을 모니터링하였다. ADA 및 TK 평가를 위해 혈청 샘플을 취하고, 3개월에 조직병리학에 의해 눈을 평가하였다.

[0983] 히드로겔은 평가 기간 전체에 걸쳐 응집성으로 하유리체에 남아있었다. 제28일에 두 동물에서 ADA의 유도에도 불구하고 유의한 생애 염증은 주목되지 않았다. 임상 관찰, 정성적 음식물 소비 및 체중에 있어서 시험 물품 관련 변화는 없었다. 도 15는 시험 물품을 함유하는 눈의 하관(inferior calotte)의 상하 조직학 절편을 보여준다. 볼 수 있는 바와 같이 가교된-HA-G6.31 AARR 겔은 3-개월 연구에서 내약성이 우수하였다. 세포 침윤, 염증 반응 및 이물 반응은 관찰되지 않았다 (4개의 눈).

[0984] 라니비주맵에 접합된 PEG-기재 미립자 히드로겔과 비교하여, 가교된-HA-G6.31 AARR 겔은 우수한 안전성 프로파일을 나타낸다. 하유리체강(inferior vitreous cavity)에 주사되는 경우에, 가교된-HA-G6.31 AARR 겔은 이동하지 않고 시축 아래에 남아있고, 따라서 환자 시력을 방해하지 않는 것으로 예상된다. 반대로, PEG-기재 미립자 히드로겔은 유리체강 내에서 자유롭게 이동하였다.

[0985] 가교된-HA-G6.31 AARR 겔은 응집성으로 남아있고, 유의한 수의 유리 미립자-유사 단편을 형성하지 않으며, 따라서 유출 차단 위험을 제한한다. PEG-기재 미립자 히드로겔의 분획이 시노물구스 원숭이 눈의 전방에서 관찰되었다.

[0986] 실시예 8: 본 발명의 항체 접합체에 사용하기 위한 예시적인 최적화된 항-VEGF 항체

[0987] 본 실시예에 기재된 임의의 최적화된 항-VEGF 항체를 사용하여 상기 실시예 3A 내지 4D에 기재된 바와 같은 항체 접합체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/053454에 기재된 임의의 최적화된 항-VEGF 항체를 사용할 수 있다. 표 3은 사용될 수 있는 예시적인 최적화된 항-VEGF 항체 뿐만 아니라 각각의 항체에 대한 VH 및 VL 도메인의 아미노산 서열을 기재한다. 표 4는 표 3에 기재된 항-VEGF 항체에 대한 VL HVR 아미노산 서열을 기재한다. 표 5는 표 3에 기재된 항-VEGF 항체에 대한 VH HVR 아미노산 서열을 기재한다. 특정한 실시양태에서, 항-VEGF 항체 G6.31 AARR (본원에서 "G6.31.AARR"로도 지칭됨)이 사용된다.

[0988] 표 3: 예시적인 항-VEGF 항체에 대한 VH 및 VL 아미노산 서열

항체 명칭	변이체 VH (SEQ ID NO)	변이체 VL (SEQ ID NO)
G6.31 WT	G6.31 WT (SEQ ID NO: 42)	G6.31 WT (SEQ ID NO: 38)
LC-N94A	G6.31 WT (SEQ ID NO: 42)	N94A (SEQ ID NO: 41)
LC-N94A.LC-F83A	G6.31 WT (SEQ ID NO: 42)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	A40E.T57E (SEQ ID NO: 40)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	N82aR.Y58R (SEQ ID NO: 11)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
HCcombo	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	G6.31 WT (SEQ ID NO: 38)
HCLC2	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
HCLC4	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
HCLC5	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)
HCLC3	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo3 (SEQ ID NO: 36)
HCLC1	HCcombo (SEQ ID NO: 33)	LCcombo1 (SEQ ID NO: 34)
R19HCcombo	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	G6.31 WT (SEQ ID NO: 38)
R19HCLC2	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo2 (SEQ ID NO: 35)
R19HCLC4	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	LCcombo4 (SEQ ID NO: 37)
R19HCLC5	R19HCcombo (SEQ ID NO: 51)	N94A.F83A (SEQ ID NO: 12)

[0989]

[0990] 표 4: 표 3으로부터의 항체에 대한 VL HVR 서열

항체 명칭	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
G6.31 WT	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
LC-N94A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
LC-N94A.LC-F83A	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC3	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
HCLC1	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCombo	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGNPFT (SEQ ID NO: 23)
R19HCLC2	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCLC4	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)
R19HCLC5	RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 8)	SASFLYS (SEQ ID NO:9)	QQGYGAPFT (SEQ ID NO: 10)

[0991]

[0992]

표 5: 표 3으로부터의 항체에 대한 VH HVR 서열

항체 명칭	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3
G6.31 WT	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTTYADSVK G (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
LC-N94A	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTTYADSVK G (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
LC-N94A.LC-F83A	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTTYADSVK G (SEQ ID NO: 53)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
LC-N94A.LC-F83A. HC-A40E.HC-T57E (G6.31 AAEE)	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVK G (SEQ ID NO: 21)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
N94A.F83A.N82aR.Y58R (G6.31 AARR)	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYTRYADSVK G (SEQ ID NO: 7)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCLC3	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
HCLC1	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
R19HCcombo	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
R19HCLC2	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
R19HCLC4	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)
R19HCLC5	DYWIH (SEQ ID NO:1)	GITPAGGYEYYADSVE G (SEQ ID NO: 22)	FVFFLPYAMDY (SEQ ID NO:3)

[0993]

[0994]

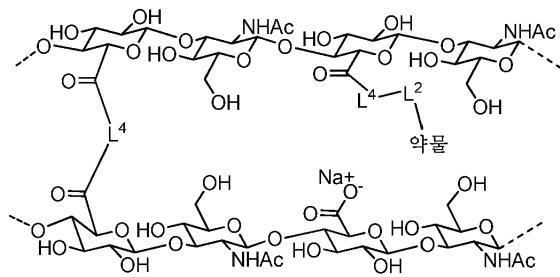
상기 열거된 임의의 항체, 예를 들어 G6.31 AARR의 Fab 중쇄의 상부 힌지 영역을 돌연변이시켜 문헌에 보고된 항-IgG1 힌지 자가항체에 대한 반응성을 제거할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Brezski et al., J. Immunol. 181:3183-3192, 2008 및 Brezski et al., mAbs 2:3, 212-220, 2010]을 참조한다. 따라서, G6.31 AARR 중쇄의 C-말단 아미노산은 T (야생형 (WT) 버전) 또는 L (항-인간 IgG Fab에 대한 반응성이 결여된 변이체 버전)일 수 있다. 야생형 G6.31 AARR의 전장 중쇄 아미노산 서열은 서열식별번호: 48이다. 항-인간 IgG Fab에 대한 반응성이 결여된 변이체 버전의 전장 중쇄 아미노산 서열은 서열식별번호: 49이다. G6.31 AARR 및 항-인간 IgG Fab에 대한 반응성이 결여된 변이체 버전 둘 다에 대한 전장 경쇄 아미노산 서열은 서열식별번호: 50이다.

[0995]

본원에 기재된 설명은 최상의 방식을 비롯하여 본 발명을 개시하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 임의의 장치 또는 시스템을 제조 및 사용하고 임의의 통합된 방법을 수행하는 것을 비롯하여 본 발명을 실시할 수 있도록 하기 위해 예를 사용한다. 본 발명의 특허가능한 범주는 청구범위에 의해 정의되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 고안하는 다른 예를 포함할 수 있다. 이러한 다른 예는, 이들이 청구범위의 문자 그대로의 표현과 상이하지 않은 구조적 요소를 갖거나 또는 이들이 청구범위의 문자 그대로의 표현과 비실질적 차이를 갖는 등가의 구조적 요소를 포함하는 경우에 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

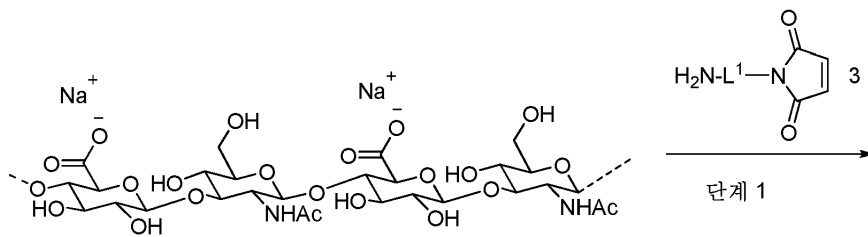
도면

도면1

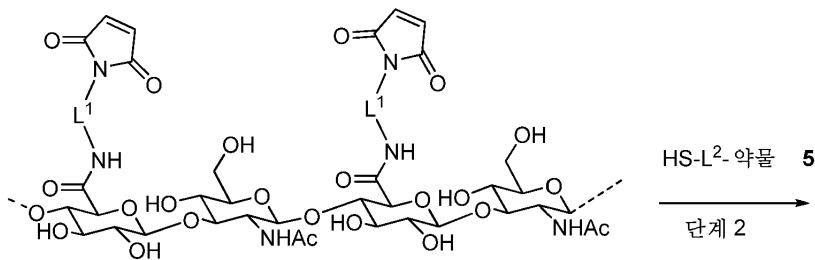


1

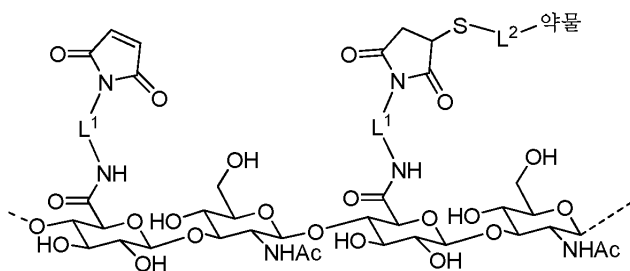
도면2



2

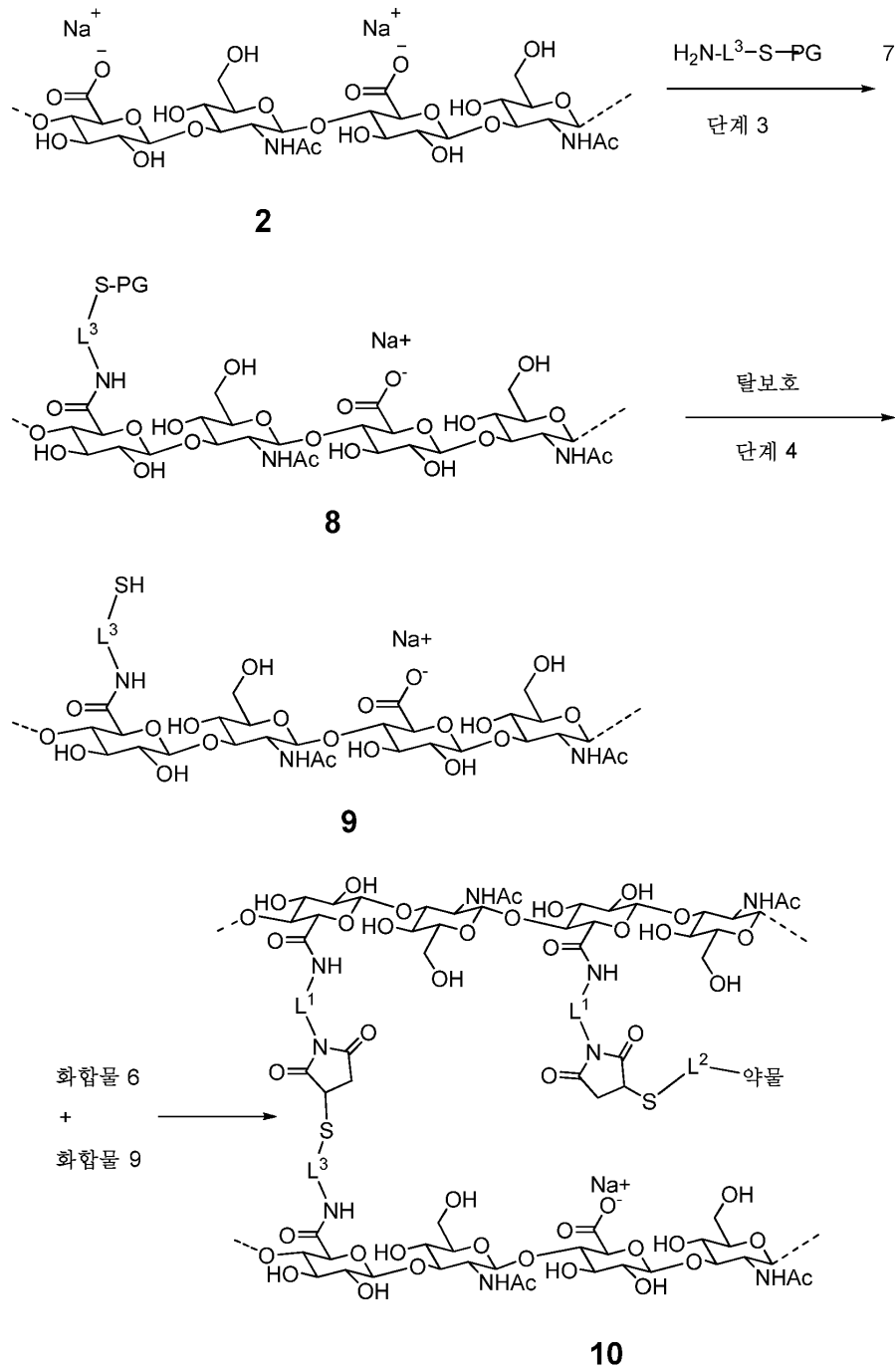


4

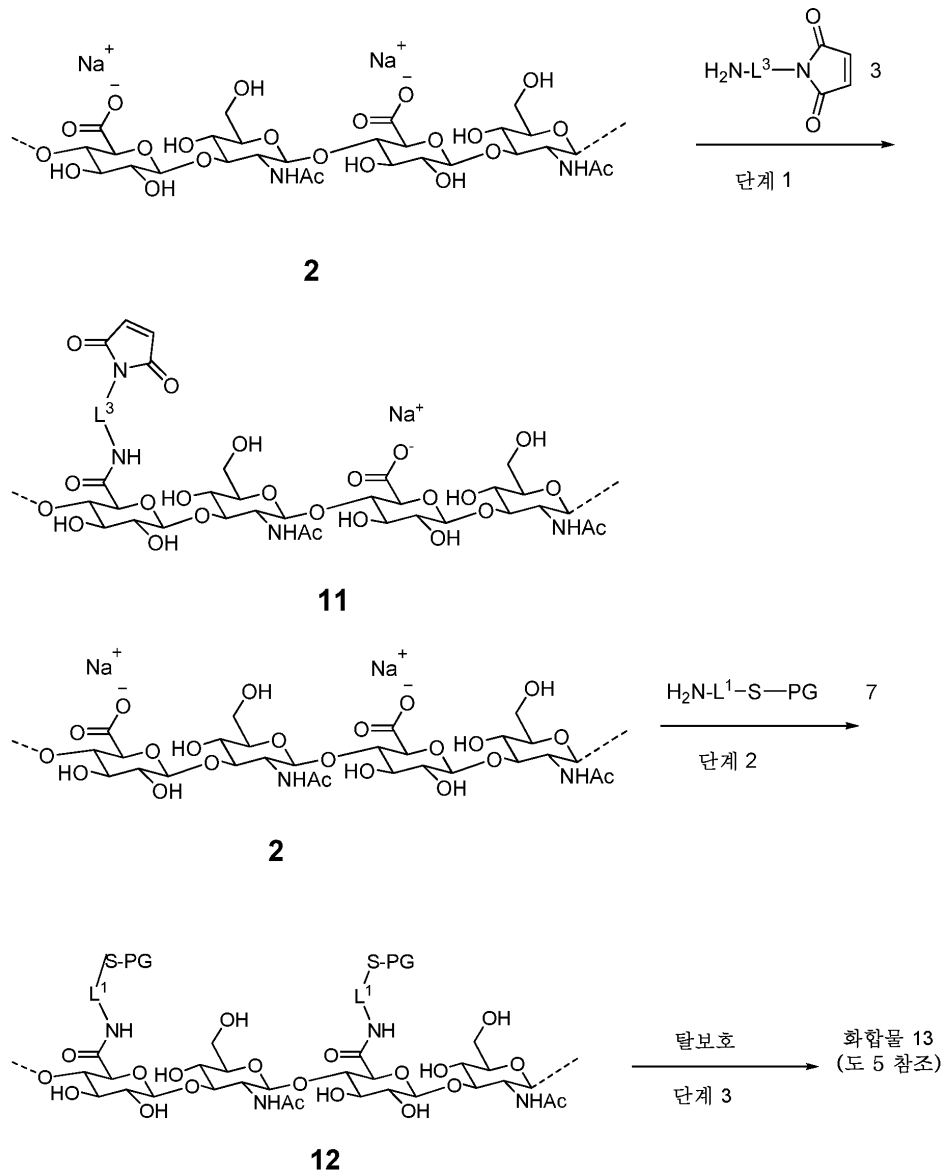


6

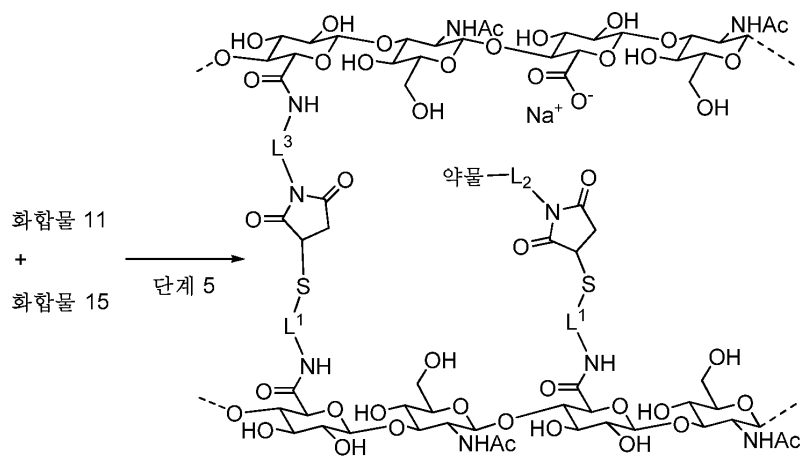
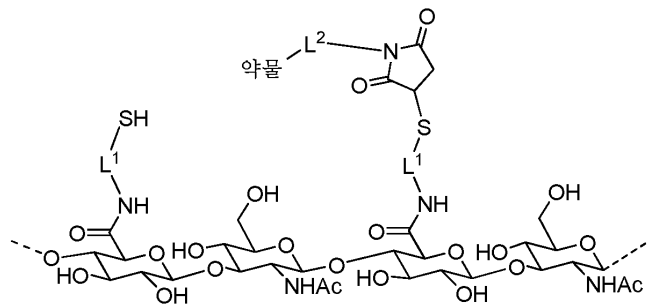
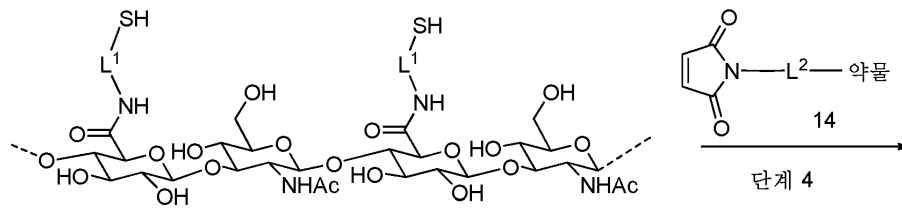
도면3



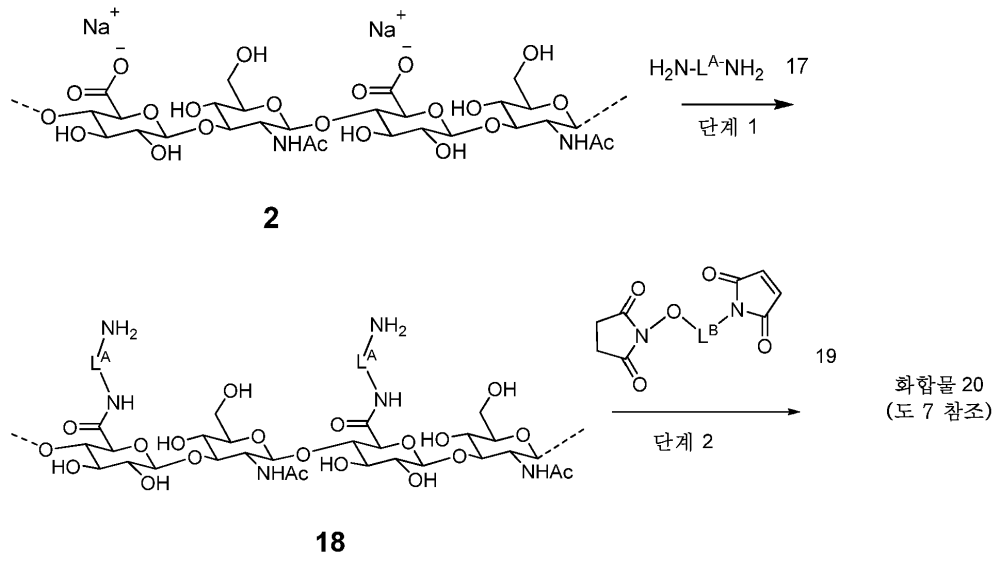
도면4



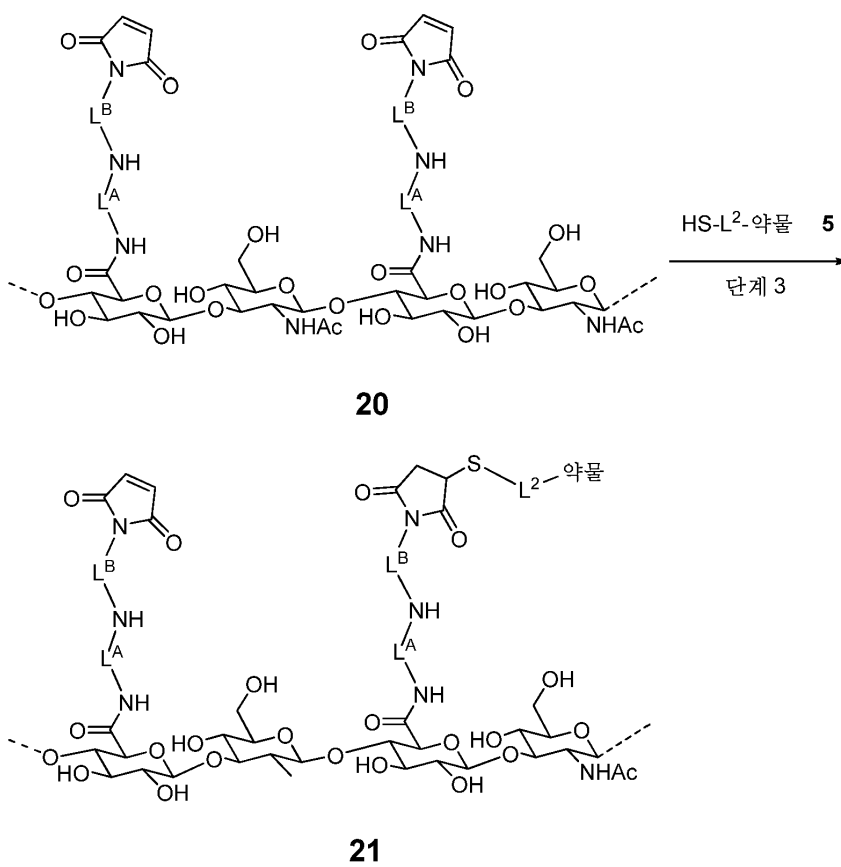
도면5



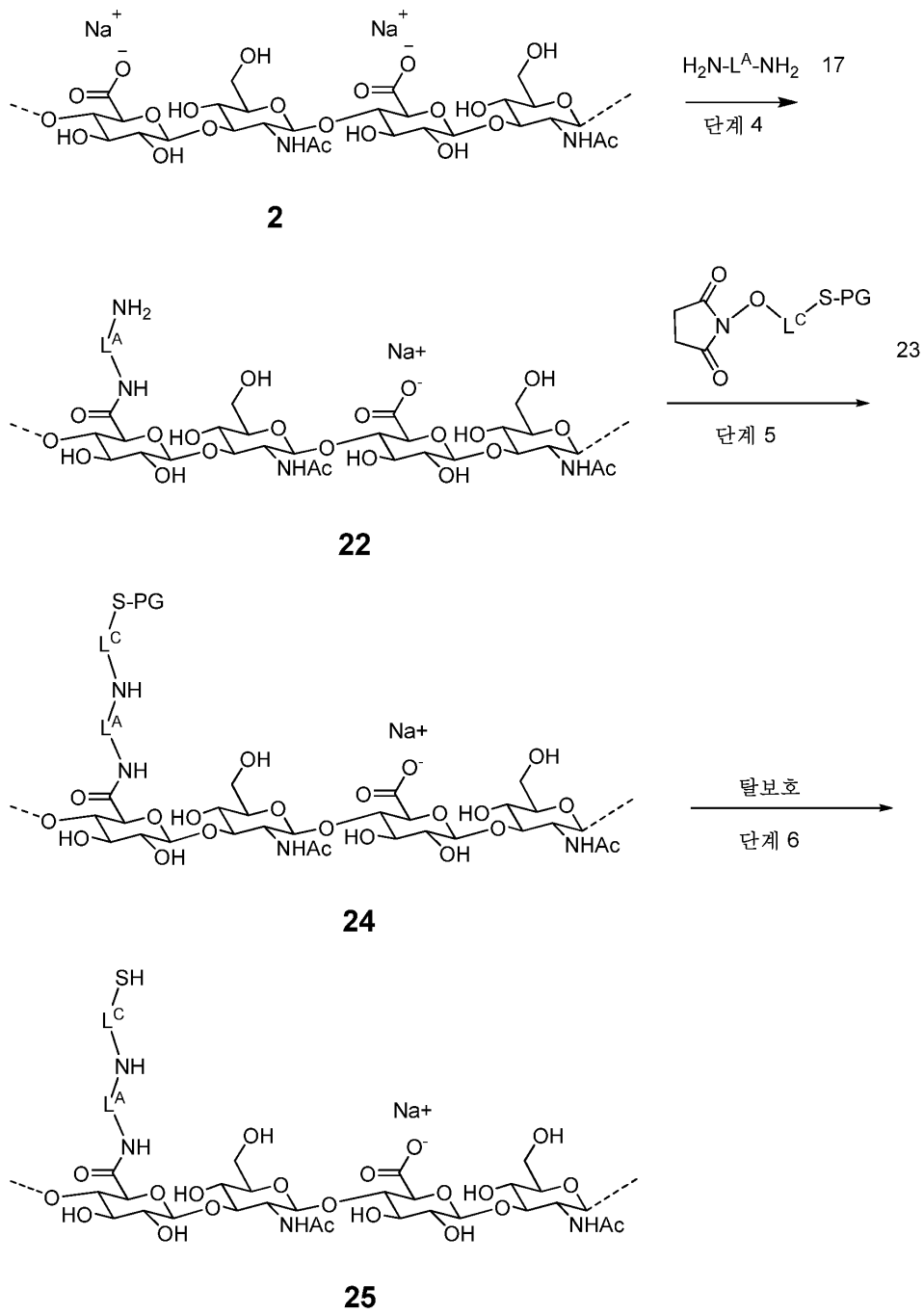
도면6



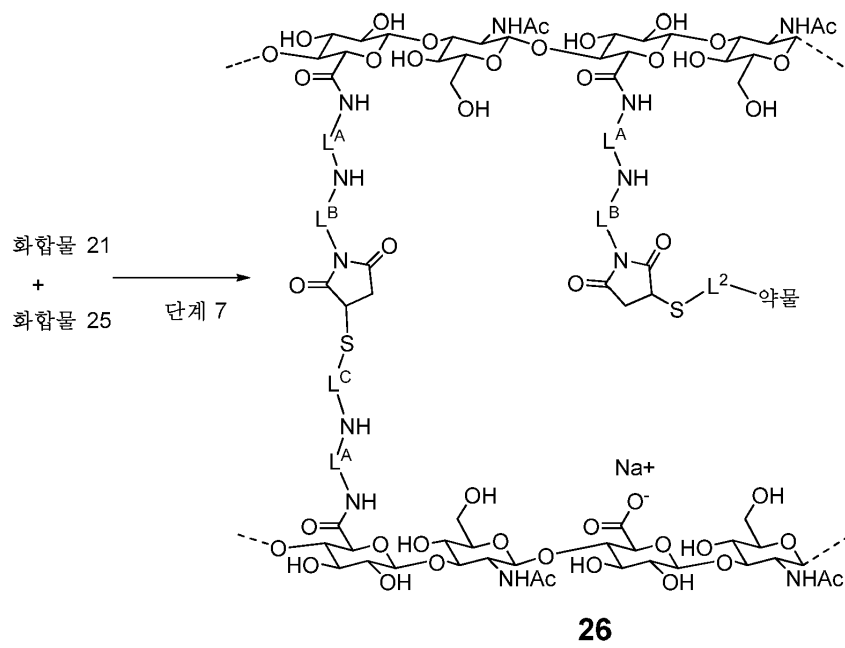
도면7



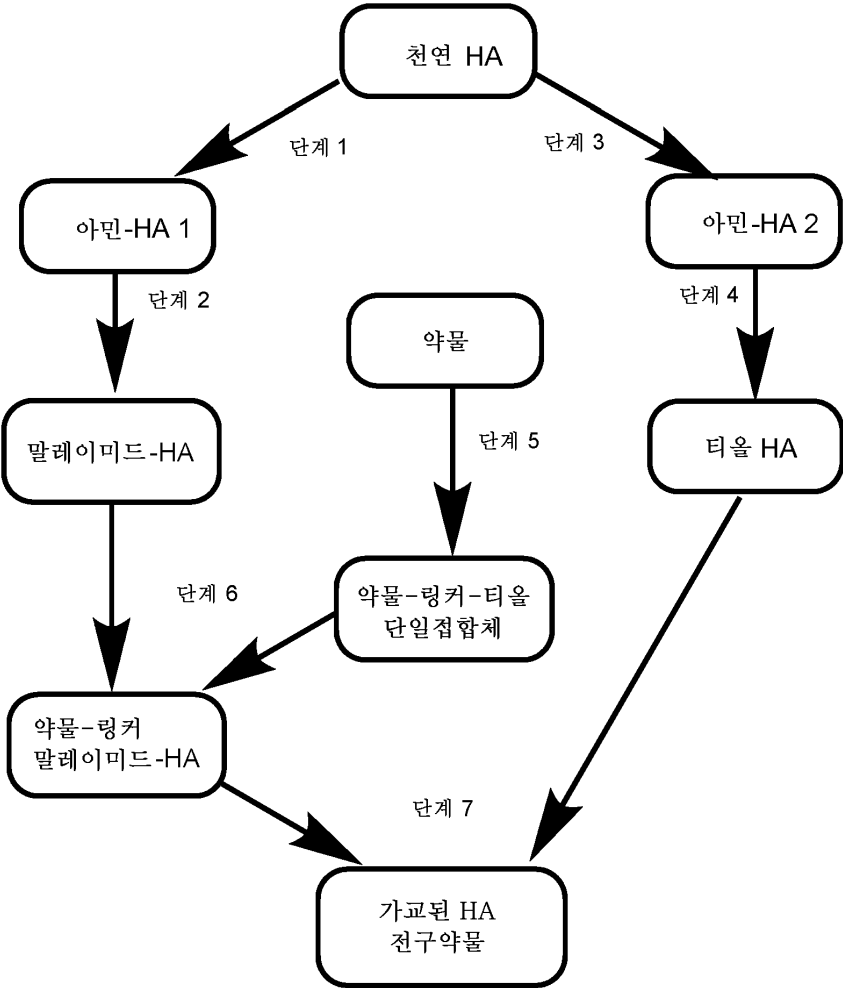
도면8



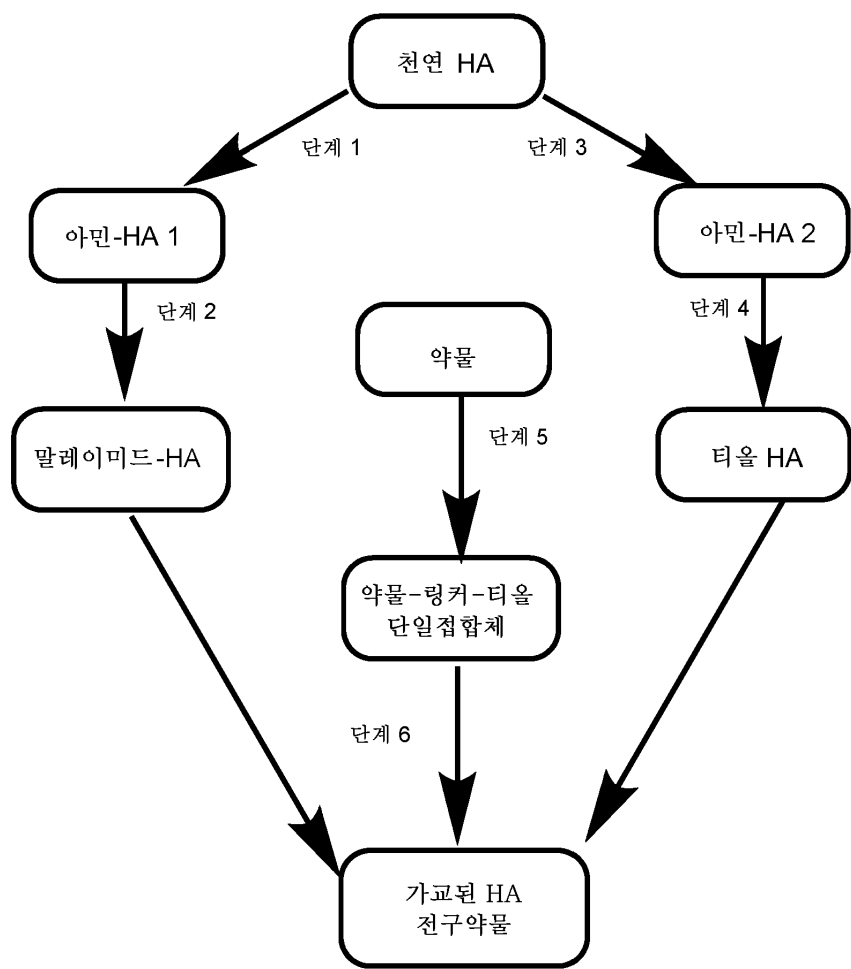
도면9



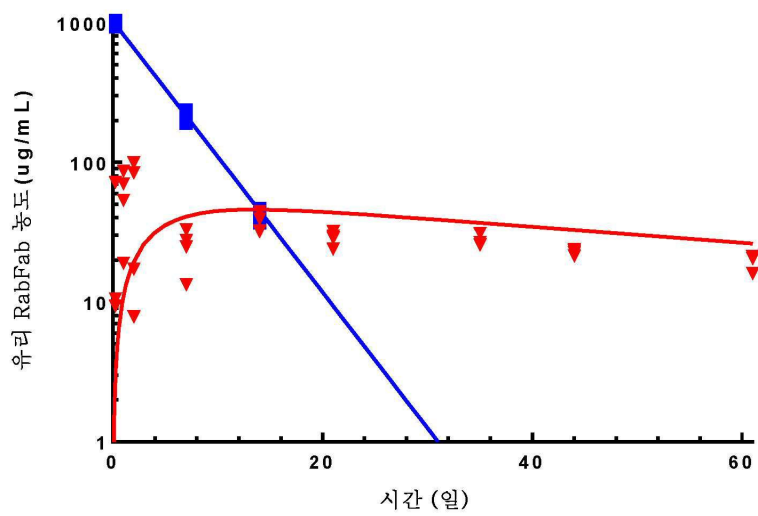
도면10



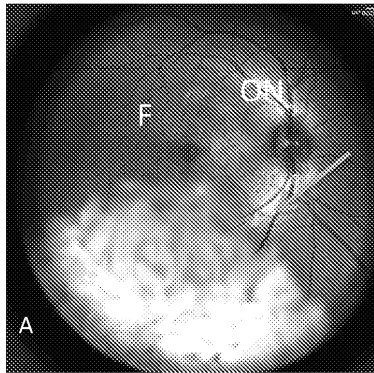
도면11



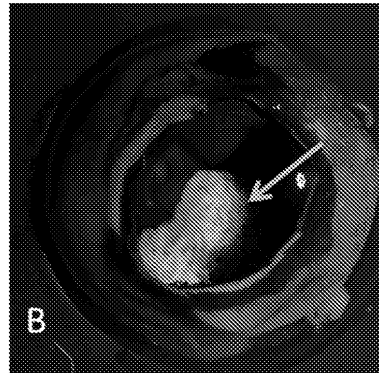
도면12



도면13



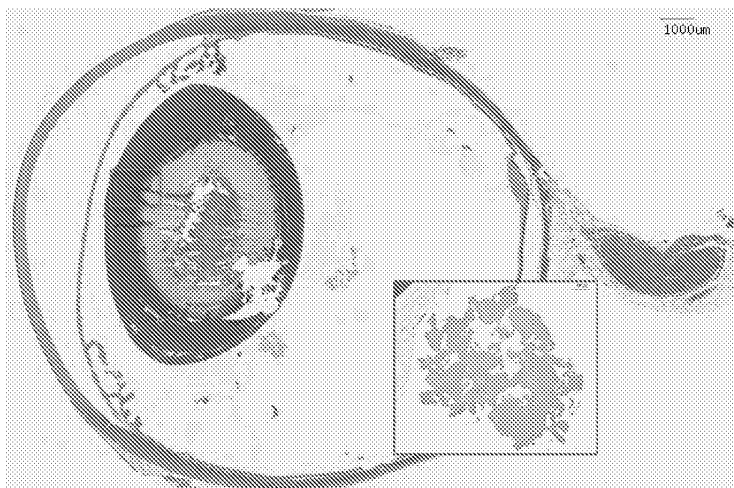
13A



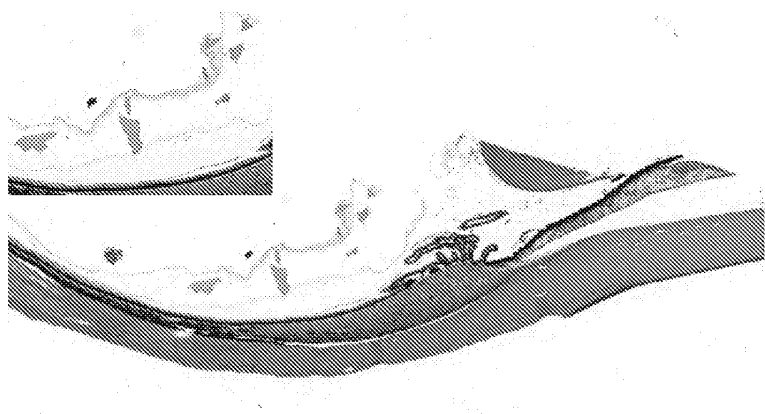
13B

시험 물품

도면14



도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Genentech, Inc.and Ascendis Pharma A/S
- <120> HYDROGEL CROSS-LINKED HYALURONIC ACID PRODRUG COMPOSITIONS AND METHODS
- <130> P34128-W0
- <140> To be assigned
- <141>
- <150> 62/475,094
- <151> 2017-03-22
- <160> 60
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic Construct
- <400> 1
- Asp Tyr Trp Ile His
- 1 5
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Ile or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Ala or Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Tyr or Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is Thr or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is Arg, Tyr, Gln, or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is Ala or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is Lys or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is Gly or Glu

<400> 2

Gly Xaa Thr Pro Xaa Gly Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Asp Ser Val Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Asp or Arg

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Xaa Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Ser or Met

<400> 5

Xaa Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Gln, Asn, or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Ala, Asn, Gln, or Arg

<400> 6

Xaa Gln Gly Tyr Gly Xaa Pro Phe Thr

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 10
 Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe Thr

1 5
 <210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser

20 25 30

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic Construct

<400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe Thr

1 5

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser

20 25 30

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

Trp Gly Gln Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 33

<211> 120

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Glu Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Glu Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 36
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Glu Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 37
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Glu Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

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

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

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

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

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

Trp Val Arg Gln Glu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

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

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

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

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

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 43
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 43

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His

225

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 45

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asp Cys

20

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic Construct

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 47

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly

20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln

35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu

50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu

65					70					75					80
Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro
				85				90				95			
Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His
				100				105				110			
Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys
				115				120				125			
Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Lys	Lys	Ser	Val
				130				135				140			
Arg	Gly	Lys	Gly	Lys	Gly	Gln	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys	Lys	Ser	Arg	Tyr
145				150				155				160			
Lys	Ser	Trp	Ser	Val	Tyr	Val	Gly	Ala	Arg	Cys	Cys	Leu	Met	Pro	Trp
				165				170				175			
Ser	Leu	Pro	Gly	Pro	His	Pro	Cys	Gly	Pro	Cys	Ser	Glu	Arg	Arg	Lys
				180				185				190			
His	Leu	Phe	Val	Gln	Asp	Pro	Gln	Thr	Cys	Lys	Cys	Ser	Cys	Lys	Asn
				195				200				205			
Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Lys	Ala	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr
210				215				220							
Cys	Arg	Cys	Asp	Lys	Pro	Arg	Arg								
225				230											
<210> 48															
<211> 228															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220><223> Synthetic Construct															
<400> 48															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Ser	Asp	Tyr

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr
 225
 <210> 49
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 49

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

 35 40 45
 Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Leu
 225
 <210> 50

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Glu Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Glu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Phe Val Phe Phe Leu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Glu Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 52

Glu Glu Gln Leu Val Glu Glu Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Glu Ile Ser

20 25 30

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 53

Gly Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 54

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 55

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

1 5 10

<210> 56

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 56

catcagatgg cggaagatg aagacagatg gtgc 34

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 57

gccatccaga tgaccagtc tcc 23

<210> 58

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 58

ggctgcacca tctgtcttc 19

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Asn Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105