



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월26일
(11) 등록번호 10-2480873
(24) 등록일자 2022년12월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 47/6817 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7013122
- (22) 출원일자(국제) 2017년09월30일
심사청구일자 2020년07월10일
- (85) 번역문제출일자 2019년05월07일
- (65) 공개번호 10-2019-0065374
- (43) 공개일자 2019년06월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2017/104706
- (87) 국제공개번호 WO 2018/064964
국제공개일자 2018년04월12일
- (30) 우선권주장
201610876568.9 2016년10월08일 중국(CN)
- (56) 선행기술조사문헌
US20160067351 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
쓰촨 바이리 파마슈티칼 컴퍼니, 리미티드
중국, 쓰촨, 청두, 웬지양 디스트릭트, 161 바이리 로드
- (72) 발명자
주이
중국, 쓰촨 611130, 청두, 웬 지양, 크로스-스트레이트 사이언스 앤드 테크놀로지 인터스트리얼 디벨롭먼트 존
왕 이시
중국, 쓰촨 611130, 청두, 웬 지양, 크로스-스트레이트 사이언스 앤드 테크놀로지 인터스트리얼 디벨롭먼트 존
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 5 항

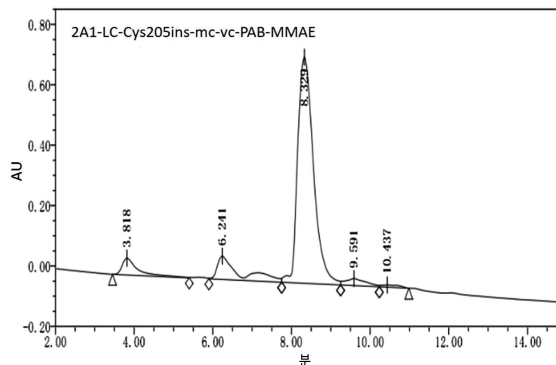
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **시스테인 개조된 항체-약물 접합체(Cysteine modified antibody-drug conjugate) 및 그의 제조 방법**

(57) 요약

시스테인(C)을 표적 항체의 중쇄 및 경쇄에 삽입시키고, 부위-특이적으로 삽입된 시스테인의 유리 티올기(-SH) 및 매우 활성인 소분자 세포독소와 접합된 링커를 통해 부위-특이적인 접합을 수행함으로써, 양호한 균일성을 갖는 시스테인 개조된 항체-약물 접합체를 형성시킨다. 상기 시스테인의 삽입 부위는 상기 항체의 경쇄의 205번 위치 및/또는 206번 위치(카뱃 넘버링), 및/또는 상기 중쇄의 439번 위치(카뱃 넘버링)이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/28 (2013.01)

(72) 발명자

주오 시

중국, 쓰촨 611130, 청두, 웨이 지양, 크로스-스트레
잇 사이언스 앤드 테크놀로지 인더스트리얼 디벨롭
먼트 존

리 지에

중국, 쓰촨 611130, 청두, 웨이 지양, 크로스-스트레
잇 사이언스 앤드 테크놀로지 인더스트리얼 디벨롭
먼트 존

첸 란

중국, 쓰촨 611130, 청두, 웨이 지양, 크로스-스트레
잇 사이언스 앤드 테크놀로지 인더스트리얼 디벨롭
먼트 존

완 웨이리

중국, 쓰촨 611130, 청두, 웨이 지양, 크로스-스트레
잇 사이언스 앤드 테크놀로지 인더스트리얼 디벨롭
먼트 존

유 용구오

중국, 쓰촨 611130, 청두, 웨이 지양, 크로스-스트레
잇 사이언스 앤드 테크놀로지 인더스트리얼 디벨롭
먼트 존

명세서

청구범위

청구항 1

항체 및 세포독소를 포함하는 시스테인 개조된(cysteine modified) 항체-세포독소 접합체로서,

항체는 시스테인 삽입 부위에 삽입된 시스테인을 포함하고,

항체는 GLSSPCVTKSF(서열번호 13)의 아미노산 서열을 갖는 경쇄, GLSSPVCTKSF(서열번호 14)의 아미노산 서열을 갖는 경쇄, 및 TQKLSLCLSPGK(서열번호 15)의 아미노산 서열을 갖는 중쇄로 구성되는 균으로부터 선택된 서열을 포함하고,

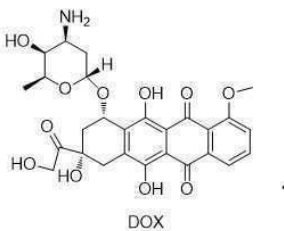
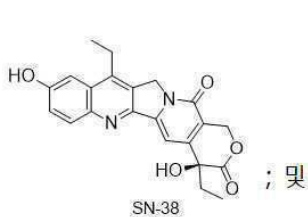
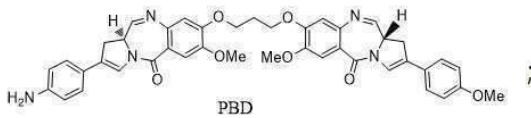
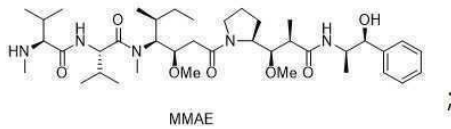
C는 삽입된 시스테인이고,

삽입된 시스테인은 티올기를 포함하고,

세포독소는 링커를 통해 티올기에 접합되고,

링커는 카텡신 절단 가능한(cathepsin-cleavable) 링커이고,

세포독소는 각각 하기 화학식의 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF), 피롤로벤조디아제핀(PBD), 항암제 SN-38, 및 독시사이클린(Dox) 중에서 선택되는 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체:



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

항체는 경쇄를 포함하고, 경쇄는 카파(κ) 또는 람다(λ) 아이소타입(isotype)을 포함하는 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

항체는 중쇄를 포함하고, 중쇄는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함하는 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항의 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체의 제조 방법으로서,

항체를 환원제로 환원시켜 환원된 항체를 제공하는 단계로서,

항체는 차폐된 티올기(shielded thiol group)를 갖는 삽입된 시스테인을 포함하고, 차폐된 티올기는 삽입된 시스테인 상에서 티올기에 커플링된 차폐기를 포함하고,

항체를 환원제로 환원시키는 것은 차폐된 티올기로부터 차폐기를 제거하여 삽입된 시스테인 상에 유리 티올기를 갖는 환원된 항체 및 디커플링된 차폐기를 제공하는 것을 포함하고,

디커플링된 차폐기 및 환원제는 양이온 교환 크로마토그래피 또는 한외여과를 통해 제거되는 단계,

환원된 항체를 산화시켜 쇄간 디설파이드 결합을 재연결시켜 산화된 항체를 제공하는 단계,

세포독소 모이어티(moiety)를 포함하는 mc-vc-PAB-페이로드를 산화된 항체와 접촉시켜 삽입된 시스테인 상의 유리 티올기를 세포독소 모이어티와 접합시켜 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체를 제공하는 단계, 및

접합되지 않은 mc-vc-PAB-페이로드를 양이온 교환 크로마토그래피 또는 한외여과에 의해 제거하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 세포독소 및 항체는 1.6 내지 2의 비율을 갖는 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 2016년 10월 8일자 출원된 중국특허출원 제 201610876568.9 호의 우선권 이득을 주장하는, 2017년 9월 30일자 출원된 국제출원번호 PCT/CN2017/104706의 국제단계 출원이며, 이들의 전체 개시는 본 명세서에 명백히 참고로 인용된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시는 치료 화합물 및 그의 제조 방법, 및 특히 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 항체-약물 접합체(ADC)는 표적 요법의 핫스팟(hot spot)이다. 예를 들어, 미국 특허출원공개공보 US2016/0067351 (2016.03.10.)에는 모 항체 또는 항체 단편의 불변부 내의 적어도 하나의 천연 아미노산을 시스테인으로 대체함으로써 항체 또는 항체 단편을 개조하기 위한 특정 위치를 제공하고 있는데, 이러한 특정 위치는 페이로드 또는 링커-페이로드 조합을 위한 부착점으로서 사용될 수 있다. 지금까지 2개 약물, 애드세트리스(Adcetris)와 캐드사일라(Kadcyla)가 미국에서 시판 승인되었으며 양호한 임상 효능이 입증되었다. 50개가 넘는 ADC 약물들이 임상 시험 단계에 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0006] 본 개시는 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체(TDC), 상기 항체-세포독소 접합체의 제조 방법, 및 그의 사용 방법을 제공한다.

[0007] 하나의 태양에서, 본 출원은 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 시스테인 삽입 부위는 표적 항체 중 하기 3개의 삽입 부위 또는 삽입 위치 중 하나 이상을 포함한다: 경쇄 205번 위치(카밧 넘버링 체계(Kabat numbering scheme), 여기에서 인근 아미노산 서열은 GLSSPCVTKSF를 포함하며, 이때 C가 삽입된 시스테인이다), 경쇄 206(카밧 넘버링 체계, 여기에서 인근 아미노산 서열은 GLSSPVCTKSF를 포함하며, 이때 C가 삽입된 시스테인이다), 및 중쇄 439번 위치(카밧 넘버링 체계, 여기에서 인근 아미노산 서열은 YTKSLSCLSPGK를 포함하며, 이때 C가 삽입된 시스테인이다).

[0008] 상기 시스테인 삽입 돌연변이들 중 하나 이상을 포함하는 항체는 모 항체처럼 항원에 결합하는 능력(친화력)을 유지한다. 하나의 실시태양에서, 본 개시는 링커-약물(즉 링커-세포독소)과 시스테인 티올기에 의한 항체-세포독소 접합체(TDC)의 부위-지향된 커플링(site-directed coupling)을 제공하며, 여기에서 상기 티올기는 상기 경쇄의 205번 및/또는 206번 위치 및/또는 상기 중쇄의 439번 위치내로 삽입된 시스테인으로부터 유래한다.

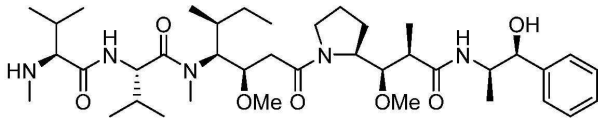
[0009] 하나의 실시태양에서, 본 출원은 부위-특이적 삽입된 시스테인을 포함하는 항체를 포함하는, 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체를 제공하며, 이때 시스테인 삽입 부위는 하기 3개의 삽입 부위 중에서 선택된 하나 이상의 부위를 포함한다: 카파/람다 경쇄 불변 영역 205번 위치(카밧 넘버링 체계), 카파/람다 경쇄 불변 영역 206번 위치(카밧 넘버링 체계), 또는 IgG 항체 중쇄 불변 영역 439번 위치(카밧 넘버링 체계).

[0010] 상기 시스테인 삽입 부위 인근의 아미노산 서열은 하기 3개의 서열 중 하나 이상을 포함한다: LC-205ins:GLSSPCVTKS; LC-206ins:GLSSPVCTKSF 또는 HC-439ins:TQKSLSCLSPGK.

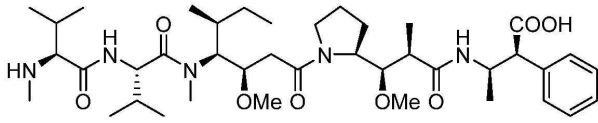
[0011] 하나의 실시태양에서, 고효성 세포독소는 항체의 특정한 시스테인 삽입 부위내에 삽입된 개조된 시스테인으로부터의 유리 티올기에 링커를 통해 접합되며, 여기에서 상기 항체 경쇄는 GLSSPCVTKSF 또는 GLSSPVCTKSF의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 항체 중쇄는 TQKSLSCLSPGK의 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 상기 C는 상기 항체의 경쇄 205번 위치, 경쇄 206번 위치, 또는 중쇄 439번 위치내에 삽입된 시스테인이다.

[0012] 하나의 실시태양에서, 상기 항체 경쇄는 카파(κ) 또는 람다(λ) 아이소타입(isotype)을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 항체 중쇄는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 삽입된 시스테인은 티올기(-SH)를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 티올기(-SH)는 화학적 접합이 가능하다.

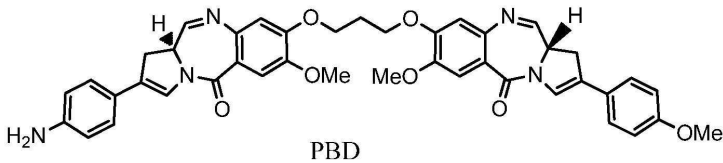
[0013] 하나의 실시태양에서, 저 분자량의 고효성 세포독소는 상기 삽입된 시스테인의 유리 티올기에 링커를 통해 부위-특이적으로 연결되며; 상기 저 분자량의 고효성 세포독소는 비제한적으로 MMAE, MMAF, PBD, SN-38, Dox 및 이들의 유도체를 포함할 수 있다. 예시적인 세포독소 MMAE, MMAF, PBD, SN-38, Dox의 화학식을 하기에 나타낸다:



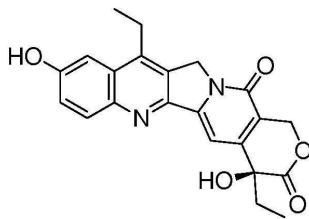
MMAE



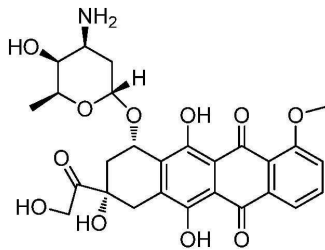
MMAF



PBD



SN-38



DOX

[0014]

[0015]

추가로 태양에서, 본 출원은 시스테인 개조된 항체-세포독소 접합체의 생성 방법을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 방법은 상기 항체를 환원 시약(예를 들어 DTT, TCEP 등)으로 환원시켜 환원된 항체를 제공하는 단계로서, 상기 항체의 삽입된 시스테인으로부터 차폐기(shielding group)를 제거하여 유리 티올기를 제공하는 단계; 상기 환원 시약 및 상기 제거된 차폐기를 양이온 교환 크로마토그래피 또는 한외여과에 의해 제거하는 단계; 상기 환원된 항체를 산화제(예를 들어 DHAA, CuSO₄)로 산화시켜 상기 항체의 쇠간 디설파이드 결합(interchain disulfide bond)을 재-연결시키는 단계; 링커-약물(즉, 링커-세포독소)을 가하여 상기 개조된 시스테인으로부터의 유리 티올기와 접합시키는 단계; 및 접합되지 않은 링커-약물을 양이온 교환 크로마토그래피 또는 한외여과에 의해 제거하는 단계를 포함한다.

[0016] 아미노산 목록:

명칭	기호 및 약어
알라닌	A 및 Ala
아르기닌	R 및 Arg
아스파라긴	N 및 Asn
아스파르트산	D 및 Asp
시스테인	C 및 Cys
글루타민	Q 및 Gln
글루탐산	E 및 Glu
글리신	G 및 Gly
히스티딘	H 및 His
이소류신	I 및 Ile
류신	L 및 Leu
리신	K 및 Lys
메티오닌	M 및 Met
페닐알라닌	F 및 Phe
프롤린	P 및 Pro
세린	S 및 Ser
쓰레오닌	T 및 Thr
트립토판	W 및 Trp
티로신	Y 및 Tyr
발린	V 및 Val

[0017]

[0018] 서열번호: 6 LC-Cys205insc 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0019] >LC-Cys205ins-카파

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPCVTKSFNRGEC

[0020]

[0021] 여기에서, 상기 GLSSPCVTKSFN 중 C는 부위-특이적 접합 위치이다. 하나의 실시태양에서, 상기 시스테인은 mc-vc-PAB-페이로드와 부위-특이적으로 접합한다.

[0022] 서열번호: 8 LC-Cys206insc 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0023] >LC-Cys206ins-카파

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPCVTKSFNRGEC

[0024]

[0025] 여기에서, 상기 GLSSPCVTKSFN 중 C는 부위-특이적 접합 위치이다. 하나의 실시태양에서, 상기 시스테인은 mc-vc-PAB-페이로드와 부위-특이적으로 접합한다.

[0026] 서열번호: 10 IgG1-Fc-Cys439ins 중쇄 불변 영역 (Fc) 아미노산 서열

[0027] >IgG1-Fc-Cys439ins

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0028]

[0029] 여기에서, 상기 TQKLSLSPGK 중 L는 부위-특이적 접합 위치이다. 하나의 실시태양에서, 상기 시스테인은 mc-vc-PAB-페이로드와 부위-특이적으로 접합한다.

[0030] 서열번호: 12 LC-V205C 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0031] >LC-V205C-카파

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLS

[0032] KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC

[0033] 여기에서, 상기 GLSSPCTKSFN 중 C는 부위-특이적 접합 위치이다. 하나의 실시태양에서, 상기 시스템은 mc-vc-PAB-페이로드와 부위-로 접합한다.

[0034] 본 개시는 비-부위-특이적 접합된 ADC와 비교시, 비제한적으로 양호한 균일성과 낮은 부작용을 포함한 현저한 이점을 제공하는 신규의 시스템인 개조된 항체-세포독소 접합체(TDC)를 개시한다. 전임상 연구는 상기 신규의 항체 접합체가 비-부위-특이적 접합된 ADC보다 현저하게 우수함을 입증하였다.

[0035] 본 출원의 목적 및 이점은 첨부되는 도면과 관련하여 하기 본 출원의 바람직한 실시태양들의 상세한 기재로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 본 개시의 상기 및 다른 특징들은 첨부되는 도면과 함께, 하기의 기재 및 첨부된 청구항들로부터 보다 충분히 자명해질 것이다. 이들 도면이 단지 본 개시에 따라 배열된 여러 실시태양들만을 묘사하고 따라서 그의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않음을 이해하면서, 본 개시를 첨부되는 도면의 사용을 통해 추가적인 특수성 및 세부사항으로 기재할 것이며, 도면에서:

도 1은 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 2는 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 3은 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 4는 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 5는 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 6은 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 7은 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 8은 실시예 25에서 수행된 바와 같이, HIC-HPLC 방법에 의해 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 9는 실시예 26에서 수행된 바와 같이, RP-HPLC 방법에 의해 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE의 독소/항체 비를 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이다.

도 10은 실시예 27에서 수행된 바와 같이, SEC-HPLC 방법에 의해 TDC 항체 골격 4D3 응집을 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 11은 실시예 27에서 수행된 바와 같이, SEC-HPLC 방법에 의해 TDC 항체 골격 4D3-LC-Cys205ins 응집을 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 12는 실시예 27에서 수행된 바와 같이, SEC-HPLC 방법에 의해 TDC 항체 골격 4D3-LC-Cys206ins 응집을 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 13은 실시예 27에서 수행된 바와 같이, SEC-HPLC 방법에 의해 TDC 항체 골격 4D3-HC-Cys439ins 응집을 검출 및 측정된 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 14는 실시예 28의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 15는 항원 c-met와 항체 4E1 및 TDC 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 및 4E1-HC-Cys439ins-MVPM간의 친화력 측정을 나타내는, 실시예 29의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 16은 항원 Trop2와 항체 4D3 및 TDC 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 및 4D3-HC-Cys439ins-MVPM간의 친화력 측정을 나타내는, 실시예 29의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 17은 암세포에 대한 ADC의 세포독성의 IC₅₀을 나타내며, 여기에서 상기 ADC는 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE, 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 및 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE이고, 상기 암세포는 EGFRwt-과발현 인간 편평세포 암종 A431이며;

도 18은 암세포에 대한 ADC의 세포독성의 I₅₀을 나타내며, 여기에서 상기 ADC는 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE, 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 및 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE이고, 상기 암세포는 EGFRvIII-과발현 인간 신경교종 세포주 U87-EGFRvIII이며;

도 19는 암세포에 대한 ADC의 세포독성의 IC₅₀을 나타내며, 여기에서 상기 ADC는 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 및 4E1이고, 상기 암세포는 C-met 고-발현 악성 신경교종 세포주 U87-MG이며;

도 20은 암세포에 대한 ADC의 세포독성의 IC₅₀을 나타내며, 여기에서 상기 ADC는 D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 및 4D3이고, 상기 암세포는 trop2 고-발현 췌장암 세포주 BXPC-3이고;

도 21은 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 인간 혈장에서의 안정성 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 22는 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 인간 혈장에서의 안정성 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 23은 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 인간 혈장에서의 안정성 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 24는 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 인간 혈장에서의 안정성 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 25는 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 인간 혈장에서의 안정성 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 26은 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 인간 혈장에서의 안정성 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

도 27은 중앙-함유 마우스에서 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 및 4D3 모 항체에 대한 약역학적 효과 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이고;

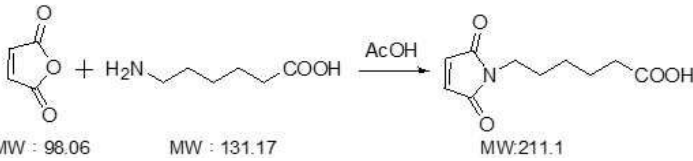
도 28은 중앙-함유 마우스에서 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 및 4D3 모 항체에 대한 약역학적 효과 측정의 시험 결과를 나타내는 도해이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037]

하기의 상세한 설명에서, 그의 일부를 형성하는 첨부 도면을 참조한다. 도면에서, 유사한 기호들은 문맥상 달리 지시되지 않는 한, 전형적으로 유사한 성분들을 나타낸다. 상기 상세한 기재, 도면 및 청구항들에 기재된 예시적인 실시태양들은 제한임을 의미하지 않는다. 다른 실시태양들을 사용할 수도 있으며, 본 명세서에 제공된 발명의 요지의 진의 또는 범위로부터 이탈되지 않으면서 다른 변화들을 수행할 수도 있다. 본 명세서에 일반적으로 기재되고 도면에 예시된 바와 같은 본 개시의 태양들을 광범위하게 다양한 상이한 구성으로 배열, 치환, 병행, 분리 및 구상할 수 있으며, 이들은 모두 본 명세서에서 명백하게 고려된다.

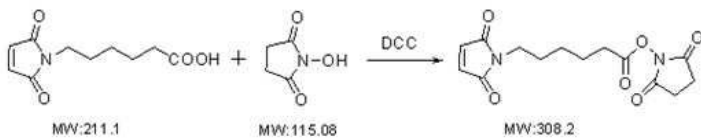
[0038] 실시예 1: mc의 합성 및 제조



[0039]

[0040] 6-아미노카프로산(3.9 g, 0.03 mol) 및 말레산 무수물(3.5 g, 0.036 mol)을 빙초산(30 ml)에 가하였다. 120 °C에서 4-6h 동안 교반한 후에, 상기 반응물을 실온으로 냉각시켰다. 상기 아세트산의 대부분을 60 °C에서 진공 농축에 의해 제거하였다. 상기 수득된 갈색을 띤 황색의 점성 액체를 수(water)에 붓고, 이어서 에틸 아세테이트(20 ml x 3)로 추출하고, 유기층들을 합하였다. 상기 유기층들을 수 및 염수로 세척하고, 무수 황산 나트륨상에서 건조시키고, 여과하고 진공하에서 증발시켜 갈색-황색 오일을 생성시켰으며, 이를 50 ml의 수 중에서 교반하여 백색 고체 물질이 상기 용액으로부터 침전되었고, 상기 백색 고체 물질을 여과하고 생성물을 감압하에 50 °C에서 건조시켜 5.08 g, 수율 80%를 생성시켰다. Mp: 89-92 °C. m/z: 212.2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400Mz, DMSO): 13.21 (br, 1H, COOH), 6.75 (s, 2H, COCH=CHCO), 3.63 (t, 2H, J = 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.42 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CH₂COOH), 1.52 - 1.68 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₂), 1.30 - 1.42 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH₂).

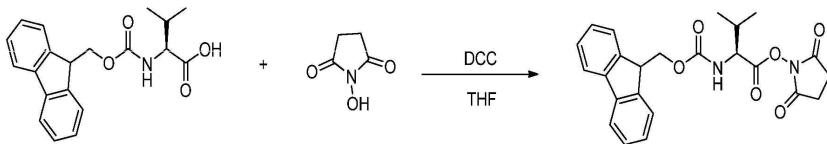
[0041] 실시예 2: Mc-OSu의 합성 및 제조



[0042]

[0043] 질소 분위기하에서, 0 °C에서 아세트니트릴(50 ml) 중의 MC(4.7 g, 22 mmol) 및 HOSu(25 g, 22 mmol)의 혼합물의 용액에 25 ml 아세트니트릴 중에 용해된 DCC(4.5 g, 22 mmol)를 서서히 가하였다. 상기 반응 용액을 0 °C에서 2시간 동안 반응시키고 이어서 실온에서 밤새 반응되게 하였다. 여과 후에, 필터 케이크(filter cake)를 아세트니트릴(10 ml x 3)로 세척하였다. 상기 여액을 감압하에서 농축 건조시켰다. 상기 수득된 오일을 감압하에 실온에서 6h 동안 건조시켜 6.4 g의 담갈색 고체를 95% 수율로 제공하였다. (정제 없이 다음 단계에 직접 사용된다) m/z: 309.2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400Mz, CDCl₃): 1~2 (m, 6H, CCH₂CH₂CH₂C), 2.68 (t, 2H, CH₂CO), 2.95 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 3.68 (t, 2H, CH₂N), 6.81 (s, 2H, CH=CH)

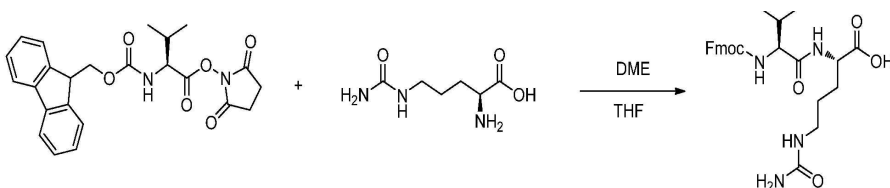
[0044] 실시예 3: Fmoc-Val-OSu의 합성 및 제조



[0045]

[0046] 0 °C에서 THF(100 ml) 중의 Fmoc-Val(10 g) 및 HOSu(3.4 g)의 혼합물의 용액에 50 ml 아세트니트릴 중에 용해된 DCC(6 g)를 서서히 가하였다. 상기 반응 용액을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 여과를 수행하고, 필터 케이크를 THF로 세척하였다. 감압하에서 상기 여액을 농축시킴으로써 투명한 오일을 수득하였다. 상기 오일을 추가의 정제 없이 다음 단계에 직접 사용하였다. m/z: 437.4[M+H]⁺.

[0047] 실시예 4: Fmoc-vc의 합성 및 제조



[0048]

[0049] THF(20 ml) 중의 Cit(4.0 g)의 용액에 60 ml 수성 탄산수소나트륨(NaHCO₃ 2 g, 1.05 eq 함유) 용액을 가하였다. DME(60 ml) 중의 Fmoc-Val-OSu(22.35 mmol)의 용액을 상기 혼합물에 가하였다. 실온에서 24시간 동안 교반 후에, 상기 반응물을 15% 수성 시트르산 용액(110 ml)에 가하고, 이어서 EtOAc로 2회 추출하였다. 합한 유기상들

을 진공하에서 농축시켜 백색 고체를 수득하였다. 100 ml의 메틸 3급-부틸 에테르를 상기 백색 물질에 가하고, 상기 혼합물을 교반하고, 여과하고, 필터 케이크를 40 °C에서 4h 동안 감압하에서 건조시켜 생성물 4.83 g, 수율 65%를 수득하였다. m/z: 497.6 (M+H)⁺. ¹HNMR(400Mz,DMSO): 0.92 (6H, m), 1.35 ~ 1.65 (4H, m), 2.10 (1H, m), 3.01(2H, q), 3.99 (1H, t), 4.01 -4.45 (2H, m), 4.45 (2H, t), 5.46 (2H, br), 6.03(1H, t), 7.20-8.02 (8H, m), 8.25 (1H, d).

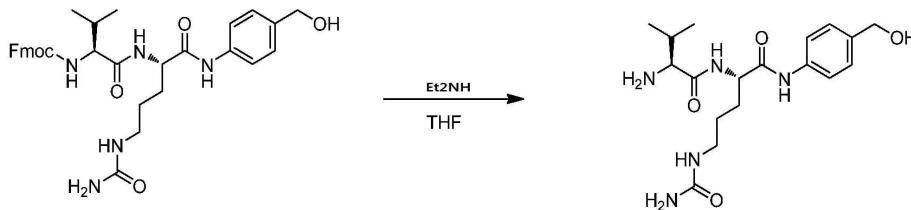
[0050] 실시예 5: Fmoc-vc-PABOH의 합성 및 제조



[0051]

[0052] DCM/MeOH = 2/1(60 ml) 중의 Fmoc-vc(2 g, 4.2 mmol) 및 PABOH(1.04 g, 2 eq)의 용액에 0 °C에서 EEDQ(2.0 g, 2 eq)를 가하였다. 10분 동안 교반 후에, MeOH(200 ml) 중의 (S)-1-페닐에탄아민(17.5 g, 144.2 mmol)의 용액을 부분 용해 후에 상기 혼합물에 서서히 가하였다. 상기 반응 시스템을 암실에서 2일 동안 실온에서 교반하였다. 상기 반응의 완료 후에, 상기 혼합물을 40 °C에서 진공하에서 농축시켜 백색 고체를 생성시켰다. 상기 백색 고체를 수집하고, 메틸 3급-부틸 에테르(100 ml)로 세척하고 여과하였다. 필터 케이크를 메틸 3급-부틸 에테르로 세척하고, 상기 수득된 백색 고체를 감압하에 40 °C에서 건조시켜 백색 고체 2.2 g, 수율 88%를 제공하였다. m/z: 602.6 (M+H)⁺. ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0.95 (6H,m), 1.45~1.69 (4H, m), 2.10 (1H, m), 3.11(2H, m), 3.99 (1H, m), 4.30 (2H, d), 4.05~-4.66 (2H, m), 4.55 (2H, d), 5.21 (1H, t), 5.51 (2H, br), 6.11(1H, t), 7.09 -8.10 (12H, m), 8.21 (1H, d), 10.51(1H, br).

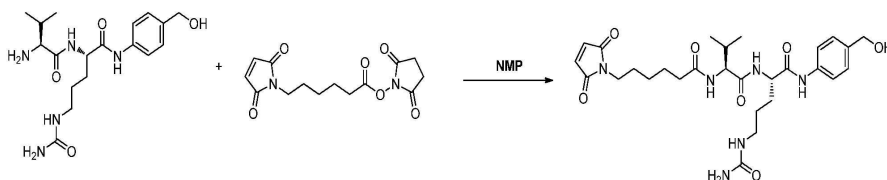
[0053] 실시예 6: vc-PABOH의 합성 및 제조



[0054]

[0055] THF(10 ml) 중의 Fmoc-vc-PABOH(490 mg, 0.815 mmol)의 용액에 디에틸아민(2 ml)을 가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 24h 동안 교반하였다. 20 ml의 DCM을 상기 수득된 생성물에 가하고, 상기 혼합물을 교반하였으며, 반응 용액으로부터 결정이 침전되었다. 상기 결정을 여과하고 필터 케이크를 DCM으로 세척하고, 상기 수득된 고체를 감압하에서 건조시켜 277 mg을 생성시켰다. 수율은 90%였다. m/z: 380.2 (M+H)⁺. ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0.89 (6H, m), 1.31~1.61 (4H, m), 1.82 (1H, m), 2.86 (1H, m), 2.89(2H, d), 4.38 (2H, d), 4.44 (1H, m), 5.01 (1H, br), 5.35 (2H, br), 5.84 (1H, br), 7.14 (2H, d), 7.42 (2H, d), 8.08 (1H, br), 9.88 (1H, br).

[0056] 실시예 7: mc-vc-PABOH의 합성 및 제조

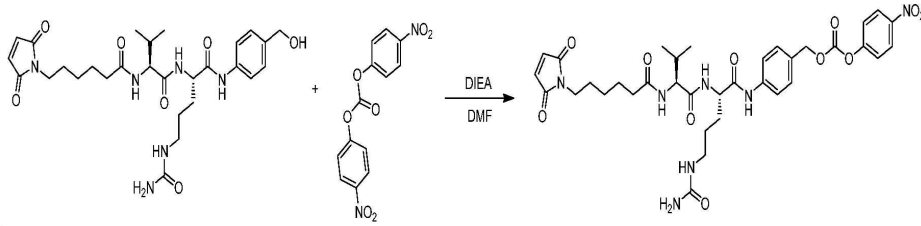


[0057]

[0058] VP-PABOH(205 mg, 0.54 mmol) 및 MC-OSu(184 mg, 1.1 eq)를 10 ml의 NMP에 가하고, 상기 반응물을 실온에서 24h 동안 교반하였다. 상기 반응의 완료 후에, 상기 혼합물을 40 °C에서 진공하에 농축시켰다. 메틸 3급-부틸 에테르(20 ml)를 상기 수득된 오일에 가하고 교반하여 결정화시켰다. 상기 결정을 여과하고 필터 케이크를 메틸 3급-부틸 에테르로 세척한 후에, 생성물 310 mg이 생성되었다. 수율은 100%이다. m/z: 573.3 (M+H)⁺. ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0.89 (6H, m), 1.15-1.99 (10H, m), 2.11(1H, m), 2.31 (2H, t), 3.21(2H, m), 3.53 (2H, t), 4.32 (1H, t), 4.51 (1H, m), 4.59 (2H, br), 5.24 (1H, br), 5.56 (2H, br), 6.20(1H, br),

7.12(2H, s), 7.23(2H, d), 7.58 (2H, d), 7.94 (1H, d), 8.17 (1H, d), 10.21 (1H, br)

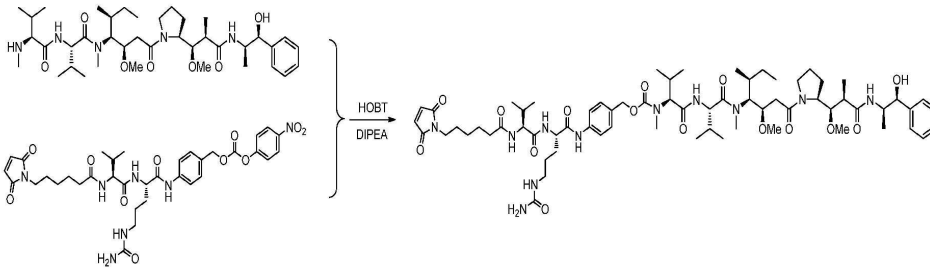
[0059] 실시예 8: mc-vc-PAB-PNP의 합성 및 제조



[0060]

[0061] 질소하에서, 무수 피리딘(5 ml) 중의 mc-vc-PABOH(166.0 mg, 0.294 mmol)의 용액에 DCM(5 ml) 중에 용해된 PNP(179 mg, 3 eq)를 0 °C에서 서서히 가하였다. 약 0 °C에서 10분 동안 교반 후에, 빙욕을 제거하고, 상기 반응물을 실온에서 3h 동안 교반하였다. 상기 반응의 완료 후에, EA(70 ml) 및 15% 수성 시트르산 용액(100 ml)을 가하고, 유기층을 분리시키고 회수하였다. 상기 유기층을 시트르산, 수, 염수로 연속적으로 세척하고, 무수 황산 나트륨으로 건조시키고, 여과하고, 상기 여액을 감압하에서 농축시켜 밝은 황색을 띤 유질 생성물을 생성시켰다. 결정화를 위해 메틸 3급-부틸 에테르를 가하여 백색같은 고체(86 mg)를 생성시켰다. 수율은 40%였다. m/z: 738(M+H)⁺. ¹HNMR (400Mz, CDC13/CD3OD): 0.84 (6H, m), 1.11-1.84 (10H, m), 2.05 (1H, m), 2.15 (2H, t), 3.09 (2H, m), 3.32 (2H, t), 4.12 (1H, m), 4.38 (1H, m), 5.15 (2H, s), 6.61 (2H, s), 6.84 (1H, d), 7.61 (1H, d), 7.21 (2H,d), 7.50 (2H,d), 7.61 (2H,d), 8.18 (2H, d), 9.59 (1H, br)

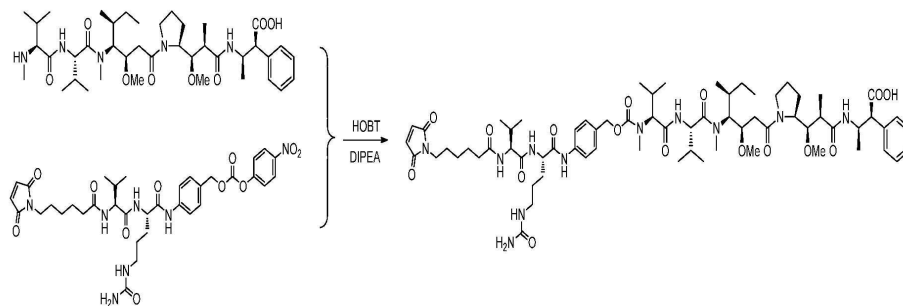
[0062] 실시예 9: mc-vc-PAB-MMAE의 합성 및 제조



[0063]

[0064] 20 mg의 mc-vc-PAB-PNP(1.5 eq) 및 3 mg의 HOBT를 2 ml의 DMF에 가하였다. 실온에서 잠시 교반 후에, 13 mg의 MMAE, 0.5 ml의 피리딘 및 25 ul의 DIPEA를 가하였다. 상기 반응 용액을 실온에서 2d 동안 교반하였다. 상기 반응의 완료 후에, 상기 반응 용액을 예비 컬럼에 의해 직접 정제시키고, 목적하는 성분들을 수집하고, 농축시키고, 동결건조시켜 약 10 mg의 생성물을 수득하며, 수율은 약 42%이다. m/z:1317.1(M+H)⁺.

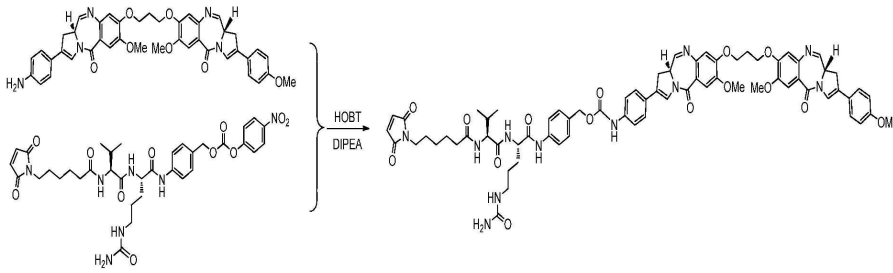
[0065] 실시예 10: mc-vc-PAB-MMAF의 합성 및 제조



[0066]

[0067] 실시예 9의 단계들에 따라 실행하여 약 12.5 mg의 mc-vc-PAB-MMAF를 수득하였으며, 수율은 45.2%였다.

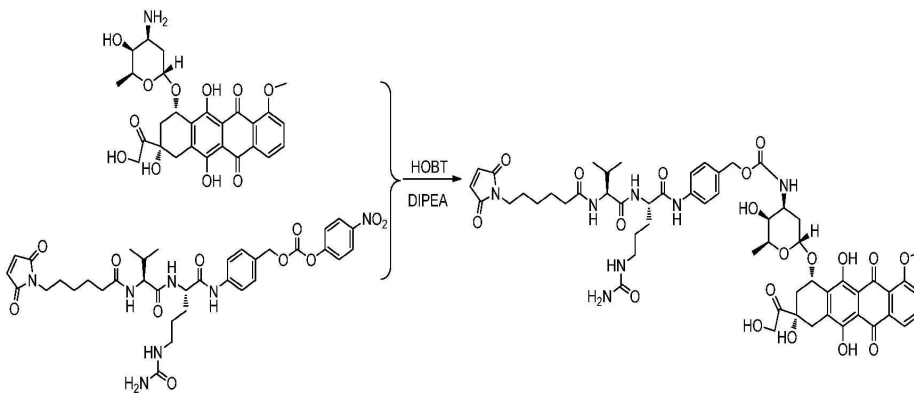
[0068] 실시예 11: mc-vc-PAB-PBD의 합성 및 제조



[0069]

[0070] 실시예 9의 단계들에 따라 실행하여 약 9.5 mg의 mc-vc-PAB-PBD를 수득하였다. 수율은 32.5%였다. m/z: 1325.4(M+H)+.

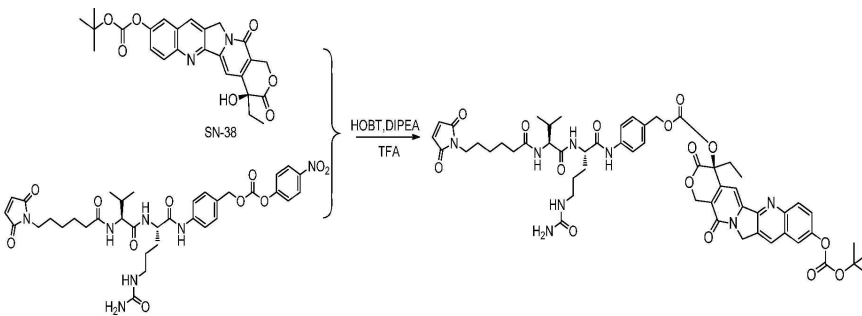
[0071] 실시예 12: mc-vc-PAB-DOX의 합성 및 제조



[0072]

[0073] 실시예 9의 단계들에 따라 실행하여 약 11.2 mg의 mc-vc-PAB-DOX를 수득하였다. 수율은 38.9%였다. m/z: 1143.2(M+H)+.

[0074] 실시예 14: mc-vc-PAB-SN-38의 합성 및 제조



[0075]

[0076] 100 mg의 10-O-Boc-SN-38을 10 ml의 무수 디클로로메탄에 용해시키고, 25.6 mg(1 eq)의 DMAP를 상기 용매에 가하고, 디클로로메탄 중의 트리포스젠의 용액을 0 °C에서 적가하고(62 mg의 트리포스젠을 2 ml의 디클로로메탄에 용해시켰다), 상기 반응을 0 °C에서 12h 동안 계속하였다. 상기 디클로로메탄을 감압하에서 제거하였다. 조 생성물을 10 ml의 무수 DMF에 용해시키고, 이어서 144 mg의 mc-vc-PABOH를 가하고, 상기 혼합물을 실온에서 24h 동안 교반하였다. 41 mg의 mc-vc-PAB-SN-38을 예비 액상 분리에 의해 분리하였으며, 2 단계의 총 수율은 19.7%였다. m/z: 1063.2(M+H)+.

[0077] 실시예 15: 표적 항체 발현 및 정제

[0078] 표적 항체를 프리스타일(Freestyle)TM 293-F(인비트로젠(Invitrogen)) 현탁 세포를 사용하여 발현시켰다. 형질 감염 하루 전에, 세포를 300 ml의 F17 완전 배지(프리스트라일TM F17 발현 배지, 깁코(Gibco))를 함유하는 1 L 진탕 플라스크에 6 x 10⁵ 세포/ml의 밀도로 시딩(seeding)하고, 37 °C, 5% CO₂, 120 rpm에서 세포 배양기에서 진

탕에 의해 밤새 증식시켰다. 다음날, 상기 항체 발현 플라스미드의 형질감염을 PEI로 수행하였으며, 여기에서 플라스미드:PEI의 비는 2:1이었다. 상기 형질감염 하루 후에, 상기 TN1 공급 배지를 2.5%(v/v)로 가하고, 상기 배양을 4일 동안 계속하고, 상등액을 원심분리에 의해 수집하였다.

[0079] 상기 수집된 세포 발현 상등액을, 0.1 M 시트르산(pH 3.0)으로 용출시키면서 단백질 An 친화성 크로마토그래피 컬럼(맵셀렉트 슈어(Mabselect Sure) LX, GE)에 의해 용출시키고, 포획된 항체를 1 M 트리스-HCl(pH 9.0)로 처리하고 1/10(v/v)으로 pH 7.0으로 조절하였다. 다량체 및 내독소와 같은 불순물을 젤 여과 컬럼 SEC(슈퍼덱스(Superdex) 200, GE)에 의해 제거하고, 동시에 상기 항체 완충제를 PBS(pH 7.4)로 교체하고, UV280 nm의 표적 피크의 샘플을 수집하고 한외여과 원심분리기 튜브(30 KD, 폴 코포레이션(Pall Corporation))를 통해 2 mg/ml로 농축시켰다. 상기 방법에 의해 수득된 표적 항체 단량체(POI%)는 90%를 초과하였으며 이를 후속 실험을 위해 보관하였다.

[0080] 실시예 16: 2A1-HC-Cys439ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC의 합성 및 제조

[0081] 상기 세포에 의해 발현된 2A1-HC-Cys439ins 항체를 맵셀렉트 슈어(Mabselect Sure)와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 2A1-HC-Cys439ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 수득하였다.

[0082] 실시예 17: 2A1-LC-Cys205ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0083] 상기 세포에 의해 발현된 2A1-LC-Cys205ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 2A1-LC-Cys205ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 수득하였다.

[0084] 실시예 18: 2A1-LC-Cys206ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0085] 상기 세포에 의해 발현된 2A1-LC-Cys206ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 2A1-LC-Cys206ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA

용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 획득하였다.

[0086] 실시예 19: 4D3-HC-Cys439ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0087] 상기 세포에 의해 발현된 4D3-HC-Cys439ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 4D3-HC-Cys439ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다.

[0088] 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 획득하였다.

[0089] 실시예 20: 4D3-LC-Cys205ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0090] 상기 세포에 의해 발현된 4D3-LC-Cys205ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 4D3-LC-Cys205ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 획득하였다.

[0091] 실시예 21: 4D3-LC-Cys206ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0092] 상기 세포에 의해 발현된 4D3-LC-Cys206ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 4D3-LC-Cys206ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 획득하였다.

[0093] 실시예 22: 4E1-HC-Cys439ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0094] 상기 세포에 의해 발현된 4E1-HC-Cys439ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 4E1-HC-Cys439ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 수득하였다.

[0095] 실시예 23: 4E1-LC-Cys205ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0096] 상기 세포에 의해 발현된 4E1-LC-Cys205ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 4E1-LC-Cys205ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 수득하였다.

[0097] 실시예 24: 4E1-LC-Cys206ins 항체 및 mc-vc-PAB-MMAE의 접합/커플링에 의한 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플의 합성 및 제조

[0098] 상기 세포에 의해 발현된 4E1-LC-Cys206ins 항체를 맵셀렉트 슈어와 같은 단백질 A 수지에 의해 정제하고, 저 pH 용액으로 용출시키고, 상기 저 pH 용출 직후에 트리스 용액의 첨가에 의해 중화시키고, 상기 용액을 pH 7.5 트리스-HCl 완충제로 변화시켰다. 백색 분말인 상기 mc-vc-PAB-MMAE 화합물을 사용을 위해 DMA에 용해시켰다. 돌연변이 시스테인 잔기상의 차폐기를 제거하기 위해서, 상기 항체를 먼저 환원시켰다. DTT의 1 M 수용액을 상기 4E1-LC-Cys206ins 항체 용액에 1:40의 분자 비로 가하고, 상기 혼합물을 고르게 혼합하고 20 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응시간에 도달한 후에, 상기 샘플의 pH를 5.0으로 조절하고, 상기 혼합물 중의 DTT 및 차폐기를 SP 세파로스 F.F. 수지와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 후속적으로, DHAA 용액을 상기 샘플에 1:20의 분자 비로 가하고 암실에서 25 °C에서 4시간 동안 반응시켜 쇠간 디설파이드 결합을 다시-연결시켰다. 후속적으로, mc-vc-PAB-MMAE 용액을 가하여 상기 mc-vc-PAB-MMAE를 상기 항체 중의 삽입된 또는 돌연변이 시스테인과 커플링시키고, 상기 혼합물을 철저히 혼합하고 25 °C에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응의 종료 후에, 상기 항체가 커플링되지 않은 mc-vc-PAB-MMAE를 SP 세파로스 F.F.와 같은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하여 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 샘플을 수득하였다.

[0099] 실시예 25: HIC-HPLC에 의한 독소:항체 비(DAR, 약물 항체 비)의 측정

[0100] 상기 TDC 샘플을 소수성 크로마토그래피와 함께 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 분석하고, 약물:항체 비(DAR, 또한 독소:항체 비로서도 공지됨)를 상응하는 피크 면적으로부터 계산하였다. 한 가지 구체적인 방법을 하기와 같이 상세히 기재한다:

[0101] 컬럼: 프로테오믹스(Proteomix)[®] HICBu⁻NP5(5 μm, 4.6 x 35 mm);

[0102] 이동상: 완충제 A: 2 M 암모늄 설페이트, 0.025 M, pH 7 포스페이트 완충제; 완충제 B: 0.025 M, pH 7 포스페이트 완충제; 완충제 C: 100% 이소프로판올;

[0103] 완충제 A는 평형화에 사용되었고, 완충제 B 및 완충제 C는 구배 용출에 사용되었으며, 검출을 25 °C, 214 nm 및 280 파장에서 수행하였다. 도 1 내지 3으로부터 모은 데이터를 근거로, 부위-특이적으로 커플링된 DAR이 1.6 내지 1.7인 것으로 계산되며, 이는 탁월한 화합물 균일성 또는 균질성을 나타낸다. 도 4 내지 6으로부터 모은 데이터를 근거로, 상기 부위-특이적으로 커플링된 DAR은 1.6 내지 1.95인 것으로 계산되며, 이는 탁월한 화합물 균일성 또는 균질성을 나타낸다. 도 7 내지 8로부터 모은 데이터를 근거로, 상기 부위-특이적으로 커플링된 DAR은 1.6 내지 1.9인 것으로 계산되며, 이는 탁월한 화합물 균일성 또는 균질성을 나타낸다.

[0104] 실시예 26: RP-HPLC에 의한 독소:항체 비(DAR, 약물 항체 비)의 측정

[0105] 상기 독소 대 항체의 비를 RP-HPLC에 의해 측정하였다. DTT로 처리된 샘플들을 역상 소수성 고정능 액체 크로마토그래피에 의해 분석하고, DAR을 상응하는 피크 면적으로부터 계산하였다. 한 가지 구체적인 방법을 하기와 같이 상세히 기재한다:

[0106] 컬럼: 프로테오믹스 RP-1000(5 μm, 4.6 x 100 mm)

[0107] 이동상: 완충제 A: 0.1% TFA 수용액; 완충제 B: 0.1% 아세트니트릴 용액.

[0108] 이동상 A 및 이동상 B를 80 °C에서 비례적인 구배로 용출시키는데 사용하였고, 측정을 214 nm 및 280 파장에서 수행하였다. 도 9에서 모은 데이터를 근거로, 부위-특이적으로 커플링된 DAR이 1.82인 것으로 계산되었으며, 이는 탁월한 화합물 균일성 또는 균질성을 나타낸다.

[0109] [표 1]

[0110] ADR: 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-LC-Cys206ins--mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 커플링 효율 DAR 목록

	화합물	DAR
부위-특이적인 커플링 (TDC)	2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.81
	2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.72
	2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.65
	2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.74
	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.92
	4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.64
	4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.75
	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.81
	4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.74
	4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.82

[0111]

[0112] 표 1은 시스템인 삽입 돌연변이 개조에 의한 부위-지향된 TDC 화합물의 커플링 효율이 균일하게 높음(이론적으로 최대는 2.0이다)(DAR ≥ 1.6)을 나타낸다.

[0113] 실시예 27: SEC-HPLC에 의한 TDC 항체 골격 응집의 측정

[0114] TDC 항체 골격 샘플을 37 °C에서 보관하였으며, 그의 응집을 각각 0, 7, 21 및 29일째에 SEC-HPLC에 의해 분석하였다. 한 가지 구체적인 방법을 하기와 같이 상세히 기재한다:

[0115] 크로마토그래피 컬럼: TSKge1 SuperSW mAb HR(7.8 mm x 30 cm),

[0116] 이동상: 0.1 M 황산 나트륨, 0.1 M, pH 6.7 포스페이트 완충제,

[0117] 측정을 25 °C, 280 nm에서 수행하였다.

[0118] 도 10 내지 13에 나타난 바와 같이, SEC-HPLC를 사용하여 TDC 항체 골격 4D3, 4D3-LC-Cys205ins, 4D3-LC-Cys206ins 및 4D3-HC-Cys439ins의 응집을 검출 및 측정하였다. 상기 샘플들을 37 °C에서 4주 동안 보관하였으며, 응집체 함량은 본질적으로 변하지 않은 채로 있었다.

[0119] 상기 동일한 검출 및 측정 방법을 사용하여, 하기 TDC들의 응집을 측정한다: 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-LC-Cys206ins--mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC. 결과를 표 II에 나타낸다.

[0120] [표 II]

[0121] 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 2A1-LC-Cys206ins--mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 TDS 표적 단량체 함량 목록

	화합물	POI%
부위-특이적인 커플링 (TDC)	2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC	96.0%
	2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	90.0%
	2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	90.4%
	2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	90.0%
	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	98.18%
	4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	94.34%
	4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	95.77%
	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	97.27%
	4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	96.06%
	4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	96.98%

[0122]

[0123] 표 II에 의해 나타난 바와 같이, 삽입된 시스테인에 의해 커플링된 TDC 화합물의 표적 단량체 함량은 90%를 초과한다.

[0124] 실시예 28: 시스테인 부위-지향된 돌연변이유발 및 삽입 돌연변이유발을 겪은 골격 항체 및 모 항체 및 EGFRvIII간의 친화력, 4E1 항체 및 c-met간의 친화력, 4D3 항체 및 Trop2간의 친화력의 측정

[0125] EGFRvIII에 대한 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins, 2A1-HC-Cys439ins 및 2A1의 상대적인 친화력을 간접적인 ELISA에 의해 비교하였다. 구체적인 단계들은 하기와 같다: 재조합 EGFRvIII-His*6 항원-코팅된 플레이트를 생선 껍질 젤라틴에 의해 차단하고; 항체 2A1, 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins 및 2A1-HC-Cys439ins를 각각 총 11개의 농도(최고 농도는 10 ug/ml이다)로 4배 구배에 의해 희석하고; HRP-표지된 2차 항체 배양을 수행하고; TMB 착색 후에, 흡수를 450 nm에서 검출하고 측정하였다. 상기 A450에서의 흡수 측정 결과를 농도에 대해 플롯팅하였다. 상기 돌연변이 항체 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins 및 2A1-HC-Cys439ins의 시스테인 부위-지향된 돌연변이유발 또는 삽입은 근접한 EC₅₀ 값들에 의해 나타난 바와 같이, 2A1에 유사한 EGFRvIII에 대한 친화력을 유지하였으며; 이들 결과는 상기 2A1 항체상의 경쇄 V205C의 부위-지향된 돌연변이유발, 상기 항체의 경쇄의 205번 위치에서의 삽입 돌연변이, 상기 항체의 경쇄의 206번 위치에서의 삽입 돌연변이, 또는 상기 항체의 중쇄의 439번 위치에서의 삽입 돌연변이가 상기 EGFRvIII 항원에 대한 그들의 친화력에 대해 영향을 미치지 않음을 가리킨다.

[0126] 도 14에 나타난 바와 같이, 상기 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins, 2A1-HC-Cys439ins 항체

들은 항원 EGFRvIII에 대한 2A1의 친화력을 유지한다.

- [0127] 실시예 29: 시스테인 부위-지향된 돌연변이유발 및 삽입 돌연변이유발을 겪고 같은 성질의 항원들에 대한 독소/약물에 결합된 골격 항체의 친화력, c-met에 대한 4E1 항체의 친화력, Trop2에 대한 4D3 항체의 친화력의 측정
- [0128] C-met에 대한 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 4E1-HC-Cys439ins-MVPM 및 4E1의 상대적인 친화력을 간접적인 ELISA에 의해 비교하였다. 구체적인 단계들은 하기와 같다:
- [0129] 제조합 C-met-His*6 항원-코팅된 플레이트를 생선 껍질 젤라틴에 의해 차단하고; TDC 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 4E1-HC-Cys439ins-MVPM 및 항체 4E1을 각각 총 11개의 농도(최고 농도는 10 ug/ml이다)로 4배 구배에 의해 희석하고; HRP-표지된 2차 항체 배양을 수행하고; TMB 착색 후에, 흡수를 450 nm에서 검출하고 측정하였다. 상기 A450에서의 흡수 측정을 농도에 대해 플롯팅하였으며, 그 결과는 상기 시스테인 부위-지향된 삽입 돌연변이를 갖는 항체들, TDC 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 및 4E1-HC-Cys439ins-MVPM이 근접한 EC₅₀ 값들에 의해 나타난 바와 같이, 4E1에 유사한 C-met에 대한 그들의 친화력을 유지하였으며; 이는 상기 4E1 경쇄의 205번 또는 206번 위치 또는 상기 4E1 중쇄의 439번 위치에서의 삽입 돌연변이가 상기 c-met 항원에 대한 상응하는 TDC의 결합 친화력에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.
- [0130] Trop2에 대한 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 4D3-HC-Cys439ins-MVPM 및 4D3의 상대적인 친화력을 간접적인 ELISA에 의해 비교하였다. 구체적인 단계들은 하기와 같다:
- [0131] 제조합 Trop2-His*6 항원-코팅된 플레이트를 생선 껍질 젤라틴에 의해 차단하고; TDC 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 4D3-HC-Cys439ins-MVPM 및 항체 4D3을 각각 총 11개의 농도(최고 농도는 10 ug/ml이다)로 4배 구배에 의해 희석하고; HRP-표지된 2차 항체 배양을 수행하고; TMB 착색 후에, 흡수를 450 nm에서 검출하고 측정하였다. 상기 A450에서의 흡수 측정을 농도에 대해 플롯팅하였다. TDC 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 및 4D3-HC-Cys439ins-MVPM은 근접한 EC₅₀ 값들에 의해 나타난 바와 같이, 4D3의 경우에 유사한 Trop2에 대한 그들의 친화력을 유지하였으며; 이는 상기 4D3 경쇄의 205번 또는 206번 위치 또는 상기 4D3 중쇄의 439번 위치에서의 삽입 돌연변이가 상기 Trop2 항원에 대한 상응하는 TDC의 결합 친화력에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.
- [0132] 도 15에 나타난 바와 같이, 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 4E1-HC-Cys439ins-MVPM 항체들은 항원 c-met에 대한 4E1의 친화력을 유지하였다.
- [0133] 도 16에 나타난 바와 같이, 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 4D3-HC-Cys439ins-MVPM 항체들은 항원 Trop2에 대한 4D3의 친화력을 유지하였다.
- [0134] 실시예 30: 세포독성 약학적 효능 시험
- [0135] TDC 세포독성 활성을 하기의 실험 과정에 의해 측정하였다: TDC를, EGFR이 과발현되었거나 또는 EGFRvIII이 발현된 인간 종양 세포의 배양 배지에 별도로 가하고, 세포 생존력(cell viability)을 세포 배양 72시간 후에 측정하였다. 세포-기반 시험관내 분석을 사용하여 본 개시 중의 세포 생존력, 세포독성, 및 TDC-유발된 세포사멸을 측정하였다.
- [0136] 상기 항체-세포독소 접합체의 시험관내 효능을 세포 증식 분석에 의해 측정하였다. 하나의 실시태양에서, 셀티터(CellTiter) 96[®] 수성 1 용액 세포 증식 분석(Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)을 상업적으로 입수할 수 있다(프로메가 코퍼레이션(Promega Corp.), 미국 위스콘신주 매디슨 소재). 상기 세포 증식 분석(a)은 세포 증식 및 세포독성 실험에서 생존성 세포의 수를 검출하기 위해 비색법을 사용하는 검출 시약이다. 상기 시약은 신규의 테트라졸륨 화합물 [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페닐)-2-(4-설포페닐)-2H-테트라졸륨, 분자내염; MTS] 및 전자 커플링제(페나진 에토설페이트; PES)를 함유한다. PES는 증대된 화학 안정성을 가지며, 이는 상기 PES가 MTS와 혼합되어 안정한 용액을 형성하게 한다. 이러한 편리한 "단일 용액" 모드는 1세대 셀티터 96[®] 수성 분석(여기에서 전자 커플링제 PMS 및 MTS 용액은 별도로 공급된다)에 기반한다. MTS(오웬(Owen)의 시약)은 세포에 의해, 착색된 포르마잔 생성물(이는 배지에 바로 용해된다)(도 1))로 생물학적으로 환원된다. 이러한 형질전환은 아마도 대사적으로 활성인 세포에서 데하이드로게나제에 의해 생성된 NADPH 또는 NADH의 작용에 의해 수행되는 듯하다. 검출을 위해서, 단순히 소량의 셀티터 96[®] 수성 1 용액 시약을 상기 배양 배지 웰에 직접 가하고, 1-4시간 동안 배양하고, 이어서 490 nm에서 미세플레이트 판독기로 흡광도를 판독한다.

이 205 및 206 삽입 돌연변이 TDC보다 약간 더 높음을 나타낸다.

[0143] U87-MG 세포에서 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC에 대한 세포독성 활성과 커플링 위치간에 일정한 상관성이 존재하였다. 상기 439 삽입된 돌연변이체의 TDC 활성은 상기 205 및 206 삽입 돌연변이체의 경우보다 약간 더 양호하였다. 상기 TDC의 활성은 모 항체의 경우보다 약간 더 양호하였다.

[0144] 췌장암 세포주 BXPc-3에서 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC의 세포독성 활성은 서로에 대해 필적하거나 유사하였으며, 상기 439 삽입 돌연변이체의 TDC 활성은 상기 205 및 206 삽입 돌연변이체의 경우보다 약간 더 양호하였고, 상기 TDC의 활성은 모 항체의 경우보다 약간 더 양호하였다.

[0145] 실시예 31: 혈장 안정성 시험

[0146] 일정량의 ADC 샘플을 취하여, 이를 인간 IgG가 제거된 인간 혈장에 가하고, 각각의 ADC에 대해 2개의 튜브를 반복하고, 37 °C 수욕에서 배양하고, 0h, 72h 동안 배양하고, ADC 샘플을 취하고, 100 μl 단백질A(PBS로 세척된 맵셀렉트 SuReTM LX Lot: #10221479 GE)를 가하고, 수직 믹서로 2h 동안 진탕시키고, 세척 및 용출 단계를 가하여 배양 후에 ADC를 수득한다. 일정 시간 동안 배양을 겪은 상기 샘플들에 HIC-HPLC 및 RP-HPLC를 가하여 상기 샘플들의 혈장 안정성을 측정하였다.

[0147] 도 21-23은 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC에 대한 인간 혈장 안정성에 대한 시험 결과를 나타낸다. 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 검출 방법은 RP-HPLC이고; 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE에 대한 검출 방법은 HIC-HPLC이다.

[0148] 도 24-26은 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC에 대한 인간 혈장 안정성에 대한 시험 결과를 나타낸다. 검출 방법은 HIC-HPLC이다.

[0149] [표 IV]

TDC 혈장 안정성 시험 결과(DAR의 변화에 의해 계산됨)			
	화합물	DAR	
		37°C 0h	37°C 72h
부위-지향된 커플링 (TDC)	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.89	1.77
	4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.81	1.62
	4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.85	1.83
	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.86	1.71
	4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.76	1.52
	4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.81	1.80

[0150] 상기 TDC들은 인간 혈장 샘플 중에서 72시간 동안 37 °C에서 배양 후 안정하였으며 양호한 약물-형성 특성을 가졌다. 비교해 보면, 439 삽입 돌연변이를 갖는 TDC가 최상의 안정성을 가졌고, 205 및 206 삽입 돌연변이를 갖는 TDC가 그 뒤를 이었다.

[0152] 실시예 32: 종양-함유 마우스 약학적 효능 시험

[0153] 본 개시에서, TDC 및 모 항체의 생체내 효능을 평가하기 위해서 BXPc-3 종양-함유 마우스 모델을 확립시켰다. 하나의 실시태양에서, 3x10⁶ BXPc-3 세포를 4-8주 된 BALB/c 누드 마우스(nude mouse)의 등쪽에 피하 주사하고, 상기 마우스의 평균 종양 크기를 400 내지 500 mm³으로 성장시키고, 상기 마우스를 무작위로 각 그룹에 5마리씩 분류하였다. 0일 및 7일째에, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC를 5 mg/kg의 용량의 단일 정맥내 용량으로 투여하고, 모 항체 4D3을 5 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 데이터 A는 측정시 평균 종양 부피±SE를 나타내고, 데이터 B는 측정시 상기 마우스의 평균 체중±SE를 나타낸다.

[0154] 도 27은 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 및 4D3에 대한 종양-함유 마우스에서의 효능에 대한 시험 결과를 나타낸다. TDC는 모 항체와 비교된 현저한 생체내 항-종양 효과를 나타내었다.

[0155] 도 28은 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 및 4D3 모 항체에 대한 종양-함유 마우스에서의 효능에 대한 시험 결과를 나타낸다. 상기 마우스의 현저한 체중 변화는 없었으며, 이는 상기 TDC가 생체내에서 독성이 적거나 없음을 입증하였다.

[0156] 본 개시는 상기 개시의 다수의 태양들을 예시하고자 하는 실시태양, 및 기능상 균등한 임의의 실시태양들에 개시되고 상기 개시의 범위내에 있는 특정한 실시태양들의 범위로 제한되지 않는다. 실제로, 상기 개시의 다양한 변형은 당해 분야의 숙련가들에게 명백하며 첨부된 청구항의 범위내에 있다.

[0157] 서열 목록

[0158] [표 V]

아미노산	
영어 명칭	기호 및 약어
알라닌	A 또는 Ala
아르기닌	R 또는 Arg
아스파라진	N 또는 Asn
아스파르트산	D 또는 Asp
시스테인	C 또는 Cys
글루타민	Q 또는 Gln
글루탐산	E 또는 Glu
글리신	G 또는 Gly
히스티딘	H 또는 His
이소류신	I 또는 Ile
류신	L 또는 Leu
리신	K 또는 Lys
메티오닌	M 또는 Met
페닐알라닌	F 또는 Phe
프롤린	P 또는 Pro
세린	S 또는 Ser
쓰레오닌	T 또는 Thr
트립토판	W 또는 Trp
티로신	Y 또는 Tyr
발린	V 또는 Val

[0159]

서열번호: 1 중쇄 불변 영역 (Fc) DNA 서열

[0160]

>IgG1-Fc

[0161]

```
GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
CGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCC
CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA
```

[0162]

[0163] 서열번호: 2 중쇄 불변 영역 (Fc) 아미노산 서열

[0164] >IgG1-Fc

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

[0165]

[0166] 서열번호: 3 경쇄 불변 영역 (카파) DNA 서열

[0167] >LC-카파

ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT
GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0168]

[0169] 서열번호: 4 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0170] >LC-카파

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQKQWVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTL
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0171]

[0172] 서열번호: 5 2A1-LC-Cys205ins 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0173] >LC-Cys205ins-카파

ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT
GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCTGCGTGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0174]

[0175] 서열번호: 6 LC-Cys205ins 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0176] >LC-Cys205ins-카파

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQKQWVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTL
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0177]

[0178] 여기서, 상기 GLSSPCVTKSNF 중 C는 부위-특이적 접합 위치이다. 하나의 실시태양에서, 상기 시스테인은 mc-vc-PAB-페이로드(payload)와 부위-특이적으로 접합된다.

[0179] 서열번호: 7 LC-Cys206ins 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0180] >LC-Cys206ins-카파

ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT
GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG
CTCGCCCGTCTGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0181]

[0182] 서열번호: 8 LC-Cys206ins 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0183] >LC-Cys206ins-카파

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQKQWVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTL
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0184]

[0185] 여기에서, 상기 GLSSPVCTKSFN 중 C는 부위-특이적 접합 위치이다. 하나의 실시태양에서, 상기 시스테인은 mc-vc-PAB-페이로드와 부위-특이적으로 접합된다.

[0186] 서열번호: 9 IgG1-Fc-Cys439ins 중쇄 불변 영역 (Fc) DNA 서열

[0187] >IgG1-Fc-Cys439ins

GCTAGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG
 CCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGAC
 CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
 GGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTC
 CTGGGGGGACCGTAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGA
 GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAG
 CGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCC
 CTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
 TGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
 AGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCTCCCGT
 GCTGGACTCGACGGCTCCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
 GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGGC
 TGTCTCCGGGTAAA

[0188]

[0189] 서열번호: 10 IgG1-Fc-Cys439ins 중쇄 불변 영역 (Fc) 아미노산 서열

[0190] >IgG1-Fc-Cys439ins

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

[0191]

[0192] 여기에서, 상기 TQKLSLSPGK 서열 중 L는 부위-특이적 접합/커플링 위치이고 mc-vc-PAB-페이로드와 부위-특이적 접합을 겪는다.

[0193] 서열번호: 11 LC-V205C 경쇄 불변 영역 (카파) DNA 서열

[0194] >LC-V205C-카파

ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTT
 GTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
 GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTC
 GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAG
 CTCGCCCTGGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

[0195]

[0196] 서열번호: 12 LC-V205C 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0197] >LC-V205C-카파

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC

[0198]

[0199] 여기에서, 상기 GLSSPCTKSFN 서열 중 C는 부위-특이적 접합/커플링 위치이고 mc-vc-PAB-페이로드와 부위-특이적 접합을 겪는다.

[0200] 서열번호: 13 LC-V205C 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

[0201] GLSSPCTKSF

[0202] 서열번호: 14 LC-V206C 경쇄 불변 영역 (카파) 아미노산 서열

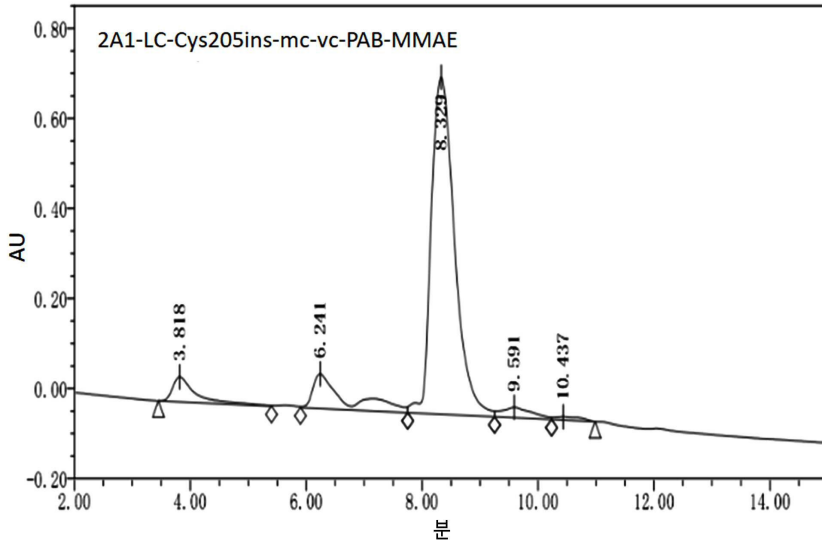
[0203] GLSSPVCTKS

[0204] 서열번호: 15 중쇄 아미노산 서열

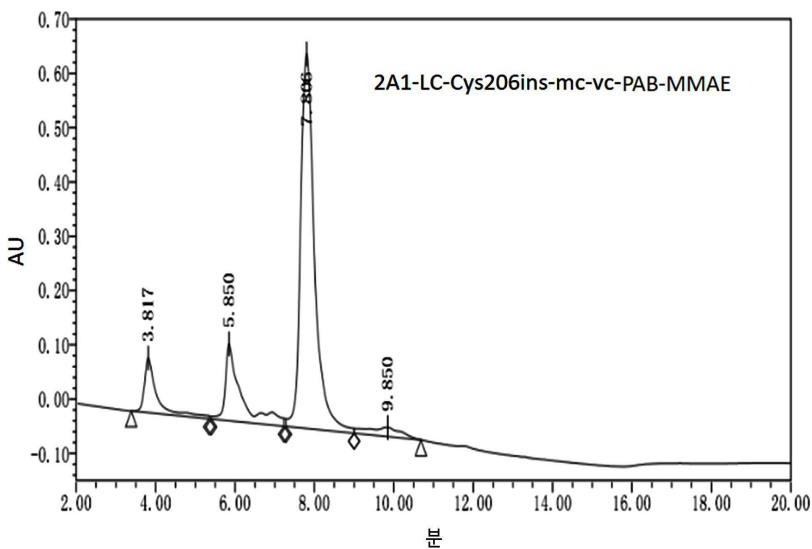
[0205] TQKLSLCLSPGK

도면

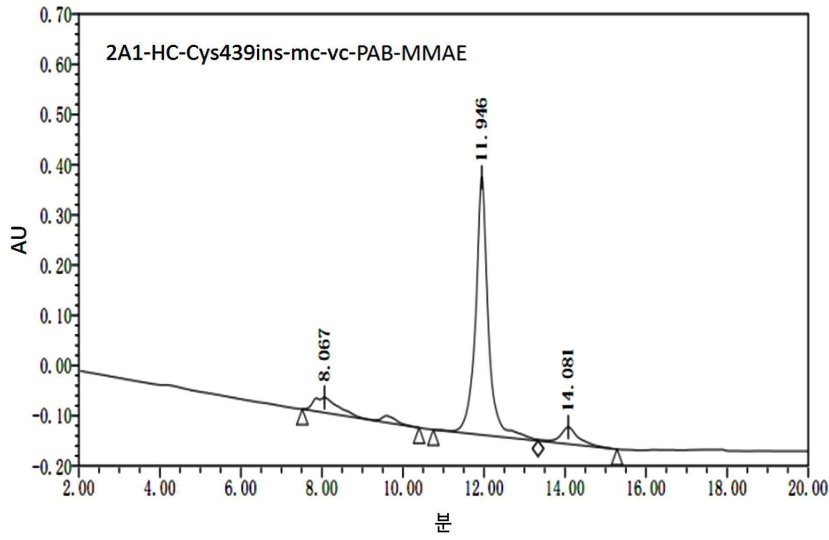
도면1



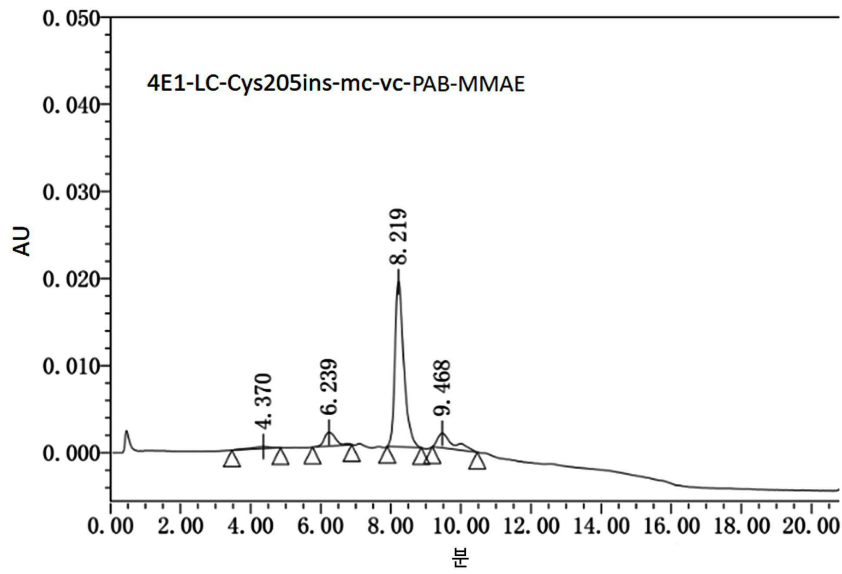
도면2



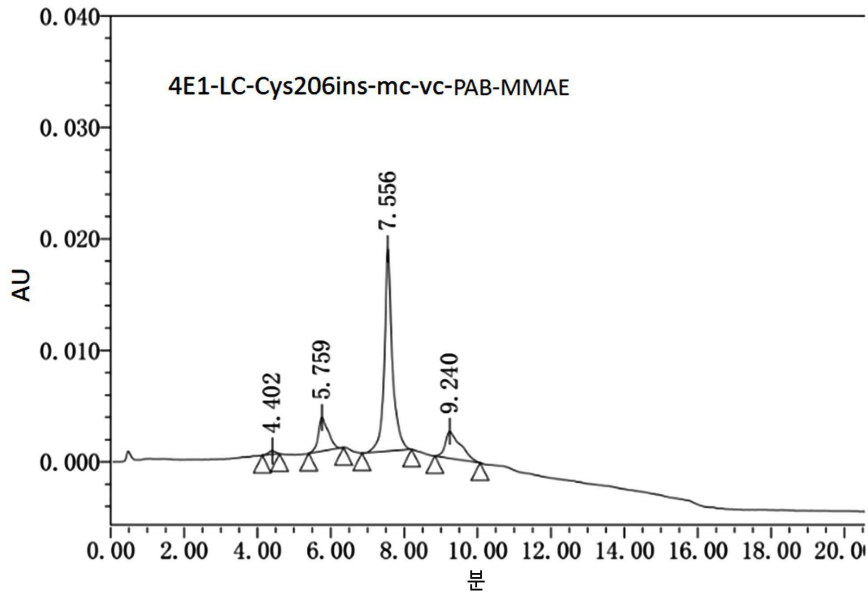
도면3



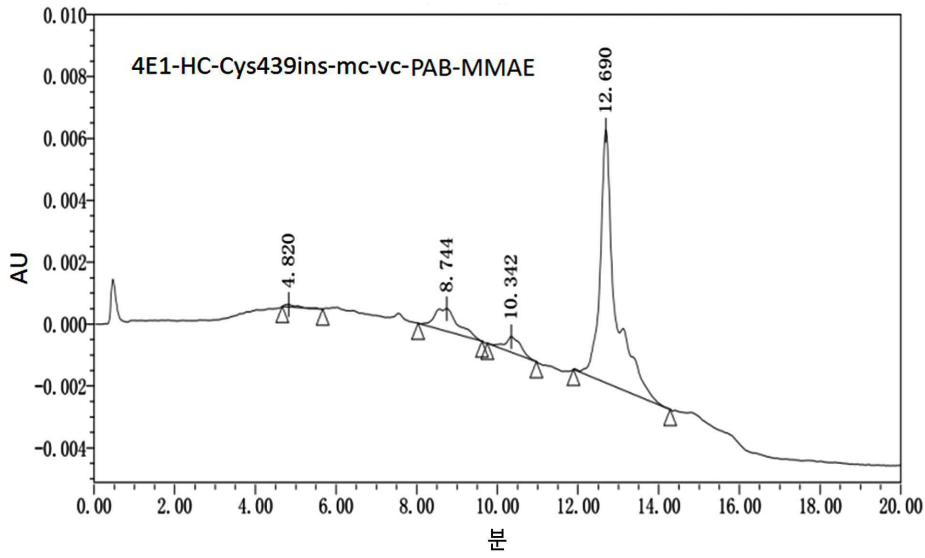
도면4



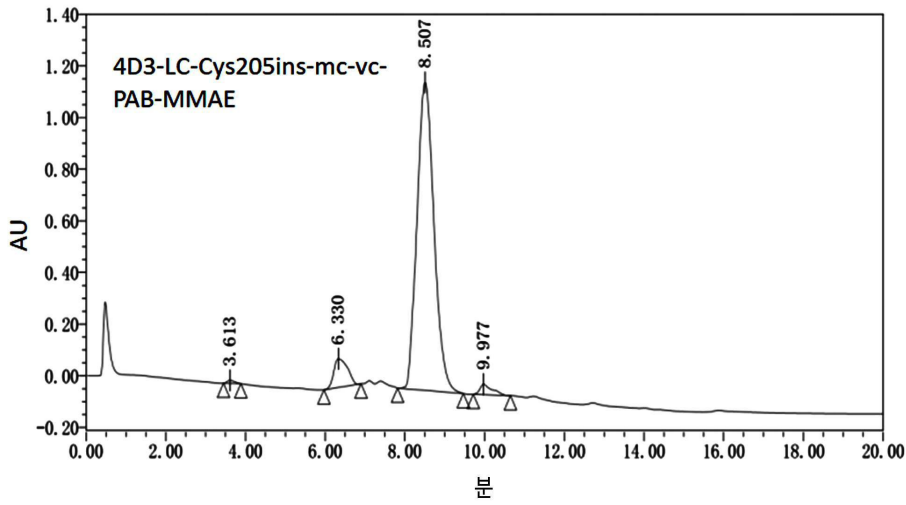
도면5



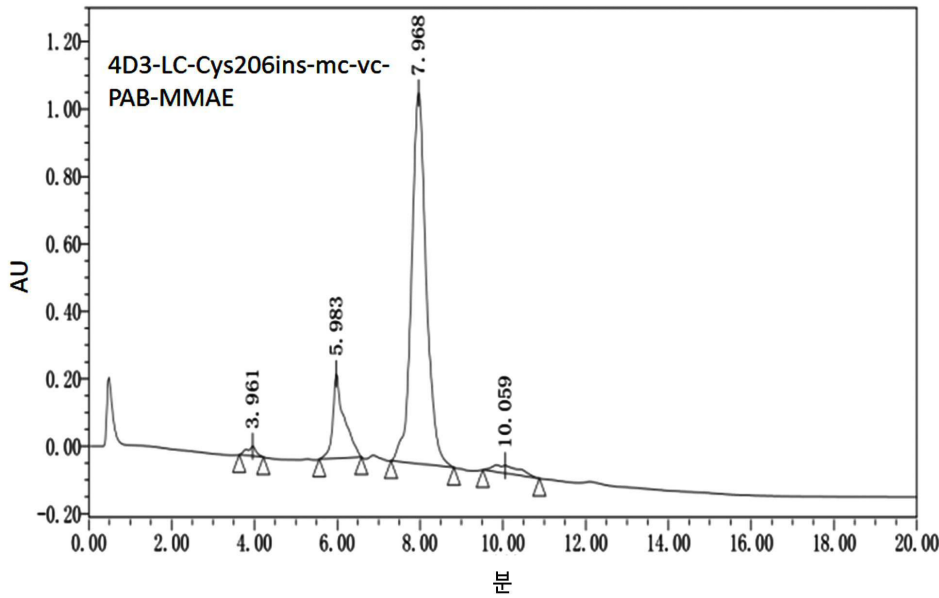
도면6



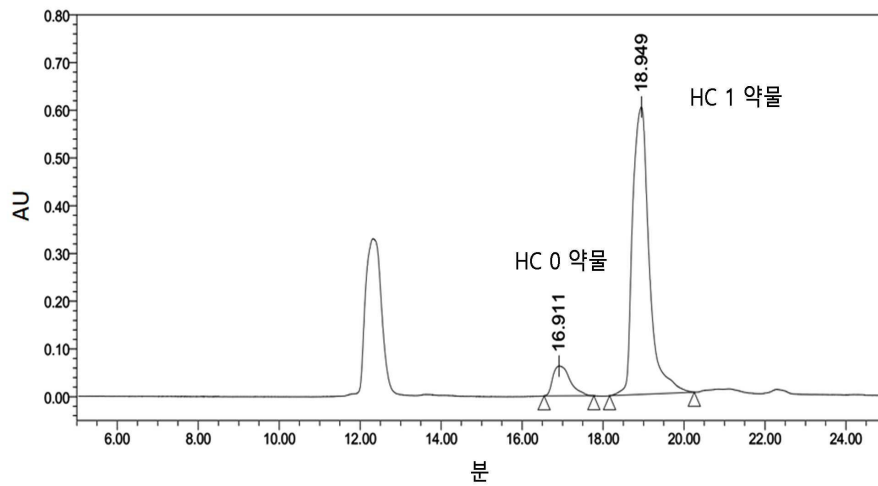
도면7



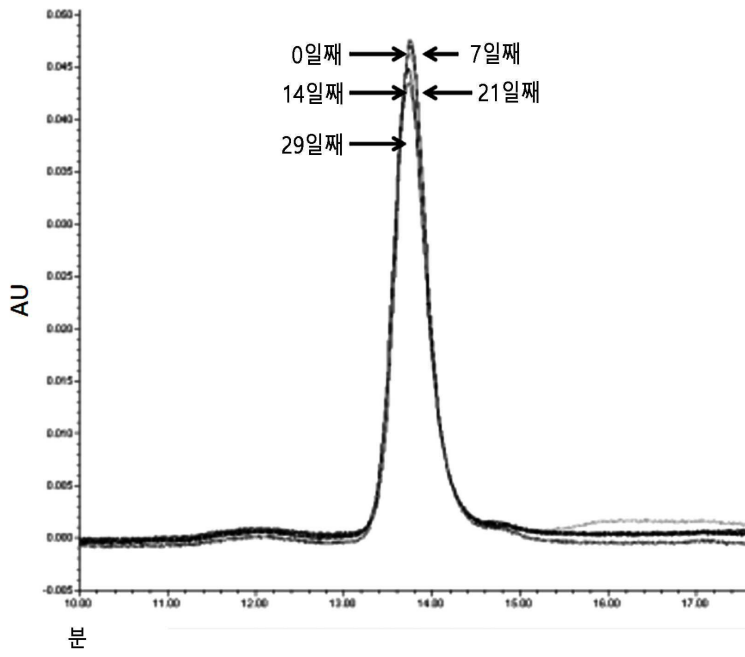
도면8



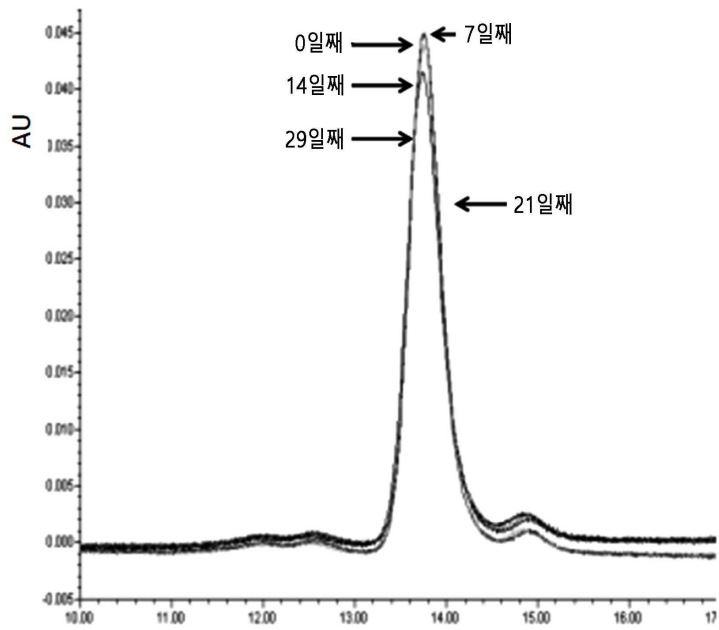
도면9



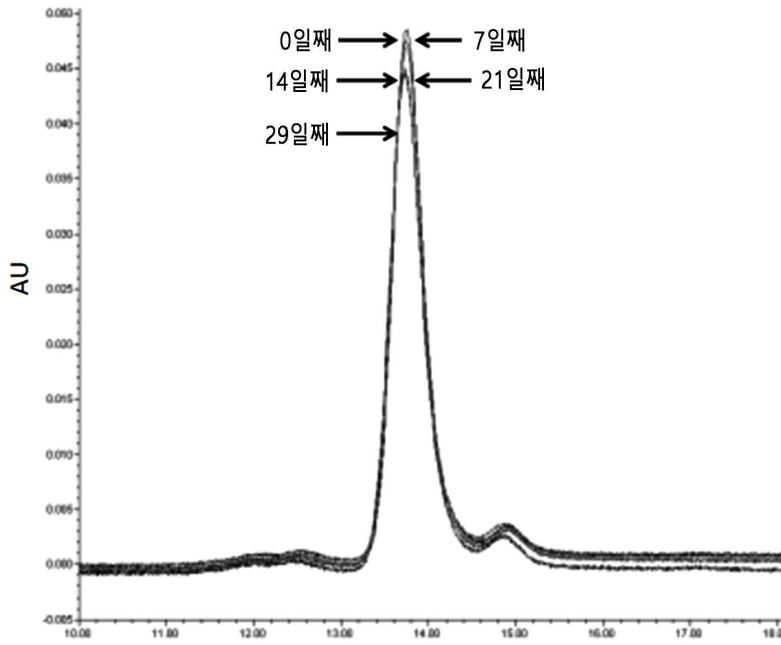
도면10



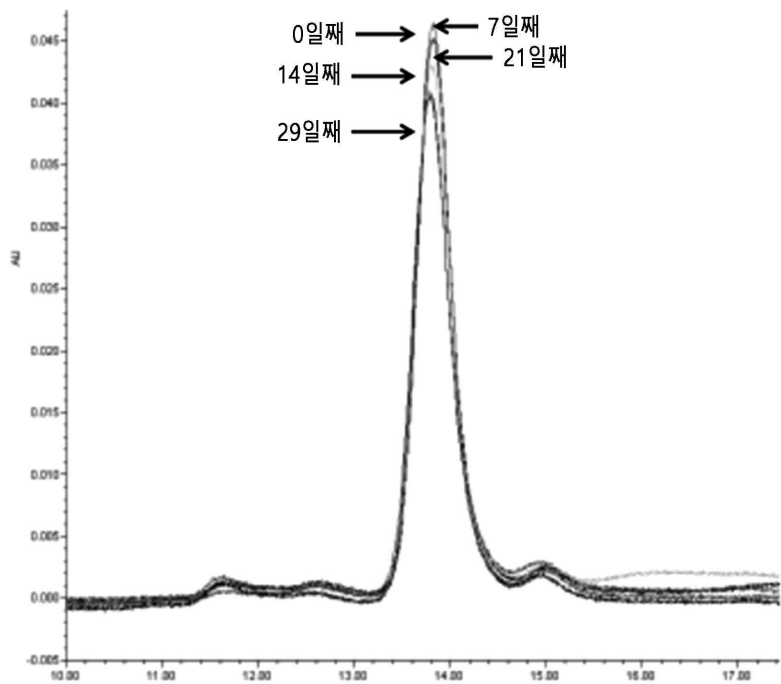
도면11



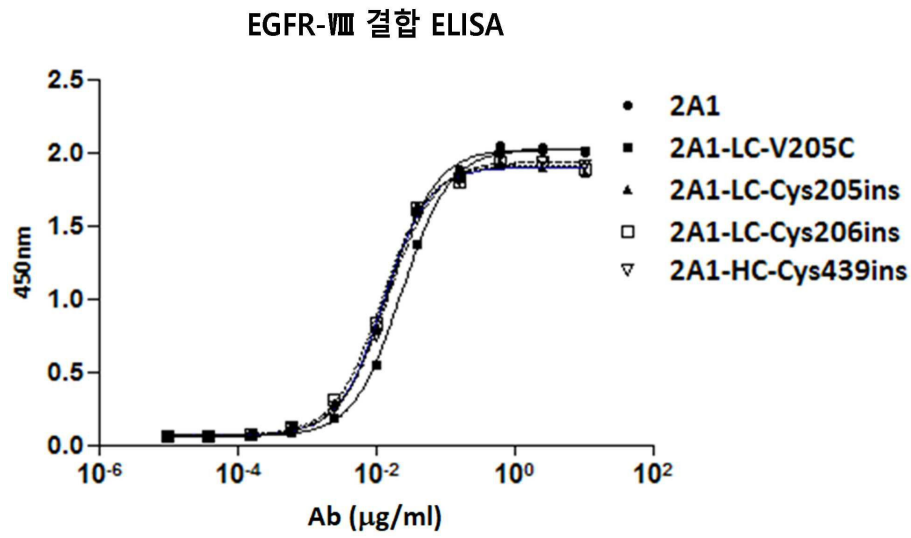
도면12



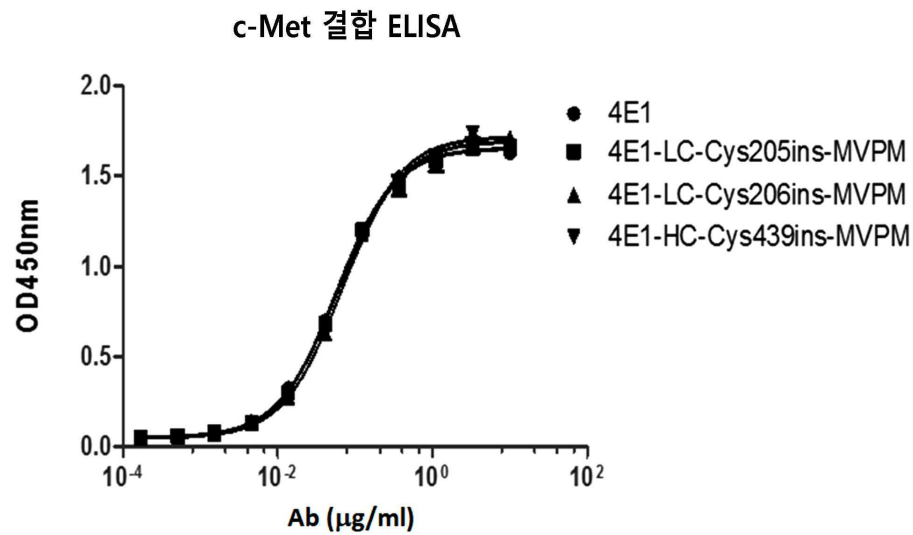
도면13



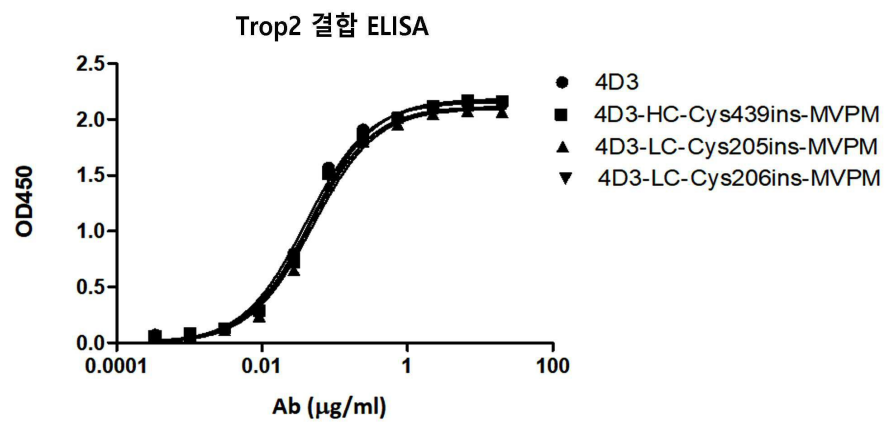
도면14



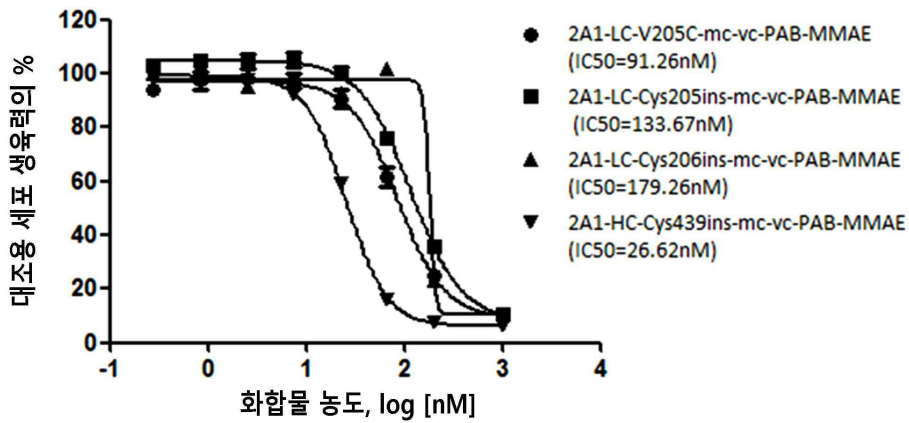
도면15



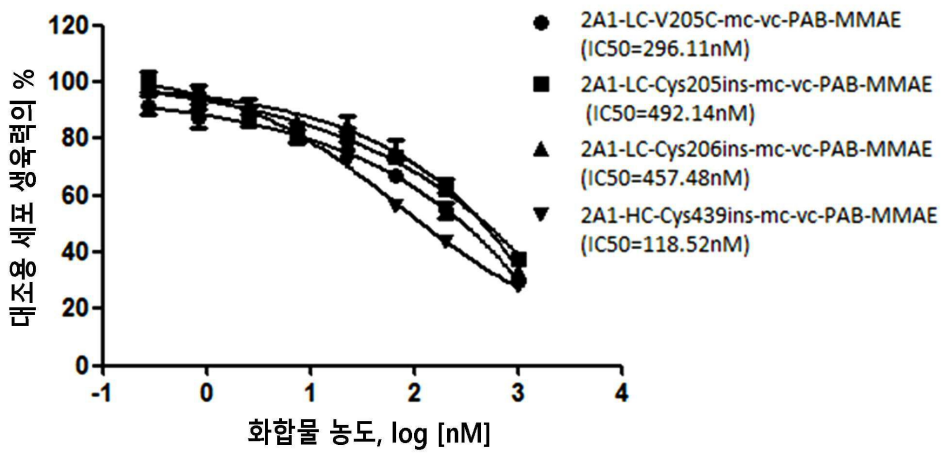
도면16



도면17

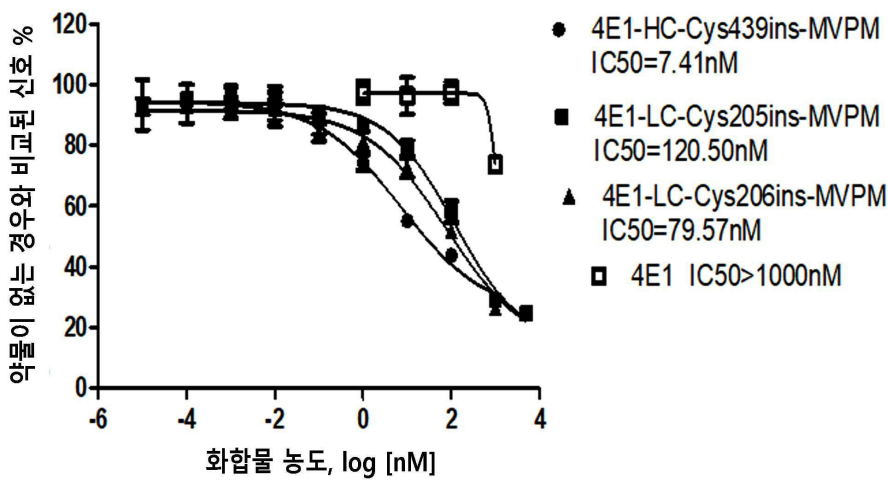


도면18

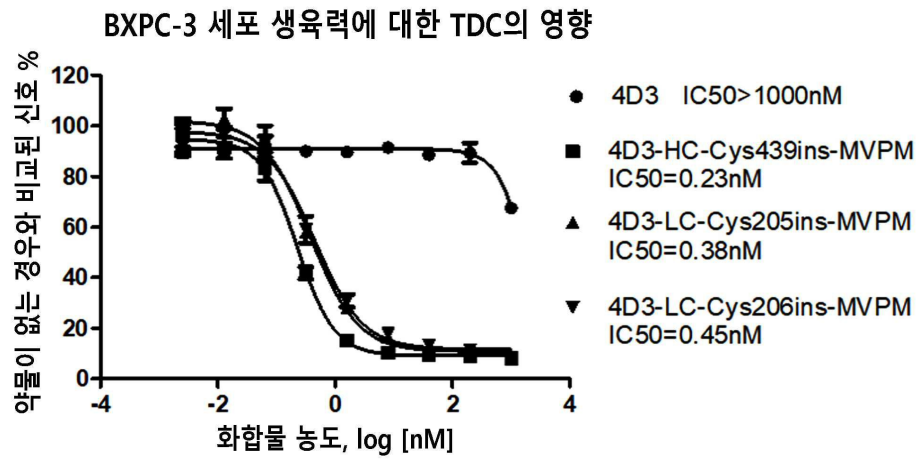


도면19

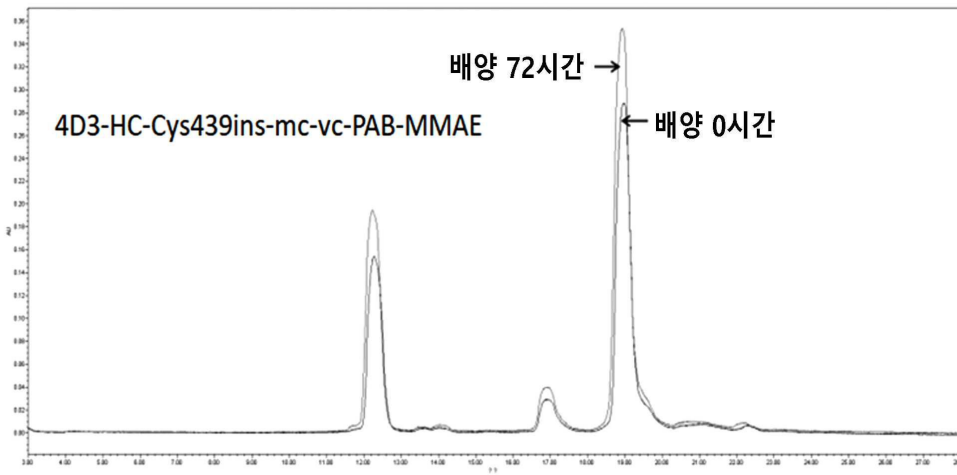
U87-MG 세포 생육력에 대한 TDC의 영향



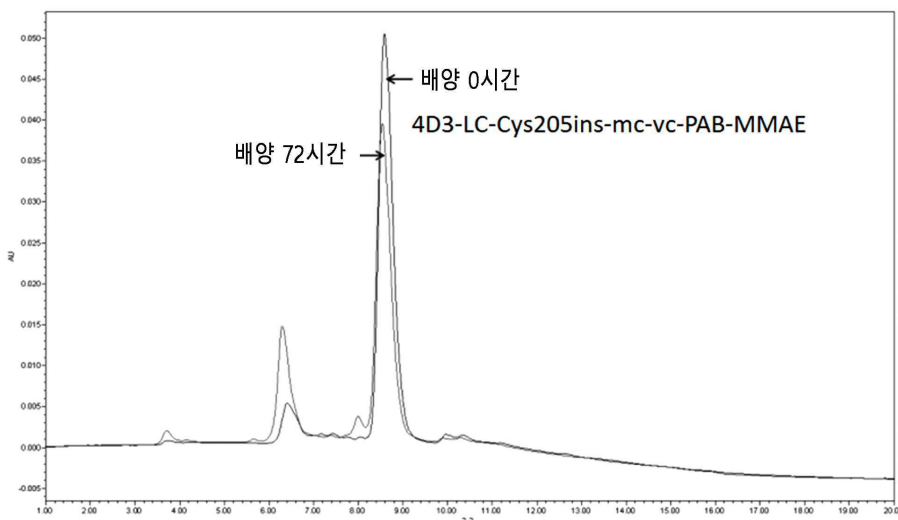
도면20



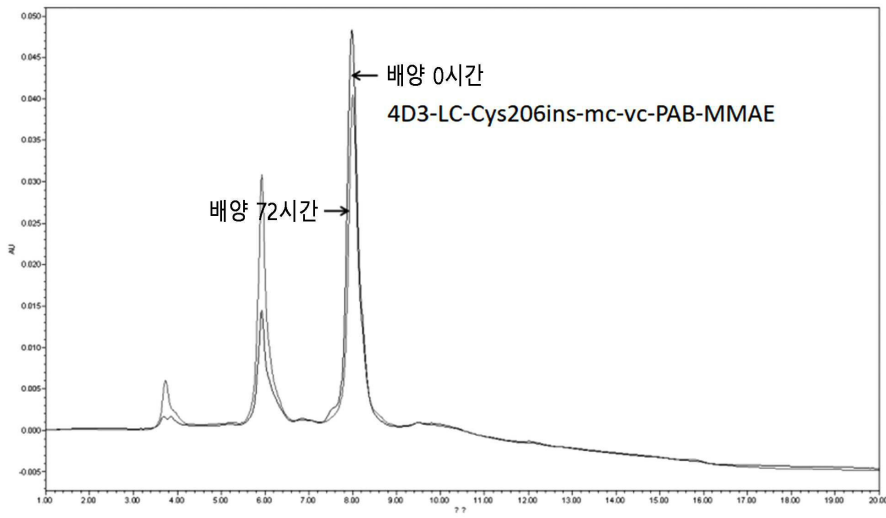
도면21



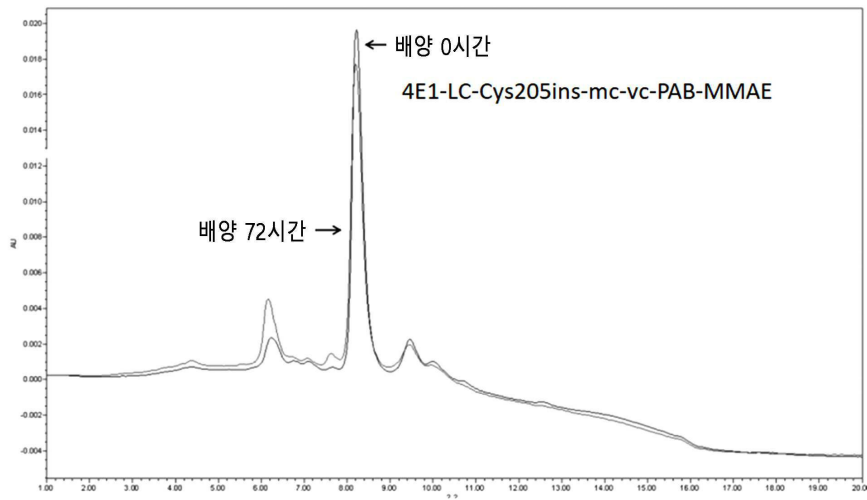
도면22



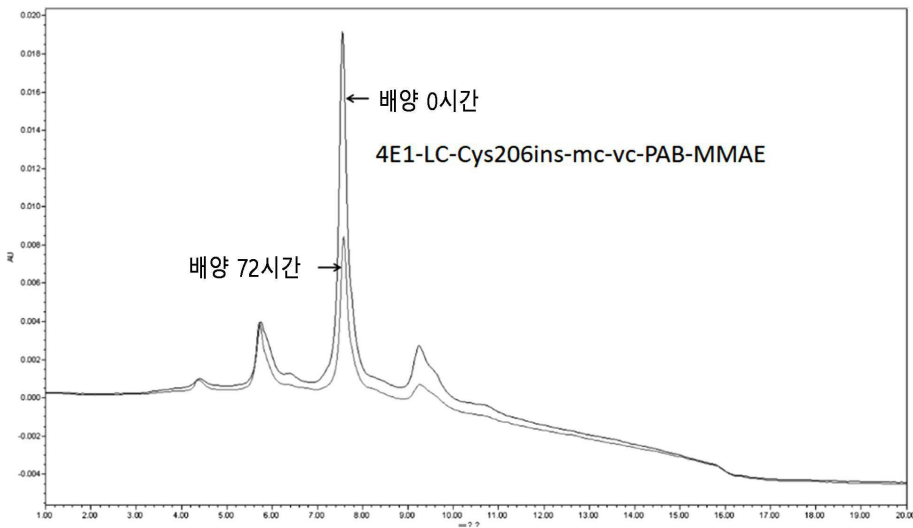
도면23



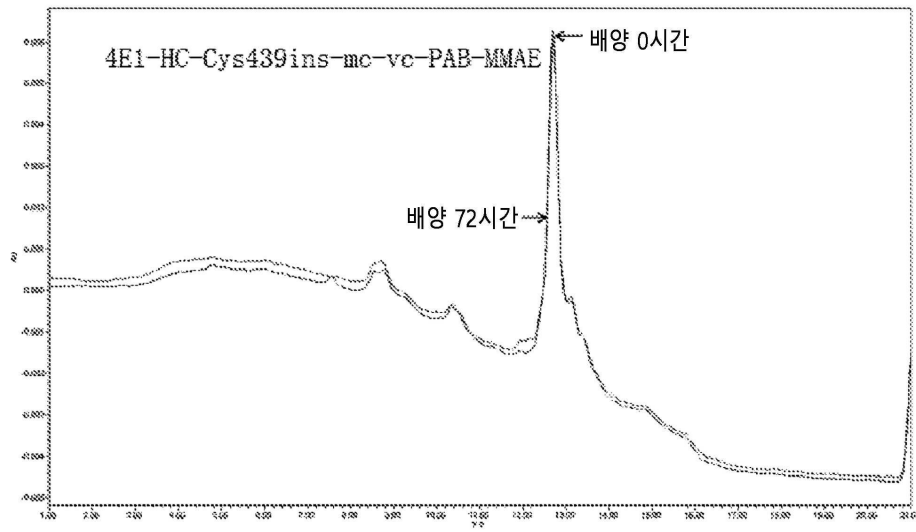
도면24



도면25

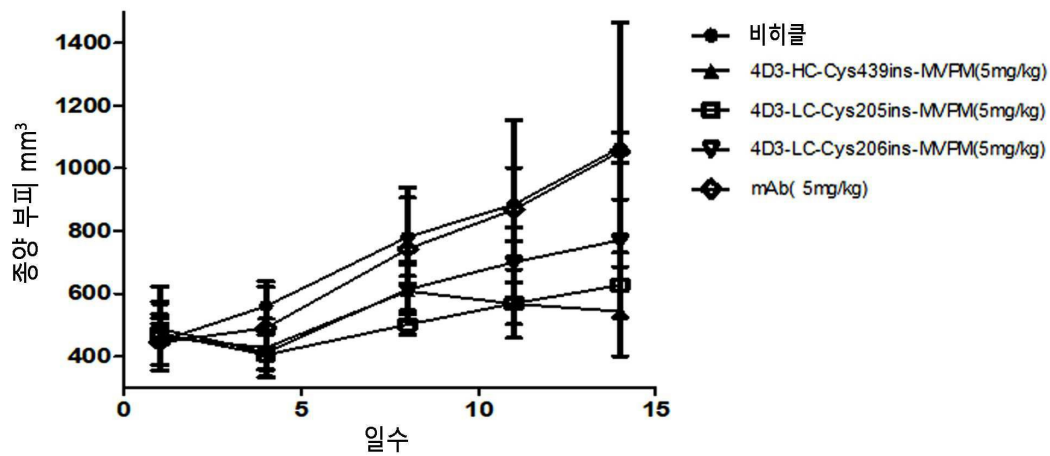


도면26



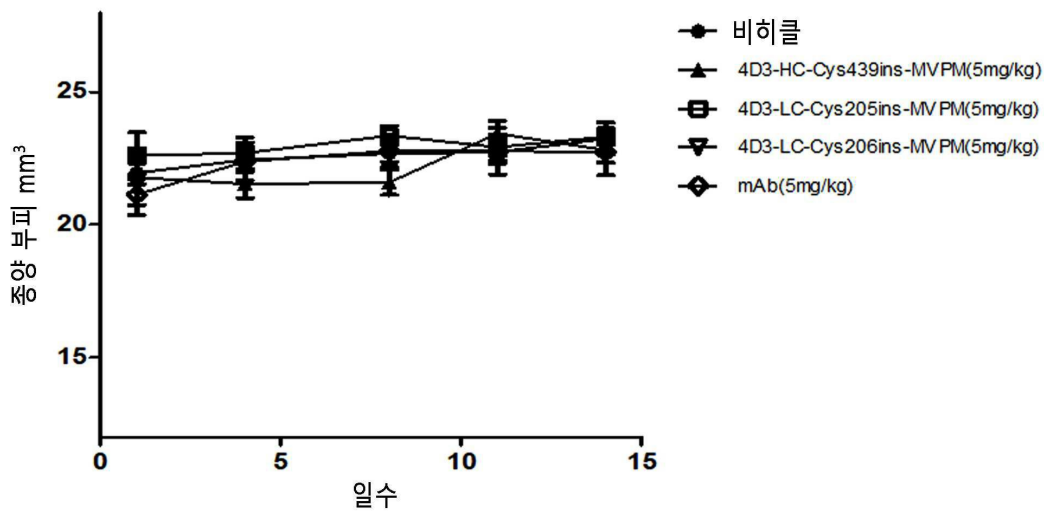
도면27

A. BXPc-3 인간 췌장암 이종이식편 모델의 치료에서 단일 제제로서 Trop2 ADC의 항종양 활성



도면28

B. 상이한 그룹들에서 마우스의 체중 변화



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SICHUAN BALI PHARM CO., LTD.

<120> CYSTEINE MODIFIED ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND PREPARATION METHOD THEREOF

<130> IPA190488-US

<150> CN 201610876568.9

<151> 2016-10-08

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 1

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccgt gacggtgtcg 120

tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180

ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgctctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 2

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

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

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 3

```

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc cgccatctg atgagcagtt gaaatctgga      60
actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg      120
aaggtggata acgcccctca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc      180

aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaaa      240
cacaaagtct acgctgcca agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc      300
ttcaacaggg gagagtgtta g                                          321
    
```

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 4

```

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1           5           10          15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

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

           85           90           95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           100          105
    
```

<210> 5

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 5

```

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc cgccatctg atgagcagtt gaaatctgga      60
actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg      120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc      180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaa      240

```

```

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cgtcacaaag      300
agcttcaaca ggggagagtg ttag                                             324

```

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 6

```

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

```

```

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
           35           40           45

```

```

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
           50           55           60

```

```

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65           70           75           80

```

```

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
           85           90           95

```

```

Cys Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           100          105

```

<210> 7

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 7

```

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc cgccatctg atgagcagtt gaaatctgga      60
actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg      120
aaggtggata acgcctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc      180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaaa     240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt ctgcacaaag     300

agcttcaaca ggggagagtg ttag                                             324

```

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 8

```

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

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

```

<210> 9

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 9

```

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg     120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccagc cacctgaact cctgggggga      360

ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccctt      420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggcttc caacaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
ctggactccg acggctcctt cttctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg      960
cagaagagcc tctctgctt gtctccgggt aaa                                  993

```

<210> 10

<211> 331

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 10

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
           20           25           30

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

```


Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Cys Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 11
 <211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 11

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc cgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgect gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaaa 240
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgtta g 321

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesized

<400> 12

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

