



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0135561
(43) 공개일자 2024년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/13 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
C07K 14/31 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/13 (2013.01)
A61K 47/68 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2023-0159105
(22) 출원일자 2023년11월16일
심사청구일자 2023년11월16일
(30) 우선권주장
1020230028269 2023년03월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
이현수
경기도 고양시 덕양구 도래울로 80, 702동 301호 (도내동, 고양 원흥 동일스위트)
김수인
서울특별시 동작구 남부순환로255길 21, 102동 1306호 (사당동, 사당삼익그린뷰아파트)
권용석
서울특별시 서초구 양재대로2길 90, 205동 1102호 (우면동, 서초힐스)
(74) 대리인
특허법인엠에이피에스

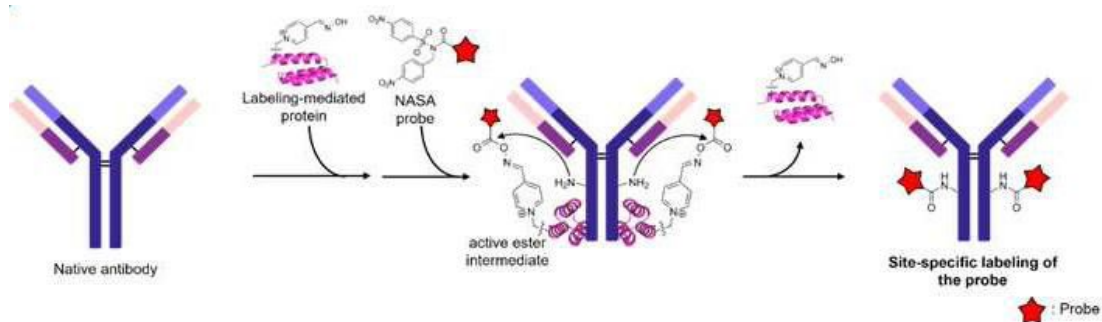
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 근접 효과 기반 위치 선택적 항체 표지를 이용한 항체-약물 접합체의 합성 방법

(57) 요약

본원은 근접 효과 기반 위치 선택적 항체 표지를 이용한 항체-약물 접합체의 합성 방법에 관한 것이다. 본원에 따르면, 비표준 아미노산을 포함하는 결합 단백질에 도입된 피리딘 유도체(표지 매개 단백질)를 이용하여, 항체에 약물을 위치 선택적으로 도입함으로써 항체-약물 접합체를 합성하는 방법을 제공할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/31 (2013.01)

C07K 16/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711160070
과제번호	2022M3E5F2017857
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업 바이오·의료기술개발사업(단위사업) 혁신신약 기초기반 기술개발
연구과제명	근접효과 기반 위치 선택적 원형 항체 표지를 통한 항체-약물 접합체 합성 기술 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	서강대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

비표준 아미노산(non-canonical amino acids)이 도입된 결합 단백질(binding protein) 및 피리디늄 옥심 유도체(pyridinium oxime derivative)가 결합된, 표지 매개 단백질(conjugation-mediating protein).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 결합 단백질은 항체에 결합하는 단백질로 알려진 단백질 A(Protein A), 단백질 G(Protein G), 단백질 L(Protein L) 또는 이와 동일한 기능을 하는 유사 단백질로부터 유래한 단백질인 것인, 표지 매개 단백질.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 결합 단백질은 단백질 A로부터 유래한 B 도메인 변이체인 것인, 표지 매개 단백질.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

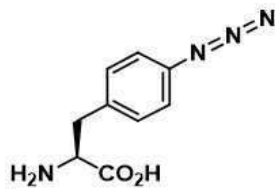
상기 B 도메인 변이체는 서열번호 1 또는 서열번호 2로서 표시되는 것인, 표지 매개 단백질.

청구항 5

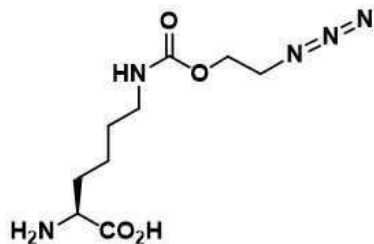
제 1 항에 있어서,

상기 비표준 아미노산은 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 표지 매개 단백질:

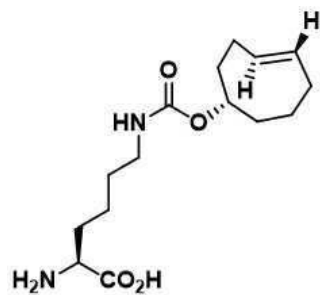
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 8]



[화학식 9]



청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 비표준 아미노산은 4-아지도-L-페닐알라닌(4-azido-L-phenylalanine) 또는 N_6 -[(2-아지도에톡시)카보닐]-L-라이신(N_6 -[(2-azidoethoxy)carbonyl]-L-lysine)인 것인, 표지 매개 단백질.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

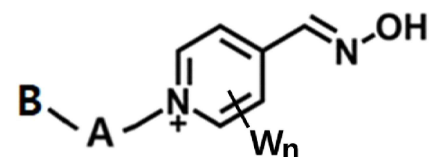
상기 비표준 아미노산은 상기 결합 단백질에 포함된 적어도 1개 이상의 아미노산과 치환되어 도입되는 것인, 표지 매개 단백질.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

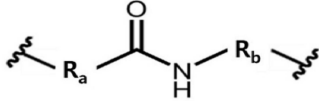
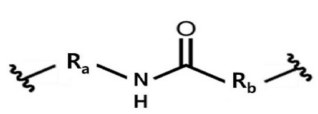
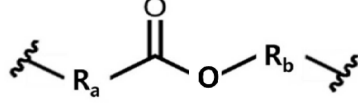
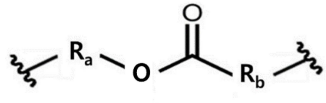
상기 피리디늄 옥심 유도체는 하기 식 1로 표시되는 것인, 표지 매개 단백질:

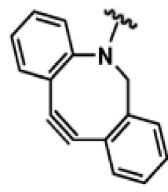
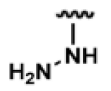
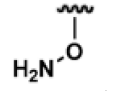
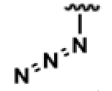
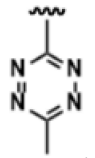
[식 1]



상기 식 1에서,

A는 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 페닐렌기, 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₁₋₁₀ 알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, N, O, 또

는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₂₀ 페닐렌기, , , ,  및 이들 의 조합들에서 선택되는 것이고, R_a 및 R_b는, 각각 독립적으로, 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기 또는 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기인 것이고,

B는 , , , , , , ,  , 또 는  에서 선택되는 것이고, W는 -F, -Cl, -Br, -NO₂, 또는 -CF₃이고, n은 0 내지 4임.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 식 1의 피리디늄 옥심 유도체의 B가 비표준 아미노산의 말단 작용기와 반응하여 결합하는 것인, 표지 매개 단백질.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 항체의 표지 방법:

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 표지 매개 단백질이 원형 항체(Native antibody)에 결합하는 제1 단계; 및

상기 표지 매개 단백질과 프로브가 결합된 N-알킬설포아미드 유도체가 반응하여 활성 에스터 중간체(Active ester intermediate)를 형성하는 제 2 단계; 및

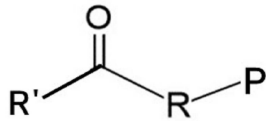
상기 원형 항체의 Fc 도메인에 포함된 라이신(Lysine)과 상기 중간체가 반응하여 아미드(Amide) 결합을 형성하는 제3 단계.

청구항 11

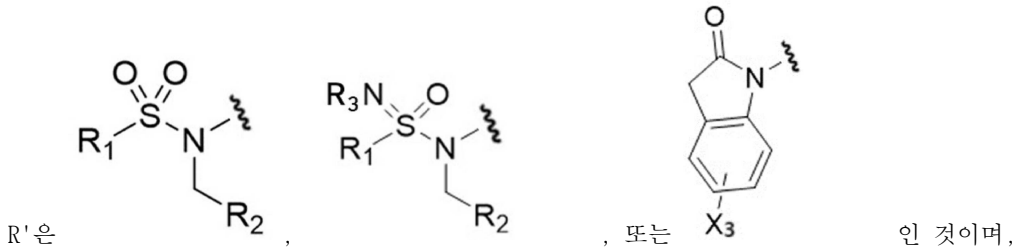
제 10 항에 있어서,

상기 프로브가 결합된 N-알킬설포아미드 유도체는 하기 식 2로 표시되는 것인, 항체의 표지 방법:

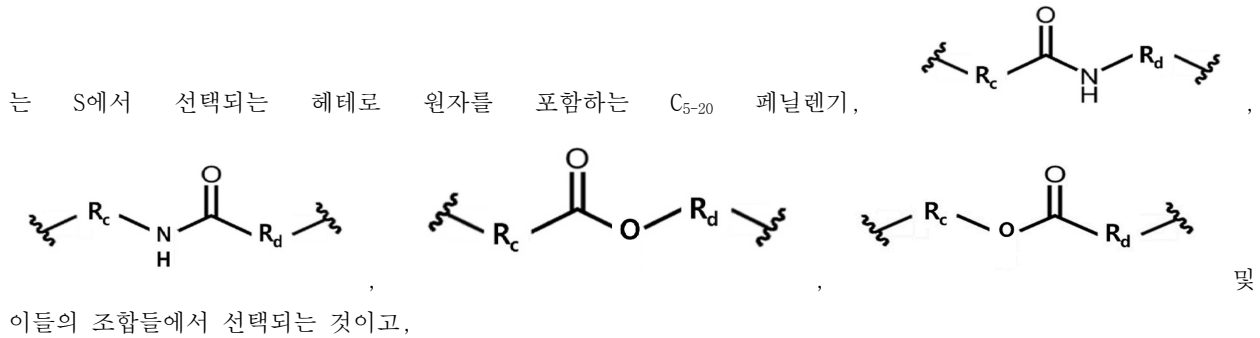
[식 2]



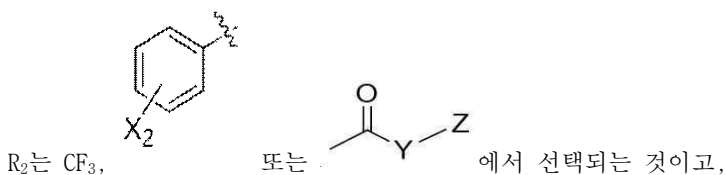
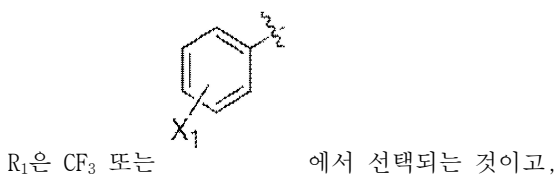
상기 식 2에서,



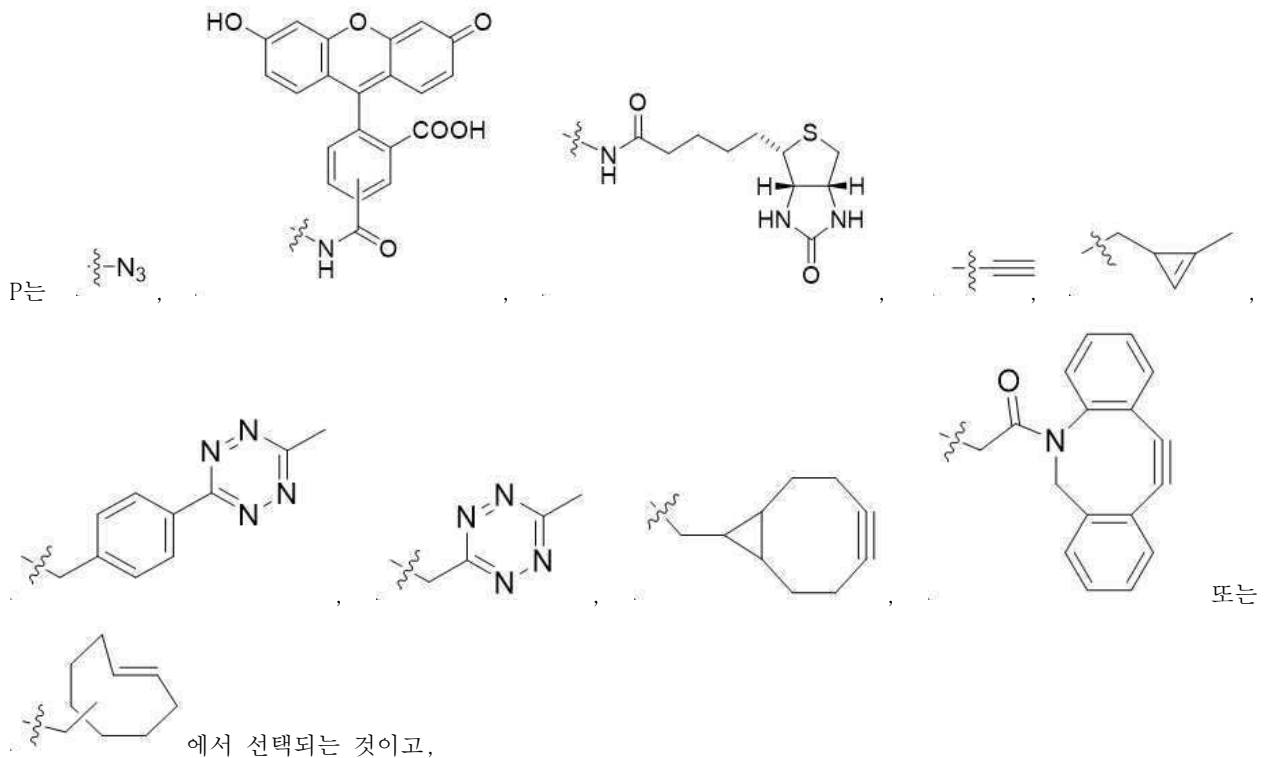
R은 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 페닐렌기, 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₁₋₁₀ 알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₂₀ 페닐렌기,



R_c 및 R_d는, 각각 독립적으로, 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기 또는 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기인 것이고,



R₃는 H, 선형 또는 분지형의 C₁₋₅ 알킬기인 것이고,



X_1 , X_2 및 X_3 은, 페닐기의 수소를 하나 이상 치환하는 것으로서, 각각 독립적으로, F, Cl, Br, CF_3 또는 NO_2 인 것이고,

Y는 O 또는 NH이고,

Z는 $-NR_eR_f$ 로 치환되거나 또는 비치환된 선형 또는 분지형의 C_{1-20} 알킬기로서,

R_e 및 R_f 는, 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬기이거나, 또는 서로 연결된 C_{4-10} 고리형알킬기로서, N, S, 또는 O의 헤테로 원자를 포함하거나 또는 포함하지 않는 것임.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 프로브가 결합된 *N*-알킬설포아미드 유도체는 *N*-알킬설포아미드-플루오레세인(fluorescein)(NASA-FL), *N*-알킬설포아미드-비오틴(biotin)(NASA-Bt), 및 *N*-알킬설포아미드- N_3 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항체의 표지 방법.

청구항 13

다음의 단계를 포함하는 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugates)의 위치 선택적(site-specific) 합성 방법:

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 표지 매개 단백질이 원형 항체에 결합하는 제1 단계;

상기 표지 매개 단백질과 프로브가 결합된 *N*-알킬설포아미드 유도체가 반응하여 활성 에스터 중간체를 형성하는 제2 단계;

상기 원형 항체의 Fc 도메인에 포함된 라이신과 상기 중간체가 반응하여 아마이드 결합을 형성하는 제3 단계; 및

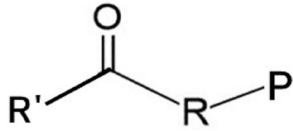
상기 프로브에 약물이 반응하여 표지되는 제4 단계.

청구항 14

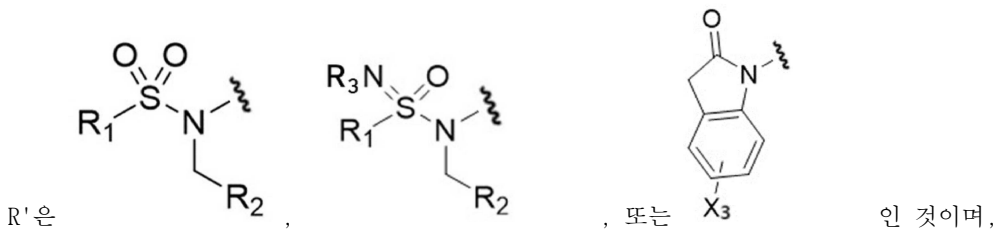
제 13 항에 있어서,

상기 프로브가 결합된 *N*-알킬설폰아미드 유도체는 하기 식 2로 표시되는 것인, 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법:

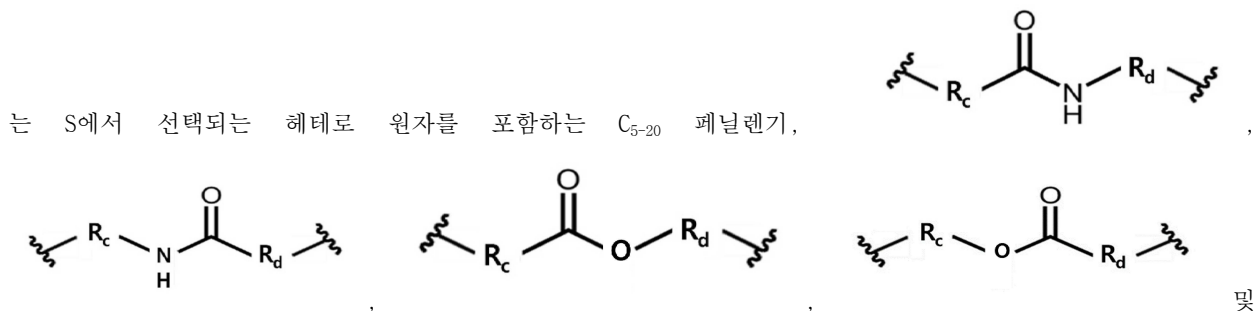
[식 2]



상기 식 2에서,

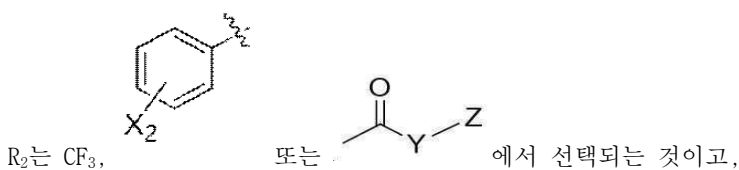
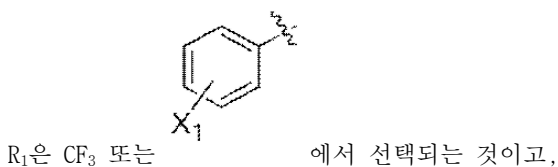


R은 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 페닐렌기, 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₁₋₁₀ 알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, N, O, 또

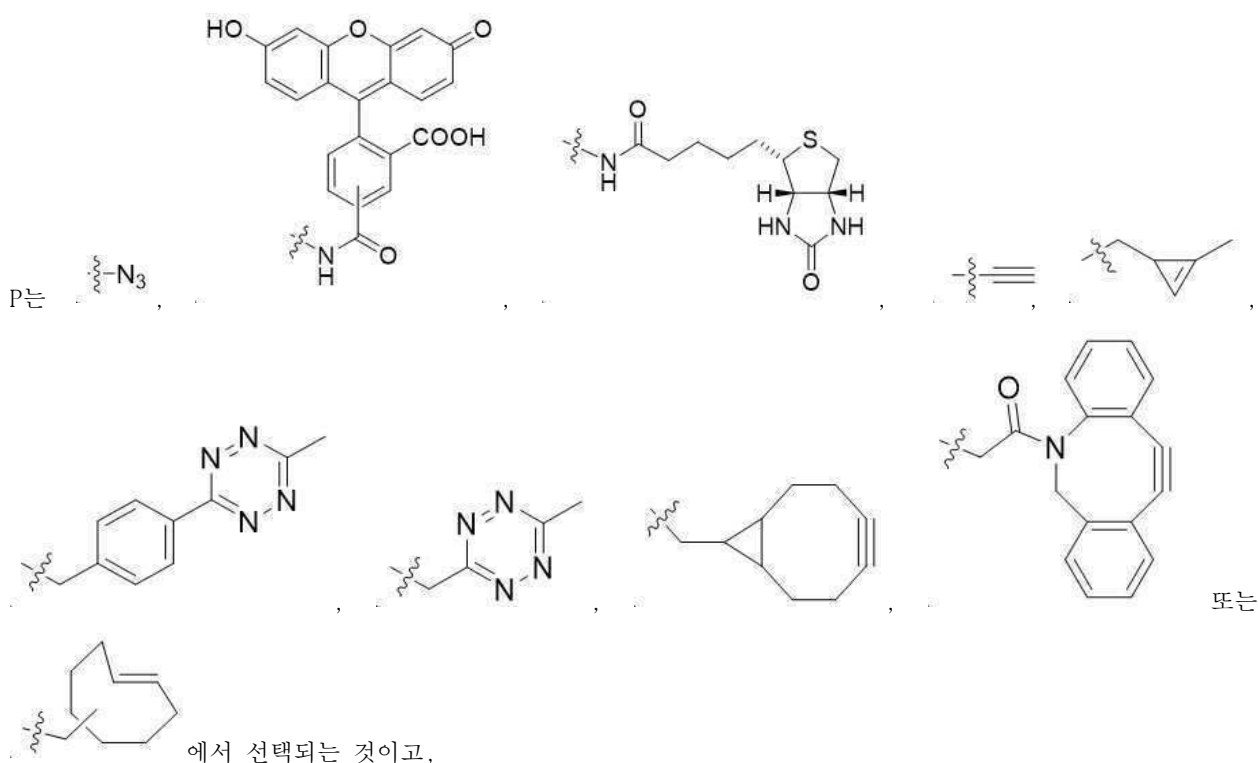


이들의 조합들에서 선택되는 것이고,

R_c 및 R_d는, 각각 독립적으로, 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기 또는 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기인 것이고,



R₃는 H, 선형 또는 분지형의 C₁₋₅ 알킬기인 것이고,



X_1 , X_2 및 X_3 은, 페닐기의 수소를 하나 이상 치환하는 것으로서, 각각 독립적으로, F, Cl, Br, CF_3 또는 NO_2 인 것이고,

Y는 O 또는 NH이고,

Z는 $-NR_eR_f$ 로 치환되거나 또는 비치환된 선형 또는 분지형의 C_{1-20} 알킬기로서,

R_e 및 R_f 는, 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬기이거나, 또는 서로 연결된 C_{4-10} 고리형알킬기로서, N, S, 또는 O의 헤테로 원자를 포함하거나 또는 포함하지 않는 것임.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

상기 프로브가 결합된 *N*-알킬설포아미드 유도체는 *N*-알킬설포아미드-플루오레세인(fluorescein)(NASA-FL), *N*-알킬설포아미드-비오틴(biotin)(NASA-Bt), 및 *N*-알킬설포아미드- N_3 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugates)의 위치 선택적(site-specific) 합성 방법.

청구항 16

제 13항에 있어서,

상기 약물은 약물 또는 절단가능한 링커를 포함하는 약물인 것인, 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 약물은 MMAE(monomethyl auristatin E), 메이탄시노이드(Maytansinoids), 칼리키아마이 (Calicheamicin), 엑사테칸(exatecan), SN-38, MMAF(monomethyl auristatin F), 및 이들의 유도체들에서 선택되는 것인, 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법.

청구항 18

다음의 단계를 포함하는 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법:

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 표지 매개 단백질이 원형 항체에 결합하는 제1 단계; 및

상기 표지 매개 단백질과 약물이 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체가 반응하여 활성 에스터 중간체를 형성하는 제 2 단계; 및

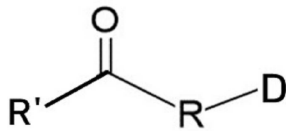
상기 원형 항체의 Fc 도메인에 포함된 라이신(Lysine)과 상기 중간체가 반응하여 아마이드 결합을 형성하는 제3 단계.

청구항 19

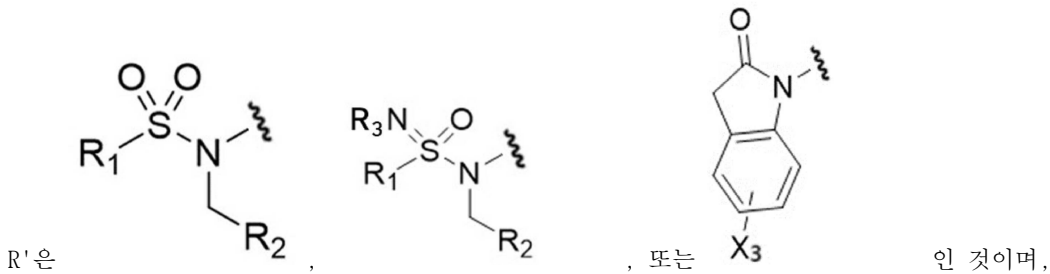
제 18 항에 있어서,

상기 약물이 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체는 하기 식 3으로 표시되는 것인, 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법:

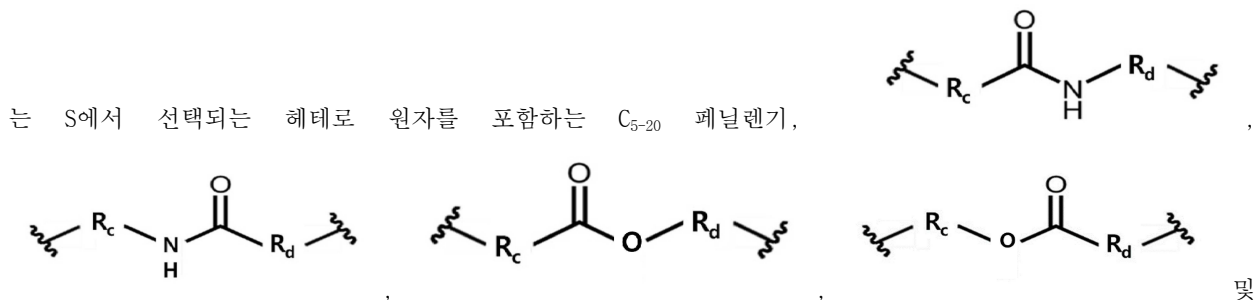
[식 3]



상기 식 3에서,

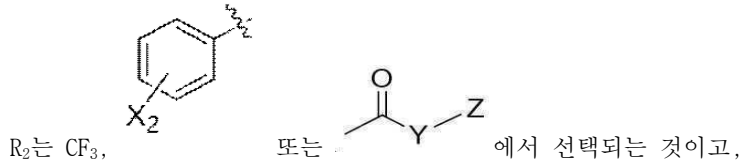
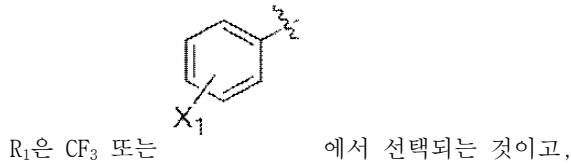


R은 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 페닐렌기, 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₁₋₁₀ 알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₂₀ 페닐렌기,



이들의 조합들에서 선택되는 것이고,

R_c 및 R_d는, 각각 독립적으로, 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기 또는 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기인 것이고,



R_3 는 H, 선형 또는 분지형의 C_{1-5} 알킬기인 것이고,

D는 약물 또는 절단가능한 링커를 포함하는 약물인 것이고,

X_1 , X_2 및 X_3 은, 페닐기의 수소를 하나 이상 치환하는 것으로서, 각각 독립적으로, F, Cl, Br, CF_3 또는 NO_2 인 것이고,

Y는 O 또는 NH이고,

Z는 $-NR_eR_f$ 로 치환되거나 또는 비치환된 선형 또는 분지형의 C_{1-20} 알킬기로서,

R_e 및 R_f 는, 각각 독립적으로 C_{1-5} 알킬기이거나, 또는 서로 연결된 C_{4-10} 고리형알킬기로서, N, S, 또는 O의 헤테로 원자를 포함하거나 또는 포함하지 않는 것임.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 약물은 MMAE(monomethyl auristatin E), 메이탄시노이드(Maytansinoids), 칼리키아마이신(Calicheamicin), 엑사테칸(exatecan), SN-38, MMAF(monomethyl auristatin F), 및 이들의 유도체들에서 선택되는 것인, 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 근접 효과 기반 위치 선택적 항체 표지를 이용한 항체-약물 접합체의 합성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugate, ADC)는 다양한 항암 신약 중에서 가장 빠르게 성장하고 있는 약물 종류 중 하나로서, 세포 독성 약물(payload)에 연결된 항체(antibody)로 구성된다. 여기서, 항체는 암세포에 특이적으로 발현되는 단백질을 인지하는 역할(targeting)을 하고, 독성 약물은 인지된 암세포 내에서 독성을 나타냄으로써 저분자 항암제에서 나타나는 정상 세포에 대한 독성 및 부작용을 최소화한다는 목적으로 설계되었다.

[0003] 실제 치료에 사용되는 ADC를 개발하기 위해서는 많은 요소들을 고려해야 한다. 구체적으로, 타겟 암세포에서 발현되는 적절한 항원, 상기 항원을 선택적으로 인지하는 항체, 및 독성을 나타내는 약물이 중요한 요소이며, 항체와 약물을 접합하기 위해서는 적절한 접합 기술과 두 물질을 연결하는 적절한 링커도 중요한 요소로서 고려되어야 한다.

[0004] 또한, ADC의 성질은 항체, 약물, 및 링커뿐만 아니라, 상기 약물이 도입된 위치, 개수, 및 균일성의 큰 영향을 받는다. 결과적으로, 이는 항체-약물 접합 기술에 의존하여 결정되며, 새로운 항체-약물 접합 기술의 개발은 암세포의 성질과 관계없이 다양한 ADC 분야에 적용 가능한 광범위한 플랫폼 기술이다.

[0005] 현재 사용되는 항체에 약물을 도입하는 접합 기술은 (1) 라이신 또는 시스테인을 이용한 화학적 도입 방법 및

(2) 효소를 이용한 위치 특이적 도입 방법이다. 우선, 화학적 방법 중 항체 표면의 라이신을 이용한 방법은 생산된 항체를 그대로 사용할 수 있다는 점이 가장 큰 장점이지만, 위치 선택성이 결여되고, ADC의 균일성(homogeneity)이 낮다는 단점이 있다. 이러한 위치 선택성 결여 및 ADC의 비균일성은 항체의 결합력 감소 및 생산 과정에서의 품질 관리에 어려움을 초래할 수 있다. 반면, 시스테인을 이용한 방법은 비교적 균일한 ADC를 합성할 수 있으나 여전히 낮은 균일성을 보이고, 유전적 변형을 통해 시스테인을 도입하거나 항체의 이황화결합(disulfide bond)을 환원시켜야 하는 단점이 존재한다. 마지막으로, 효소를 이용한 방법의 경우는 위치 선택적으로 효율적인 접합 반응을 수행할 수 있으나, 대부분의 경우에 효소가 인식할 수 있는 아미노산 서열을 항체에 도입하는 유전적 변형이 수반되어야 하는 단점이 있다.

[0006] 따라서, 유전적 변형 없이 기존의 항체 생산 시스템을 그대로 활용할 수 있고, 위치 선택적이면서 균일한 ADC를 합성할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 10-2014-0046302

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원은 비표준 아미노산(non-canonical amino acids)이 도입된 결합 단백질(binding protein) 및 피리디늄 옥심 유도체(pyridinium oxime derivative)가 결합된 표지 매개 단백질(conjugation-mediating protein), 상기 표지 매개 단백질을 이용한 항체의 표지 방법, 및 항체-약물 접합체(antibody-drug conjugates)의 위치 선택적(site-specific) 합성 방법을 제공한다.

[0009] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본원의 제 1 측면은, 비표준 아미노산이 도입된 결합 단백질 및 피리디늄 옥심 유도체가 결합된, 표지 매개 단백질을 제공한다.

[0011] 본원의 제 2 측면은, 표지 매개 단백질을 이용한 항체의 표지 방법을 제공한다.

[0012] 본원의 제 3 측면은, 표지 매개 단백질을 이용한 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본원에 따르면, 비표준 아미노산을 포함하는 결합 단백질에 도입된 피리디늄 옥심 유도체(표지 매개 단백질)를 이용하여, 항체에 약물을 위치 선택적으로 도입함으로써 항체-약물 접합체를 합성하는 방법을 제공할 수 있다.

[0014] 본원에 따른 항체-약물 접합체 합성 방법은 원형 항체에 적용 가능하고, 기존의 항체 생산 시스템에 어떤 추가 변경도 필요하지 않기 때문에 활용도가 높을 것으로 기대된다.

[0015] 또한, 본원에 따른 항체-약물 접합체 합성 방법은 매우 높은 수율로 진행될 수 있고 균일성이 확보될 수 있는 바, 항체 신약 및 다양한 단백질 신약에 적용 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은, 본원의 일 구현예에 따른 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법의 모식도이다.

도 2a 및 2b는, 본원의 일 구현예에 따른 항체 표지 방법의 모식도이다.

도 3은, 본원의 일 실시예에 있어서, Z-도메인 단백질(Z-domain protein; Z-DM) 및 Z-도메인 특이적 어피바디(Z-domain-specific affibody; Z-AFB)로 구성된 단백질을 나타내는 모식도이다.

도 4는, 본원의 일 실시예에 사용되는 4-아지도-L-페닐알라닌(4-azido-L-phenylalanine; AzF), N_6 -[(2-아지도에톡시)카보닐]-L-라이신(N_6 -[(2-azidoethoxy)carbonyl]-L-lysine; AzK), 피리디늄 옥심(pyridinium oxime)-알카인(PyOx-Alkyne), PyOx-C₆-Alkyne, *N*-알킬설포나미드(*N*-alkylsulfonamide)-플루오레세인(fluorescein)(NASA-FL), NASA-비오틴(biotin)(NASA-Bt), 및 NASA-N₃의 화학식이다.

도 5는, 본원의 일 실시예에 따른 유전자 코드 확장법 및 Cu-축매 아지드-알카인 고리화 첨가 반응(Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition; CuAAC)을 사용하여 Z-DM을 표지하는 방법을 나타내는 모식도이다.

도 6은, 본원의 일 실시예에 있어서, 비표준 아미노산(non-canonical amino acids; ncAA)이 도입되는 Z-AFB의 위치 및 상기 Z-AFB에서부터 Z-DM의 표지 위치까지의 거리를 나타내는 모식도이다.

도 7은, 본원의 일 실시예에 있어서, Z-DM, Z-AFB_K4AzF-PyOx, Z-AFB_K28AzF-PyOx, Z-AFB_F32AzF-PyOx 및 Z-AFB_K28AzK-PyOx를 사용하여 수행된 MALDI-TOF 분석 스펙트럼이다.

도 8은, 본원의 일 실시예에 있어서, Z-AFB_K4AzF-PyOx, Z-AFB_K28AzF-PyOx, Z-AFB_F32AzF-PyOx 및 Z-AFB_K28AzK-PyOx에 따른 표지 효율성 그래프 및 어피바디 K4, K28, 및 F32의 표적 라이신(Lys)까지의 거리를 나타내는 표이다.

도 9는, 본원의 일 실시예에 있어서, 원형 Z-DM 펩타이드 단편(펩타이드 단편 1), 및 FL-표지된 Z-DM 단편(펩타이드 단편 2)의 프로테아제(Glu-C) 분해 분석 스펙트럼이다.

도 10은, 본원의 일 실시예에 있어서, 펩타이드 단편 1(KGSVDNKFNKE, 서열번호 4)의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 11은, 본원의 일 실시예에 있어서, K18에서 FL의 표지를 입증하는 펩타이드 단편 2의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 12a는, 본원의 일 실시예에 있어서, 시간에 따른 Z-DM의 표지 효율성 그래프이며, 도 12b는, 본원의 일 실시예에 있어서, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 및 4 시간의 표지 시간에 따른 Z-DM 표지를 위한 MALDI-TOF MS 분석 스펙트럼이다.

도 13a 및 13b는, 본원의 일 실시예에 있어서, 각각, 비결합 단백질에 대한 표지 평가를 나타내는 모식도; 및 스트렙 Z-도메인(strep-Z domain), Fc 단편, 리소자임(lysozyme) 및 TrpR에 대한 표지 효율성 그래프이다.

도 14는, 본원의 일 실시예에 있어서, 인간 면역글로불린(human immunoglobulin) G1(IgG1)의 Fc 단편의 표지 방법을 나타내는 개략도이다.

도 15는, 본원의 일 실시예에 있어서, 알파폴드2(AlphaFold2) 프로그램을 통하여 구성된 Z-도메인 변이체(Z-M) 단백질과 PDB ID 5U4Y에서 파생된 3-나선 Fc 결합 단백질의 결정 구조를 겹쳐 놓은 이미지이다.

도 16은, 본원의 일 실시예에 있어서, Z-M 단백질에서 ncAA 및 PyOx 도입을 위한 최적의 위치 선택을 위한 Z-M 단백질과 Fc 단편의 거리를 나타내는 모식도이다.

도 17은, 본원의 일 실시예에 있어서, Z-M 변이체(Z-M_M8AzK-PyOx, Z-M_M8AzK-PyOx-C₆, Z-M_D37AzK-PyOx, Z-M_K33AzK-PyOx, 및 Z-M_H19AzK-PyOx) 및 NASA 프로브(NASA-FL 및 NASA-Bt)를 사용한 Fc 단편; NASA-FL을 사용한 Fc 단편; 및 Fc 단편에 대한 표지 실험의 HPLC 분석 그래프이다.

도 18은, 본원의 일 실시예에 있어서, Z-M 단백질의 H19, K33 및 D37에 대한 표적 라이신에 관한 구조적 방해를 나타내는 모식도이다.

도 19는, 본원의 일 실시예에 있어서, Z-M 단백질의 M8과 Fc 단편의 K248 및 K246 사이의 거리를 나타내는 모식도이다.

도 20은, 본원의 일 실시예에 있어서, 원형 Fc 단편(펩타이드 단편 5), FL-표지된 Fc 단편(펩타이드 단편 6), 및 Bt-표지된 Fc 단편(펩타이드 단편 7)의 프로테아제(트립신) 분해 분석 스펙트럼(MALDI-TOF/TOF 탠덤(tandem) MS)이다.

도 21은, 본원의 일 실시예에 있어서, 펩타이드 단편 5(ASDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR, 서열번호 6)의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 22는, 본원의 일 실시예에 있어서, K248에서 비오틴의 표지를 입증하는 펩타이드 단편 6의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 23은, 본원의 일 실시예에 있어서, K248에서 FL의 표지를 입증하는 펩타이드 단편 7의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 24는, 본원의 일 실시예에 있어서, 트라스투주맙 WT 및 Bt-표지된 트라스투주맙의 HPLC 분석 그래프이다.

도 25는, 본원의 일 실시예에 있어서, 원형 트라스투주맙 단편(펩타이드 단편 8) 및 Bt-표지된 트라스투주맙 단편(펩타이드 단편 9)의 프로테아제(트립신) 분해 분석 스펙트럼(MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS)이다.

도 26은, 본원의 일 실시예에 있어서, 펩타이드 단편 8(GPSVFLFPPKPKDTLMISR, 서열번호 8)의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 27은, 본원의 일 실시예에 있어서, 펩타이드 단편 9의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 28은, 본원의 일 실시예에 있어서, NASA-N₃을 사용하여 트라스투주맙에 BCN-VC-PABC-MMAE를 도입하는 표지 방법의 개략도이다.

도 29는, 본원의 일 실시예에 있어서, 트라스투주맙 WT, 트라스투주맙-N₃ 및 트라스투주맙-(VC-PABC-MMAE)₂의 HPLC 분석 그래프이다.

도 30은, 본원의 일 실시예에 있어서, 트라스투주맙 WT 및 트라스투주맙-N₃의 HPLC 분석 그래프이다.

도 31은, 본원의 일 실시예에 있어서, IdeS로 분해된 트라스투주맙-WT의 오비트랩(Orbitrap)-MS 분석 그래프이다.

도 32는, 본원의 일 실시예에 있어서, IdeS로 분해된 트라스투주맙-N₃의 오비트랩-MS 분석 그래프이다.

도 33은, 본원의 일 실시예에 있어서, 원형 트라스투주맙 단편(펩타이드 단편 10) 및 트라스투주맙-N₃ 단편(펩타이드 단편 11)의 프로테아제(트립신) 분해 분석 스펙트럼(MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS)이다.

도 34는, 본원의 일 실시예에 있어서, 펩타이드 단편 10(GPSVFLFPPKPKDTLMISR, 서열번호 8)의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 35는, 본원의 일 실시예에 있어서, 펩타이드 단편 11의 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석 스펙트럼이다.

도 36은, 본원의 일 실시예에 있어서, MDA-MB-231, MDA-MB-453 및 SK-BR-3에 대한 캐드사일라(Kadcyla), 트라스투주맙 WT 및 트라스투주맙-(VC-PABC-MMAE)₂의 농도에 따른 인 비트로(*in vitro*) 항종양 활성 그래프이다.

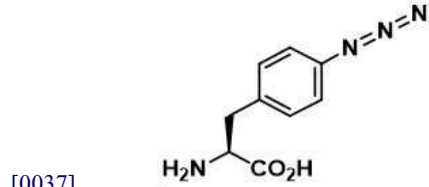
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0018] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐만 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.
- [0019] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐만 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0021] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

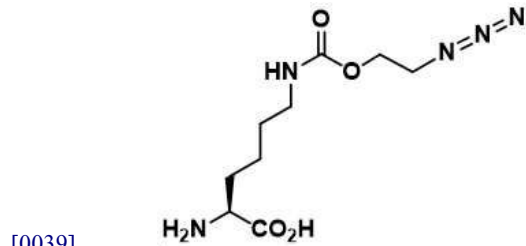
- [0022] 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~ 하는 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합(들)"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는, "A 또는 B, 또는 A 및 B"를 의미한다.
- [0025] 본원 명세서 전체에서, 작용기들이 치환된 경우, 아실기, 아미노기 (단순한 아미노기, 모노 및 디알킬아미노기, 모노 및 디아릴아미노기 및 알킬아릴아미노기를 포함함), 아실아미노기 (카르바모일기, 및 우레이도기를 포함함), 알킬카르보닐옥시기, 아릴카르보닐옥시기, 알콕시카르보닐옥시기, 알콕시카르보닐기, 카르복시기, 카르복실레이트기, 아미노카르보닐기, 모노 및 디알킬아미노카르보닐기, 시아노기, 아지도기, 할로젠기, 히드록실기, 니트로기, 트리플루오로메틸기, 티올기, 알킬티올기, 아릴티올기, 알킬티오카르보닐기, 티오카르복실레이트기, C₁₋₁₀ 알킬기, C₂₋₁₀ 알케닐기, C₂₋₁₀ 알키닐기, 시클로알킬기, 헤테로시클로알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 저급 알콕시기, 아릴옥시기, 아릴옥시카르보닐옥시기, 벤질옥시기, 벤질기, 설퍼닐기, 알킬설퍼닐기, 설퍼닐기, 설퍼이트기, 설퍼네이트기, 설퍼아미드기, 포스페이트기, 포스포네이트기, 포스페네이트기, 옥소기, 구아니딘기, 이미노기, 및 포르밀기에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0027] 이하, 본원의 구현예를 상세히 설명하였으나, 본원이 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0029] 본원의 제 1 측면은, 비표준 아미노산(non-canonical amino acids)이 도입된 결합 단백질(binding protein) 및 피리디늄 옥심 유도체(pyridinium oxime derivative)가 결합된, 표지 매개 단백질(conjugation-mediating protein)을 제공한다.
- [0030] 본 발명에서, "결합 단백질(binding protein)"은 후술할 비표준 아미노산이 유전적으로 도입될 수 있는 모든 종류의 단백질을 의미한다. 이때, "유전적으로 도입"은 결합 단백질의 종류와 상관없이 단백질에 포함된 아미노산 하나 혹은 그 이상에 대응하는 핵산 서열을 다른 핵산 서열로 치환함으로써 상기 결합 단백질에 포함된 상기 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하는 것을 의미한다.
- [0031] 예를 들어, 상기 결합 단백질은 항체에 결합하는 단백질로 알려진 단백질 A(Protein A), 단백질 G(Protein G), 단백질 L(Protein L) 또는 이와 동일한 기능을 하는 유사 단백질로부터 유래한 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 구체적으로, 상기 결합 단백질은 포도상 구균의 균체 내에 존재하는 단백질 A(Staphylococcal Protein A)의 B 도메인 변이체일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 B 도메인 변이체는 서열번호 1 또는 서열번호 2(이하, "Z-M"으로도 표시함)로서 표시되는 아미노산 서열로 이루어져 있다.
- [0034] 본 발명에서, "비표준 아미노산(non-canonical amino acids)"은 20 가지 통상의 아미노산, 셀레노시스테인(selenocysteine), 파이로라이신(pyrrolysine) 중 하나가 아닌 모든 아미노산을 지칭하며, 용어 "비표준 아미노산"과 유사한 의미로 사용될 수 있는 다른 용어는 "비천연 아미노산", "비천연적으로 코딩된 아미노산", "자연적으로 존재하지 않는 아미노산" 등이 있으나 과학적 정의는 다소 다를 수 있다. 상기 천연적으로 코딩된 아미노산이란, 20 가지 통상의 아미노산, 셀레노시스테인 또는 파이로라이신을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 예를 들어, 상기 비표준 아미노산은 하기 화학식 1 내지 화학식 9로 표시되는 아미노산인 4-아지도-L-페닐알라닌(4-azido-L-phenylalanine), N₆-((2-아지도에톡시)카보닐)-L-라이신(N₆-((2-azidoethoxy)carbonyl)-L-lysine), 4-아세틸-페닐알라닌(4-acetyl-phenylalanine), 0-프로파르길-티로신(0-propargyl-tyrosine), N₆-(프로파르길옥시)카보닐-라이신(N₆-(propargyloxy)carbonyl-lysine), N₆-(바이사이클로노닐옥시)카보닐-라이신(N₆-(bicyclononyloxy)carbonyl-lysine), N₆-((2-메틸사이클로프로페닐)메톡시)카보닐-라이신(N₆-((2-methylcyclopropyl)methoxy)carbonyl-lysine),

methylcyclopropenyl)methoxy)carbonyl)-lysine), N₆-(트랜스-사이클로옥테닐옥시)카모닐)-라이신(N₆-(trans-cyclooctenyloxy)carbonyl-lysine) 및 4-(6-메틸테트라지닐)페닐알라닌(4-(6-methyltetrazinyl)phenylalanine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

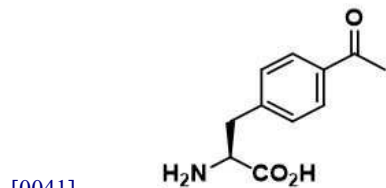
[0036] [화학식 1]



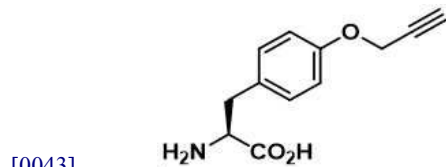
[0038] [화학식 2]



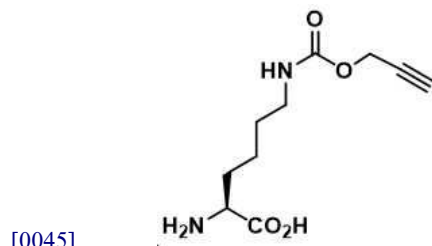
[0040] [화학식 3]



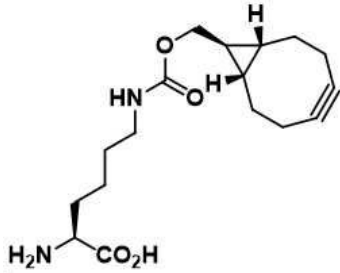
[0042] [화학식 4]



[0044] [화학식 5]

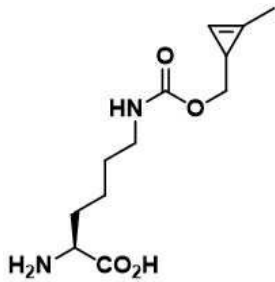


[0046] [화학식 6]



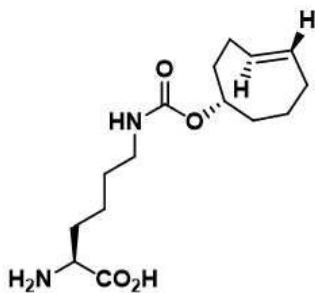
[0047]

[0048] [화학식 7]



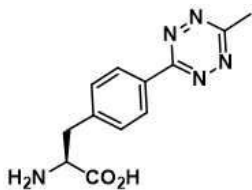
[0049]

[0050] [화학식 8]



[0051]

[0052] [화학식 9]



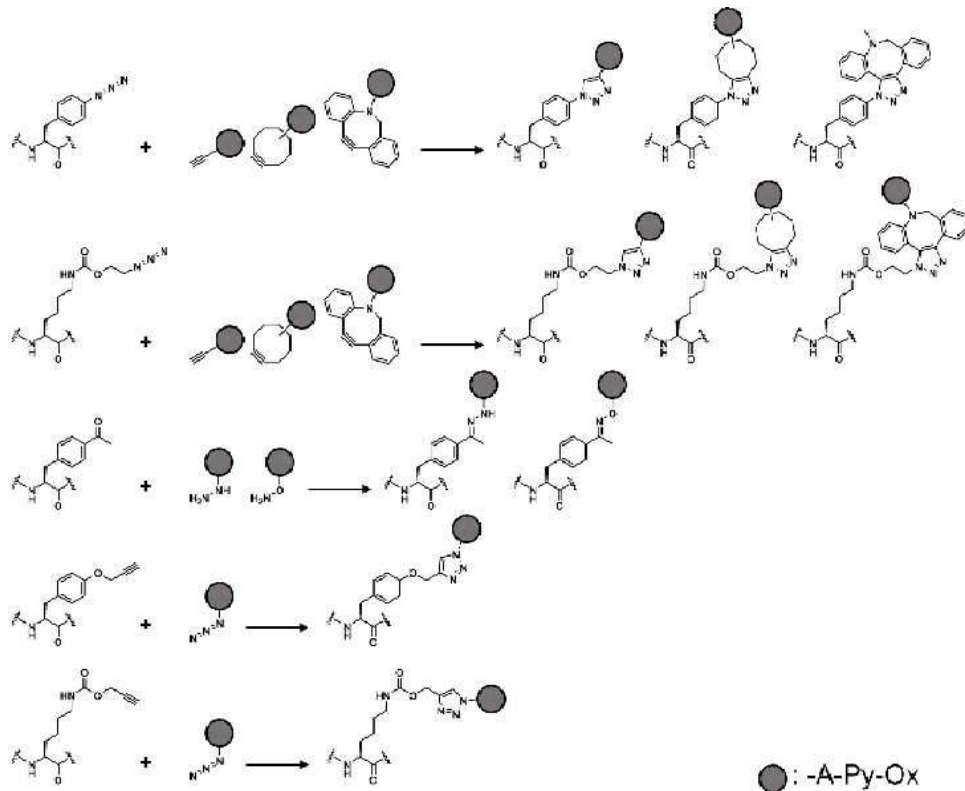
[0053]

[0054] 구체적으로, 상기 비표준 아미노산은 4-아지도-L-페닐알라닌(4-azido-L-phenylalanine), N_6 -((2-아지도에톡시)카보닐)-L-라이신(N^6 -((2-azidoethoxy)carbonyl)-L-lysine), 0-프로파르길-티로신(0-propargyl-tyrosine), 또는 N_6 -(프로파르길옥시)카보닐-라이신(N_6 -(propargyloxy)carbonyl-lysine)일 수 있다.

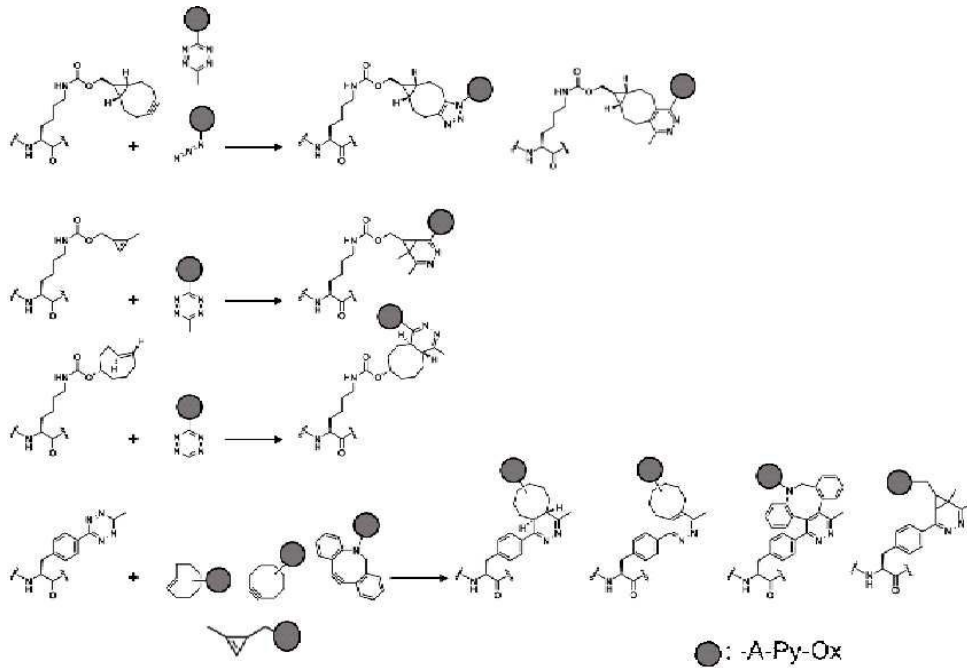
[0055] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비표준 아미노산은 상기 결합 단백질에 포함된 적어도 1개 이상의 아미노산과 치환되어 도입되는 것일 수 있다.

[0056] 상기 비표준 아미노산으로 치환될 수 있는 결합 단백질의 아미노산의 위치는, 하나 이상의 결합 파트너에 결합하는 부위인 잠재적인 수용체 결합 부위로부터 배제된 위치, 완전히 또는 부분적으로 용매에 노출될 수 있는 위치, 근접 잔기와 수소결합 상호작용이 최소화되거나 전무한 위치, 근접 반응성 잔기에 최소한으로 노출된 위치, 단백질의 3 차원 구조로부터 예상되는 바, 매우 유연성이 높거나 구조적으로 강성인 위치, 관련 수용체, 리간드 또는 결합 단백질과 결합하였거나 결합하지 않은 위치, 또다른 단백질 또는 다른 생물학적으로 활성인 분자에 결합하였거나 결합하지 않은 부위에 있는 위치, 또는 전체 구조의 유연성 또는 강성을 원하는 대로 변경시킴으로써 단백질 그 자체, 또는 하나 이상의 단백질을 포함하는 이량체 또는 다량체의 입체형태를 조절할 수 있는

- [0068] W는 -H, -F, -Cl, -Br, -NO₂, 또는 -CF₃이고,
- [0069] N은 0 내지 4임.
- [0070] 여기서, 상기 C₁₋₁₀ 알킬렌기는 메틸렌기, 에틸렌기, 프로필렌기, 부틸렌기, 펜틸렌기, 헥실렌기, 헵틸렌기, 노닐렌기, 데실렌기, 및 이들의 이성질체들로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0071] 여기서, 상기 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기는 $[-(C_2H_4)-O-]_m$ 으로서 표시할 수 있으며, m은 1 내지 5의 정수일 수 있다.
- [0072] 여기서, A로서 나열된 연결기들의 조합에 따라, $-(CH_2)_o-O-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-O-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-O-(CH_2)_p-$ (여기서, o 및 p는, 각각 독립적으로, 0 내지 5임)와 같은 형태의 연결 부위를 가질 수도 있다.
- [0073] 상기 피리디늄 옥심에 존재하는 히드록실기의 pK_a는 8 이하의 값을 가지고 일반적인 생체 내 조건에서 음이온 상태로 존재할 수 있는 바, 표지 물질(비표준 아미노산이 도입된 결합 단백질)과 효율적이고 선택적인 반응이 가능하다.
- [0074] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 결합 단백질에 도입된 비표준 아미노산과 피리디늄 옥심 유도체는 구리(I)-축매 아지드-알카인 고리화 첨가 반응(Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition; CuAAC) 또는 스트레인-촉진 아지드-알카인 고리화 첨가 반응(Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition; SPAAC) 등의 생물직교 반응(Bioorthogonal reactions)에 의해 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 구체적으로, 상기 생물직교 반응은 상기 식 1의 피리디늄 옥심 유도체의 B가 상술한 비표준 아미노산의 말단 작용기와 반응하는 것일 수 있다.
- [0076] 예를 들어, 상기 식 1의 피리디늄 옥심 유도체의 B가 상술한 비표준 아미노산의 말단 작용기와 반응하여 결합하는 반응에 따라 형성되는 구조는 하기와 같을 수 있다:



[0077]



[0078]

[0079]

상기 CuAAC는 구리 이온(Cu^{2+}), 환원제(ascorbic acid, Cu^{2+} 를 Cu^+ 로 변환시킴), 리간드(구리 이온 안정화)가 존재하는 조건에서 효율적으로 반응이 진행될 수 있다.

[0080]

상기 CuAAC는 높은 민감성과 특이성을 가지는 반응으로, 도 5는 상기 CuAAC의 과정을 나타내는 개략도이다. 도 5에 나타난 바에 따르면, 아지드기(N_3)-함유 비표준 아미노산이 유전적으로 도입된 결합 단백질에 포함된 상기 아지드기(N_3)가 피리디늄 옥심 유도체와 CuAAC에 의한 컨쥬게이션 반응을 일으킨다.

[0081]

피리디늄 옥심 유도체와 CuAAC는 높은 속도상수(0.1 내지 $1.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)를 가지고 있고, 반응 후 생성되는 구조가 상대적으로 작은 트리아졸(triazole)이기 때문에 단백질과 같은 생화학 분자들의 컨쥬게이션(bioconjugation)에 이상적인 것으로 잘 알려져 있다. 단백질 컨쥬게이션에 CuAAC를 적용하기 위해서는, 결합 단백질에 반드시 아지드기(알카인기)가 도입되어 있어야 한다. 결합 단백질 내의 아지드기(알카인기)의 도입은 유전적 방법에 의하여 성취될 수 있으므로, 유전적으로 도입된 아지드기(알카인기)-함유 아미노산에 대한 CuAAC의 적용은 결합 단백질의 효과적인 표지를 가능하게 할 수 있다.

[0082]

상기 컨쥬게이션 반응은 상기 결합 단백질과 상기 피리디늄 옥심 유도체의 혼합에 의해 개시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083]

본 발명에서, 상기 "비표준 아미노산이 도입된 결합 단백질"을 코딩하는 핵산 서열은 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열에 기초하며, 상기 아미노산 서열에 포함된 특정 아미노산을 도입, 치환, 또는 제거시키기 위하여 상기 아미노산 서열에 대응하는 상기 핵산 서열을 변화시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 핵산 서열은 당업계에서 공지된 방법에 따라 선택적으로 또는 비선택적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질의 유전자 중 특정 아미노산을 코딩하는 코돈을 앰버 코돈(TAG)으로 치환하고; 상기 정지 코돈으로 치환된 코돈을 가지는 단백질의 유전자를 포함하는 플라스미드, 적합한 tRNA 유전자 및 적합한 아미노아실-tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 플라스미드를 세포, 예를 들어, 대장균 내로 도입하여 형질전환 세포를 제조하고; 상기 형질전환 세포를 상기 비표준 아미노산이 포함된 배지에서 배양하는 방법을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0084]

상기 형질전환 세포가 단백질 돌연변이체를 생산함에 있어서, 상기 비표준 아미노산은 상기 아미노아실-tRNA 합성효소에 의하여 tRNA에 결합할 수 있고, 상기 비표준 아미노산과 결합된 상기 tRNA는 상기 치환된 핵산 서열(TAG)을 인식하여, 번역되는 단백질의 적합한 자리에 상기 비표준 아미노산을 삽입하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

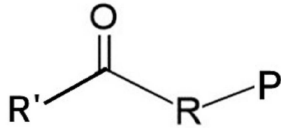
[0085]

상기 비표준 아미노산은 단백질의 임의의 말단 위치 또는 임의의 내부 위치를 비롯한, 단백질 상의 임의의 위치에 존재할 수 있다. 상기 비표준 아미노산이 도입된 단백질은 생합성적으로 또는 고정상 펩티드 합성법(solid-

phase peptide synthesis)을 통해 생산될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 "생합성적으로" 라는 것은 폴리뉴클레오티드, 코돈, tRNA, 및 리보솜 중 1 개 이상을 사용하는 것을 포함하여, 세포성 번역 시스템을 사용한 방법을 의미하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

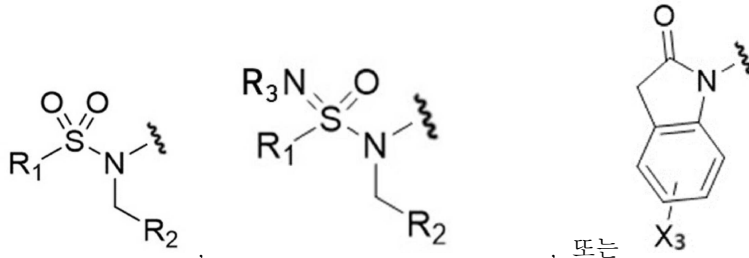
- [0086] 본 발명에서, "표지 매개 단백질(conjugation-mediating protein)"은 직접적인 표지 물질을 포함하고 있지는 않지만 타겟 단백질에 결합하여 표지를 촉매하는 매개체 역할을 하는 단백질을 의미한다.
- [0088] 본원의 제 2 측면은, 다음의 단계를 포함하는 항체의 표지 방법을 제공한다:
- [0089] 상술한 표지 매개 단백질이 원형 항체(Native antibody)에 결합하는 제1 단계;
- [0090] 상기 표지 매개 단백질과 프로브가 결합된 *N*-알킬설포나미드 유도체가 반응하여 활성 에스터 중간체(Active ester intermediate)를 형성하는 제2 단계; 및
- [0091] 상기 원형 항체의 Fc 도메인에 포함된 라이신(Lysine)과 상기 중간체가 반응하여 아미드(Amide) 결합을 형성하는 제3 단계.
- [0092] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 항체의 표지 방법이 수행되는 제1 단계, 제2 단계 및 제3 단계는 순차적으로 기재되어 있으나, 이는 반응을 설명하기 위한 기재로서, 각 단계의 진행 순서는 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 항체의 표지 방법은 실질적으로 동시에 또는 거의 동시에 진행되는 반응일 수 있다.
- [0093] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1 단계는 피리디늄 옥심 유도체가 표지된 결합 단백질(표지 매개 단백질)과 원형 항체를 섞어 줌으로써 수행되는 것일 수 있다.
- [0094] 본 발명에서, "원형 항체(native antibody)"는 손상되지 않은 인간 면역 체계의 기능 결과로 자연적으로 발생하는 모든 종류의 항체를 의미하며, "천연 항체", "완전한 항체" 등과 동일한 의미로 사용될 수 있다. 원형 항체는 재조합 라이브러리 방법(파지 또는 형질전환 마우스)으로 얻은 항체와 일부 측면에서 다르며, 인간 바이러스 질병에 대한 이상적인 치료법이 될 수 있는 독특한 특성을 가지고 있다.
- [0095] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(kappa) 및 람다(lambda) 타입을 가진다(Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).
- [0096] 본 발명에서, 상기 "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3 개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한 본 발명에서 상기 "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [0097] 구체적으로, 상기 원형 항체는 인간 면역글로불린 G1(human immunoglobulin G1; IgG1)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2 단계는 표지 매개 단백질이 결합된 원형 항체에 프로브가 결합된 *N*-알킬설포나미드 유도체를 섞어 줌으로써 수행되는 것일 수 있다.
- [0099] 본 발명에서, "프로브가 결합된 *N*-알킬설포나미드(*N*-alkylsulfonamide, NASA) 유도체"는 *N*-알킬설포나미드기 또는 이의 유도체가 치환된 프로브(P)를 의미하며, 하기 식 2로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0100] [식 2]



[0101]

[0102] 상기 식 2에서,



[0103] R'은 , 또는 인 것이며,

[0104] R은 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 페닐렌기, 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₁₋₁₀ 알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, N, O, 또

는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₂₀ 페닐렌기, ,

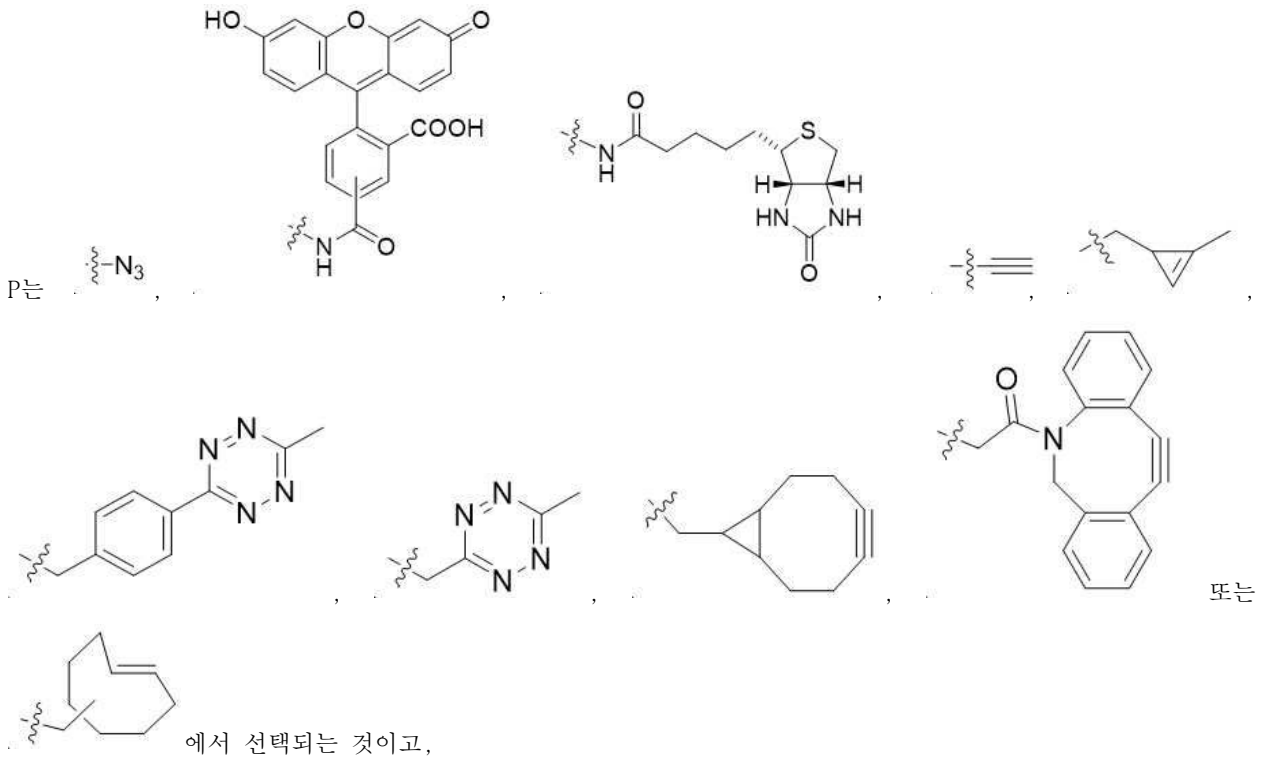
, , 및 이들의 조합들에서 선택되는 것이고,

[0105] R_c 및 R_d는, 각각 독립적으로, 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기 또는 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기인 것이고,

[0106] R₁은 CF₃ 또는 에서 선택되는 것이고,

[0107] R₂는 CF₃, 또는 에서 선택되는 것이고,

[0108] R₃는 H, 선형 또는 분지형의 C₁₋₅ 알킬기인 것이고,



[0110] X_1 , X_2 및 X_3 은, 페닐기의 수소를 하나 이상 치환하는 것으로서, 각각 독립적으로, F, Cl, Br, CF_3 또는 NO_2 인 것이고,

[0111] Y는 O 또는 NH이고,

[0112] Z는 $-NR_eR_f$ 로 치환되거나 또는 비치환된 선형 또는 분지형의 C_{1-20} 알킬기로서,

[0113] Re 및 Rf 는, 각각 독립적으로, C_{1-5} 알킬기이거나, 또는 서로 연결된 C_{4-10} 고리형알킬기로서, N, S, 또는 O의 형태로 원자를 포함하거나 또는 포함하지 않는 것이다.

[0114] 여기서, 상기 C_{1-10} 알킬렌기는 메틸렌기, 에틸렌기, 프로필렌기, 부틸렌기, 펜틸렌기, 헥실렌기, 헵틸렌기, 노닐렌기, 데실렌기, 및 이들의 이성질체들로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0115] 여기서, 상기 C_{2-10} 폴리에틸렌글리콜기는 $[-(C_2H_4)-O-]_m$ 으로서 표시할 수 있으며, m은 1 내지 5의 정수일 수 있다.

[0116] 여기서, 상기 C_{1-10} 알킬렌기와 상기 C_{2-10} 폴리에틸렌글리콜기의 조합에 따라, $-(CH_2)-(CH_2CH_2)-O-$ 또는 $-(CH_2CH_2)-(CH_2CH_2)-O-$ 와 같은 형태의 연결 부위를 가질 수도 있다.

[0117] 여기서, R로서 나열된 연결기들의 조합에 따라, $-(CH_2)_o-O-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-O-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-O-(CH_2)_p-$ (여기서, o 및 p는, 각각 독립적으로, 0 내지 5임)와 같은 형태의 연결 부위를 가질 수도 있다.

[0118] 구체적으로, 상기 프로브가 결합된 *N*-알킬설포나미드 유도체는 *N*-알킬설포나미드-플루오레세인(fluorescein)(NASA-FL), *N*-알킬설포나미드-비오틴(biotin)(NASA-Bt), *N*-알킬설포나미드- N_3 , *N*-알킬설포나미드-싸이올(thiol), 테트라진(tetrazine), 사이클로프로펜(cyclopropene), 트랜스-사이클로옥텐(trans-cyclooctene), 바이사이클로[6.1.0]논-4-인(bicyclo[6.1.0]non-4-yne)(BCN), 및/또는 다이벤조사이클로옥텐(dibenzocyclooctyne)(DBCO)일 수 있다.

[0119] 보다 구체적으로, 상기 프로브가 결합된 *N*-알킬설포나미드 유도체는 *N*-알킬설포나미드-플루오레세인(fluorescein)(NASA-FL), *N*-알킬설포나미드-비오틴(biotin)(NASA-Bt) 또는 *N*-알킬설포나미드- N_3 일 수 있다.

[0120] 본 발명에서, 상기 표지 매개 단백질과 프로브가 결합된 *N*-알킬설포나미드 유도체는 상호 특이적으로 반응하여

활성 에스터 중간체를 형성하는 것일 수 있다.

[0121] 본 발명에서, "활성 에스터 중간체(active ester intermediate)"는 아실-옥심 중간체 (Acyl-oxime intermediate)를 의미한다.

[0122] 본 발명에서, 상기 활성 에스터 중간체는 상기 원형 항체의 Fc 도메인에 포함된 라이신(Lysine)과 결합되는 것일 수 있다.

[0123] 구체적으로, 상기 활성 에스터 중간체와 라이신은 아마이드(Amide) 결합을 형성하여 결합되는 것일 수 있다.

[0124] 본 발명에서, "Fc 도메인(Fc domain)"은 항체의 단일 중쇄 Fc 영역을 의미하며, 상기 Fc 도메인은 CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 것일 수 있다.

[0125] 구체적으로, 상기 Fc 도메인은 힌지(hinge) 영역을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0126] 또한 구체적으로, 상기 Fc 도메인은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, 이들의 조합(combination) 및 이들의 하이브리드(hybrid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0127] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 Fc 도메인 단백질은 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어져 있다.

[0128] 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 본원의 제 1 측면에 대해 설명한 내용은 본원의 제 2 측면에서 그 설명이 생략되었다더라도 동일하게 적용될 수 있다.

[0130] 본원의 제 3 측면은, 다음의 단계를 포함하는 항체-약물 접합체(Antibody-drug conjugates)의 위치 선택적 (site-specific) 합성 방법을 제공한다:

[0131] 상술한 표지 매개 단백질이 원형 항체에 결합하는 제1 단계;

[0132] 상기 표지 매개 단백질과 프로브가 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체가 반응하여 활성 에스터 중간체를 형성하는 제2 단계;

[0133] 상기 원형 항체의 Fc 도메인에 포함된 라이신과 상기 중간체가 반응하여 아마이드 결합을 형성하는 제3 단계; 및

[0134] 상기 라이신에 결합된 프로브에 약물이 반응하여 표지되는 제4 단계.

[0135] 또는

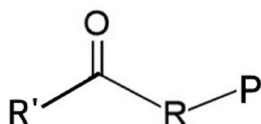
[0136] 상술한 표지 매개 단백질이 원형 항체에 결합하는 제1 단계;

[0137] 상기 표지 매개 단백질과 약물이 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체가 반응하여 활성 에스터 중간체를 형성하는 제2 단계; 및

[0138] 상기 원형 항체의 Fc 도메인에 포함된 라이신과 상기 중간체가 반응하여 아마이드 결합을 형성하는 제3 단계.

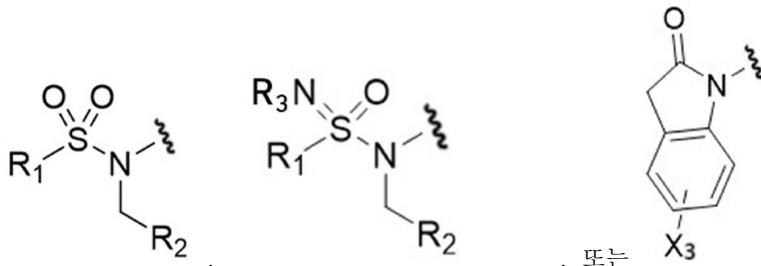
[0139] 본 발명에서, "프로브가 결합된 N-알킬설폰아미드(N-alkylsulfonamide, NASA) 유도체"는 N-알킬설폰아미드기 또는 이의 유도체가 치환된 프로브(P)를 의미하며, 하기 식 2로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0140] [식 2]



[0141]

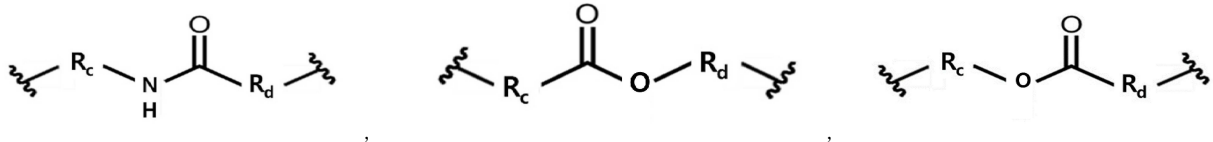
[0142] 상기 식 2에서,



[0143] R'은 , 또는 인 것이며,

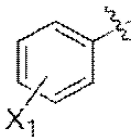
[0144] R은 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 페닐렌기, 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₁₋₁₀ 알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, N, O, 또

는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₂₀ 페닐렌기,

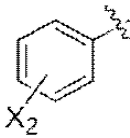


및 이들의 조합들에서 선택되는 것이고,

[0145] R_c 및 R_d는, 각각 독립적으로, 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기 또는 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기인 것이고,

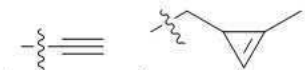
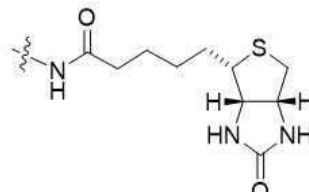
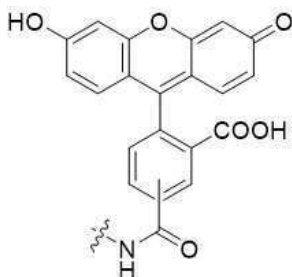


[0146] R₁은 CF₃ 또는 에서 선택되는 것이고,

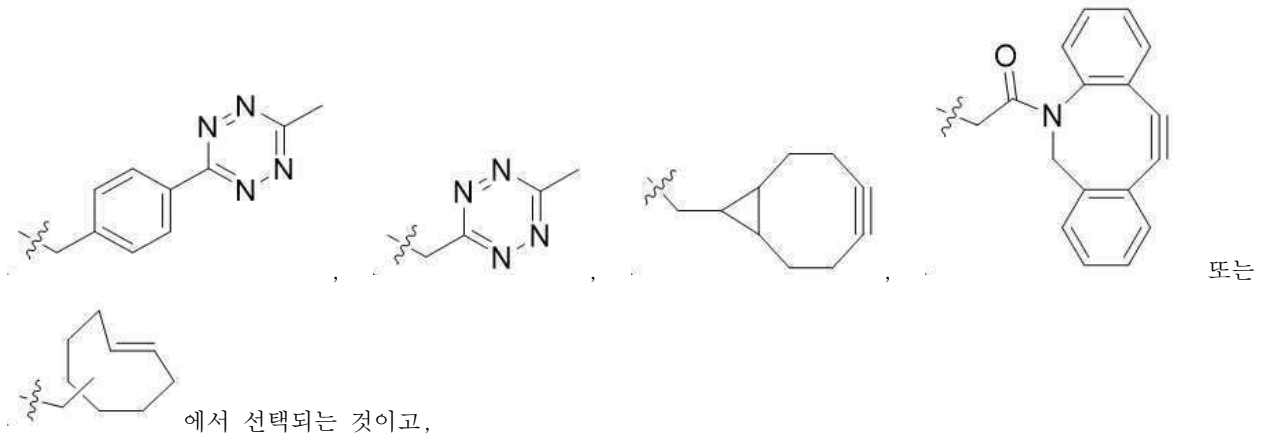


[0147] R₂는 CF₃, 또는 에서 선택되는 것이고,

[0148] R₃는 H, 선형 또는 분지형의 C₁₋₅ 알킬기인 것이고,

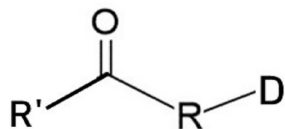


[0149] P는 , , ,



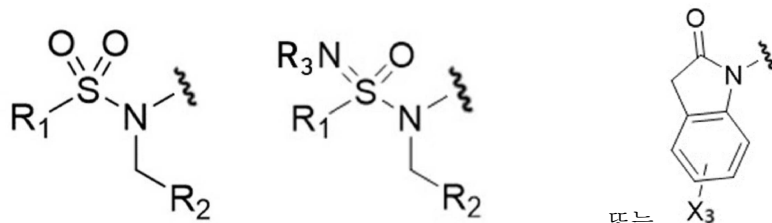
- [0150] X_1 , X_2 및 X_3 은, 페닐기의 수소를 하나 이상 치환하는 것으로서, 각각 독립적으로, F, Cl, Br, CF_3 또는 NO_2 인 것이고,
- [0151] Y는 O 또는 NH이고,
- [0152] Z는 $-NR_eR_f$ 로 치환되거나 또는 비치환된 선형 또는 분지형의 C_{1-20} 알킬기로서,
- [0153] Re 및 Rf는, 각각 독립적으로, C_{1-5} 알킬기이거나, 또는 서로 연결된 C_{4-10} 고리형알킬기로서, N, S, 또는 O의 헤테로 원자를 포함하거나 또는 포함하지 않는 것이다.
- [0154] 여기서, 상기 C_{1-10} 알킬렌기는 메틸렌기, 에틸렌기, 프로필렌기, 부틸렌기, 펜틸렌기, 헥실렌기, 헵틸렌기, 노닐렌기, 데실렌기, 및 이들의 이성질체들로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0155] 여기서, 상기 C_{2-10} 폴리에틸렌글리콜기는 $[-(C_2H_4)-O-]_m$ 으로서 표시할 수 있으며, m은 1 내지 5의 정수일 수 있다.
- [0156] 여기서, 상기 C_{1-10} 알킬렌기와 상기 C_{2-10} 폴리에틸렌글리콜기의 조합에 따라, $-(CH_2)-(CH_2CH_2)-O-$ 또는 $-(CH_2CH_2)-(CH_2CH_2)-O-$ 와 같은 형태의 연결 부위를 가질 수도 있다.
- [0157] 여기서, R로서 나열된 연결기들의 조합에 따라, $-(CH_2)_o-O-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-O-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-O-(CH_2)_p-$ (여기서, o 및 p는, 각각 독립적으로, 0 내지 5임)와 같은 형태의 연결 부위를 가질 수도 있다.
- [0158] 구체적으로, 상기 프로브가 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체는 N-알킬설폰아미드-플루오레세인(fluorescein)(NASA-FL), N-알킬설폰아미드-비오틴(biotin)(NASA-Bt), N-알킬설폰아미드- N_3 , N-알킬설폰아미드-싸이올(thiol), 테트라진(tetrazine), 사이클로프로펜(cyclopropene), 트랜스-사이클로옥텐(trans-cyclooctene), 바이사이클로[6.1.0]논-4-인(bicyclo[6.1.0]non-4-yne)(BCN), 및/또는 다이벤조사이클로옥텐(dibenzocyclooctyne)(DBCO)일 수 있다.
- [0159] 보다 구체적으로, 상기 프로브가 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체는 N-알킬설폰아미드-플루오레세인(fluorescein)(NASA-FL), N-알킬설폰아미드-비오틴(biotin)(NASA-Bt) 또는 N-알킬설폰아미드- N_3 일 수 있다.
- [0160] 본 발명에서, 상기 표지 매개 단백질과 프로브가 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체는 상호 특이적으로 반응하여 활성 에스터 중간체를 형성하는 것일 수 있다.
- [0161] 본 발명에서, 상기 라이신에 결합되는 "프로브"는 상기 식 2로서 표시되는 상기 프로브가 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체에서 P로서 표시되는 부분일 수 있다.
- [0162] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 표지 매개 단백질과 약물이 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체가 직접적으로 반응하는 경우, 상기 약물이 프로브로서의 기능을 수행하는 것일 수 있다. 이 경우, 상기 약물이 결합된 N-알킬설폰아미드 유도체는 하기 식 3으로 표시되는 것일 수 있다:

[0163] [식 3]



[0164]

[0165] 상기 식 3에서,



[0166] R'은 , 또는 인 것이며,

[0167] R은 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, 치환 또는 비치환된 C₅₋₁₀ 페닐렌기, 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₁₋₁₀ 알킬렌기, N, O, 또는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₁₀ 시클릭알킬렌기, N, O, 또

는 S에서 선택되는 헤테로 원자를 포함하는 C₅₋₂₀ 페닐렌기, ,

, , 및 이들의 조합들에서 선택되는 것이고,

[0168] R_c 및 R_d는, 각각 독립적으로, 존재하지 않거나, 치환 또는 비치환된 C₁₋₁₀ 알킬렌기 또는 치환 또는 비치환된 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기인 것이고,

[0169] R₁은 CF₃ 또는 에서 선택되는 것이고,

[0170] R₂는 CF₃, 또는 에서 선택되는 것이고,

[0171] R₃는 H, 선형 또는 분지형의 C₁₋₅ 알킬기인 것이고,

[0172] D는 약물 또는 절단가능한 링커를 포함하는 약물인 것이고,

[0173] X₁, X₂ 및 X₃은, 페닐기의 수소를 하나 이상 치환하는 것으로서, 각각 독립적으로, F, Cl, Br, CF₃ 또는 NO₂인 것이고,

[0174] Y는 O 또는 NH이고,

[0175] Z는 -NR_eR_f로 치환되거나 또는 비치환된 선형 또는 분지형의 C₁₋₂₀알킬기로서,

- [0176] Re 및 Rf는, 각각 독립적으로, C₁₋₅ 알킬기이거나, 또는 서로 연결된 C₄₋₁₀ 고리형알킬기로서, N, S, 또는 O의 헤테로 원자를 포함하거나 또는 포함하지 않는 것이다.
- [0177] 여기서, 상기 C₁₋₁₀ 알킬렌기는 메틸렌기, 에틸렌기, 프로필렌기, 부틸렌기, 펜틸렌기, 헥실렌기, 헵틸렌기, 노닐렌기, 데실렌기, 및 이들의 이성질체들로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0178] 여기서, 상기 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기는 $[-(C_2H_4)-O-]_m$ 으로서 표시할 수 있으며, m은 1 내지 5의 정수일 수 있다.
- [0179] 여기서, 상기 C₁₋₁₀ 알킬렌기와 상기 C₂₋₁₀ 폴리에틸렌글리콜기의 조합에 따라, $-(CH_2)-(CH_2CH_2)-O-$ 또는 $-(CH_2CH_2)-(CH_2CH_2)-O-$ 와 같은 형태의 연결 부위를 가질 수도 있다.
- [0180] 여기서, R로서 나열된 연결기들의 조합에 따라, $-(CH_2)_o-O-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-NH-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-O-(C_6H_4)-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-NH-(CH_2)_p-$, $-(CH_2)_o-(C_6H_4)-O-(CH_2)_p-$ (여기서, o 및 p는, 각각 독립적으로, 0 내지 5임)와 같은 형태의 연결 부위를 가질 수도 있다.
- [0181] 본 발명에서, "약물(payload)"은 실제 항암 효과의 상당 부분을 차지하게 되는 저분자 합성 화합물을 의미하며, 항체만큼 중요한 항체-약물 접합체의 구성 요소 중 하나이다. 본 발명에서 상기 약물은 세포독성 및 항암 효과를 나타내는 모든 종류의 화합물을 포함한다.
- [0182] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약물은 약물 또는 절단가능한(cleavable) 링커를 포함하는 약물일 수 있다.
- [0183] 본 발명의 일 구현예에 따른 항체-약물 접합체의 위치 선택적 합성 방법은, 본 발명의 적용에 제한되는 사항이 없는 한, 항체-약물 접합체에 적용될 수 있는 약물이면 제한없이 적용될 수 있다. 예를 들어, 상기 약물은 MMAE (monomethyl auristatin E), 메이탄시노이드(Maytansinoids; 비제한적인 예로서, DM1 및 DM4), 칼리키아마이신(Calicheamicin), 엑사테칸(exatecan), SN-38, MMAF (monomethyl auristatin F), 및 이들의 유도체들에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0184] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 링커는 본 기술분야에서 통상적으로 사용되며 항체-약물 결합체에 유용한 링커는 제한없이 사용될 수 있다. 여기서, 상기 링커는 항체와 약물을 부착시키는 화학적 연결 고리로서, 체내에서 순환되거나 분포될 때는 안정성을 유지하되, 종양 내에 침투하여 세포 내로 들어가는 경우에만 선택적으로 잘려 나가 결합된 약물을 방출해야 한다. 통상적으로 상기 링커는 어태치먼트(attachment)-스페이서(spacer)-릴리스(release)로 구성되며, 상용화된 링커의 구성 중 어태치먼트, 스페이서 및 릴리스 중 하나 이상의 구성요소를 변형 및/또는 개량하여 새로운 링커를 개발할 수 있다. 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 링커는 본 기술분야에서 상용되는 링커 뿐만 아니라 새로이 개발되는 링커도 제한없이 사용될 수 있다.
- [0185] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 링커는 "절단 가능한 링커"로서, N-숙신이미딜-4-(2-피리딜다이싸이오)펜타노에이트 [N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)pentanoate; SPP], N-숙신이미딜-4-(2-피리딜다이싸이오)부타노에이트 [N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)butanoate; SPDB], sulfo-SPDB, MDS, DMDS, DSDM, 또는 NDMS 등의 다이설파이드 링커; Phe-Lys-PABC, Val-Cit-PABC, Val-Ala-PABC, MHVCBC (valine-citrulline), 또는 MHFKBC (phenylalanine-lysine) 등의 효소적으로 절단 가능한 링커; MHH 등의 히드라존 링커; 또는 GBC (글루쿠론산, glucuronic acid), GBDCN (글루쿠론산), β-글루쿠로나이드 링커 등의 글루코시테이스-민감성 링커를 포함하거나, 또는 절단 불가능성 링커로서, Mal-PEG-NHS, N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트 [N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate, SMCC], Mal-alkane linker, 비스-말레이미도폴리에틸렌글리콜 (bis-maleimidopolyethyleneglycol, BMPEO), N-(β-말레이미도프로필옥시)숙신이미드 에스터 [N-(β-maleimidopropoxy)succinimide ester, BMPS], ε-말레이미도카프로산 N-히드록시숙신이미드 에스터 (ε-maleimidocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester, EMCS), γ-말레이미도부티르산 N-숙신이미딜 에스터 (γ-maleimidobutyric acid N-succinimidyl ester, GMBS), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스터 (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, MBS), 4-(4-N-말레이미도페닐)-부티르산 히드라지드 [4-(4-N-maleimidophenyl)-butyric acid hydrazide, MPBH], N-숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트 [N-succinimidyl 3-(bromoacetamido)propionate, SBAP], N-숙신이미딜 아이오도아세테이트 (N-succinimidyl iodoacetate, SIA), N-숙신이미딜-4-(아이오도아세틸)-아미노벤조에이트 [N-succinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoate, SIAB], N-숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트 [N-succinimidyl 4-(p-

maleimidophenyl)butyrate, SMPB], 또는 숙신이미딜-6-(말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트 [succinimidyl-6-(maleimidopropionamido)hexanoate, SMPH] 등을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0186] 구체적으로, 상기 "절단가능한 링커"는 Val-Cit-*p*-aminobenzyloxycarbonyl(Val-Cit-PABC)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0187] 상기 약물은 상기 프로브가 원형 항체에 결합된 후 상기 프로브에 약물이 결합하는 형태로 도입되거나, 또는 상술한 약물이 결합된 N-알킬설포나미드 유도체 형태로 사용되어 표지 매개 단백질에 의해 항체와 아미드 결합을 형성하여 원형 항체에 도입될 수 있다.

[0188] 본원의 제 1 및/또는 제 2 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 본원의 제 1 및/또는 제 2 측면에 대해 설명한 내용은 본원의 제 3 측면에서 그 설명이 생략되었다라도 동일하게 적용될 수 있다.

[0190] 이하, 본원에 대하여 실시예를 이용하여 좀더 구체적으로 설명하지만, 하기 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것일 뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0192] [실시예]

[0193] 1. 실험 물질 및 분석 방법

[0194] 1.1. 실험 물질

[0195] 단백질 표지에 필요한 물질은 구입 후 추가적인 정제 단계 없이 사용하였다.

[0196] 비표준 아미노산(ncAA) 도입에 있어서, N₆-[(2-아지도에톡시)카보닐]-L-라이신(N₆-[(2-azidoethoxy)carbonyl]-L-lysine; AzK)은 아이리스 바이오테크(Iris Biotech)에서 구입하고, 4-아지도-L-페닐알라닌(4-azido-L-phenylalanine; AzF)은 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)에서 구입하였다. NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CuSO₄, NaOH, 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA), 글리세롤, 소듐-L-아스코르베이트(sodium-L-ascorbate), 아미노구아니딘 염산염(aminoguanidine hydrochloride) 및 아미노산은 삼전화학에서 구입하였다. 유당(lactose)과 황산도데실소듐(sodium dodecyl sulfate; SDS)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였다. 아라비노스(arabinose)와 클로람페니콜(chloramphenicol)은 알파 에이사(Alfa Aesar)에서 구입하였다. 암피실린(ampicillin), 카나마이신(kanamycin), 디티오프레이톨(dithiothreitol; DTT)은 각각 피셔 바이오리 에이전트(Fisher BioReagent), 대정 화학, 바이오베이직(BioBasic)에서 구입하였다. Ni-NTA 아가로스(NTA agarose)는 퀴아젠(Qiagen)에서 구입하였다. HEPES와 LB 액체 배지는 각각 도진도 래보라토리스(Dojindo Laboratories)와 김코(Gibco)에서 구입하였다.

[0197] 말디-토프(matrix-associated laser desorption ionization time-of-flight; MALDI-TOF) 분석에 있어서, 시나프산(sinapic acid; SA), α-시아노-4-하이드록시신남산(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA) 및 2,5-디하이드록시벤조산(2,5-dihydroxybenzoic acid; DHB)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였다.

[0198] [16] 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography; HPLC) 분석에 있어서, HPLC-등급 아세토니트릴(acetonitrile; ACN), 포름산 및 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid; TFA)은 삼전화학에서 구입하였다. 4-니트로벤젠설포나미드(4-nitrobenzenesulfonamide)와 4-(니트로벤질 브로마이드)(4-nitrobenzyl bromide)는 콤비-블록스(Combi-Blocks)에서 구입하였다. 5(6)-카르복시플루오레세인(carboxyfluorescein)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였고, 피리딘-4-카르복시알도옥심(pyridine-4-carboxaldoxime), 4-브로모-1-뷰타인(4-bromo-1-butyne), 6-클로로-1-헥사인(6-chloro-1-hexyne)은 알파 에이사(Alfa Aesar)에서 구입하였다. 2-아지도아세트산(2-azidoacetic acid)과 N-숙신이미딜 D-비오틴(D-biotinyl succinimidyl D-biotinate)은 TCI에서 구입하였다. Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP, 모노메틸 오리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE) 및 BCN-PEG₄-acid는 각각 안젠(Angene), 캄신(Chemscene), 및 비엘디 팜(BLD Pharm)에서 구입하였다.

[0199] 항체 표지 실험에 있어서, 트라스투주맵은 로슈(Roche)에서 구입하였으며, IdeS 효소는 아크로바이오시스템스(ACROBiosystems)에서 구입하였다. 시퀀싱 등급의 변형된 트립신(Sequencing Grade Modified Trypsin)은 프로

메가(Promega)에서 구입하였다.

[0200] DNA 조작에 있어서, PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 및 제한효소는 타카라 바이오(Takara Bio)에서 구입하였다. DNA 올리고뉴클레오티드는 마크로젠(Macrogen)에서 구입하였으며, PCR/Gel 정제 키트와 플라스미드 미니 준비 키트는 뉴클레오젠(Nucleogen)에서 구입하였다. 단백질 준비를 위하여 Amicon® Ultra 원심분리 필터, 집팁 피펫 팁스(ZipTip® Pipette Tips)는 머크 밀리포어(Merck Millipore)에서 구입하였다. 피어스(Pierce™) C18 스펀 컬럼 및 슬라이드-A-라이저(Slide-A-Lyzer) 투석 카세트는 써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)에서 구입하였으며, PD 스피트랩(SpinTrap) G-25는 싸이티바(Cytiva)에서 구입하였다.

[0202] 1.2. 분석 방법

[0203] 1) 분석용-HPLC(analytical-high performance liquid chromatography)

[0204] 역상 액체 크로마토그래피(reversed-phase liquid chromatography; RPLC)의 경우, 각 샘플(3 µg)은 애질런트(Agilent) 1260 인피니티(Infinity) I과 포로셸(Poroshell) 300SB-C8(Agilent, 1.0 X 75 mm, 5 µm)을 사용하여 1 mL/분의 유속으로 분석되었다. 처음에 이동상 A(수중 0.1% TFA)는 2 분 동안 80%를 유지하였다. 이동상 B(ACN의 0.1% TFA)는 2 분에서 8 분에 20%에서 60%로 증가하였다. 추가로 2 분(8 분 내지 10 분) 동안 이동상 B가 60%에서 98%로 증가하여 컬럼의 모든 샘플을 용출했으며, 280 nm에서 가변 파장 검출기(variable wavelength detector; VWD)로 검출되었다.

[0205] 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography; HIC)의 경우, 각 샘플(10 µg)을 MAbPac HIC-Butyl HPLC(Thermo Scientific™, 4.6 X 100 mm, 5 µm)와 동일한 HPLC를 사용하여 1 mL/분의 유속으로 분석하였다. 0%에서 100%까지 1 분에서 15 분까지의 변화도가 사용되었다. 완충액 A: (1.5 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨, pH 7.0); 완충액 B: (50 mM 인산나트륨, pH 7.0); 유속 = 1 mL/분. 샘플은 280 nm에서 VWD로 검출되었다.

[0206] 2) Fc 단편 및 트라스투주맙의 질량 분석

[0207] 각 샘플(30 µg)을 중탄산암모늄 완충액(50 mM)이 포함된 PD 스피트랩(SpinTrap) G-25로 세척하고 분석 전에 30 단위의 IdeS 효소로 처리하였다. 샘플은 분석용 ACQUITY UPLC Protein BEH C4 컬럼(Waters, 300 Å, 2.1 X 50 mm, 1.7 µm)과 함께 초고성능 액체 크로마토그래피 얼티메이트(Ultimate) 3000(UHPLC, Thermo Fisher Scientific)이 결합된 선형 이온-트랩 오비트랩(Orbitrap) 질량 분석기를 사용하여 분석되었다. UHPLC 방법의 경우 이동상 A(수중 0.1% TFA)는 처음에 1 분 동안 80%를 유지하였다. 이동상 B(ACN의 0.1% TFA)는 1 분에서 10 분 사이에 20%에서 90%로 증가하였다. 오비트랩(Orbitrap)-MS는 500 m/z 내지 4,000 m/z의 확장된 질량 범위에서 검출되었다. 유니텍(UniDec) 소프트웨어를 사용하여 피크의 디콘볼루션(deconvolution)을 수행하였다.

[0208] 3) HIC를 이용한 ADC 정제

[0209] 정제되지 않은 트라스투주맙-MMAE를 정제하기 위하여 스킬팩 페닐(Skillpak Phenyl)-650S HIC 수지(Tosoh Bioscience)로 미리 포장된 HIC 컬럼(0.8 X 10 cm, 5 mL)을 AKTA pure(Cytiva)에 연결하였다. 전체 과정은 실온에서 수행되었다. 샘플을 주입하기 전, 상기 컬럼을 20 컬럼 부피의 완충액 A (50 mM 인산나트륨, pH 7.0, 2 M NaCl)로 평형화하였다. 상기 컬럼에 로딩하기 위하여, 0.25 mL의 정제되지 않은 ADC(제형 완충액 중 1 mg/mL)를 0.25 mL의 완충액 A와 혼합하였다. 이어서 생성된 혼합물(총 부피 0.5 mL)을 상기 컬럼에 주입하고 100% 완충액 A에서 100% 완충액 B(50 mM 인산나트륨, pH 7.0, 20% IPA(v/v))까지 선형 구배를 사용하여 용리하였다.

[0210] 4) 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance; NMR)

[0211] ¹H NMR 스펙트럼은 주위 온도에서 브루커(Bruker) 400 MHz 분광계로 기록되었으며, 자동 위상 조정 및 다항식 기준선 수정 기능을 사용하는 메스트레노바(MestReNova) 6.0.2를 사용하여 처리되거나, 바리안(Varian) 400 MHz 분광계로 기록하였다. 일반적인 ¹³C NMR 스펙트럼은 양성자가 완전히 분리된 브루커(Bruker) 400 MHz 또는 브루커(Bruker) 700 MHz 분광계에서 기록되었다. ¹³C 공명은 CDCl₃(77.16 ppm)에 대한 용매 잔류 피크를 기준으로 ppm 단위로 보고되었다.

[0212] 5) 푸리에 변환 적외선 분광학(Fourier-transform infrared spectroscopy; FTIR)

[0213] 적외선 스펙트럼은 JASCO FT/IR-4600 분광계에 기록되었으며 $v_{\max}$ 는 부분적으로 cm^{-1} 단위로 기록되었다. FAB 모드를 갖춘 JEOL JMS-700 장비에서 고해상도 질량 스펙트럼을 획득하였다. 분석용 박층 크로마토그래피(analytical thin-layer chromatography)는 60 Å 실리카겔(Silica Gel) F254 사전 코팅된 플레이트(두께 0.25 mm)를 사용하여 수행되었으며, TLC 플레이트는 UV 램프를 조사하여 시각화되었다. 순상 컬럼 크로마토그래피(normal-phase column chromatography)는 적절한 이동상 조성 및 구배와 함께 60 Å 실리카 겔(32 내지 62 μm)을 사용하였으며, 코스모실(COSMOSIL)의 다이오드 어레이 검출기(diode array detector)와 컬럼이 장착된 애질런트(Agilent) 1260 시리즈 장비를 사용하여 수행되었다.

[0215] 2. 실험 절차

[0216] 2.1. 단백질 제조

[0217] 1) 대장균에서의 단백질 발현, ncAA 혼입 및 정제

[0218] 스트렙-태그 Z-도메인 단백질(strep-tagged Z-domain; STZ)을 획득하기 위하여, Z-도메인 WT 유전자를 유전자 합성을 통해 증폭시키고, N 말단의 스트렙-태그(strep-tag) 서열(GWSHPQFEK) 및 C 말단의 헥사-히스티딘(hexa-histidine) 태그 서열과 중첩시켜 STZ 유전자를 생성하였다. NdeI 및 EcoRI 제한 위치와 pET20b 벡터를 사용하여 pET20b-스트렙 Z-도메인을 생성하였다. 이어서, pET20b-Strep Z-도메인을 대장균 BL21(DE3) 세포로 형질전환시키고 암피실린(ampicillin)(100 $\mu\text{g/mL}$)을 포함하는 6 mL LB 액체 배지에서 37°C에서 밤새 증폭시켰다. 증폭된 세포(1 mL)를 정의된 배지 (50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% 미량 금속, 0.5% 글리세롤, 0.05% 포도당, 0.2% 유당, 및 5% 아미노산)에 접종하였다. 동일한 양의 암피실린을 첨가하고, 세포를 37°C에서 밤새 배양하였다. 원심력(10,000 rpm, 5 분)으로 세포를 수득하고 추가 정제를 위하여 세포 펠렛을 -20°C에서 동결시켰다. 제조업체의 프로토콜에 따라 펠렛을 해동하고 Ni-NTA 아가로스 수지(agarose resin)로 정제하였다. 정제된 단백질의 농도는 280 nm에서의 UV 흡광도로 측정하였고 순도는 8% 내지 12% SDS-PAGE로 검사하였다. 단백질의 몰 흡광 계수는 바이오몰 단백질 흡광 계수 계산기(Biomol Protein Extinction Coefficient Calculator)를 사용하여 계산되었다 (<http://www.biomol.net/en/tools/proteinextinction.htm>).

[0219] 어피바디(affibody)는 유전자 합성을 통해 수득하였고 헥사-히스티딘 태그(hexa-histidine tag)는 중첩 PCR을 사용하여 부착되었다. Z-M 변이체의 유전자는 단백질 A의 최소화된 Z-도메인에서 생성되었으며 Z-도메인 WT의 세 번째 나선의 서열이 추가되었다. 또한, 유전자의 C-말단에 헥사-히스티딘 태그를 추가하였다. 어피바디는 각각 pBAD-어피바디 및 pET20b-Z-M을 생성하는 Z-M 변이체의 유전자에 대해 NcoI/KpnI 제한 효소 위치와 pET20b 및 NdeI/EcoRI 사이의 pBAD 벡터에 삽입되었다. pBAD-어피바디 돌연변이(K4, K28, F32TAG) 및 pET20b-Z-M 변이체(M8, H19, K33, D37TAG)는 위치 지정 돌연변이 유발에 의해 생성되었다. pBAD-어피바디 F32TAG, pET20b-Z-M M8, 및 D37TAG의 경우 프로브의 자체 표지를 피하기 위하여 가장 가까운 Lys를 Arg(CGT 코돈)으로 대체하여 각각 K28CGT_F32TAG, K5CGT_M8TAG, 및 K33CGT_D37TAG를 생성하였다. 그 후, 플라스미드를 DH10B 또는 BL21 세포에서 pEvol-AzFRS 또는 pEvol-AzKRS로 공동 형질전환(co-transformed)시켰다. 형질전환된 세포는 비천연 아미노산(AzF 100 μM 또는 AzK 1 mM) 및 클로람페니콜(chloramphenicol)(35 $\mu\text{g/mL}$)을 사용하여 상술한 방식으로 발현 및 정제되었다. 농도와 순도도 같은 방법으로 검사하였다.

[0220] 2) IgG1 Fc 도메인의 발현 및 정제

[0221] Fc 도메인 유전자를 PCR로 증폭시킨 후, pCDNA3.4(Invitrogen, USA)의 XhoI과 BamHI 위치 사이에 삽입하여 pCDNA3.4-Fc 도메인을 생성하였다. Fc 도메인을 포함하는 플라스미드를 제조사의 프로토콜(Polysciences, USA)에 따라 PEI-형질주입(transfection) 시약을 사용하여 프리스타일TM(FreeStyleTM) 293 세포(Invitrogen, USA)에 일시적으로 형질주입시켰다. 발현을 위하여, 각각의 Fc 도메인 구조물로 일시적으로 형질주입된 프리스타일 TM(FreeStyleTM) 293 세포의 상청액(supernatant)을 4°C에서 20 분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하여 수확하였다. 발현된 Fc 도메인은 제조업체의 프로토콜(Cytiva, Switzerland)에 따라 히트랩 프로틴A(Hitrap ProteinA) HP 컬럼을 사용하여 정제되었으며, 상기 컬럼은 A 완충액(1.8 mM KH_2PO_4 , 10 mM K_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)으로 평형화되었다. Fc 도메인이 포함된 상청액을 상기 컬럼에 로딩하고, 세척하여 결합되지 않은 불순물을 제거한 후 정제된 Fc 도메인을 B 완충액(100 mM 시트레이트, 100 mM NaCl, pH 3.0)으로 용출시켰다. 정제된 Fc 도메인을 A 완충액에 대해 3 회 투석하여 잔류 정제 완충액을 제거하였으며, Fc 도메인의 농도는 Fc

도메인의 흡광계수($7.157 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)를 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0222] **3) 구리(I)-촉매 아지드-알카인 고리화 첨가 반응(Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition; CuAAC)**

[0223] 정제된 어피바디 및 Z-M 단백질 변이체를 슬라이드-A-라이저(Slide-A-Lyzer™) 투석 카세트, 3.5K MWCO를 사용하여 20 mM 인산칼륨 완충액(100 mM NaCl, pH 7.0)에 대해 투석하였다. 각 단백질 20 μM , PyOx(4 mM), $\text{CuSO}_4\text{:BTAA}$ 프리믹스(300 μM :1500 μM), 소듐-L-아스코르베이트(sodium-L-ascorbate)(5 mM) 및 아미노구아니딘 염산염(aminoguanidine hydrochloride)(5 mM)의 혼합물을 25℃에서 250 rpm으로 교반하면서 1 시간 동안 배양하였다. 반응 혼합물을 50 mM HEPES 완충액(pH 7.2 또는 8.0)에 대해 투석하고 추가 반응을 위하여 Amicon® Ultra 원심분리 필터(3K MWCO)로 농축하였다.

[0225] **2.2. 단백질 표지**

[0226] **1) NASA-FL을 STZ로 표지**

[0227] PyOx(30 μM)를 포함하는 어피바디 돌연변이를 STZ(15 μM)와 혼합하였다. NASA-FL(75 μM)을 혼합물에 첨가하고 HEPES 완충액(50 mM, pH 7.2)에서 37℃에서 4 시간 동안 배양하였다. 최종 농도가 5 mM인 L-Lys와 But-PyOx의 혼합물 100 mM로 반응을 켄칭(quenched)하였다. 표지된 NASA-FL은 제조업체의 프로토콜에 따라 0.6 μL C18 수지가 포함된 집팁(ZipTip)을 사용하여 탈염되었으며 표지 수율은 MALDI-TOF MS 분석(매트릭스: 시나픽산(sinapic acid))으로 결정되었다.

[0228] **2) Z-M 단백질 변이체의 PyOx 위치 선택을 위한 NASA-FL의 Fc 단편 표지**

[0229] PyOx(30 μM)를 포함하는 Z-M 변이체를 Fc 단편(7.5 μM)과 혼합하였다. NASA-FL(75 μM)도 혼합물에 첨가하고 HEPES 완충액(50 mM, pH 7.2)에서 37℃에서 4 시간 동안 배양하였으며, 상기 반응과 동일한 방식으로 켄칭되었다. 반응하지 않은 NASA-FL을 제거하기 위하여 PD 스피트랩(SpinTrap) G-25로 세척하였다.

[0230] **3) Fc 단편 및 트라스투주맙에 대한 NASA 프로브의 최적화된 표지**

[0231] PyOx(60 μM)를 갖는 Z-M 변이체를 Fc 단편 또는 트라스투주맙(5 μM)과 혼합하였다. NASA-프로브(250 μM)를 혼합물에 첨가하고 HEPES 완충액(50 mM, pH 8.0)에서 37℃에서 6 시간 동안 배양하였으며, 상기 반응과 동일한 방식으로 켄칭되었다. 반응하지 않은 NASA 프로브를 제거하기 위하여 PD 스피트랩(SpinTrap) G-25로 세척하였다.

[0232] **4) ADC 제조**

[0233] ADC를 제조하기 위하여 트라스투주맙(5 μM)과 Z-M M8AzK-PyOx(60 μM)를 혼합하였다. NASA-N₃(60 μM)을 혼합물에 첨가하고 HEPES 완충액(50 mM, pH 8.0)에서 37℃에서 6 시간 동안 배양하여 트라스투주맙-N₃를 생성하였다. 반응 후, 혼합물을 켄칭하고 추가 SPAAC 반응을 위하여 PBS(pH 7.4)로 교환하였다. 트라스투주맙-N₃(10 μM)을 BCN-MMAE(50 μM)와 혼합하고 25℃에서 36 시간 동안 반응시켰으며, FPLC를 사용한 추가 정제를 위하여 생성물을 PBS로 교환하였다.

[0235] **2.3. 표지된 잔기의 분석**

[0236] **1) WT 및 FL 표지된 STZ의 소화**

[0237] WT 및 FL 표지된 STZ(15 μg)를 중탄산암모늄 완충액(50 mM)이 포함된 PD 스피트랩(SpinTrap) G-25로 세척하였다. 요소(최종 농도 6 M)를 반응 혼합물에 첨가하고 50℃에서 45 분 동안 배양하였다. 엔도프로테이나제(endoproteinase) Glu-C(Worthington)를 최종 농도 2 μM 로 첨가하고 37℃에서 밤새 배양하였다. 반응 혼합물을 0.4% TFA로 켄칭하고 피어스(Pierce?) C18 스핀 컬럼을 사용하여 추가 정제를 수행하였다. 정제된 생성물을 N₂ 취입(blowing)을 사용하여 용매 증발에 의해 농축시켰으며, DHB와 균등하게 혼합하였다. MALDI-TOF(Bruker Autoflex®)는 표지된 펩타이드 단편을 찾기 위하여 사용되었고 MALDI-TOF/TOF는 정확한 표지된 잔기를 결정하기 위하여 사용되었다.

[0238] 2) WT 및 프로브 표지된 Fc 단편의 소화

[0239] WT 및 프로브 표지된 Fc 단편(30 μ g)을 0.1% SDS를 포함하는 중탄산암모늄 완충액(50 mM)을 갖는 PD 스핀트랩(SpinTrap) G-25로 세척하였다. DTT를 최종 농도 20 mM로 첨가하고 95°C에서 20 분간 배양하였다. 연속적으로, IAA를 50 mM의 최종 농도로 첨가하고 암실에서 25°C에서 30 분 동안 배양하고 과량의 IAA를 5 mM DTT로 퀀칭하였다. 시퀀싱 등급의 변형된 트립신(Sequencing Grade Modified Trypsin)을 Fc 단편의 1/20 양으로 첨가하고 37°C에서 밤새 배양하였다. 반응 혼합물을 0.4% TFA로 퀀칭하고 C18 스핀 컬럼으로 정제하였다. 또한 샘플은 N_2 취입을 사용하여 용매 증발에 의해 농축되었으며, 조사를 위하여 CHCA와 균등하게 혼합되었다. MALDI-TOF는 표지된 펩타이드 단편을 찾기 위하여 사용되었고, MALDI-TOF/TOF는 정확한 표지된 잔기를 결정하기 위하여 사용되었다.

[0240] 3) WT 및 프로브 표지된 항체의 소화

[0241] WT 및 프로브 표지된 트라스투주맙(30 μ g)을 중탄산암모늄 완충액(50 mM)이 포함된 PD 스핀트랩(SpinTrap) G-25로 세척하고 30 단위의 IdeS 효소로 처리하였다. 이후, 샘플에 0.1% SDS를 첨가하고, 시퀀싱 등급의 변형된 트립신(Sequencing Grade Modified Trypsin)을 항체 양의 1/20로 첨가하였다. MALDI-TOF 및 MALDI-TOF/TOF에 대한 시료 준비는 Fc 단편 분석과 동일하게 수행하였다.

[0243] 2.4. 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)을 이용한 결합 친화도 측정

[0244] 1) Z-M 단백질과 항체의 결합 친화도 분석

[0245] 결합 상수(K_D)는 히스 포획 방법(His capture method)을 사용하여 아미노 결합된 CM5 칩을 사용하여 측정되었다. HBS-EP+ 완충액(150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM EDTA 및 0.05%(v/v) 계면활성제 P20, pH 7.4)을 실행 완충액으로 사용하였으며, 상기 칩의 블랭크 채널은 음성 대조군으로 사용되었으며 어피타딘은 상기 칩에 고정되었다. 다양한 농도(0.78 nM, 1.56 nM, 3.13 nM, 6.25 nM 및 12.50 nM)에서 항체의 2 배 연속 희석액이 상기 칩 표면 위로 흘렀다. 각 사이클 후에 상기 칩 표면은 10 mM 글리신-HCl 완충액(pH 1.5)을 사용하여 재생되었으며, BIA 평가 소프트웨어를 사용하여 1:1(Langmuir) 결합 적합 모델을 사용하여 친화도를 계산하였다.

[0246] 2) FcRn(Neonatal Fc receptor)과 항체 또는 ADC의 결합 친화도 분석

[0247] 결합 동역학(binding kinetics)을 평가하기 위하여 비아코어(BIAcore) T200 시스템을 사용하여 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 분석을 수행하였다. 결합 상수(binding constant; K_D)는 직접 고정화 방법을 통해 아미노 결합된 CM5 칩을 사용하여 결정되었다. pH 6.0 또는 pH 7.4의 인산염 완충액(50 mM 인산나트륨, 150 mM NaCl 및 0.05%(v/v) 계면활성제 P20)을 실행 완충액으로 사용하였다. 상기 칩의 블랭크 채널은 음성 대조군으로 사용되었으며 FcRn은 상기 칩에 고정되었다. 다양한 농도(1.96 nM, 3.91 nM, 7.81 nM, 15.63 nM 및 31.25 nM)에서 항체의 2 배 연속 희석액이 상기 칩의 표면 위로 흘렀다. 각 사이클 후에 상기 칩 표면은 트리스-HCl 완충액(0.1 M Tris-HCl, pH 8.0)을 사용하여 재생되었으며, BIA 평가 소프트웨어를 사용하여 1:1(Langmuir) 결합 적합 모델을 사용하여 친화도를 계산하였다.

[0248] 3) HER2(human epidermal growth factor receptor type2)와 항체 또는 ADC의 결합 친화도 분석

[0249] 결합 상수(K_D)는 인간 Fc 방법(Human Fc method)을 통해 아미노 결합된 CM5 칩을 사용하여 결정되었다. HBS-EP+ 완충액(150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM EDTA 및 0.05%(v/v) 계면활성제 P20, pH 7.4)을 실행 완충액으로 사용하였다. 상기 칩의 블랭크 채널은 음성 대조군으로 사용되었으며 트라스투주맙 또는 트라스투주맙-ADC는 상기 칩에 고정되었다. 다양한 농도(0.78 nM, 1.56 nM, 3.13 nM, 6.25 nM 및 12.50 nM)의 항체를 2 배 연속 희석하여 상기 칩의 표면 위로 흘렀다. 각 사이클 후에 상기 칩 표면은 3 M 염화마그네슘 완충액으로 재생되었으며, BIA 평가 소프트웨어를 사용하여 1:1(Langmuir) 결합 적합 모델을 사용하여 친화도를 계산하였다.

[0251] 2.5. ADC의 세포독성 확인

[0252] 1) 세포 배양

[0253] MDA-MB-231, MDA-MB-453, 및 SK-BR-3은 KCLB(서울, 한국)에서 구입하였다. 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine

serum; FBS), 및 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신(Welgene, Korea)이 보충된 RPMI1640에서 세포를 배양하였으며, 가습된 5% CO₂ 인큐베이터에서 37℃로 배양하였다.

[0254] 2) 증식 방지(anti-proliferation) 분석

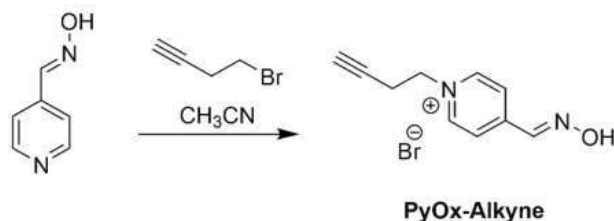
[0255] 웰 당 3,000 개의 세포 밀도로 96-웰 플레이트(96-well plate)에 세포를 시딩하였으며, 세포 부착 후, PBS에 4 배 연속 희석된 ADC를 세포에 처리하였다. 37℃에서 72 시간 배양한 후 셀타이터 글로(CellTiter Glo)(G7572, Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 세포 생존율을 관찰하였다. 적합 용량-반응 곡선 및 GI50 값은 그래프 패드 프리즘 6.0 (Graphpad prism 6.0) 소프트웨어를 사용하여 수득하였으며, 모든 실험은 이중으로 수행되었다.

[0256] 3) 웨스턴 블롯(Western blot)

[0257] HER2(#2165) 및 GAPDH(#5174) 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)에서 구입하였다. HRP-결합 염소-항토끼 2차 항체(HRP-conjugated goat anti-Rabbit secondary antibody)(SA002-500)는 젠디포(Gendepot)에서 구입하였다. 각 세포를 차가운 PBS로 간단히 두 번 세척하고 프로테아제 억제제 콕테일(phosphatase inhibitor cocktail)(#11873580001, Roche) 및 포스파타제 억제제 콕테일(phosphatase inhibitor cocktail)(#04906837001, Roche)을 포함하는 NP40 완충액(50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP40, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl)으로 용해하였다. 각 샘플에는 동일한 양의 단백질이 로딩되어 있으며 SDS-PAGE 젤로 분리되었다. 상기 샘플을 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 막으로 옮긴 후 5% 탈지유(TBS/T)로 차단하였다. TBS/T에서 1:1,000(v/v)으로 균일하게 희석된 1차 항체와 함께, 상기 막을 4에서 밤새 배양하였다. 실온에서 1 시간 동안 2차 항체(1:10,000, v/v)와 함께 배양한 후 ECL 용액을 처리하고 이미징퀀트(ImageQuant) LAS 4000(GE Healthcare, USA)을 이용하여 화학발광 신호를 검출하였으며, 이미지제이(ImageJ)를 이용하여 웨스턴 블롯(western blot) 이미지를 정량화하였다 (n = 3).

[0259] 3. 각 화합물의 합성 방법

[0260] 3.1. PyOx-알카인의 합성



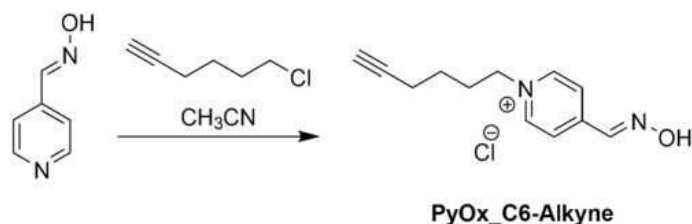
[0261]

[0262] 건조 CH₃CN(1.5 mL)에 용해된 피리딘-4-카르복스알도옥심(pyridine-4-carboxaldoxime)(370 mg, 3.03 mmol, 1 당량)의 교반 용액에 4-브로모-1-부틴(4-bromo-1-butyne)(0.60 mL, 6.6 mmol, 2.2 당량)을 첨가하고, 혼합물을 24 시간 동안 환류시켰다. 용액을 실온으로 냉각하고 여과하여 노란색 고체상의 PyOx-알카인(518 mg, 2.03 mmol, 67%)을 수득하였다.

[0263] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.24 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.48 (m, 1H).

[0264] HRMS: Exact mass calculated for [C₁₀H₁₁N₂O₁+H]⁺ requires *m/z* = 175.0866, found *m/z* = 175.0868 (HESI+).

[0266] 3.2. PyOx_C₆-알카인의 합성



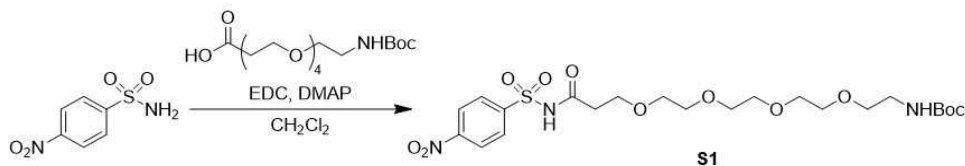
[0267]

[0268] 건조 CH₃CN(1.5 mL)에 용해된 피리딘-4-카르복살도キシム(pyridine-4-carboxaldoxime)(370 mg, 3.03 mmol, 1 당량)의 교반 용액에 6-클로로-1-헥사인(6-chloro-1-hexyne)(0.73 mL, 6.06 mmol, 2.2 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 가열하여 환류시키고(85℃, 바이알) 25 시간 동안 교반시켰다. 침전물을 수집하고 건조 CH₃CN(1.5 mL)에서 추가로 24 시간 동안 교반하였다. 용액을 실온으로 냉각하고 여과하여 노란색 고체상의 PyOx_C₆-알카인(210 mg, 1.04 mmol, 34%)을 수득하였다.

[0269] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.80 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.59 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.32 (m, 1H), 2.25 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.55 (m, 2H).

[0270] HRMS: Exact mass calculated for [C₁₂H₁₅N₂O₁+H]⁺ requires *m/z* = 203.1179, found *m/z* = 203.1182 (HESI+).

[0272] 3.3. tert-부틸(15-((4-니트로페닐)설포나미도)-15-옥소-3,6,9,12-테트라옥사펜타데실)카르바메이트(*tert*-butyl (15-((4-nitrophenyl)sulfonamido)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecyl) carbamate)(S1)의 합성



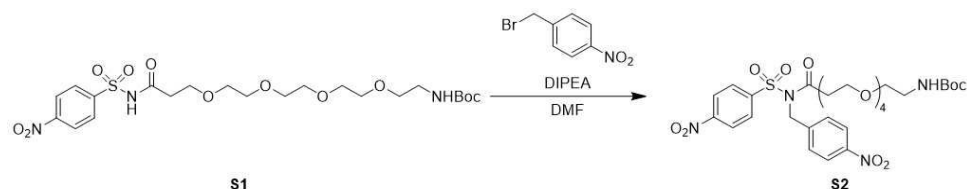
[0273]

[0274] 건조 DMF(10 mL)에 녹인 Boc-NH-PEG₄-COOH(1.00 g, 2.74 mmol, 1.2 당량) 용액에 디이소프로필에틸아민(diisopropylethylamine)(1.05 mL, 6.02 mmol), 4-니트로벤젠설포나미드(4-nitrobenzenesulfonamide)(0.61 g, 3.01 mmol, 1 당량), 및 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥사이드 헥사플루오로포스페이트(1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-Oxide Hexafluorophosphate; HATU) (1.25 g, 3.28 mmol)을 넣고 실온에서 6 시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 에틸아세테이트로 희석하고 0.5 M HCl 수용액 및 염수로 2 회 세척하였다. 유기상을 MgSO₄로 건조시키고 감압 하에 증발시킨 후, 잔류물을 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂:MeOH = 20:1)로 정제하여 무색 오일상의 S1(0.83 g, 수율 55%)을 수득하였다.

[0275] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.71-3.51 (m, 18H), 3.32 (m, 2H), 2.56 (m, 2H), 1.42 (s, 9H).

[0276] ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 156.4, 150.3, 129.7 (2C), 123.9 (2C), 70.69, 70.62, 70.58, 70.5, 70.35, 70.32, 70.2, 70.11, 70.06, 66.7, 53.6, 40.4, 37.8, 28.5 (3C).

[0278] 3.4. tert-부틸(1-(4-니트로페닐)-2-((4-니트로페닐)술포닐)-3-옥소-6,9,12,15-테트라옥사-2-아자헵타데칸-17-일)카르바메이트(*tert*-butyl (1-(4-nitrophenyl)-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-3-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-2-azaheptadecan-17-yl)carbamate)(S2)의 합성



[0279]

[0280]

건조 DMF(6.3 mL, 0.3 M)에 용해된 화합물 S1(1.0 g, 1.8 mmol, 1 당량)의 용액에 4-니트로벤질브로마이드(nitrobenzylbromide)(472 mg, 2.2 mmol, 1.2 당량) 및 DIPEA(0.6 mL, 3.6 mmol, 2 당량)를 넣고 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 용매를 제거한 후, 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고 염수로 세척하였다. 유기상을 $MgSO_4$ 로 건조시키고 감압 하에 증발시킨 후, 잔류물을 실리카겔 플래시 컬럼 크로마토그래피(헥산:EtOAc = 1:2)로 정제하여 무색 오일상의 화합물 S2(731 mg, 수율 59%)를 수득하였다.

[0281]

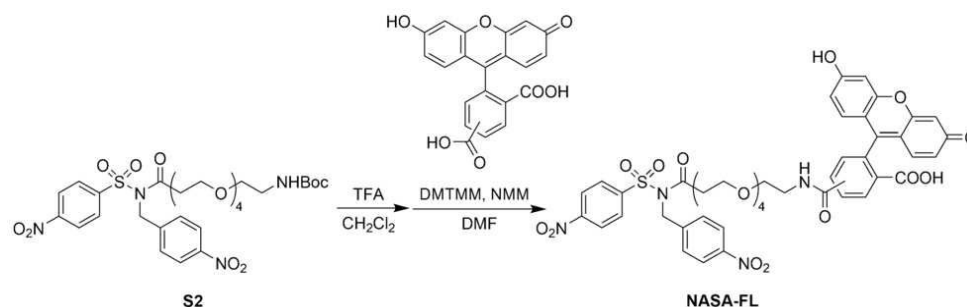
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.39 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.24 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.13 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.70-3.65 (m, 2H), 3.64-3.57 (m, 8H), 3.56-3.52 (m, 2H), 3.52-3.48 (m, 4H), 3.34-3.23 (m, 2H), 2.82 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

[0282]

^{13}C NMR (175 MHz, $CDCl_3$) δ 171.5, 151, 147.9, 144.7, 143.4, 129.5 (2C), 128.4 (2C), 124.6 (2C), 124.2 (2C), 70.8, 70.7 (2C), 70.5, 70.39, 70.37, 66.5, 49.5, 40.5, 37.0, 31.7, 28.6 (3C), 22.8, 14.2.

[0284]

3.5. NASA-FL의 합성



[0285]

[0286]

CH_2Cl_2 (0.5 mL)에 용해된 화합물 S2(8.2 mg, 12.0 μ mol, 1 당량)의 용액에 TFA(30 μ L)를 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 교반하고, 용매를 진공에서 제거하였다. 건조 DMF(0.5 mL)에 용해된 이 잔류물의 용액에 5(6)-카르복시플루오레세인(carboxyfluorescein)(5.4 mg, 14.4 μ mol, 1.2 당량), 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-yl)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드 (4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride; DMTMM) (3.9 mg, 14.1 μ mol, 1.2 당량) 및 *N*-메틸모르폴린(*N*-methylmorpholine; NMM) (3.9 μ L, 35.5 μ mol, 3 당량)를 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 교반한 후, 4°C에서 밤새 교반하였다. 용매를 제거한 후, 생성된 혼합물을 실리카겔 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2 :MeOH = 10:1)로 정제하여 화합물 NASA-FL(8.5 mg, 수율 75%)을 수득하였다.

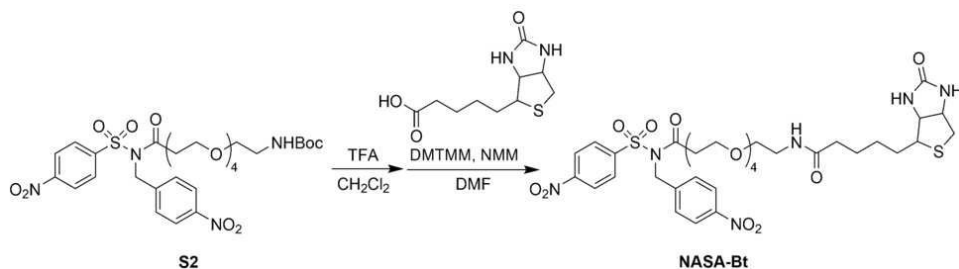
[0287]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.39 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.20-8.10 (m, 6H), 7.61-7.22 (m, 3H), 6.66-6.50 (m, 6H), 5.25 (s, 2H), 3.63-3.33 (m, 18H), 2.79-2.75 (m, 2H).

[0288]

HRMS: Exact mass calculated for $[C_{45}H_{42}N_4O_{17}S+H]^+$ requires m/z = 943.2338, found m/z = 943.2339 (HESI+).

3.6. NASA-Bt의 합성

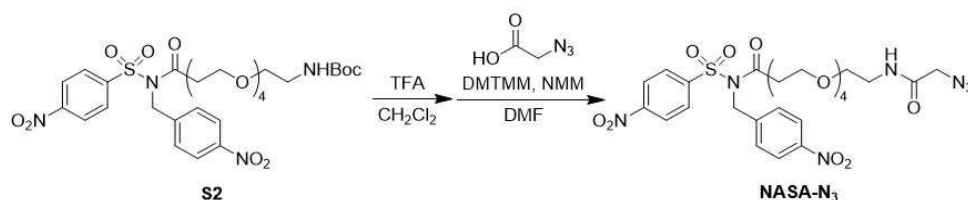


CH₂Cl₂(0.5mL)에 용해된 화합물 S2(8.2 mg, 12.0 μmol, 1 당량)의 용액에 TFA(30 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하고, 용매를 진공에서 제거한 잔류물을 건조 DMF(0.5 mL)에 용해시키고 *N*-숙신이미딜 D-비오틴네이트(*N*-succinimidyl D-biotinate)(4.92 mg, 14.4 μmol, 1.2 당량), DMTMM(3.9 mg, 14.1 μmol, 1.2 당량) 및 *N*-메틸모르폴린(*N*-methylmorpholine; NMM) (3.9 μL, 35.5 μmol, 3 당량)을 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 교반한 후, 4℃에서 밤새 교반하였다. 용매를 제거한 후, 생성된 혼합물을 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂:MeOH = 10:1)로 정제하여 화합물 NASA-Bt(5.4 mg, 수율 55%)를 수득하였다.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.15 (m, 4H), 8.11 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.56–3.38 (m, 18H), 3.09 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 2.59 (dd, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.10 (m, 2H), 1.55–1.32 (m, 6H).

HRMS: Exact mass calculated for [C₃₄H₄₆N₆O₁₃S₂+Na]⁺ requires *m/z* = 833.2457, found *m/z* = 833.2490 (HESI+).

3.7. NASA-N₃의 합성



CH₂Cl₂(7 mL, 0.02 M) 중의 화합물 S2(100 mg, 0.15 mmol, 1 당량)의 용액에 TFA(0.02 mL, 0.30 mmol, 2 당량)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하고, 용매를 진공에서 제거한 잔류물을 건조 DMF(7 mL, 0.02 M)에 용해시키고 2-아지도아세트산(2-azidoacetic acid)(18 mg, 0.18 mmol, 1.2 당량), DMTMM(49 mg, 0.18 mmol, 1.2 당량) 및 *N*-메틸모르폴린(*N*-methylmorpholine; NMM) (0.05 mL, 0.35 mmol, 2.3 당량)을 첨가하여 실온에서 8 시간 동안 교반하였다. 용매를 제거한 후, 생성된 혼합물을 실리카겔(CH₂Cl₂:MeOH = 20:1)에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 무색 오일상의 화합물 NASA-N₃ (83 mg, 수율 86%)을 수득하였다.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.37 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.91 (s, 2H), 3.66 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.63–3.57 (m, 8H), 3.56–3.46 (m, 6H), 3.43 (m, 2H), 2.81 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 171.5, 166.9, 150.9, 147.9, 144.7, 143.4, 129.5 (2C), 128.4 (2C), 124.6 (2C), 124.2 (2C), 70.70, 70.66 (3C), 70.5, 70.4, 69.7, 66.5, 52.8, 49.5, 39.3, 37.0.

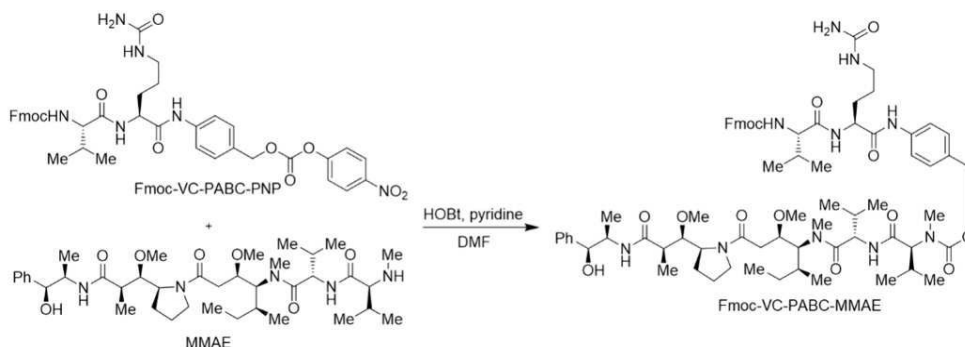
IR (FT-ATR, cm⁻¹, CH₂Cl₂) $\bar{\nu}_{\max}$ 3064, 2873, 2359, 2338, 2106, 1837, 1818, 1779, 1756, 1707, 1689, 1669, 1647, 1641, 1629, 1623, 1606, 1576, 1570, 1559, 1526, 1496, 1481, 1465, 1442, 1424, 1404, 1346, 1267,

1168, 1086, 1012, 854, 731, 700, 682.

[0302] HRMS: Exact mass calculated for $[C_{26}H_{33}N_7O_{12}S+H]^+$ requires $m/z = 668.1981$, found $m/z = 668.1980$ (FAB+).

[0304] 3.8. BCN-VC-PABC-MMAE의 합성

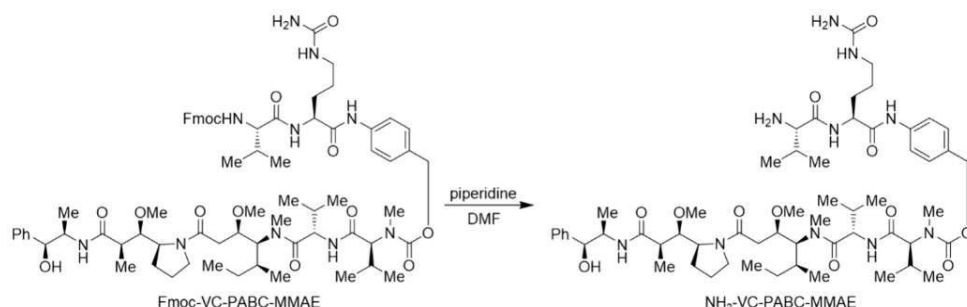
[0305] 1) Fmoc-VC-PABC-MMAE의 합성



[0306]

[0307] Fmoc-VC-PABC-PNP(200mg, 0.26 mmol, 1 당량) 및 MMAE(280 mg, 0.39 mmol, 1.5 당량)를 DMF(40 mL, 6.5 mM)에 용해시켰다. 이어서, 하이드록시벤조트리아졸(hydroxybenzotriazole; HOBt)(8 mg, 0.52 mmol, 2 당량) 및 피리딘(0.6 mL, 7.5 mmol, 28 당량)을 용액에 첨가하여 실온에서 30 시간 동안 교반하고 RP-HPLC로 모니터링하였다. 생성물을 분취용 컬럼으로 정제하여 백색 분말을 수득하였다 (232 mg, 수율 66%).

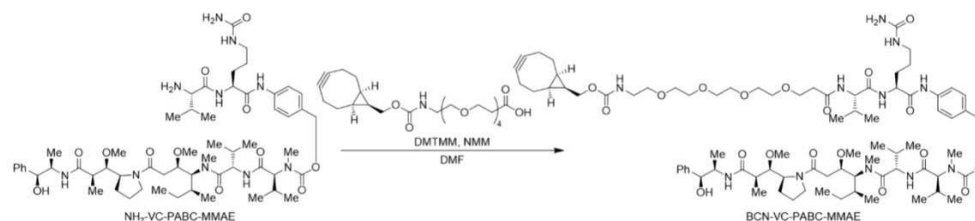
[0308] 2) NH_2 -VC-PABC-MMAE의 합성



[0309]

[0310] Fmoc-VC-PABC-MMAE(125 mg, 0.09 mmol)를 20.0% 피페리딘을 포함하는 DMF(0.9 mL, 0.1 M)에 용해시키고 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. RP-HPLC 분석은 de-Fmoc 공정의 완료를 나타낸 후, 용액을 감압 하에 농축하여 백색 분말을 수득하였다 (88.0 mg, 수율 88%).

[0311] 3) BCN-VC-PABC-MMAE의 합성



[0312]

[0313] BCN-PEG₄-COOH (13 mg, 0.03 mmol, 1 당량), NH_2 -VC-PABC-MMAE (40 mg, 0.036 mmol, 1.2 당량), DMTMM (10 mg, 0.036 mmol, 1.2 당량) 및 *N*-메틸모르폴린(*N*-methylmorpholine; NMM) (0.01 mL, 0.09 mmol, 3 당량)을 DMF (0.14 mL, 0.2 M)에 용해시켜 실온에서 8 시간 동안 교반하였다. 용매를 제거한 후, 생성된 혼합물을 분취 컬럼으로 정제하여 백색 분말을 수득하였다 (22 mg, 수율 48%).

[0314] HRMS: Exact mass calculated for $[C_{80}H_{127}N_{11}O_{19}+Na]^+$ requires $m/z = 1568.9202$, found $m/z = 1568.9223$

(HESI+).

[0316] **4. 단백질의 위치 선택적 표지(도 3 및 4 참조)**

[0317] 손상되지 않은 단백질의 위치 선택적인 표지를 위하여, 결합 단백질에 결합할 수 있는 단백질을 사용하는 근접 기반 표지 시스템을 사용하였다. 결합 단백질은 촉매 역할을 하며, 표지제는 결합 단백질과 선택적으로 반응하여 결합 단백질 근처에서 반응성이 높은 중간체를 형성하여 결합 단백질의 인접한 라이신 잔기와 공유 결합 형성을 촉진한다.

[0318] 포도상 구균 단백질 A(*Staphylococcal Protein A*)의 B 도메인 변이체인 Z-도메인 단백질(Z-domain protein; Z-DM)을 타겟 단백질로서, Z-도메인 특이적 어피바디(Z-domain-specific affibody; Z-AFB)를 결합 단백질로서 사용하였다(도 3 참조). 상기 두 단백질은 크기가 작고(8 kDa 이하) 고해상도의 복잡한 구조를 사용할 수 있어 모델 시스템으로 사용하기에 적합하다. 결합 단백질의 촉매 기능을 보장하기 위하여 표지제와 반응성이 높은 중간체를 형성할 수 있는 촉매로서 피리디늄 알도キシ(pyridinium aldoxime; PyOx)를 사용하였다(도 4 참조). PyOx는 *N*-알킬설폰아미드(*N*-alkylsulfonamide; NASA)와 빠르게 반응하여 반응성 에스테르를 형성한 후 아민과 아미드 결합을 효율적으로 형성하는 것으로 알려져 있다.

[0319] Z-AFB의 특정 위치에 PyOx를 도입하기 위하여, 아지드를 포함하는 ncAA를 Z-AFB에 위치별로 도입하는 확장 기술인 유전자 코드 확장법을 사용하였으며, 그 후, Cu-촉매 아지드-알카인 고리화 첨가(CuAAC) 반응을 사용하여 PyOx를 Z-AFB의 특정 위치에 부착하였다. PyOx를 포함하는 Z-DM, Z-AFB 및 NASA로 유도체화된 프로브의 세 가지 구성 요소를 단순히 혼합함으로써 결합 단백질에 대한 프로브의 위치별 접합이 효과적으로 가능하다(도 5 참조).

[0321] **4.1. 온전한 Z-DM에 대한 표지 실험**

[0322] **1) ncAA를 Z-AFB에 도입**

[0323] Z-AFB의 특정 위치에 PyOx를 도입하기 위하여, 비표준 아미노산(non-canonical amino acids; ncAA)을 Z-AFB에 도입하였다. ncAA 도입 위치(F32, K28 및 K4)는 Z-AFB 및 Z-DM 복합체의 X-선 결정 구조를 기반으로 선택되었으며, Z-AFB와 Z-DM의 결합에 영향을 주지 않고 Z-DM의 Lys에 근접하게 위치하였다(도 6 참조). 생체직교 반응(bioorthogonal reactions)을 통한 단백질 표지에 널리 사용되는 4-아지도-L-페닐알라닌(4-azido-L-phenylalanine; AzF, 도 7 참조)을 도입 물질로서 사용하였다. AzF를 Z-AFB에 도입하기 위하여 Z-AFB 유전자의 F32, K28 및 K4에 해당하는 코돈을 앰버 코돈(amber codons; TAG)으로 변형하였다. 변형된 유전자는 AzF가 존재하는 조건에서 아미노아실-tRNA(aminoacyl-tRNA) 및 아미노아실-tRNA 합성효소(aminoacyl-tRNA synthetase; AzFRS) 쌍과 함께 발현되어, AzF를 포함하는 Z-AFB 변이체(Z-AFB_K4AzF, Z-AFB_K28AzF, 및 Z-AFB_F32AzF)가 합성되었다. SDS-PAGE 및 MALDI-TOF MS를 사용한 분석을 통해 AzF의 정량적 결합이 확인되었다.

[0324] **2) AzF 포함 Z-AFB에 PyOx 도입**

[0325] CuAAC 반응을 통해 AzF를 포함하는 Z-AFB에 PyOx를 도입하였다. 알카인으로 치환된 PyOx 화합물(상기 실시예 3.1. 참조)은 종래의 보고된 조건에서 Z-AFB와 반응했으며, SDS-PAGE 및 MALDI-TOF 분석을 통해 모든 Z-AFB 변이체(Z-AFB_K4AzF-PyOx, Z-AFB_K28AzF-PyOx 및 Z-AFB_F32AzF-PyOx)에 도입되었음을 확인하였다.

[0326] **3) 표지제로서 NASA-FL 제조**

[0327] 종래에 보고된 방법을 사용하여 플루오레세인(fluorescein; FL)과 NASA를 연결하여 표지제로서 NASA-FL을 합성하였다(상기 실시예 3.5. 참조). Z-AFB-PyOx 및 NASA-FL을 사용하여 Z-DM의 기본 상태에서 위치별 표지의 가능성 여부를 테스트하였다. 표지 실험은 Z-DM과 Z-AFB-PyOx 및 NASA-FL을 간단히 혼합하여 진행하였으며, 표지 반응 후 MALDI-TOF 분석을 통해 표지 효율성을 확인하였다. 세 가지 Z-AFB-PyOx 변이체(Z-AFB_K4AzF-PyOx, Z-AFB_K28AzF-PyOx, 및 Z-AFB_F32AzF-PyOx)를 사용하여 표지 반응을 수행한 결과, Z-AFB_K4AzF-PyOx, Z-AFB_K28AzF-PyOx, 및 Z-AFB_F32AzF-PyOx는 각각 35%, 70%, 및 96%의 표지 효율성을 달성하였다(도 7 및 8 참조).

[0328] 세 가지 변이체 사이에서 관찰된 표지 효율의 차이는 PyOx가 도입된 Z-AFB 위치에서 Z-DM의 가장 가까운 Lys 잔기까지의 거리가 가까울수록 표지 효율이 높아졌다. 이를 확인하기 위하여, AzF를 대신하여 더 긴 알킬 사슬을

갖는 N_6 -[(2-아지도에톡시)카보닐]-L-라이신(N_6 -[(2-azidoethoxy)carbonyl]-L-lysine; AzK)을 포함하는 Z-AFB_K28AzK-PyOx를 합성하고 동일한 조건에서 표지 실험을 수행하였으며, 그 결과, 93%의 향상된 표지 효율성을 확인하였다(도 7 참조).

[0329] 종합적으로, 상기 표지 방법은 천연 Z-DM 단백질 표지에 있어 높은 효율(Z-AFB_F32AzF-PyOx를 사용한 표지 실험의 경우 96%)을 나타냈으며, GCE 기술을 사용하여 PyOx의 위치를 스크리닝; 및 Z-AFB-PyOx에서 링커의 길이를 조절함으로써 표지 효율을 최적화할 수 있다.

[0331] 4.2. Z-DM 내 표지 잔기 확인

[0332] Z-DM의 표지된 위치가 결정 구조를 기반으로 예측된 Lys 잔기와 일치하는지 확인하였다. Z-AFB_F32AzF-PyOx를 사용한 표지 실험에서 FL로 표지된 Z-DM을 프로테아제(Glu-C)로 처리하였다. 생성된 펩티드를 MALDI-TOF/TOF 질량 MS로 분석하여 표지된 위치를 분석한 결과, 결정 구조를 기반으로 예측된 위치와 일치하는 Z-DM의 K18에서 표지가 발생했음을 확인하였다(도 9 내지 도 11). 이는 설계된 표지 시스템이 온전한 단백질을 효과적으로 표지하고 구조 분석을 통해 표지 위치를 예측할 수 있음을 나타낸다.

[0333] 또한, 다양한 시간에 따른 Z-DM 표지 효율성을 측정한 결과, 반응 개시 후 최대 4 시간까지 시간이 증가함에 따라 표지 효율이 증가하는 것을 확인하였다. Z-DM의 절반 이상이 1 시간 이내에 표지되었으며, 4 시간 이내에 96%의 단백질이 표지되었다(도 12a 및 12b 참조). 반응 시간을 더 연장하면 N-말단 아민에서 소량의 표지가 관찰되었으나(데이터는 표시되지 않음), 4 시간까지는 K18에 주로 표지가 집중됐다. 비결합 단백질에 표지 반응이 가했을 때 표지가 전혀 발생하지 않거나 거의 발생하지 않았는데, 이는 PyOx가 포함된 결합 단백질이 있는 경우에만 표지 반응이 발생했음을 나타낸다(도 13a 및 13b 참조).

[0335] 4.3. Fc 단편 표지를 위한 시스템 설계

[0336] 표지 시스템을 항체 표지에 적용하기 위하여 인간 면역글로불린(human immunoglobulin) G1(IgG1)의 Fc 단편을 표지하였다(도 14 참조). Fc 단편은 다양한 치료용 항체에 보존되어 있기 때문에 Fc 단편에 대해 개발된 표지 방법을 동일한 Fc 단편을 갖는 항체에 직접 적용할 수 있다. Fc 단편의 위치 특이적 표지를 달성하기 위하여, 높은 친화도와 선택성을 갖는 Fc 결합 단백질을 검색 및 평가한 후, 변형된 2-나선 Fc 결합 단백질을 선택하였고, 더 나은 단백질 안정성과 발현을 위하여 추가 나선을 도입하여 더욱 최적화하였다. 상기 추가 나선의 디자인은 기존의 3-나선 Fc 결합 단백질의 서열을 기반으로 하였다. 알파폴드2(AlphaFold2) 프로그램을 이용한 전산 분석을 통하여 추가 나선이 바람직한 3 개의 나선 구조를 유지함을 확인하였으며(도 15 참조), 생성된 3-나선 단백질(Z-M)은 Fc 단편에 안정적이고 특이적으로 결합하도록 설계되었다.

[0337] Fc 결합 플랫폼인 Z-M 단백질을 사용하여 PyOx 도입에 적합한 위치를 결정하기 위하여, 2-나선 Fc 결합 단백질과 Fc 단편에 의해 형성된 복합체의 결정 구조를 참조하였다. PyOx 도입을 위한 최적의 위치로서 Z-M 단백질의 M8, H19, K33 및 D37을 선택하였다. 이러한 위치는 Fc 결합의 교란을 최소화하면서 Fc 단편에 매우 근접한 것으로 확인되어 효과적인 표지를 가능하게 한다(도 16 참조). Z-M에서 선택된 잔기와 Fc 단편의 가장 가까운 Lys 사이의 거리는 약 15 Å 내지 약 22 Å인 것으로 확인되었으며, 이는 Z-DM/Z-AFB에 대해 측정된 거리에 비해 상당히 멀었다. 표지 효율성과 PyOx 도입 위치에서 가장 가까운 Lys까지의 거리 사이의 상관 관계를 고려할 때, AzF 대신 AzK가 더 긴 사슬 길이로 인해 Fc 단편 표지에 더 적합할 것으로 예상된다.

[0338] 결과적으로, AzK는 GCE 기술을 사용하여 위치 M8, H19, K33 및 D37에서 Z-M에 도입되었으며, 이는 SDS-PAGE 및 MALDI-TOF MS를 통해 확인되었고, Z-M 단백질로의 정량적 도입을 나타낸다. 이후 CuAAC 반응을 통해 각 Z-M 변이체에 PyOx를 도입하고 SDS-PAGE와 MALDI-TOF MS를 사용하여 정량적인 접합을 검증하였다.

[0340] 4.4. Z-M 변이체의 결합 친화도 평가

[0341] SPR(surface plasmon resonance) 분석을 사용하여 Fc 도메인이 있는 항체(트라스투주맵)에 대한 AzK 또는 AzK-PyOx를 포함하는 Z-M 변이체의 결합 친화도를 평가하였다.

표 1

샘플	K_D (M)	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	R_{max} (RU)	Chi^2 (RU ²)	U-값
Z-M_WT	4.964×10^{-9}	1.897×10^5	9.415×10^{-4}	66.66	0.832	2
Z-M_M8AzK	3.939×10^{-9}	1.820×10^5	7.169×10^{-4}	116.2	1.76	2
Z-M_H19AzK	5.101×10^{-9}	1.882×10^5	9.597×10^{-4}	62.52497	0.994	2
Z-M_K33AzK	4.846×10^{-9}	1.973×10^5	9.561×10^{-4}	70.48	0.948	2
Z-M_D37AzK	3.521×10^{-9}	1.941×10^5	6.835×10^{-4}	117.1	1.84	2
Z-M_M8AzK-PyOx	5.016×10^{-9}	1.914×10^5	9.602×10^{-4}	80.2403	0.963	2
Z-M_H19AzK-PyOx	4.944×10^{-9}	1.934×10^5	9.560×10^{-4}	72.21	0.841	1
Z-M_K33AzK-PyOx	3.481×10^{-9}	1.966×10^5	6.843×10^{-4}	118.3	2	2
Z-M_D37AzK-PyOx	4.792×10^{-9}	2.002×10^5	9.593×10^{-4}	70.51	0.961	2

상기 표 1을 참조하면, 모든 변이체는 Z-M 야생형 단백질과 비교하여 거의 동일한 결합 친화도를 나타냈다. 이는 PyOx의 도입이 Z-M 단백질 변이체와 Fc 단편 사이의 결합 친화도에 큰 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

4.5. 온전한 Fc 단편의 표지화 및 표지된 잔기의 특성화

PyOx를 포함하는 Z-M 변이체를 사용하여 Fc 단편에 대한 표지 효율성을 테스트하였다. 먼저, 가장 높은 표지 효율성을 보이는 최적의 Z-M 변이체를 선별하였다. 표지 반응은 각 Z-M 변이체와 NASA-FL을 Fc 단편에 혼합하여 수행하였고, HPLC를 이용하여 표지 효율을 평가하였다.

1) 분석 결과

Z-M_M8AzK-PyOx가 가장 높은 표지 효율을 나타냈으며, 표지가 없거나 부분적으로 표지가 붙은 Fc가 거의 또는 전혀 남아 있지 않은 상태에서 Fc 단편을 효과적이고 정량적으로 표지하는 것으로 나타났다(도 17 참조). 대조적으로, 다른 Z-M 변이체를 사용한 경우에는 상당한 양의 Fc 단편이 표지되지 않은 채로 남아 있었다. Z-M-PyOx가 없는 대조 실험에서는 표지가 거의 관찰되지 않았으며, 이는 최소한의 배경 표지를 나타낸다.

Z-AFB를 사용한 Z-DM 표지와 달리, Z-M을 사용한 Fc 단편 표지의 표지 효율은 PyOx와 표적 Lys 사이의 거리와 강한 상관관계를 나타내지 않았다. PyOx 위치와 Lys 사이의 거리는 M8 > H19 > D37 > K33의 순서로 측정되었으나, 표지 효율은 M8 > D37 > K33 > H19의 순서로 나타났다(도 16 및 17 참조). PyOx가 가장 가까운 위치(M8)에 도입되었을 때 가장 효율적인 표지가 발생했지만, 다음으로 가장 가까운 위치(H19)는 가장 낮은 표지 효율성을 나타냈다. 이러한 결과는 Fc 단편과 Z-M 단백질 변이체의 복잡한 구조를 면밀히 살펴보면 설명될 수 있다. Fc 단편 내 K338은 Z-M_H19AzK-PyOx를 사용할 때 표지 반응에 관여하는 잔기이다. 복잡한 구조에서 K338은 인접한 잔기에 부분적으로 묻혀 있어 잠재적으로 표지 반응에 구조적 방해로 일으킬 수 있다(도 18 참조). 따라서 Z-M_H19AzK-PyOx를 사용한 표지 반응의 효율은 더 짧은 거리에도 불구하고 Z-M_D37AzK-PyOx 또는 Z-M_K33AzK-PyOx에 비해 낮았다. 이는 PyOx 도입 위치를 선택할 때 표지된 Lys까지의 거리뿐만 아니라 표지할 Lys의 주변 환경도 중요한 요소임을 나타낸다.

2) 추가 표지 실험

Fc 단편 표지 실험에서 가장 좋은 표지 효율을 보인 Z-M_M8AzK-PyOx를 사용하여 추가 표지 실험을 수행하였다. NASA-FL 외에 NASA-Bt(상기 실시예 3.6. 참조)을 Fc 표지 실험에 사용하였으며, HPLC 분석을 통해 NASA-FL과 유사한 높은 표지 효율을 확인하였다(도 13 참조).

또한, PyOx 링커에 약간 더 긴 알킬 사슬을 갖는 Z-M_M8AzK-PyOx_C₆을 준비하고 표지 효율을 분석한 결과, Z-M_M8AzK-PyOx_C₆이 Z-M_M8AzK-PyOx와 거의 유사한 정량적 표지 효율성을 나타내었다. 두 변이체 Z-M_M8AzK-PyOx

및 Z-M₈AzK-PyOx-C₆은 모두 효율적인 Fc 단편 표지를 나타냈으므로 PyOx 링커 길이에 대한 추가 최적화는 수행되지 않았다.

[0354] 다음으로, Z-M₈AzK-PyOx를 사용하여 표지된 Fc 단편의 표지된 잔기를 특성화하였다. Z-M 단백질 변이체와 Fc 단편의 복잡한 구조는 Fc 단편에서 Z-M의 M8에 가장 가까운 Lys가 K248이고, 또 다른 Lys(K246)가 근처에서 발견된다는 것을 나타낸다(도 19 참조). 표지된 잔기를 확인하기 위하여 표지된 Fc 단편을 트립신(trypsin)으로 처리하고, MALDI-TOF/TOF 탠덤(tandem) MS를 사용하여 생성된 펩타이드 단편을 분석하였다. K248을 포함하는 펩타이드 단편은 MALDI-TOF 분석에서 FL 표지 및 Bt 표지 단편 모두에 대해 상응하는 표지 단편으로 명확하게 이동되었다(도 20 참조). HPLC 결과(도 17)에서 관찰된 바와 같이, 표지되지 않은 단편이 전혀 또는 거의 발견되지 않았다. 펩타이드 단편에 대한 MALDI-TOF/TOF 탠덤 MS 분석에서는 K248이 다른 표지된 잔기(예: K246)가 검출되지 않은 채 단편에서 명확하게 표지된 것으로 나타났다(도 21 내지 23 참조).

[0356] 4.6. 온전한 트라스투주맵에 대한 표지 실험

[0357] Z-M₈AzK-PyOx를 이용하는 Fc 단편의 효율적이고 선택적인 표지 방법을 항체 표지에 적용하기 위하여, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)에 특이적으로 결합하고 암 치료에 사용되는 트라스투주맵을 사용하였다. Z-M₈AzK-PyOx와 NASA-Bt를 이용하여 트라스투주맵을 표지하여 HPLC로 분석하였다. 항체 전체를 HPLC로 분석할 때 분리능이 충분하지 않아 IdeS 효소를 이용하여 항체를 F(ab)₂와 Fc/2 단편으로 나누었다. 그 결과, Fc/2 피크만 이동한 것으로 나타났으며, 이는 Fc 단편에 대한 특이적 표지를 확인시켜 준다(도 24 참조). 그 후, MALDI-TOF/TOF 직렬 MS 분석은 위에서 설명한 Fc 단편 결과와 일치하는 K248에서 비오틴(biotin) 표지를 나타냈다(도 25 내지 27 참조).

[0358] 다음으로, ADC를 합성하는 약물을 이용하여 트라스투주맵을 표지하였다. FDA-승인된 ADC 중 가장 널리 사용되는 약물인 모노메틸 오리스타틴 E(monomethyl auristatin E; MMAE)를 사용하여 발린-시트룰린-p-아미노벤조일옥시 카르보닐(valine-citrulline-p-aminobenzoyloxycarbonyl; VC-PABC) 링커에 도입된 NASA 부분과 ADC를 합성하려 했으나, NASA-VC-PABC-MMAE의 용해도 문제로 인해 VC-PABC-MMAE를 트라스투주맵에 직접 도입할 수 없었다. 대신 NASA-N₃(상기 실시예 3.7. 참조)을 사용하여 트라스투주맵에 아지드 그룹을 도입하고 균주 촉진 아지드 알카인 고리화 첨가(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition; SPAAC)를 수행하여 VC-PABC-MMAE를 도입하기 위하여(도 28 참조), Z-M₈AzK-PyOx 및 NASA-N₃을 사용하여 트라스투주맵 표지 반응을 수행하였다. 트라스투주맵은 N₃으로 효율적으로 표지되었지만 효율성은 NASA-Bt보다 약간 낮았으며(도 29 내지 32 참조), MS 분석을 통해 Fc 단편 표지와 동일한 위치(K248)에서 표지가 발생했음을 확인하였다(도 33 내지 35 참조).

[0359] 트라스투주맵-N₃에 VC-PABC-MMAE를 도입하기 위하여, SPAAC 반응에 널리 사용되는 변형된 알카인 그룹으로서 바이사이클로노닌(bicyclo[6.1.0]non-4-yne; BCN)을 사용하여 BCN-VC-PABC-MMAE(상기 실시예 3.8. 참조)를 제조하였다(도 28 참조). 트라스투주맵-N₃ 및 BCN-VC-PABC-MMAE에 대하여 SPAAC 반응을 수행하여 트라스투주맵-(VC-PABC-MMAE)₂를 획득하였고 이는 균질한 트라스투주맵-(VC-PABC-MMAE)₂에 대해 FPLC로 정제되었다(도 29 참조).

[0361] 4.7. 세포 생존력 분석

[0362] 합성된 ADC의 세포독성을 평가하기 위하여 유방암 세포주를 사용하여 세포 생존을 분석을 수행하였다. 3 개의 세포주가 사용되었으며, 그 중 2 개는 HER2 양성 세포(SK-BR-3: 높음; MDA-MB-453: 낮음)이고 하나는 HER2 음성 세포(MDA-MB-231)이다. 세포를 트라스투주맵-(VC-PABC-MMAE)₂로 처리하고, 트라스투주맵 WT 및 캐드사일라(Kadcyla)도 비교를 위하여 함께 테스트하였다.

표 2

[0363]

샘플	MDA-MB-231	GI50s (nM)	SK-BR-3
캐드사일라(Kadcyla)	>10	>10	0.249±0.043
트라스투주맵 WT	>10	>10	>10
트라스투주맵-MMAE ₂	>10	>10	0.125±0.065

[0365] 분석 결과, 상기 표 2 및 도 32를 참조하면, 트라스투주맙-(VC-PABC-MMAE)₂는 HER2 양성 SK-BR-3 세포에서 높은 효능을 나타냈다. 또한 ADC는 캐드사일라(Kadcyla)에 비해 약간 더 높은 효능을 나타냈다. 반대로, HER2 음성 MDA-MB-231 세포는 세포 독성을 나타내지 않은 반면, HER2-낮은 발현 MDA-MB-453 세포는 중간 정도의 세포 독성을 나타냈다.

[0367] 4.8. HER2와 FcRn에 대한 트라스투주맙-(VC-PABC-MMAE)₂의 결합 친화도 측정

[0368] 추가적으로, HER2와 FcRn에 대한 트라스투주맙-(VC-PABC-MMAE)₂의 결합 친화도를 측정하였다.

표 3

[0369]

샘플	K _D (M)	k _a (1/Ms)	K _d (1/s)	R _{max} (RU)	Chi ² (RU ²)	U-값
트라스투주맙-WT	3.672×10 ⁻¹⁰	4.343×10 ⁵	1.595×10 ⁻⁴	80.2403	0.256	1
트라스투주맙-MMAE ₂	3.824×10 ⁻¹⁰	4.340×10 ⁵	1.660×10 ⁻⁴	86.64	0.155	1

표 4

[0370]

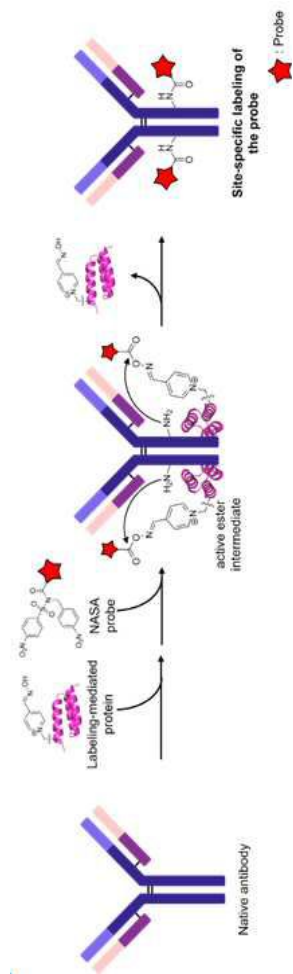
샘플	K _D (M)	k _a (1/Ms)	K _d (1/s)	R _{max} (RU)	Chi ² (RU ²)	U-값
트라스투주맙-WT	5.718×10 ⁻¹⁰	3.123×10 ⁵	1.786×10 ⁻⁴	231.7	14.1	2
트라스투주맙-MMAE ₂	6.040×10 ⁻¹⁰	2.950×10 ⁵	1.782×10 ⁻⁴	246.6	1.42	1

[0372] 상기 표 3 및 표 4를 참조하면, 항체를 약물로 표지하는 것이 결합 친화도에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였으며, 이는 결합 친화도가 트라스투주맙 WT의 결합 친화도와 유사하다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 본 실시예의 표지 시스템을 사용하여 생성된 ADC가 높은 암세포 특이적 세포 독성을 가지며, FcRn에 대한 결합 친화도가 손상되지 않았음을 입증하여 향후 치료적 적용 가능성을 시사한다.

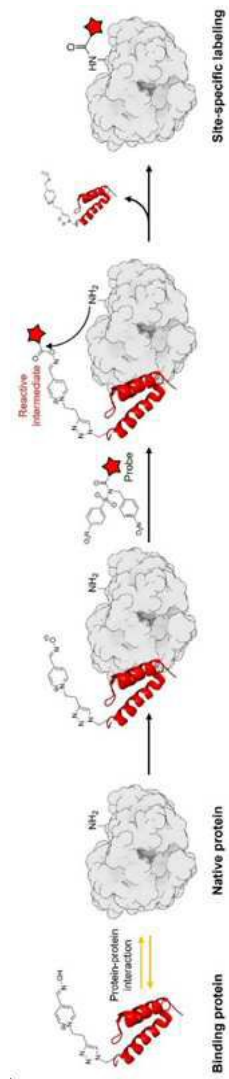
[0374] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수도 있다.

도면

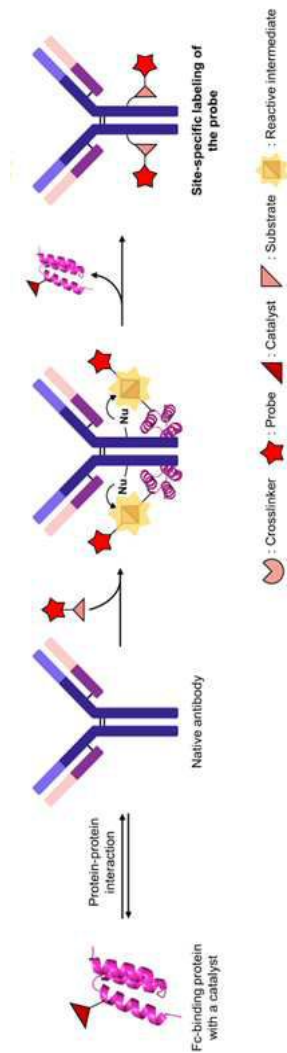
도면1



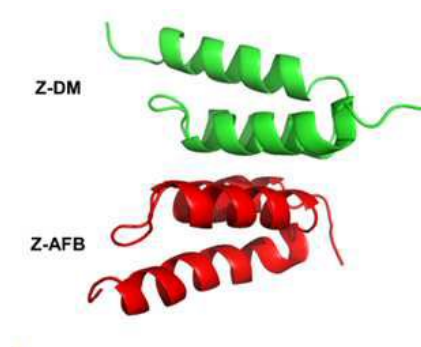
도면2a



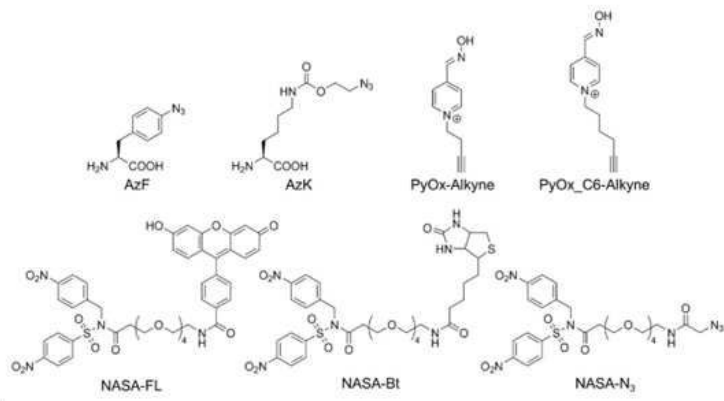
도면2b



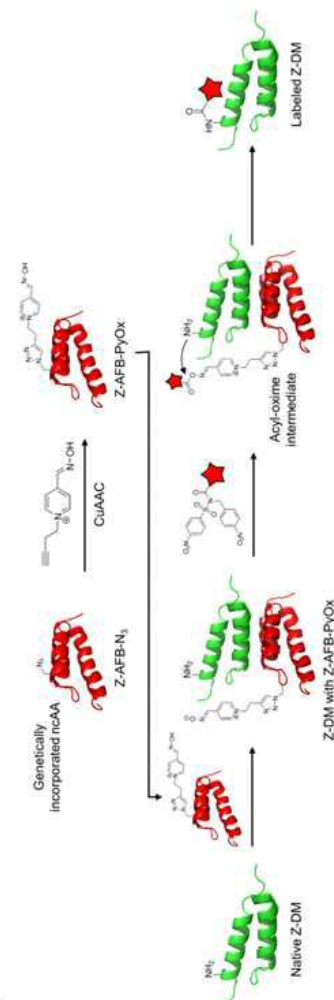
도면3



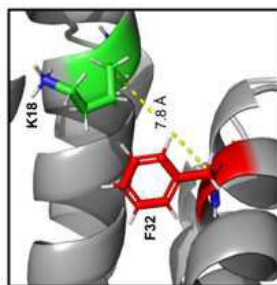
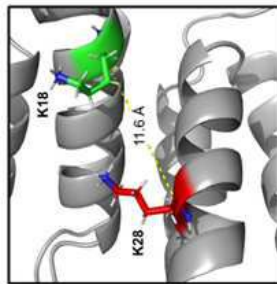
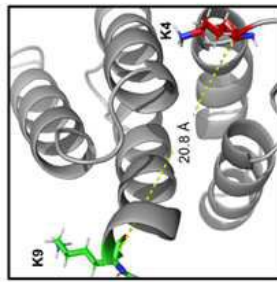
도면4



도면5



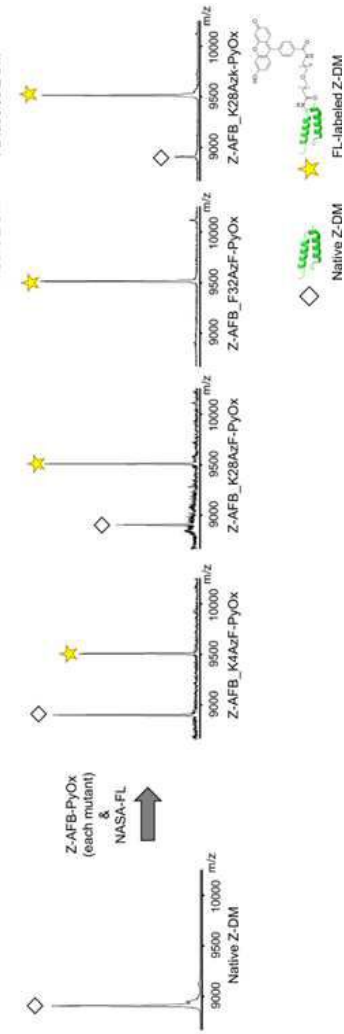
도면6



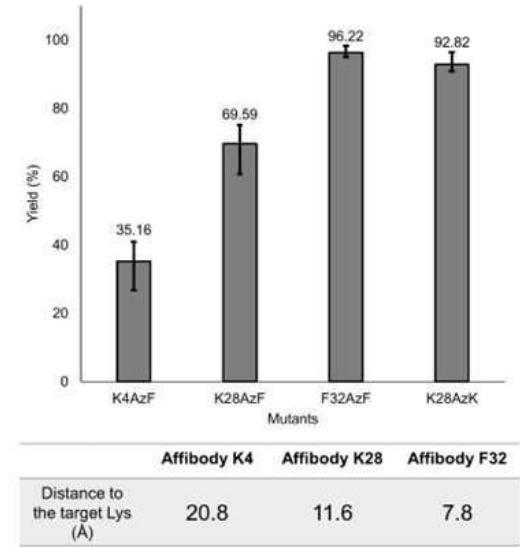
Z-DM

Z-AFB

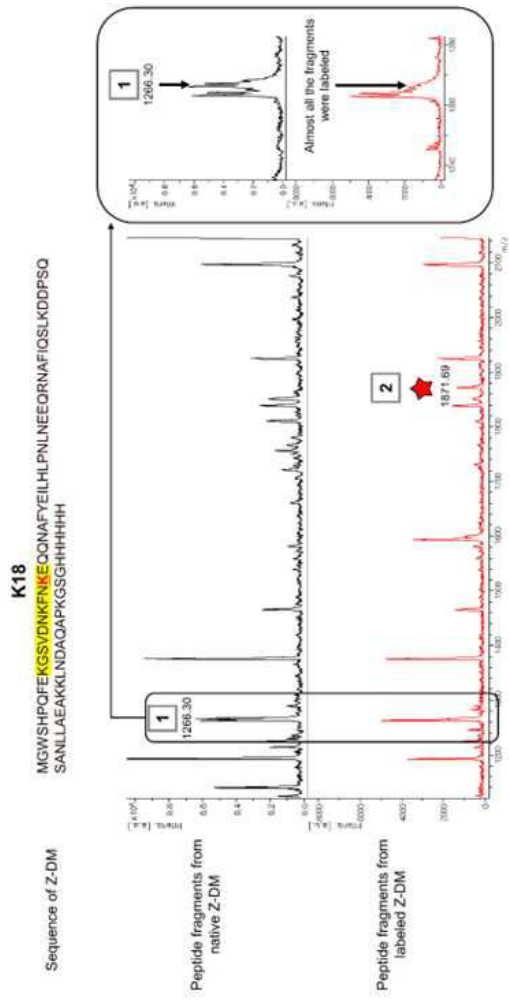
도면7



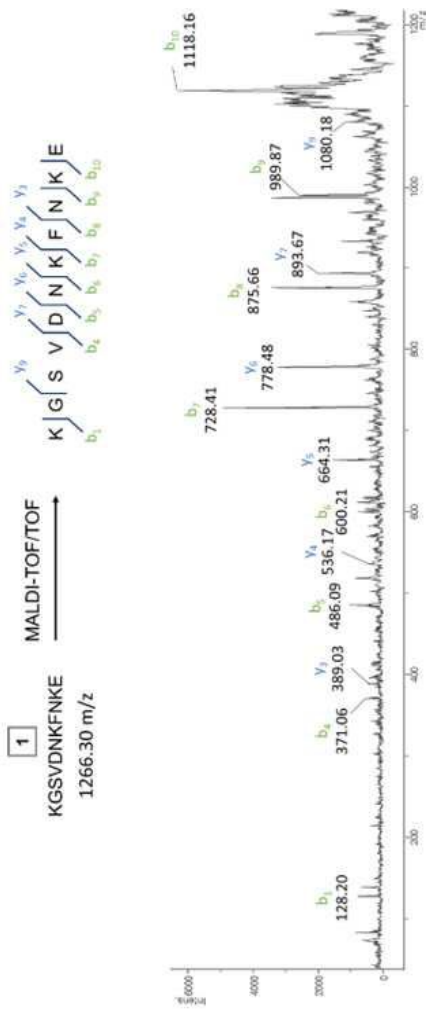
도면8



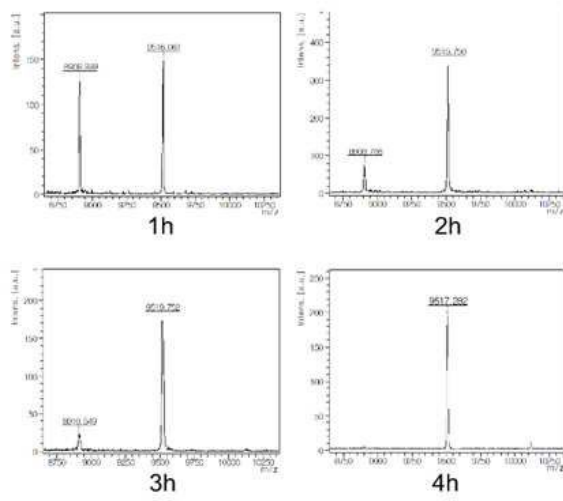
도면9



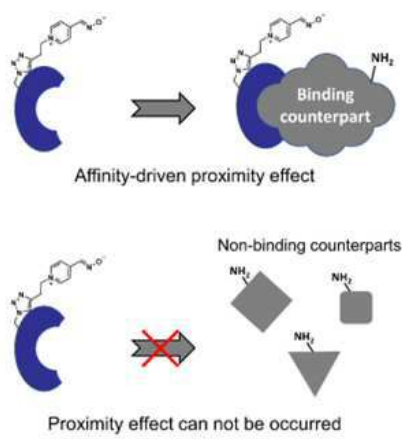
도면10



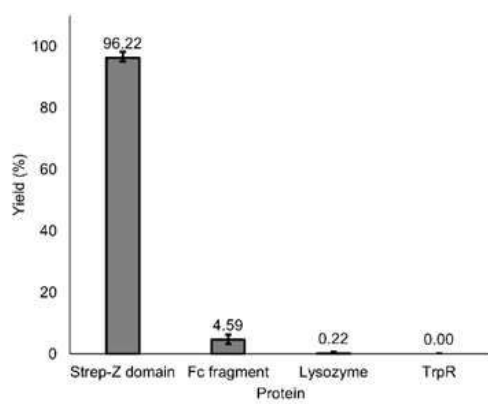
도면12b



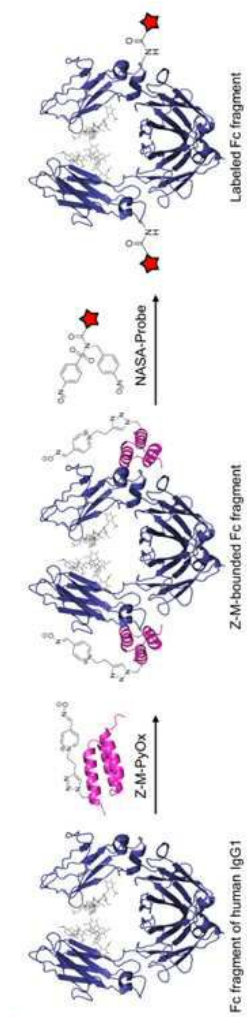
도면13a



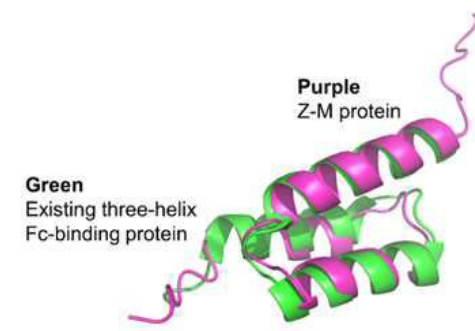
도면13b



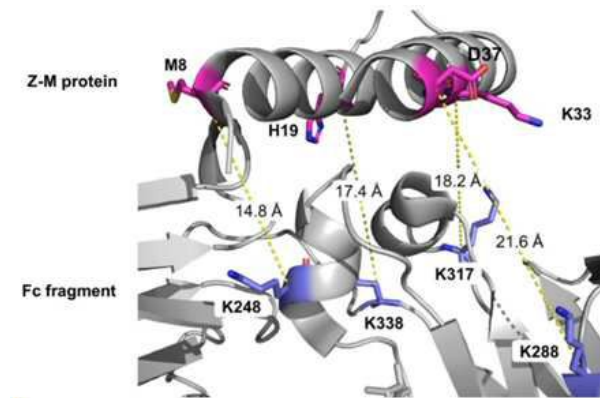
도면14



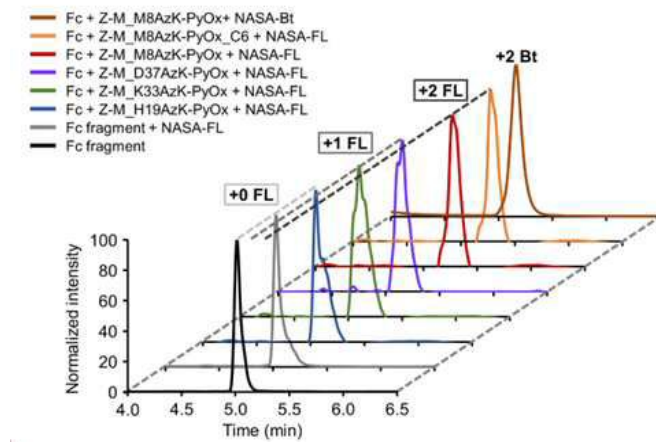
도면15



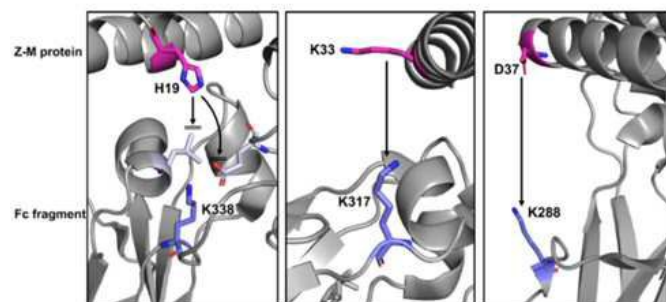
도면16



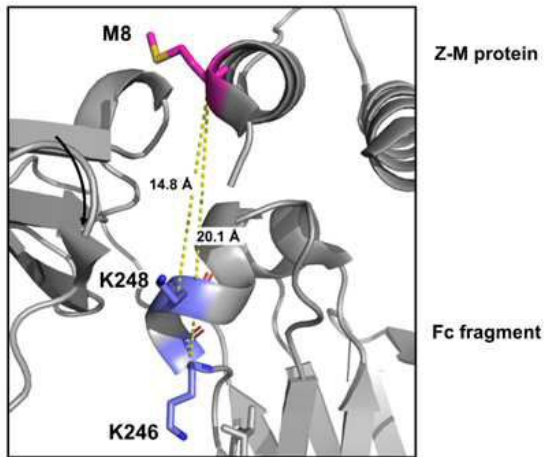
도면17



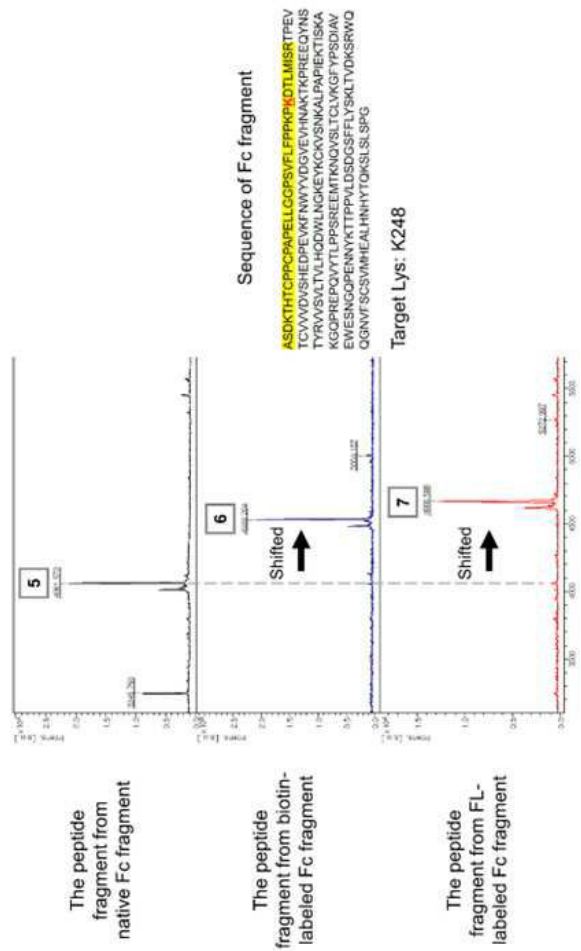
도면18



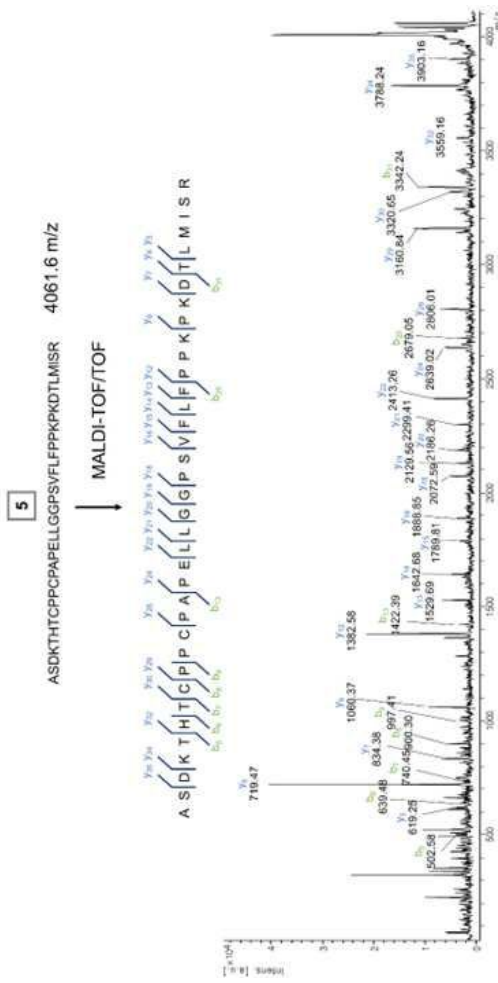
도면19



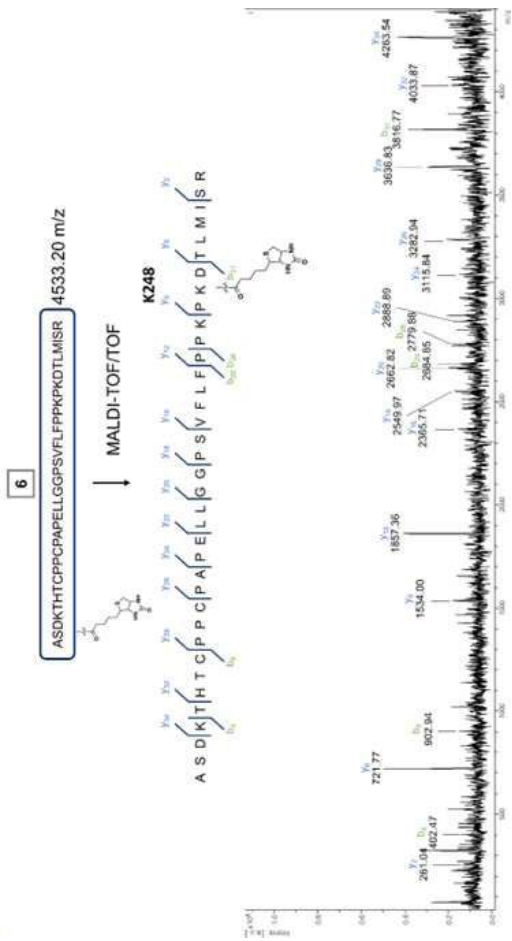
도면20



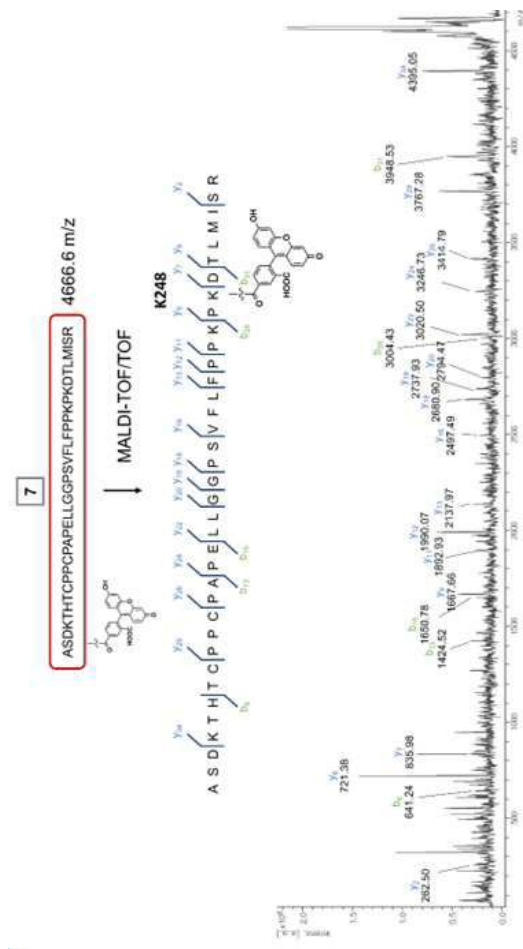
도면21



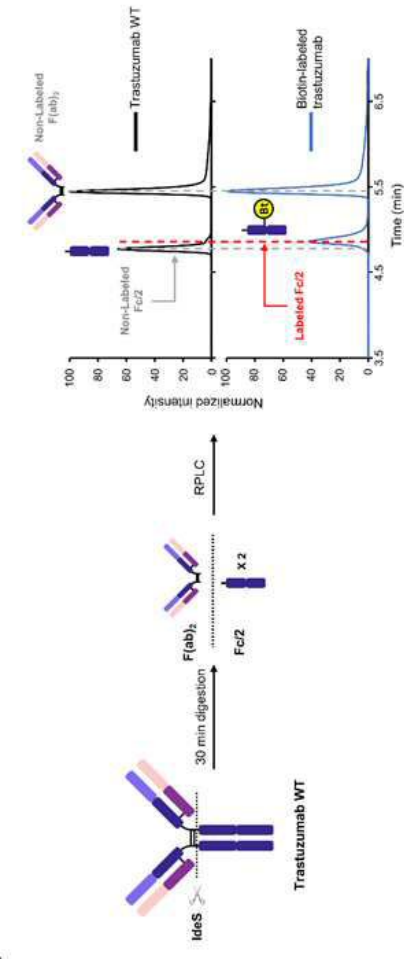
도면22



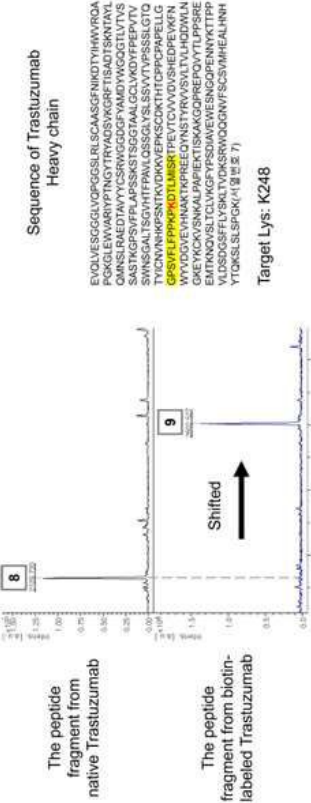
도면23



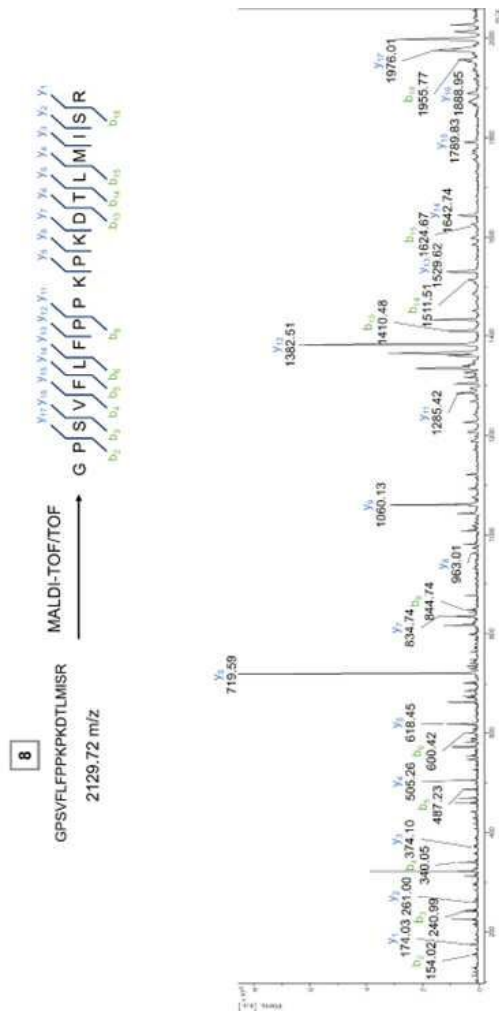
도면24



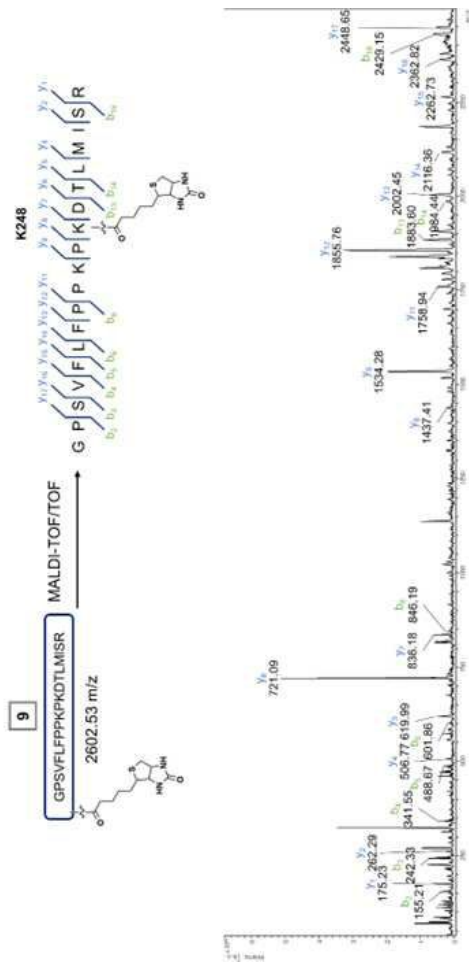
도면25



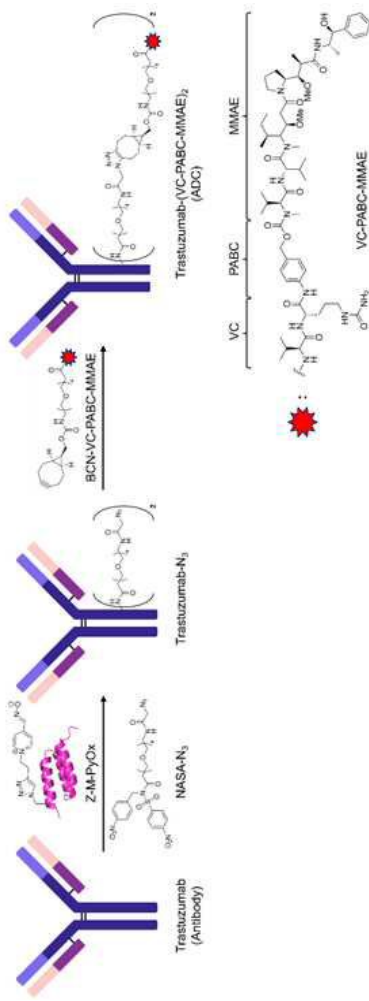
도면26



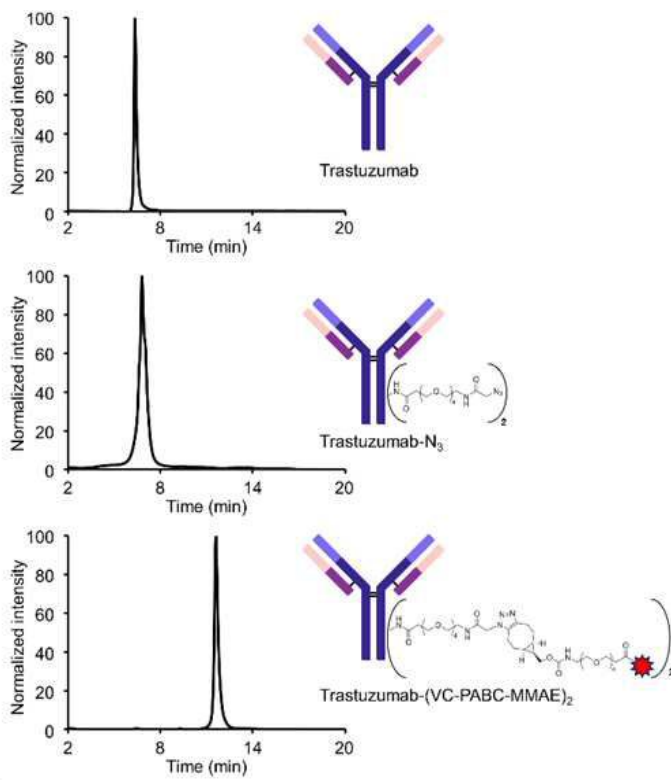
도면27



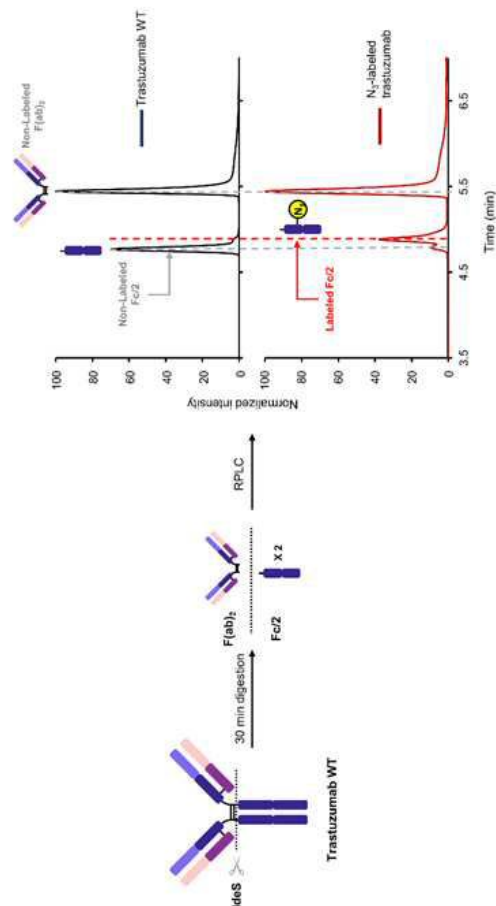
도면28



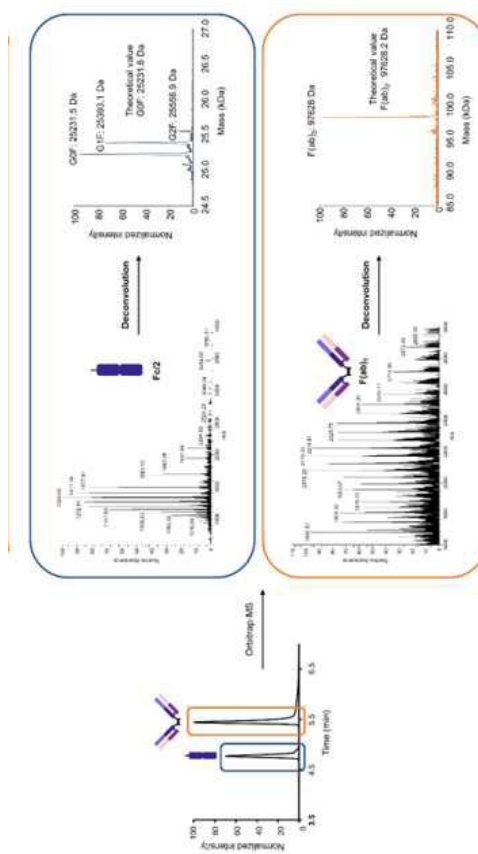
도면29



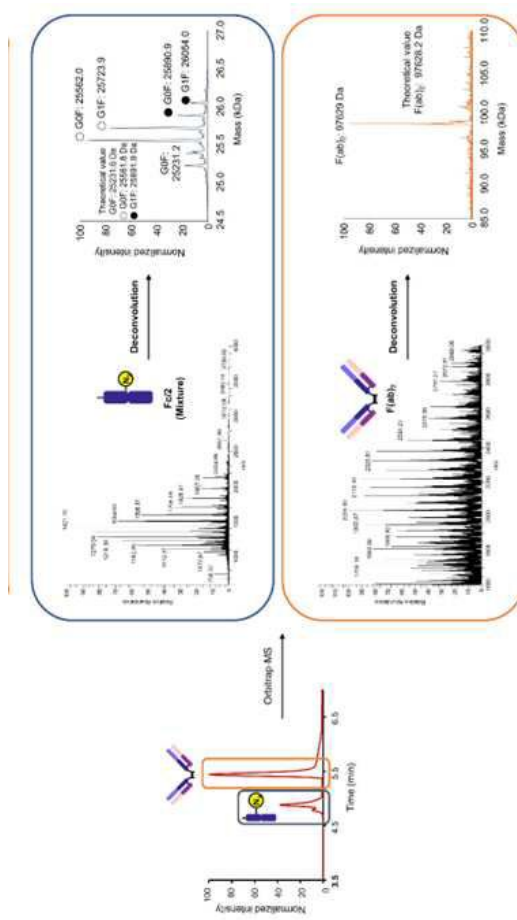
도면30



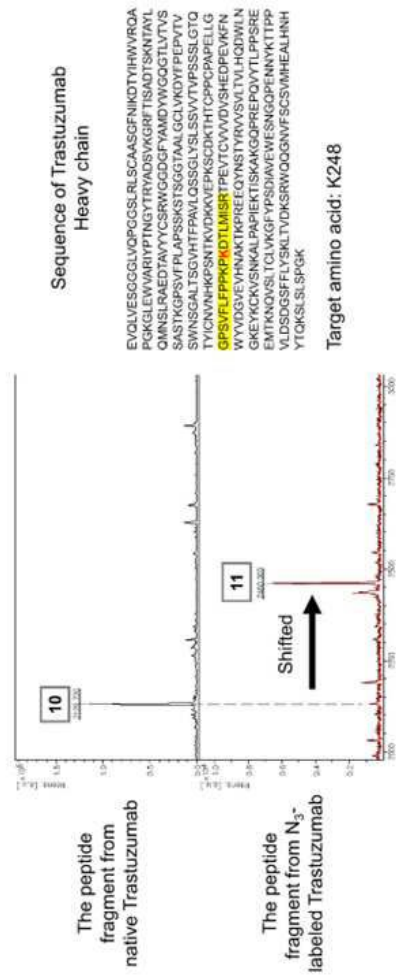
도면31



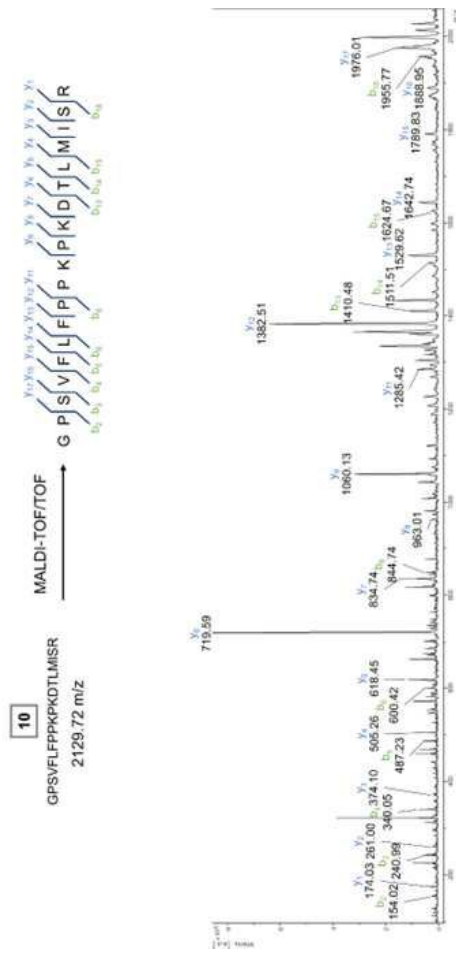
도면32



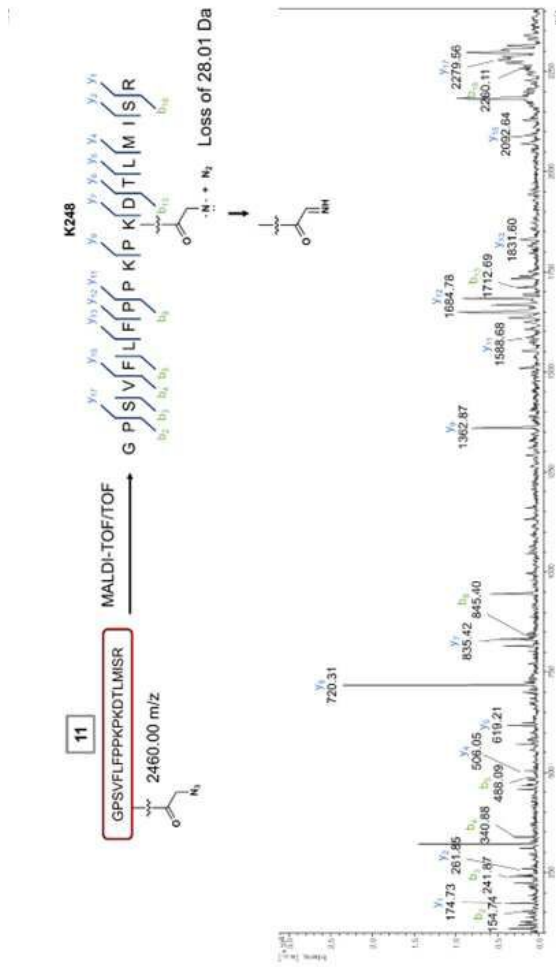
도면33



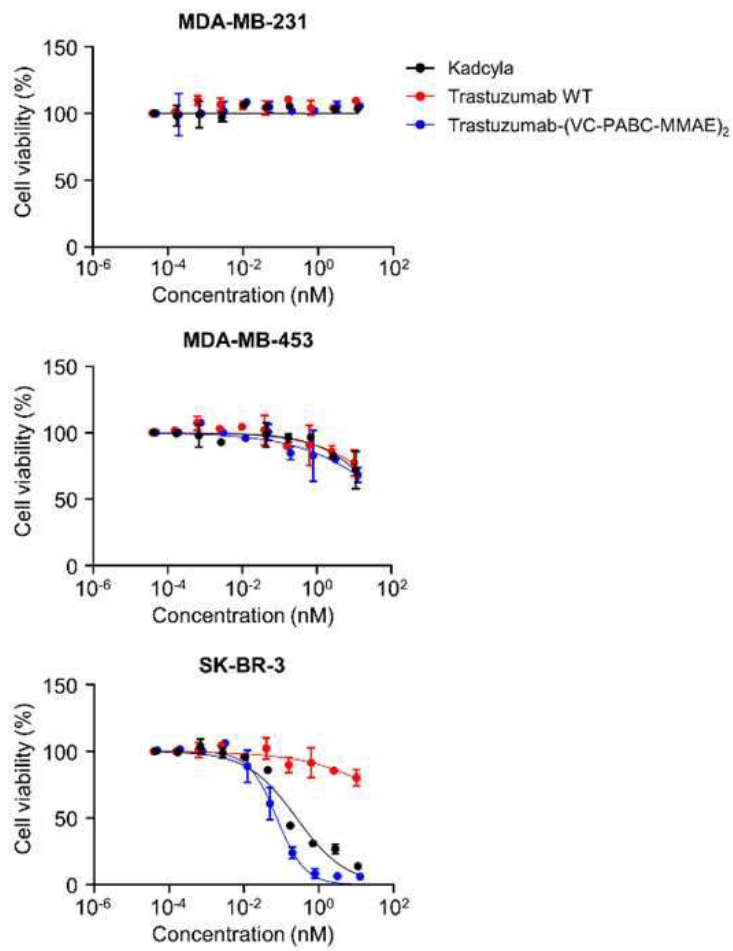
도면34



도면35



도면36



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.