



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0042965  
(43) 공개일자 2020년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/68 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 47/6817 (2017.08)  
A61K 47/6849 (2017.08)  
(21) 출원번호 10-2020-7010853(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2012년03월29일  
심사청구일자 없음  
(62) 원출원 특허 10-2013-7028135  
원출원일자(국제) 2012년03월29일  
심사청구일자 2017년03월29일  
(85) 번역문제출일자 2020년04월14일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/031243  
(87) 국제공개번호 WO 2012/135517  
국제공개일자 2012년10월04일  
(30) 우선권주장  
61/468,997 2011년03월29일 미국(US)

(71) 출원인  
이뮤노젠 아이엔씨  
미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830  
(72) 발명자  
리, 신광  
미국 메사추세츠 02467 뉴튼 브루클린 스트리트 85  
워폴, 제어드 엠.  
미국 펜실베이니아 15232 피츠버그 사우스 네글리 에버뉴 #2 625  
(74) 대리인  
특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 일-단계 방법에 의한 메이탄시노이드 항체 접합체의 제조

(57) 요약

본 발명은 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제조하기 위한 일-단계 방법을 제시하고, 상기 방법은 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 형성하고, 그리고 약 4 내지 약 9의 pH를 갖는 용액 내에서 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 링커를 제공하는 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체, 여기서 세포-결합 작용제는 링커를 통해 세포독성제에 화학적으로 커플링되고, 유리 세포독성제, 그리고 반응 부산물을 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계를 포함한다. 두 번째 혼합물은 이후, 정제된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공하기 위해 정제에 선택적으로 종속된다.

(52) CPC특허분류

*A61K 47/6867* (2017.08)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) 항체를 메이탄시노이드와 접촉시켜 항체와 메이탄시노이드를 포함하는 첫 번째 혼합물을 형성하고, 그 이후 4 내지 9의 pH를 갖는 용액 내에서 첫 번째 혼합물을 링커를 포함하는 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 (i) 항체-메이탄시노이드 접합체, 여기서 항체는 링커를 통해 메이탄시노이드에 화학적으로 커플링되고, (ii) 유리 메이탄시노이드, 그리고 (iii) 반응 부산물을 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계를 포함하는, 항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하기 위한 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 특허 출원은 2011년 3월 29일자 제출된 U.S. 특허가출원 번호 61/468,997에 대한 우선권을 주장하고, 이는 참고문헌으로 편입된다.

[0004] 전자 제출된 자료의 참고문헌 편입

[0005] 다음과 같이 확인된 컴퓨터 판독가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열목록이 본 명세서에 그 전체가 참고문헌으로 편입된다: 2012년 4월 3일에 생성된 하나의 9,233바이트 ASCII(Text) 파일(파일명 "710088SequenceListing.TXT").

[0007] 암 및 기타 질환의 치료에 유용한 항체-약물-접합체 (ADC's)는 통상적으로, 3가지 상이한 요소: 세포-결합 작용제; 링커; 그리고 세포독성제로 구성된다. 세포-결합 작용제, 예를 들면, 항체를 세포독성제에 접합하는 전통적인 방법은 항체와의 2가지 상이한 반응 단계를 이용한다. 첫 번째 반응 단계 (변형 단계)에서, 항체는 헤테로이작용성 링커와 반응되어 링커-변형된 항체가 생산된다. 변형된 항체 산물은 이후, 과량의 링커 또는 가수분해된 링커 시약으로부터 선택적으로 정제된다. 두 번째 반응 단계 (접합 단계)에서, 링커-변형된 항체는 반응성 기, 예를 들면, 티올을 내포하는 세포독성제와 반응되어 항체-세포독성제 접합체가 산출되고, 이것은 추가의 정제 단계에서 다시 한 번 정제된다.

#### 배경 기술

[0008] 항체-세포독성제 접합체의 제조를 위한 기존에 기술된 방법은 복잡한데, 그 이유는 이들이 수행하기 번잡하거나, 또는 최적으로 요망되는 것보다 덜 순수하거나 덜 안정한 면역접합체를 생산하는 단계로 방해되기 때문이다. 따라서 산물 속성, 예를 들면, 순도 및/또는 안정성을 향상시키면서 하나 또는 그 이상의 제조 단계를 변형하거나 제거하는 것이 바람직할 것이다.

[0009] [선행기술문헌]

[0010] [특허문헌]

[0011] 미국 특허공보 US 5,208,020

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0012] 전술한 것에 비추어, 실질적으로 높은 순도를 갖고, 그리고 번잡한 단계를 회피하고 사용자까지의 시간과 비용을 감소시키면서 제조될 수 있는 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체를 제조하기 위한 향상된 방법을 개발하는 것이 당분야에서 요구된다. 본 발명은 이런 방법을 제시한다. 본 발명의 이들 이점 및 다른 이점뿐만 아니라 추

가의 발명적 특질은 본원에서 제공된 발명의 상세한 설명으로부터 명백할 것이다.

## 과제의 해결 수단

[0013]

발명의 간단한 요약

[0014]

본 발명은 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제조하기 위한 방법을 제시하고, 상기 방법은 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 형성하고, 그리고 그 이후, 약 4 내지 약 9의 pH를 갖는 용액 내에서 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 링커를 포함하는 이작용성(bifunctional) 가교 시약과 접촉시켜 (i) 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체, 여기서 세포-결합 작용제는 링커를 통해 세포독성제에 화학적으로 커플링되고, (ii) 유리 세포독성제, 그리고 (iii) 반응 부산물을 포함하는 혼합물을 제공하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 혼합물을 정제하여 정제된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

[0015]

본 발명의 방법은 높은 순도 및/또는 안정성을 갖는 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공한다. 접합체의 높은 순도 및/또는 안정성을 달성하기 위하여, 세포독성제가 먼저, 세포-결합 작용제와 접촉되어 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 형성하고, 그 이후에 상기 혼합물이 이작용성 가교 시약과 접촉되는 것이 필수적이다.

[0016]

본 발명은 또한, 본원에서 기술된 방법에 따라 제조된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 포함한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

발명의 상세한 설명

[0018]

본 발명은 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제조하기 위한 일-단계 방법을 제시한다. 상기 방법은 세포-결합 작용제 (가령, 항체)를 세포독성제와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 형성하고, 그리고 그 이후, 약 4 내지 약 9의 pH를 갖는 용액 내에서 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 링커를 포함하는 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체, 유리 세포독성제, 그리고 반응 부산물을 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 세포-결합 작용제는 링커를 통해 세포독성제에 화학적으로 커플링된다. 두 번째 혼합물은 이후, 정제된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공하기 위해 정제에 종속된다.

[0019]

한 구체예에서, 접촉은 세포-결합 작용제를 제공하고, 그 이후 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 형성하고, 그리고 그 이후, 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 이작용성 가교 시약과 접촉시킴으로써 달성된다. 가령, 한 구체예에서, 세포-결합 작용제가 반응 용기 내에 제공되고, 세포독성제가 반응 용기에 첨가되고 (따라서 세포-결합 작용제와 접촉하고), 그리고 그 이후, 이작용성 가교 시약이 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물에 첨가된다 (따라서 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물과 접촉한다). 한 구체예에서, 세포-결합 작용제가 반응 용기 내에 제공되고, 그리고 세포독성제가 세포-결합 작용제를 용기에 제공한 직후에 반응 용기에 첨가된다. 다른 구체예에서, 세포-결합 작용제가 반응 용기 내에 제공되고, 그리고 세포독성제가 세포-결합 작용제를 용기에 제공한 이후에 일정한 시간 간격 (가령, 세포-결합 작용제를 공간에 제공한 후 약 5분, 약 10분, 약 20분, 약 30분, 약 40분, 약 50분, 약 1시간, 약 1일 또는 더욱 긴 시간) 후 반응 용기에 첨가된다. 세포독성제는 빠르게 (즉, 짧은 시간 간격, 예를 들면, 약 5분, 약 10분 이내에) 또는 느리게 (가령, 펌프를 이용하여) 첨가될 수 있다.

[0020]

세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물은 이후, 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시킨 직후에, 또는 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시킨 후 일정한 후기 시점 (가령, 약 5분 내지 약 8시간 또는 더욱 긴 시점)에 이작용성 가교 시약과 접촉될 수 있다. 가령, 한 구체예에서, 이작용성 가교 시약은 세포-결합 작용제를 포함하는 반응 용기에 세포독성제의 첨가 직후에, 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물에 첨가된다. 대안으로, 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물은 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시킨 후, 약 5분, 약 10분, 약 20분, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 또는 더욱 긴 시점에 이작용성 가교 시약과 접촉될 수 있다.

[0021]

다른 구체예에서, 세포독성제와 이작용성 작용제는 복수 사이클 (가령, 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 사이클)을 통해 첨가된다. 가령, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법을 제시한다: a) 세포-결합 작용제를 세포독성제

와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 첫 번째 혼합물을 형성하고, 그리고 그 이후 약 4 내지 약 9의 pH를 갖는 용액 내에서 첫 번째 혼합물을 링커를 포함하는 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체, 유리 세포독성제, 그리고 반응 부산물을 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계, 여기서 세포-결합 작용제는 링커를 통해 세포독성제에 화학적으로 커플링되고; b) 두 번째 혼합물을 세포독성제와 접촉시켜 세 번째 혼합물을 형성하고, 그리고 그 이후 약 4 내지 약 9의 pH에서 세 번째 혼합물을 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 네 번째 혼합물을 제공하는 단계; 그리고 c) 네 번째 혼합물을 정제하여 정제된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공하는 단계. 한 구체예에서, 단계 b)는 단계 a) 이후에, 일정한 시간 간격 (가령, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간 또는 더욱 긴 기간) 후 수행된다. 다른 구체예에서, 단계 b)는 단계 c)가 수행되기 이전에, 수회 (가령, 1, 2, 3, 4회 또는 그 이상) 반복될 수 있다. 추가 단계 b)는 초기 단계 b) 이후에, 일정한 시간 간격 (가령, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간 또는 더욱 긴 기간) 후 수행될 수 있다.

[0022] 다른 구체예에서, 이작용성 가교 시약은 세포독성제의 완전한 첨가 이전에 첨가된다. 가령, 한 구체예에서, 세포독성제는 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 형성하기 위해 일정한 시간 간격 (가령, 약 5분, 약 10분, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 또는 더욱 긴 기간)에 걸쳐 연속적으로 세포-결합 작용제에 첨가된다. 세포독성제의 첨가가 완결되기 이전에, 이작용성 가교 시약이 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물에 첨가되고, 단서로써 임의의 시점에서, 세포독성제는 이작용성 가교 시약의 몰 과량으로 존재한다. 한 구체예에서, 이작용성 가교 시약은 일정한 시간 간격 (가령, 약 5분, 약 10분, 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 또는 더욱 긴 기간)에 걸쳐 연속적으로 첨가된다.

[0023] 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물이 이작용성 가교 시약과 접촉된 이후, 반응은 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 또는 더욱 긴 기간 (가령, 약 30시간, 약 35시간, 약 40시간, 약 45시간, 또는 약 48시간) 동안 진행하도록 허용된다.

[0024] 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 것 (즉, 반응 단계)은 약 4 내지 약 9 (가령, 약 4, 약 4.5, 약 5, 약 5.5, 약 6, 약 6.5, 약 7, 약 7.5, 약 8, 약 8.5, 또는 약 9)의 pH를 갖는 용액 내에서 일어난다. 한 구체예에서, 반응 단계는 약 6 또는 그 이하 (가령, 약 4 내지 약 6, 약 4 내지 약 5.5, 또는 약 4.5 내지 약 5.5)의 pH를 갖는 용액 내에서 일어난다.

[0025] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 약 6 또는 그 이상 (가령, 약 6 내지 약 9, 약 6 내지 약 7, 약 7 내지 약 9, 약 7 내지 약 8.5, 약 7.5 내지 약 8.5, 약 7.5 내지 약 8.0, 약 8.0 내지 약 9.0, 또는 약 8.5 내지 약 9.0)의 pH를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 것을 포함한다. 가령, 본 발명의 방법은 약 6.0, 약 6.1, 약 6.2, 약 6.3, 약 6.4, 약 6.5, 약 6.6, 약 6.7, 약 6.8, 약 6.9, 약 7.0, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.7, 약 7.8, 약 7.9, 약 8.0, 약 8.1, 약 8.2, 약 8.3, 약 8.4, 약 8.5, 약 8.6, 약 8.7, 약 8.8, 약 8.9, 또는 약 9.0의 pH를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 것을 포함한다. 특정한 구체예에서, 본 발명의 방법은 약 7.8의 pH (가령, 7.6 내지 8.0의 pH 또는 7.7 내지 7.9의 pH)를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0026] 본 발명의 방법은 당분야에 공지된 임의의 적절한 온도에서 일-단계 반응 (즉, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시킴)을 수행하는 것을 포함한다. 가령, 일-단계 반응은 약 20℃ 또는 그 이하 (가령, 약 -10℃ (단서로써 용액은 예로써, 세포독성제와 이작용성 가교 시약을 용해하는데 이용되는 유기 용매의 존재에 의해 동결로부터 예방된다) 내지 약 20℃, 약 0℃ 내지 약 18℃, 약 4℃ 내지 약 16℃), 실온 온도 (가령, 약 20℃ 내지 약 30℃ 또는 약 20℃ 내지 약 25℃), 또는 상승된 온도 (가령, 약 30℃ 내지 약 37℃)에서 일어날 수 있다. 한 구체예에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 것은 약 16℃ 내지 약 24℃ (가령, 약 16℃, 약 17℃, 약 18℃, 약 19℃, 약 20℃, 약 21℃, 약 22℃, 약 23℃, 약 24℃, 또는 약 25℃)의 온도에서 일어난다.

[0027] 다른 구체예에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 것은 약 15℃ 또는 그 이하의 온도 (가령, 약 -10℃ 내지 약 15℃, 또는 약 0℃ 내지 약 15℃)에서 일어난다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 약 15℃, 약 14℃, 약 13℃, 약 12℃, 약 11℃, 약 10℃, 약 9℃, 약 8℃, 약 7℃, 약 6℃, 약 5℃, 약 4℃, 약 3℃, 약 2℃, 약 1℃, 또는 약 0℃, 약 -1℃, 약 -2℃, 약 -3℃, 약 -4℃, 약 -5℃, 약 -6℃, 약 -7℃, 약 -8℃, 약 -9℃, 또는 약 -10℃의 온도에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작

용성 가교 시약과 접촉시키는 단계를 포함하고, 단서로써 용액은 예로써, 이작용성 가교 시약을 용해하는데 이용되는 유기 용매(들)의 존재에 의해 동결로부터 예방된다. 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 약 -10℃ 내지 약 15℃, 약 0℃ 내지 약 15℃, 약 0℃ 내지 약 10℃, 약 0℃ 내지 약 5℃, 약 5℃ 내지 약 15℃, 약 10℃ 내지 약 15℃, 또는 약 5℃ 내지 약 10℃의 온도에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 약 10℃의 온도 (가령, 8℃ 내지 12℃의 온도 또는 9℃ 내지 11℃의 온도)에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0028] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 낮은 온도 (가령, 약 15℃ 또는 그 이하)에서 높은 pH (가령, 약 7 또는 그 이상)를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 단계를 포함한다. 가령, 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 약 15℃의 온도에서 약 7.5의 pH를 갖는 용액, 약 10℃의 온도에서 약 7.8의 pH를 갖는 용액, 약 0℃의 온도에서 약 8.2의 pH를 갖는 용액, 또는 약 0℃의 온도에서 약 8.5의 pH를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 5℃ 내지 15℃의 온도에서 7.0 내지 8.5의 pH (가령, 7.5 내지 8.0의 pH)를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0029] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 임의의 반응되지 않은 세포독성제 및/또는 반응되지 않은 이작용성 가교 시약을 진정시키는 진정 단계를 더욱 포함한다. 진정 단계는 세포-결합 작용제 세포독성제의 정제에 앞서 수행된다. 가령, 본 발명의 방법은 (a) 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 형성하고, 그 이후 약 4 내지 약 9의 pH를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 링커를 포함하는 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 (i) 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체, 여기서 세포-결합 작용제는 링커를 통해 세포독성제에 화학적으로 커플링되고, (ii) 유리 세포독성제, 그리고 (iii) 반응 부산물을 포함하는 혼합물을 제공하는 단계, (b) 단계 (a)에서 제조된 혼합물을 진정시켜 임의의 반응되지 않은 세포독성제 및/또는 반응되지 않은 이작용성 가교 시약을 진정시키는 단계, 그리고 (c) 혼합물을 정제하여 정제된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공하는 단계를 포함한다.

[0030] 한 구체예에서, 혼합물은 혼합물을 진정 시약과 접촉시킴으로써 진정된다. 본원에서 이용된 바와 같이, "진정 시약"은 유리 세포독성제 및/또는 이작용성 가교 시약과 반응하는 시약을 지칭한다.

[0031] 한 구체예에서, 말레이미드 또는 할로아세트아미드 진정 시약, 예를 들면, 4-말레이미도부티르산, 3-말레이미도 프로피온산, N-에틸말레이미드, 요오드아세트아미드, 또는 요오드아세트아미도프로피온산이 세포독성제 내에 임의의 반응되지 않은 기 (가령, 티올)가 진정되도록 담보하는데 이용될 수 있다. 진정 단계는 세포독성제, 특히 반응되지 않은 티올 기를 갖는 세포독성제 (가령, DM1)의 이합체화를 예방하는데 도움을 줄 수 있다. 이합체화된 세포독성제는 제거하기 어려울 수 있다. 진정 단계는 또한, 고유 항체 이황화 기와의 임의의 원치 않는 티올-이황화 교환 반응을 최소화시킬지도 모른다. 극성의 하전된 티올-진정 시약 (가령, 4-말레이미도부티르산 또는 3-말레이미도프로피온산)으로 진정 직후에, 과량의 반응되지 않은 세포독성제는 극성의 하전된 물-용해성 부가물로 전환되고, 이것은 정제 단계 동안 공유-연결된 접합체로부터 쉽게 분리될 수 있다. 비-극성과 중성 티올-진정 시약으로 진정 역시 이용될 수 있다.

[0032] 한 구체예에서, 혼합물은 반응되지 않은 이작용성 가교 시약과 반응하는 진정 시약과 혼합물을 접촉시킴으로써 진정된다. 가령, 임의의 반응되지 않은 이작용성 가교 시약을 진정시키기 위해 친핵성 시약이 혼합물에 첨가될 수 있다. 친핵성 시약은 바람직하게는, 아미노기 내포 친핵성 시약, 예를 들면, 리신, 타우린과 히드록실아민이다.

[0033] 바람직한 구체예에서, 반응 (즉, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시킴)은 혼합물을 진정 시약과 접촉시키기에 앞서, 완결까지 진행하도록 허용된다. 이와 관련하여, 진정 시약은 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물이 이작용성 가교 시약과 접촉된 이후, 약 1시간 내지 약 48시간 (가령, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 또는 약 25시간 내지 약 48시간) 시점에 혼합물에 첨가된다.

[0034] 본 발명의 방법은 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체의 용해도와 회수를 증가시키기 위해, 반응 단계 (즉, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 이작용성 가교 시약과 접촉시킴)에 수크로오스의 첨가를 선택적으로 포함할 수

있다. 바람직하게는, 수크로오스는 약 0.1% (w/v) 내지 약 20% (w/v) (가령, 약 0.1% (w/v), 1% (w/v), 5% (w/v), 10% (w/v), 15% (w/v), 또는 20% (w/v))의 농도에서 첨가된다. 바람직하게는, 수크로오스는 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v) (가령, 약 0.5% (w/v), 약 1% (w/v), 약 1.5% (w/v), 약 2% (w/v), 약 3% (w/v), 약 4% (w/v), 약 5% (w/v), 약 6% (w/v), 약 7% (w/v), 약 8% (w/v), 약 9% (w/v), 약 10% (w/v), 또는 약 11% (w/v))의 농도에서 첨가된다. 이에 더하여, 반응 단계는 또한, 완충제의 첨가를 포함할 수 있다. 당분야에 공지된 임의의 적절한 완충제가 이용될 수 있다. 적절한 완충제에는 예로써, 시트레이트 완충액, 아세테이트 완충액, 숙시네이트 완충액, 그리고 포스페이트 완충액이 포함된다. 한 구체예에서, 완충제는 HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-히드록시프로판술폰산)), POSPO (피페라진-1,4-비스-(2-히드록시-프로판-술폰산) 탈수물), HEPES (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄술폰산), HEPPS (EPPS) (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-프로판술폰산), TES (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]-2-아미노에탄술폰산), 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.

[0035] 반응 단계 이후에, 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체는 정제 단계에 종속된다. 이와 관련하여, 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체는 막-기초된 접선 유동 여과 방법인 접선 유동 여과 (TFF), 비-흡착 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선별 침전, 또는 임의의 다른 적절한 정제 방법뿐만 아니라 이들의 조합을 이용하여, 혼합물의 다른 성분 (가령, 유리 세포독성제와 반응 부산물)로부터 정제될 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체는 단일 정제 단계 (가령, TFF)를 이용하여 정제된다. 바람직하게는, 접합체는 단일 정제 단계 (가령, TFF)를 이용하여 정제되고 적절한 제제로 교체된다. 본 발명의 다른 구체예에서, 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체는 2가지 순차적 정제 단계를 이용하여 정제된다. 가령, 접합체는 먼저, 선별 침전, 흡착 여과, 흡착 크로마토그래피 또는 비-흡착 크로마토그래피에 의해 정제되고, 그 이후에 TFF로 정제될 수 있다. 당업자는 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체의 정제가 세포독성제에 화학적으로 커플링된 세포-결합 작용제를 포함하는 안정된 접합체의 분리를 가능하게 한다는 것을 인지할 것이다.

[0036] Pellicon 타입 시스템 (Millipore, Billerica, MA), Sartocoon Cassette 시스템 (Sartorius AG, Edgewood, NY), 그리고 Centrasette 타입 시스템 (Pall Corp., East Hills, NY)을 비롯한 임의의 적절한 TFF 시스템이 정제에 이용될 수 있다.

[0037] 임의의 적절한 흡착 크로마토그래피 수지가 정제에 이용될 수 있다. 바람직한 흡착 크로마토그래피 수지에는 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 전하 유도 크로마토그래피 (HCIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 혼합형 이온 교환 크로마토그래피, 고정된 금속 친화성 크로마토그래피 (IMAC), 색소 리간드 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 그리고 이들의 조합이 포함된다. 적절한 히드록시아파타이트 수지의 실례에는 세라믹 히드록시아파타이트 (CHT 타입 I과 타입 II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), HA Ultrogel 히드록시아파타이트 (Pall Corp., East Hills, NY), 그리고 세라믹 플루오르아파타이트 (CFT 타입 I과 타입 II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)가 포함된다. 적절한 HCIC 수지의 실례는 MEP Hypercel 수지 (Pall Corp., East Hills, NY)이다. 적절한 HIC 수지의 실례에는 부틸-세파로오스, 헥실-세파로오스, 페닐-세파로오스, 그리고 옥틸 세파로오스 수지 (이들 모두 GE Healthcare, Piscataway, NJ)뿐만 아니라 Macro-prep 메틸과 Macro-Prep t-부틸 수지 (Biorad Laboratories, Hercules, CA)가 포함된다. 적절한 이온 교환 수지의 실례에는 SP-세파로오스, CM-세파로오스, 그리고 Q-세파로오스 수지 (이들 모두 GE Healthcare, Piscataway, NJ), 그리고 Unosphere S 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)가 포함된다. 적절한 혼합형 이온 교환체의 실례에는 Bakerbond ABx 수지 (JT Baker, Phillipsburg NJ)가 포함된다. 적절한 IMAC 수지의 실례에는 킬레이트화 세파로오스 수지 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 및 Profinity IMAC 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)가 포함된다. 적절한 색소 리간드 수지의 실례에는 블루 세파로오스 수지 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 및 Affi-젤 블루 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)가 포함된다. 적절한 친화성 수지의 실례에는 단백질 A 세파로오스 수지 (가령, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) (여기서, 세포-결합 작용제는 항체이다), 그리고 렉틴 친화성 수지, 예를 들면, Lentil 렉틴 세파로오스 수지 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) (여기서, 세포-결합 작용제는 적절한 렉틴 결합 부위를 보유한다)가 포함된다. 대안으로, 세포-결합 작용제에 특이적인 항체가 이용될 수도 있다. 이런 항체는 예로써, 세파로오스 4 Fast Flow 수지 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)에 고정될 수 있다. 적절한 역상 수지의 실례에는 C4, C8, 그리고 C18 수지 (Grace Vydac, Hesperia, CA)가 포함된다.

[0038] 임의의 적절한 비-흡착 크로마토그래피 수지가 정제에 이용될 수 있다. 적절한 비-흡착 크로마토그래피 수지의 실례에는 SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ 수지 (가령, S-200 및 S-300), SUPERDEX™ 수지 (가령, SUPERDEX™ 75 및 SUPERDEX™ 200), BIO-GEL® 수지 (가령, P-6, P-10, P-30, P-60, 그리고 P-100), 그리고 당

업자에 공지된 다른 것들이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

- [0039] 한 구체예에서, 본 발명의 방법은 세포-결합 작용제로부터 불안정하게 결합된 링커를 방출하기 위한 유지 단계를 더욱 포함한다. 유지 단계는 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체의 정제에 앞서 (가령, 반응 단계 후, 반응 단계와 진정 단계 사이에, 또는 진정 단계 후), 혼합물을 유지하는 것을 포함한다. 가령, 본 발명의 방법은 (a) 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 형성하고, 그 이후 약 4 내지 약 9의 pH를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 링커를 제공하는 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 (i) 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체, 여기서 세포-결합 작용제는 링커를 통해 세포독성제에 화학적으로 커플링되고, (ii) 유리 세포독성제, 그리고 (iii) 반응 부산물을 포함하는 혼합물을 제공하는 단계, (b) 단계 (a)에서 제조된 혼합물을 유지하여 세포-결합 작용제로부터 불안정하게 결합된 링커를 방출하는 단계, 그리고 (c) 혼합물을 정제하여 정제된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공하는 단계를 포함한다.
- [0040] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 (a) 세포-결합 작용제를 세포독성제와 접촉시켜 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 형성하고, 그 이후 약 4 내지 약 9의 pH를 갖는 용액 내에서, 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물을 링커를 제공하는 이작용성 가교 시약과 접촉시켜 (i) 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체, 여기서 세포-결합 작용제는 링커를 통해 세포독성제에 화학적으로 커플링되고, (ii) 유리 세포독성제, 그리고 (iii) 반응 부산물을 포함하는 혼합물을 제공하는 단계, (b) 단계 (a)에서 제조된 혼합물을 진정시켜 임의의 반응되지 않은 세포독성제 및/또는 반응되지 않은 이작용성 가교 시약을 진정시키는 단계, (c) 단계 (b)에서 제조된 혼합물을 유지하여 세포-결합 작용제로부터 불안정하게 결합된 링커를 방출하는 단계, 그리고 (d) 혼합물을 정제하여 정제된 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체를 제공하는 단계를 포함한다.
- [0041] 대안으로, 유지 단계는 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체의 정제 후 수행되고, 추가의 정제 단계가 뒤따를 수 있다.
- [0042] 바람직한 구체예에서, 반응 (즉, 세포-결합 작용제를 세포독성제 및 그 이후, 이작용성 가교 시약과 접촉시킴)은 유지 단계에 앞서, 완결까지 진행하도록 허용된다. 이와 관련하여, 유지 단계는 세포-결합 작용제와 세포독성제를 포함하는 혼합물이 이작용성 가교 시약과 접촉된 이후, 약 1시간 내지 약 48시간 (가령, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 또는 약 24시간 내지 약 48시간) 시점에 수행될 수 있다.
- [0043] 유지 단계는 세포-결합 작용제로부터 안정하게 결합된 링커를 실질적으로 방출하지 않으면서 세포-결합 작용제로부터 불안정하게 결합된 링커를 방출하기 위해 적절한 온도 (가령, 약 0℃ 내지 약 37℃)에서 적절한 기간 (가령, 약 1시간 내지 약 1주, 약 1시간 내지 약 24시간, 약 1시간 내지 약 8시간, 또는 약 1시간 내지 약 4시간) 동안 용액을 유지하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 유지 단계는 약 20℃ 또는 그 이하 (가령, 약 0℃ 내지 약 18℃, 약 4℃ 내지 약 16℃), 실온 (가령, 약 20℃ 내지 약 30℃ 또는 약 20℃ 내지 약 25℃), 또는 상승된 온도 (가령, 약 30℃ 내지 약 37℃)에서 용액을 유지하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 유지 단계는 약 16℃ 내지 약 24℃ (가령, 약 15℃, 약 16℃, 약 17℃, 약 18℃, 약 19℃, 약 20℃, 약 21℃, 약 22℃, 약 23℃, 약 24℃, 또는 약 25℃)의 온도에서 용액을 유지하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 유지 단계는 약 2℃ 내지 약 8℃ (가령, 약 0℃, 약 1℃, 약 2℃, 약 3℃, 약 4℃, 약 5℃, 약 6℃, 약 7℃, 약 8℃, 약 9℃, 또는 약 10℃)의 온도에서 용액을 유지하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 유지 단계는 약 37℃ (가령, 약 34℃, 약 35℃, 약 36℃, 약 37℃, 약 38℃, 약 39℃, 또는 약 40℃)의 온도에서 용액을 유지하는 것을 포함한다.
- [0044] 유지 단계의 지속 기간은 유지 단계가 수행되는 온도와 pH에 좌우된다. 가령, 유지 단계의 지속 기간은 상승된 온도에서 유지 단계를 수행함으로써 실질적으로 감소될 수 있는데, 최대 온도는 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체의 안정성에 의해 제한된다. 유지 단계는 약 1시간 내지 약 1일 (가령, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 12시간, 약 14시간, 약 16시간, 약 18시간, 약 20시간, 약 22시간, 또는 약 24시간), 약 10시간 내지 약 24시간, 약 12시간 내지 약 24시간, 약 14시간 내지 약 24시간, 약 16시간 내지 약 24시간, 약 18시간 내지 약 24시간, 약 20시간 내지 약 24시간, 약 5시간 내지 약 1주, 약 20시간 내지 약 1주, 약 12시간 내지 약 1주 (가령, 약 12시간, 약 16시간, 약 20시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 또는 약 7일), 또는 약 1일 내지 약 1주 동안 용액을 유지하는 것을 포함할 수 있다.
- [0045] 한 구체예에서, 유지 단계는 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 적어도 약 12시간 내지 최대 1주의 기간 동안 용액

을 유지하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 유지 단계는 하룻밤 (가령, 약 12 내지 약 24시간, 바람직하게는 약 20시간) 동안 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 용액을 유지하는 것을 포함한다.

[0046] 유지 단계를 위한 pH 값은 바람직하게는, 약 4 내지 약 10이다. 한 구체예에서, 유지 단계를 위한 pH 값은 약 4 또는 그 이상, 하지만 약 6 이하 (가령, 4 내지 5.9), 또는 약 5 또는 그 이상, 하지만 약 6 이하 (가령, 5 내지 5.9)이다. 다른 구체예에서, 유지 단계를 위한 pH 값은 약 6 내지 약 10의 범위 (가령, 약 6.5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8)에서 변한다. 가령, 유지 단계를 위한 pH 값은 약 6, 약 6.5, 약 7, 약 7.5, 약 8, 약 8.5, 약 9, 약 9.5, 또는 약 10일 수 있다.

[0047] 특정한 구체예에서, 유지 단계는 25℃ 및 약 6-7.5의 pH에서 약 12시간 내지 약 1주 동안 혼합물을 배양하거나, 4℃ 및 약 4.5-5.9의 pH에서 약 5시간 내지 약 5일 동안 혼합물을 배양하거나, 또는 25℃ 및 약 4.5-5.9의 pH에서 약 5시간 내지 약 1일 동안 혼합물을 배양하는 것을 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명은 세포독성제에 화학적으로 커플링된 세포-결합 작용제를 포함하는 안정된 접합체의 조성물을 제조하기 위한 방법을 제시하고, 여기서 이들 조성물은 안정되지 않은 접합체가 실질적으로 없다. 이와 관련하여, 본 발명은 실질적으로 높은 순도와 안정성의 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체를 제조하기 위한 방법을 제시한다. 이런 조성물은 접합체의 높은 순도와 안정성으로 인하여 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 세포독성제, 예를 들면, 메이탄시노이드에 화학적으로 커플링된 세포-결합 작용제, 예를 들면, 항체를 포함하는 조성물은 예로써, U.S. 특허 7,374,762에서 설명되고, 이의 전체 교시는 본원에 전체로서 참고문헌으로 편입된다. 본 발명의 한 양상에서, 실질적으로 높은 순도의 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체는 하기 특질 중에서 하나 또는 그 이상을 갖는다: (a) 접합체 종류 중에서 약 90% 이상 (가령, 약 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 또는 그 이상), 바람직하게는 약 95% 이상이 단위체이고, (b) 접합체 제조물 내에 비-접합된 링커 수준이 약 10% 이하 (가령, 약 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0% 또는 그 이하) (전체 링커에 비하여)이고, (c) 접합체 종류 중에서 10% 이하 (가령, 약 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0% 또는 그 이하)가 가교되고, (d) 접합체 제조물 내에 유리 세포독성제 수준이 약 2% 이하 (가령, 약 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1.0%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 또는 0% 또는 그 이하) (전체 세포독성제에 비하여 mol/mol)이고, 및/또는 (e) 보관 시에 (가령, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 또는 약 5년 후) 유리 세포독성제의 수준에서 실질적인 증가 없음. 유리 세포독성제의 수준에서 "실질적인 증가"는 일정한 보관 기간 (가령, 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 1년, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 또는 약 5년) 후, 유리 세포독성제의 수준에서 증가가 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 약 1.0%, 약 1.1%, 약 1.2%, 약 1.3%, 약 1.4%, 약 1.5%, 약 1.6%, 약 1.7%, 약 1.8%, 약 1.9%, 약 2.0%, 약 2.2%, 약 2.5%, 약 2.7%, 약 3.0%, 약 3.2%, 약 3.5%, 약 3.7%, 또는 약 4.0% 이하라는 것을 의미한다.

[0049] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "비-접합된 링커"는 이작용성 가교 시약과 공유 연결되는 세포-결합 작용제를 지칭하고, 여기서 세포-결합 작용제는 이작용성 가교 시약의 링커를 통해 세포독성제에 공유 커플링되지 않는다 (즉, "비-접합된 링커"는 CBA-L로 표시될 수 있고, 여기서 CBA는 세포-결합 작용제를 나타내고, 그리고 L은 이작용성 가교 시약을 나타낸다. 대조적으로, 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체는 CBA-L-D로 표시될 수 있고, 여기서 D는 세포독성제를 나타낸다).

[0050] 한 구체예에서, 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체에서 세포독성제 대 세포-결합 작용제의 평균 몰 비율은 약 1 내지 약 10, 약 2 내지 약 7, 약 3 내지 약 5, 약 2.5 내지 약 4.5 (가령, 약 2.5, 약 2.6, 약 2.7, 약 2.8, 약 2.9, 약 3.0, 약 3.1, 약 3.3, 약 3.4, 약 3.5, 약 3.6, 약 3.7, 약 3.8, 약 3.9, 약 4.0, 약 4.1, 약 4.2, 약 4.3, 약 4.4, 약 4.5), 약 3.0 내지 약 4.0, 약 3.2 내지 약 4.2, 또는 약 4.5 내지 5.5 (가령, 약 4.5, 약 4.6, 약 4.7, 약 4.8, 약 4.9, 약 5.0, 약 5.1, 약 5.2, 약 5.3, 약 5.4, 또는 약 5.5)이다.

[0051] 본 발명은 세포독성제에 화학적으로 커플링된 세포-결합 작용제를 포함하는 안정된 접합체의 조성물을 제조하기 위한 더욱 효과적인 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 세포-결합 작용제와 세포독성제의 접합체를 제조하기 위한 전통적인 방법과 비교하여, 접합체를 위한 세포독성제 대 세포-결합 작용제의 동일한 평균 몰 비율을 달성하기 위해 더욱 적은 양의 세포독성제가 요구된다.

[0052] 세포-결합 작용제는 세포, 전형적으로 및 바람직하게는, 동물 세포 (가령, 인간 세포)에 결합하는 임의의 적절한 작용제일 수 있다. 세포-결합 작용제는 바람직하게는, 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 적절한 세포-결합 작용제에는 예로써, 항체 (가령, 단일클론 항체 및 이들의 단편), 인터페론 (가령, .알파., .베타., .감마.), 림포

카인 (가령, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6), 호르몬 (가령, 인슐린, TRH (갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬), MSH (멜라닌 세포 자극 호르몬), 스테로이드 호르몬, 예를 들면, 안드로겐과 에스트로겐), 성장 인자 및 집락-촉진 인자, 예를 들면, EGF, TGF-알파, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF와 GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984)), 영양소-수송 분자 (가령, 트랜스페린), 비타민 (가령, 엽산염), 그리고 세포의 표면 상에서 표적 분자에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 작용제 또는 분자가 포함된다.

[0053] 세포-결합 작용제가 항체인 경우에, 이것은 폴리펩티드 또는 글리코토프이고 막통과 분자 (가령, 수용체) 또는 리간드, 예를 들면, 성장 인자일지도 모르는 항원에 결합한다. 예시적인 항원에는 레닌; 인간 성장 호르몬과 소 성장 호르몬을 비롯한 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지질단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체 형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예를 들면, 인자 vmc, 인자 IX, 조직 인자 (TF), 그리고 폰빌레브란트 인자; 항-응고 인자, 예를 들면, 단백질 C; 심방 나트륨이뇨성 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예를 들면, 우로키나아제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 보메신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파와 -베타; 엔케팔리나아제; RANTES (활성화에서 조절되고 정상적으로 T-세포 발현되고 분비됨); 인간 대식세포 염증단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예를 들면, 인간 혈청 알부민; 필러관-저해 물질; 틸렉신 A-사슬; 틸렉신 B-사슬; 프로틸렉신; 생쥐 성선자극호르몬-연관된 펩티드; 미생물 단백질, 예를 들면, 베타-락타마아제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 연관된 항원 (CTLA), 예를 들면, CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류머티즘 인자; 신경영양 인자, 예를 들면, 뼈-유래된 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예를 들면, NGF-β; 혈소판-유래된 성장 인자 (PDGF); 섬유아세포 성장 인자, 예를 들면, aFGF와 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 전환 성장 인자 (TGF), 예를 들면, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, 또는 TGF-β5를 비롯한 TGF-알파와 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I과 -II (IGF-I과 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (너 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, EphA 수용체, EphB 수용체, 엽산염 수용체, FOLR1, 메소텔린, 크립토, 알파, 베타<sub>6</sub>, 인테그린, VEGF, VEGFR, EGFR, 트랜스페린 수용체, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; CD 단백질, 예를 들면, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 또는 본원에 전체로서 참고문헌으로 편입되는 U.S. 특허 출원 공개 번호 2008/0171040 또는 U.S. 특허 출원 공개 번호 2008/0305044에서 개시된 하나 또는 그 이상의 종양-연관된 항원 또는 세포-표면 수용체에 결합하는 항체; 에리트로포이에틴; 골유도성 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예를 들면, 인터페론-알파, -베타, 그리고 -감마; 집락 자극 인자 (CSFs), 예를 들면, M-CSF, GM-CSF, 그리고 G-CSF; 인터류킨 (ILs), 예를 들면, IL-1 내지 IL-10; 과산화물 디스무타아제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 분해 촉진 인자; 바이러스 항원, 예를 들면, HIV 외피의 일부분; 수송 단백질; 호밍 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예를 들면, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4와 VCAM; 종양 연관된 항원, 예를 들면, HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 엔도글린, c-Met, IGF1R, 전립선 항원, 예를 들면, PCA3, PSA, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, TMEFF2, 그리고 STEAP1; LGR5, B7H4, 그리고 앞서-열거된 폴리펩티드 중에서 한 가지의 단편과 같은 분자가 포함된다.

[0054] 부가적으로, 골수성 세포에 결합하는 GM-CSF가 급성 골수성 백혈병으로부터 병든 세포에 세포-결합 작용제로서 이용될 수 있다. 활성화된 T-세포에 결합하는 IL-2는 이식편 거부반응의 예방, 이식편-대-숙주 질환의 치료와 예방, 그리고 급성 T-세포 백혈병의 치료에 이용될 수 있다. 멜라닌세포에 결합하는 MSH는 흑색종을 지향하는 항체가 그러한 것처럼, 흑색종의 치료에 이용될 수 있다. 엽산은 난소 및 기타 종양에서 발현된 엽산염 수용체를 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 표피 성장 인자는 폐 및 두경부와 같은 편평상피암을 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 소마토스타틴은 신경모세포종 및 기타 종양 유형을 표적으로 하는데 이용될 수 있다.

[0055] 유방과 고환의 암은 세포-결합 작용제로서 각각, 에스트로겐 (또는 에스트로겐 유사체) 또는 안드로겐 (또는 안드로겐 유사체)로 성공적으로 치료될 수 있다.

[0056] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "항체"는 임의의 면역글로불린, 임의의 면역글로불린 단편, 예를 들면, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, dsFv, sFv, 미니바디, 디아바디, 트리바디, 테트라바디 (Parham, *J. Immunol.* 131: 2895-2902 (1983); Spring et al. *J. Immunol.* 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230-244 (1960), Kim et al., *Mol. Cancer Ther.*, 7: 2486-2497 (2008), Carter, *Nature Revs.*, 6: 343-357

(2006)), 또는 세포의 표면 상에서 항원에 결합할 수 있는 (가령, 상보성 결정 영역 (CDR)을 내포하는) 면역글로불린 키메라를 지칭한다. 임의의 적절한 항체가 세포-결합 작용체로서 이용될 수 있다. 당업자는 적절한 항체의 선별이 표적화되는 세포 집단에 좌우된다는 것을 인지할 것이다. 이와 관련하여, 특정 세포 집단 (전형적으로 및 바람직하게는, 병든 세포 집단)에서 선별적으로 발현되는 세포 표면 분자 (즉, 항원)의 유형과 숫자는 본 발명의 조성물에서 이용을 위한 적절한 항체의 선별을 지배할 것이다. 세포 표면 발현 프로파일은 중앙 세포 유형을 비롯한 매우 다양한 세포 유형에 대해 알려져 있거나, 또는 알려져 있지 않으면, 일과적인 분자생물학과 조직화학 기술을 이용하여 결정될 수 있다.

[0057]

항체는 다중클론 또는 단일클론일 수 있지만, 가장 바람직하게는 단일클론 항체이다. 본원에서 이용된 바와 같이, "다중클론" 항체는 면역화된 동물의 혈청 내에 전형적으로 포함되는, 항체 분자의 이질성 집단을 지칭한다. "단일클론" 항체는 특정 항원에 특이적인 항체 분자의 동질성 집단을 지칭한다. 단일클론 항체는 전형적으로, B 림프구 ("B 세포")의 단일 클론에 의해 생산된다. 단일클론 항체는 표준 하이브리도마 기술 (예로써, Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), 그리고 C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)를 참조한다)을 비롯하여, 당업자에게 공지된 다양한 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 간단히 말하면, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 방법은 전형적으로, 임의의 적절한 동물, 전형적으로 및 바람직하게는 생쥐에 항원 (즉, "면역원")을 주입하는 것을 수반한다. 상기 동물은 차후 희생되고, 그리고 이의 비장으로부터 분리된 B 세포는 인간 골수종 세포와 융합된다. 하이브리드 세포 (즉, "하이브리도마")가 생산되고, 이것은 무한히 증식하고, 그리고 원하는 특이성을 갖는 높은 역가의 항체를 시험관내에서 연속적으로 분비한다. 당분야에 공지된 임의의 적절한 방법이 원하는 특이성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인하는데 이용될 수 있다. 이런 방법에는 예로써, 효소-연결 면역흡착 측정법 (ELISA), 웨스턴 블롯 분석, 그리고 방사면역측정법이 포함된다. 하이브리도마의 집단은 개별 클론을 분리하기 위해 스크리닝되고, 이들 각각은 항원에 대한 단일 항체 종류를 분비한다. 각 하이브리도마가 단일 B 세포와의 융합으로부터 유래된 클론이기 때문에, 이것이 생산하는 모든 항체 분자는 그들의 항원 결합 부위와 이소타입을 비롯하여, 구조에서 동일하다. 단일클론 항체는 또한, EBV-하이브리도마 기술 (예로써, Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984), 그리고 Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121: 140-67 (1986)을 참조한다), 박테리오파지 벡터 발현 시스템 (예로써, Huse et al., *Science*, 246: 1275-81 (1989)을 참조한다), 또는 항체 단편, 예를 들면, Fab와 scFv (단일 사슬 가변 영역)를 포함하는 파지 전사 라이브러리 (예로써, U.S. 특허 5,885,793과 5,969,108, 그리고 국제 특허 출원 공개 WO 92/01047과 WO 99/06587을 참조한다)을 비롯한 다른 적절한 기술을 이용하여 산출될 수도 있다.

[0058]

단일클론 항체는 임의의 적절한 동물에서 분리되거나 생산될 수 있지만, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 생쥐 또는 인간, 그리고 가장 바람직하게는 인간에서 생산된다. 생쥐에서 항체를 생산하기 위한 방법은 당업자에게 널리 알려져 있고 본원에서 설명된다. 인간 항체에 대하여, 당업자는 다중클론 항체가 적절한 항원으로 예방접종된 또는 면역화된 인간 개체의 혈청으로부터 분리될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 대안으로, 인간 항체는 생쥐와 같은 비-인간 동물에서 인간 항체를 생산하기 위한 공지된 기술을 개조함으로써 산출될 수 있다 (예로써, U.S. 특허 5,545,806, 5,569,825와 5,714,352, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 번호 2002/0197266 A1을 참조한다).

[0059]

인간 항체, 특히 인간 단일클론 항체는 인간에서 치료적 적용을 위한 이상적인 선택이긴 하지만, 전형적으로 생쥐 단일클론 항체보다 산출하기가 더욱 어렵다. 생쥐 단일클론 항체는 하지만, 인간에 투여될 때 급속한 숙주 항체 반응을 유도하고, 이것은 항체-세포독성제 접합체의 치료적 또는 진단적 잠재력을 감소시킬 수 있다. 이들 곤란한 상황을 피하기 위하여, 단일클론 항체는 바람직하게는, 인간 면역계에 의해 "이물"로서 인식되지 않는다.

[0060]

이를 위하여, 파지 전사가 항체를 산출하는데 이용될 수 있다. 이와 관련하여, 항체의 항원-결합 가변 (V) 도메인을 인코딩하는 파지 라이브러리가 표준 분자생물학 및 재조합 DNA 기술을 이용하여 산출될 수 있다 (예로써, Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)를 참조한다). 원하는 특이성을 갖는 가변 영역을 인코딩하는 파지는 원하는 항원에 대한 특이적 결합에 대해 선별되고, 그리고 선별된 가변 도메인을 포함하는 완전한 인간 항체는 재구성된다. 재구성된 항체를 인코딩하는 핵산 서열은 단일클론 항체의 특징을 갖는 인간 항체가 세포에 의해 분비되도록, 하이브리도마 생산에 이용되는 적절한 세포주, 예를 들면, 골수종 세포 내로 도입된다 (예로써, Janeway

et al., *supra*, Huse et al., *supra*, 그리고 U.S. 특허 6,265,150을 참조한다). 대안으로, 단일클론 항체는 특정한 인간 중쇄와 경쇄 면역글로불린 유전자에 대한 도입 유전자를 갖는 생쥐로부터 산출될 수 있다. 이런 방법은 당분야에 알려져 있고 예로써, U.S. 특허 5,545,806과 5,569,825, 그리고 Janeway et al., *supra*에서 설명된다.

[0061] 가장 바람직하게는, 항체는 인간화 항체이다. 본원에서 이용된 바와 같이, "인간화" 항체는 항체의 항원 결합 루프를 형성하는, 생쥐 단일클론 항체의 상보성 결정 영역 (CDR)이 인간 항체 분자의 프레임워크 위에 이식되는 항체이다. 생쥐와 인간 항체의 프레임워크의 유사성으로 인하여, 이러한 접근법은 인간 항체에 항원적으로 동일하지만, CDR 서열이 유래된 생쥐 단일클론 항체와 동일한 항원에 결합하는 단일클론 항체를 생산하는 것으로 당분야에서 일반적으로 인정된다. 인간화 항체를 산출하기 위한 방법은 당분야에 널리 알려져 있고 예로써, Janeway et al., *supra*, U.S. 특허 5,225,539, 5,585,089와 5,693,761, European 특허 번호 0239400 B1, 그리고 United Kingdom 특허 번호 2188638에서 상세하게 설명된다. 인간화 항체는 또한, U.S. 특허 5,639,641 및 Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235: 959-973 (1994)에서 설명된 항체 재포장 기술을 이용하여 산출될 수 있다. 본 발명의 조성물의 접합체에 이용되는 항체는 가장 바람직하게는, 인간화 단일클론 항체이지만, 전술한 바와 같은 인간 단일클론 항체 및 생쥐 단일클론 항체 역시 본 발명의 범위 내에 있다.

[0062] 적어도 하나의 항원 결합 부위를 갖고, 따라서 표적 세포의 표면 상에 존재하는 적어도 하나의 항원 또는 수용체를 인식하고 여기에 결합하는 항체 단편 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 이와 관련하여, 온전한 항체 분자의 단백질 분해 개열은 항원을 인식하고 이들에 결합하는 능력을 유지하는 다양한 항체 단편을 생산할 수 있다. 가령, 프로테아제 파괴인으로 항체 분자의 제한된 절단은 전형적으로, 3개의 단편을 생산하고, 이들 중에서 2개는 동일하고 Fab 단편으로서 지칭되는데, 그 이유는 이들이 부모 항체 분자의 항원 결합 활성을 유지하기 때문이다. 효소 펩신으로 항체 분자의 개열은 정상적으로, 2개의 항체 단편을 생산하고, 이들 중에서 1개는 항체 분자의 양쪽 항원-결합 팔을 유지하고, 따라서 F(ab')<sub>2</sub> 단편으로서 지칭된다. 디티오프레이톨 또는 메르캅토에틸아민으로 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 환원은 Fab' 단편으로서 지칭되는 단편을 생산한다. 합성 펩티드를 거쳐 항체 경쇄의 V 도메인에 연결된 항체 중쇄의 가변 (V) 도메인을 포함하는 절두된 Fab 단편으로 구성되는 단일-사슬 가변 영역 단편 (sFv) 항체 단편은 일과적인 재조합 DNA 기술 기술을 이용하여 산출될 수 있다 (예로써, Janeway et al., *supra*를 참조한다). 유사하게, 이황화-안정화된 가변 영역 단편 (dsFv)은 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다 (예로써, Reiter et al., *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)를 참조한다). 하지만, 본 발명의 배경에서 항체 단편은 항체 단편의 이들 예시적인 유형으로 한정되지 않는다. 원하는 세포 표면 수용체 또는 항원을 인식하고 여기에 결합하는 임의의 적절한 항체 단편이 이용될 수 있다. 항체 단편은 예로써, Parham, *J. Immunol.*, 131: 2895-2902 (1983), Spring et al., *J. Immunol.*, 113: 470-478 (1974), 그리고 Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960)에서 더욱 설명된다. 항체-항원 결합은 당분야에 공지된 임의의 적절한 방법, 예를 들면, 방사면역측정법 (RIA), ELISA, 웨스턴 블롯, 면역침전, 그리고 경쟁 저해 측정법을 이용하여 분석평가될 수 있다 (예로써, Janeway et al., *supra*, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 번호 2002/0197266 A1을 참조한다).

[0063] 이에 더하여, 항체는 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. "키메라"는 항체가 적어도 2개의 상이한 종류로부터 수득되거나 유래된 적어도 2개의 면역글로불린 (가령, 2개의 상이한 면역글로불린, 예를 들면, 무린 면역글로불린 가변 영역과 합동된 인간 면역글로불린 불변 영역), 또는 이들의 단편을 포함한다는 것을 의미한다. 항체는 또한, 도메인 항체 (dAb) 또는 이의 항원 결합 단편, 예를 들면, 낙타 항체 (예로써, Desmyter et al., *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)를 참조한다), 또는 상어 항체, 예를 들면, 새로운 항원 수용체 (IgNAR) (예로써, Greenberg et al., *Nature*, 374: 168 (1995), 그리고 Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)을 참조한다)일 수 있다.

[0064] 임의의 적절한 항체가 본 발명의 배경에서 이용될 수 있다. 가령, 단일클론 항체 J5는 공통 급성 림프아구성 백혈병 항원에 특이적이고 (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), 그리고 CALLA를 발현하는 세포 (가령, 급성 림프아구성 백혈병 세포)를 표적으로 하는데 이용될 수 있는 무린 IgG2a 항체이다. 단일클론 항체 MY9는 CD33 항원에 특이적으로 결합하고 (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), 그리고 CD33을 발현하는 세포 (가령, 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포)를 표적으로 하는데 이용될 수 있는 무린 IgG1 항체이다.

[0065] 유사하게, 단일클론 항체 항-B4 (일명, B4)는 B 세포 상에서 CD19 항원에 결합하고 (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), 그리고 CD19를 발현하는 B 세포 또는 병든 세포 (가령, 비-호지킨 림프종 세포 및 만성 림프아구성 백혈병 세포)를 표적으로 하는데 이용될 수 있는 무린 IgG1 항체이다. N901은 소세포 폐

종양을 비롯한 신경내분비 원점의 세포 상에서 발견되는 CD56 (신경 세포 유착 분자) 항원에 결합하는 뮤린 단일클론 항체이고, 이것은 신경내분비 원점의 세포에 약물을 표적화하기 위해 접합체에 이용될 수 있다. J5, MY9, 그리고 B4 항체는 바람직하게는, 접합체의 일부로서 그들의 이용에 앞서 재포장되거나 인간화된다. 항체의 재포장 또는 인간화는 예로써, Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-73 (1994)에서 설명된다.

[0066] 이에 더하여, 단일클론 항체 C242는 CanAg 항원에 결합하고 (예로써, U.S. 특허 5,552,293을 참조한다), 그리고 CanAg 발현 종양, 예를 들면, 결장직장, 췌장, 비-소세포 폐, 그리고 위 암에 접합체를 표적화하는데 이용될 수 있다. HuC242는 단일클론 항체 C242의 인간화 형태이다 (예로써, U.S. 특허 5,552,293을 참조한다). HuC242가 생산되는 하이브리도마는 ECACC 식별 번호 90012601로 기탁된다. HuC242는 CDR-이식 방법 (예로써, U.S. 특허 5,585,089, 5,693,761, 그리고 5,693,762를 참조한다) 또는 재포장 기술 (예로써, U.S. 특허 5,639,641을 참조한다)을 이용하여 제조될 수 있다. HuC242는 CanAg 항원을 발현하는 종양 세포, 예를 들면, 결장직장, 췌장, 비-소세포 폐, 그리고 위 암 세포에 접합체를 표적화하는데 이용될 수 있다.

[0067] 난소 암과 전립선 암 세포를 표적으로 하기 위하여, 항-MUC1 항체가 접합체에서 세포-결합 작용제로서 이용될 수 있다. 항-MUC1 항체에는 예로써, 항-HMFG-2 (예로써, Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)을 참조한다), hCTM01 (예로써, van Hof et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)를 참조한다), 그리고 DS6이 포함된다. 전립선 암 세포는 또한, 항-전립선-특이적 막 항원 (PSMA)을 세포-결합 작용제로서 이용한 접합체, 예를 들면, J591로 표적화될 수 있다 (예로써, Liu et al., *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)를 참조한다). 게다가, Her2 항원을 발현하는 암 세포, 예를 들면, 유방, 전립선, 그리고 난소 암은 항-Her2 항체, 예를 들면, 트라스투주맵을 세포-결합 작용제로서 이용한 접합체로 표적화될 수 있다. 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 및 이의 변이체, 예를 들면, 타입 III 결실 돌연변이, EGFRvIII을 발현하는 세포는 항-EGFR 항체를 이용한 접합체로 표적화될 수 있다. 항-EGFR 항체는 국제 특허 출원 번호 PCT/US11/058385 및 PCT/US11/058378에서 설명된다. 항-EGFRvIII 항체는 U.S. 특허 7,736,644와 7,628,986, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790과 2009/0155282에서 설명된다. 인슐린-유사 성장 인자 수용체에 결합하는 항-IGF-IR 항체, 예를 들면, U.S. 특허 7,982,024에서 설명된 것들 역시 접합체에 이용될 수 있다. CD27L, 크립토, CD138, CD38, EphA2, 인테그린, CD37, 엽산염, CD20, PSGR, NGEP, PSCA, TMEFF2, STEAP1, 엔도글린, 그리고 Her3에 결합하는 항체 역시 접합체에 이용될 수 있다.

[0068] 한 구체예에서, 항체는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 항-HER2 항체 (가령, 트라스투주맵), 비바투주맵, 시브로투주맵, 리톡시맵, huDS6, 국제 특허 출원 공개 WO 2010/124797에서 설명된 항-메소텔린 항체 (가령, MF-T), U.S. 특허 출원 공개 2010/0093980에서 설명된 항-크립토 항체 (가령, huB3F6), U.S. 특허 출원 공개 2007/0183971에서 설명된 항-CD138 항체 (가령, huB-B4), 국제 특허 출원 번호 PCT/US11/058385와 PCT/US11/058378에서 설명된 항-EGFR 항체 (가령, EGFR-7), U.S. 특허 7,736,644와 7,628,986, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790과 2009/0155282에서 설명된 항-EGFRvIII 항체, 국제 특허 출원 공개 WO 2011/039721과 WO 2011/039724에서 기술된 인간화 EphA2 항체 (가령, 2H11R35R74); 국제 특허 출원 공개 WO 2008/047242에서 설명된 항-CD38 항체 (가령, hu38SB19), 국제 특허 출원 공개 WO 2011/106528에서 설명된 항-엽산염 항체, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 2012/0009181에서 설명된 항-엽산염 항체 (가령, huMov19); U.S. 특허 5,958,872, 6,596,743과 7,982,024에서 설명된 항-IGF1R 항체; U.S. 특허 출원 공개 2011/0256153에서 설명된 항-CD37 항체 (가령, huCD37-3); U.S. 특허 출원 공개 2006/0127407에서 설명된 항-인테그린  $\alpha_v\beta_6$  항체 (가령, CNT095); 그리고 국제 특허 출원 공개 WO 2012/019024에서 설명된 항-Her3 항체로 구성된 군에서 선택된다.

[0069] 특허 바람직한 항체는 본원에서 기술된 인간화 단일클론 항체이다. 실례에는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 인간화 단일클론 항-Her2 항체 (가령, 트라스투주맵), 비바투주맵, 시브로투주맵, CNT095, huDS6, 그리고 리톡시맵이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다 (예로써, U.S. 특허 5,639,641과 5,665,357, U.S. 특허가출원 번호 60/424,332 (이것은 U.S. 특허 7,557,189에 관련된다), 국제 (PCT) 특허 출원 공개 번호 WO 02/16401, Pedersen et al., *supra*, Roguska et al., *supra*, Liu et al., *supra*, Nadler et al., *supra*, Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cancer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), 그리고 Maloney et al., *Blood*, 90: 2188-2195 (1997)를 참조한다). 기타 인간화 단일클론 항체는 당분야에 알려져 있고 본 발명과 관련하여 이용될 수 있다.

[0070] 한 구체예에서, 세포-결합 작용제는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화 항-엽산염 항체 또는

이의 항원 결합 단편이고, 여기서 상기 항체는 하기를 포함한다: (a) GYFMN(SEQ ID NO: 1)을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDIFYNQXaa<sub>1</sub>FXaa<sub>2</sub>Xaa<sub>3</sub>(SEQ ID NO: 2)을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 YDGSRAMDY(SEQ ID NO: 3)를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO: 4)를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA(SEQ ID NO: 5)를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSREYPYT(SEQ ID NO: 6)를 포함하는 경쇄 CDR3; 여기서 Xaa<sub>1</sub>은 K, Q, H, 그리고 R에서 선택되고; Xaa<sub>2</sub>는 Q, H, N, 그리고 R에서 선택되고; 그리고 Xaa<sub>3</sub>은 G, E, T, S, A, 그리고 V에서 선택된다. 바람직하게는, 중쇄 CDR2 서열은 RIHPYDGDIFYNQKFQG(SEQ ID NO: 7)를 포함한다.

[0072] 다른 구체예에서, 항-엽산염 항체는 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDIFYNQKFQKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVKDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 8)의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0073] 다른 구체예에서, 항-엽산염 항체는 2010년 4월 7일자에 ATCC에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 PTA-10772 및 PTA-10773 또는 10774를 갖는 플라스미드 DNA에 의해 인코딩된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0074] 다른 구체예에서, 항-엽산염 항체는 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDIFYNQKFQKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQGTITVTVSS(SEQ ID NO: 9)에 약 적어도 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 도메인, 그리고 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNI SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO: 10); 또는 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO: 11)에 적어도 약 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0075] 세포-결합 작용제는 바람직하게는, 항체이지만, 세포-결합 작용제는 또한, 비-항체 분자일 수 있다. 적절한 비-항체 분자에는 예로써, 인터페론 (가령, 알파, 베타, 또는 감마 인터페론), 림포카인 (가령, 인터류킨 2 (IL-2), IL-3, IL-4, 또는 IL-6), 호르몬 (가령, 인슐린), 성장 인자 (가령, EGF, TGF-알파, FGF, 그리고 VEGF), 집락-촉진 인자 (가령, G-CSF, M-CSF, 그리고 GM-CSF (예로써, Burgess, *Immunology Today*, 5: 155-158 (1984)을 참조한다), 소마토스타틴, 그리고 트랜스페린 (예로써, O'Keefe et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 932-937 (1985)을 참조한다)이 포함된다. 가령, 골수성 세포에 결합하는 GM-CSF는 급성 골수성 백혈병 세포를 표적으로 하기 위해 세포-결합 작용제로서 이용될 수 있다. 이에 더하여, 활성화된 T-세포에 결합하는 IL-2는 이식편 거부반응의 예방, 이식편-대-숙주 질환의 치료와 예방, 그리고 급성 T-세포 백혈병의 치료에 이용될 수 있다. 표피 성장 인자 (EGF)는 편평상피암, 예를 들면, 폐 암 및 두경부 암을 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 소마토스타틴은 신경모세포종 세포 및 기타 종양 세포 유형을 표적으로 하는데 이용될 수 있다.

[0076] 접합체는 임의의 적절한 세포독성제를 포함할 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, "세포독성제"는 세포의 사멸을 유발하거나, 세포 사멸을 유도하거나, 또는 세포 생존능을 감소시키는 임의의 화합물을 지칭한다. 적절한 세포독성제에는 예로써, 메이탄시노이드 및 접합가능 안사미토신 (예로써, 2011년 11월 3일자 제출된 국제 특허 출원 번호 PCT/US11/59131을 참조한다), 탁소이드, CC-1065와 CC-1065 유사체, 그리고 돌라스타틴과 돌라스타틴 유사체가 포함된다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 세포독성제는 메이탄시놀과 메이탄시놀 유사체를 비롯한 메이탄시노이드이다. 메이탄시노이드는 미세소관 형성을 저해하고 포유동물 세포에 매우 유독한 화합물이다. 적절한 메이탄시놀 유사체의 실례에는 변형된 방향족 고리를 갖는 것들 및 다른 위치에서 변형을 갖는 것들이 포함된다. 이런 메이탄시노이드는 예로써, U.S. 특허 4,256,746, 4,294,757, 4,307,016, 4,313,946, 4,315,929, 4,322,348, 4,331,598, 4,361,650, 4,362,663, 4,364,866, 4,424,219, 4,371,533, 4,450,254, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 그리고 6,333,410에서 설명된다.

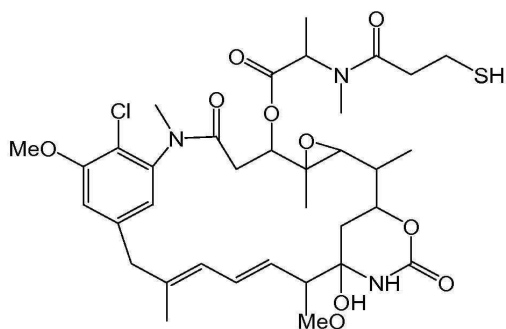
[0077] 변형된 방향족 고리를 갖는 메이탄시놀 유사체의 실례에는 (1) C19-테클로로 (U.S. 특허 4,256,746) (안사미토신 P2의 LAH 환원에 의해 제조됨), (2) C-20-히드록시 (또는 C-20-테메틸) +/-C-19-테클로로 (U.S. 특허 4,361,650과 4,307,016) (스트렙토미세스 (*Streptomyces*) 또는 악티노미세스 (*Actinomyces*)를 이용한

탈메틸화, 또는 LAH를 이용한 탈염소에 의해 제조됨), 그리고 (3) C-20-테메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/- 데클로로 (U.S. 특허 4,294,757) (아실 염화물을 이용한 아실화에 의해 제조됨)가 포함된다.

[0078] 방향족 고리 이외의 위치에서 변형을 갖는 메이탄시놀 유사체의 실례에는 (1) C-9-SH (U.S. 특허 4,424,219) (메이탄시놀과 H<sub>2</sub>S 또는 P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>의 반응에 의해 제조됨), (2) C-14-알콕시메틸 (테메톡시/CH<sub>2</sub>OR) (U.S. 특허 4,331,598), (3) C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH<sub>2</sub>OH 또는 CH<sub>2</sub>OAc) (U.S. 특허 4,450,254) (노카트리아 (*Nocardia*)로부터 제조됨), (4) C-15-히드록시/아실옥시 (U.S. 특허 4,364,866) (스트렙토미세스 (*Streptomyces*)에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조됨), (5) C-15-메톡시 (U.S. 특허 4,313,946과 4,315,929) (트레위아 누디플로라 (*Trewia nudiflora*)로부터 분리됨), (6) C-18-N-테메틸 (U.S. 특허 4,362,663과 4,322,348) (스트렙토미세스 (*Streptomyces*)에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조됨), 그리고 (7) 4,5-데옥시 (U.S. 특허 4,371,533) (메이탄시놀의 티타늄 삼염산염/LAH 환원에 의해 제조됨)가 포함된다.

[0079] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 접합체는 N<sup>2'</sup>-데아세틸-N<sup>2'</sup>-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신으로 알려져 있는 티올-내포 메이탄시노이드 DM1을 세포독성제로서 이용한다. DM1의 구조는 화학식 (I)로 표시된다:

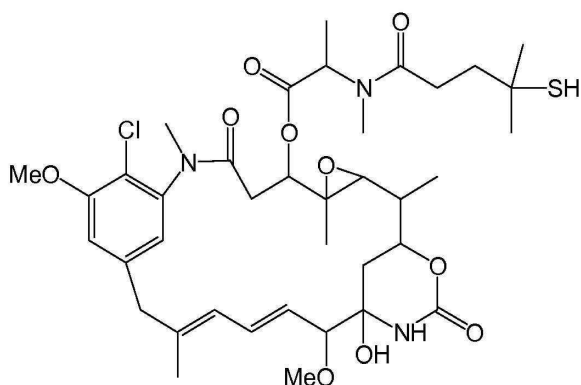
[0080] [화학식 I]



[0081]

[0083] 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 접합체는 N<sup>2'</sup>-데아세틸-N<sup>2'</sup>-(4-메틸-4-메르캅토-1-옥소펜틸)-메이탄신으로 알려져 있는 티올-내포 메이탄시노이드 DM4를 세포독성제로서 이용한다. DM4의 구조는 화학식 (II)로 표시된다:

[0084] [화학식 II]



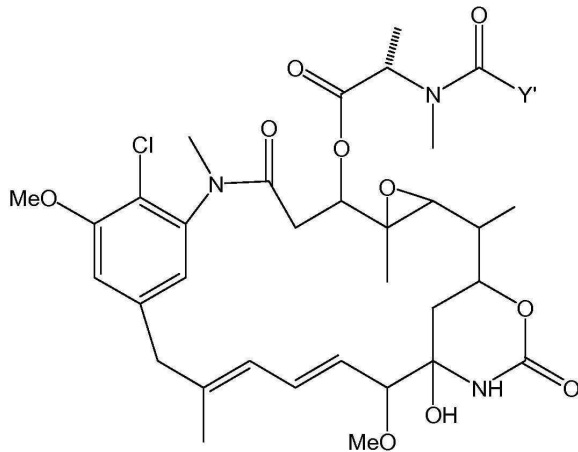
[0085]

[0087] 예로써, 황 원자를 보유하는 탄소 원자 상에서 모노 또는 디-알킬 치환을 보유하는 티올과 이황화-내포 메이탄시노이드를 비롯한 다른 메이탄시노이드가 본 발명의 배경에서 이용될 수도 있다. C-3 위치에서 (a) C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 테스메틸 기능성, 그리고 (b) 방해된 설퍼드릴 기를 보유하는 아실 기로 아실화된 아미노산 측쇄를 갖는 메이탄시노이드가 특히 바람직한데, 여기서 티올 기능성을 보유하는 아실 기의

탄소 원자는 1개 또는 2개의 치환기를 갖고, 상기 치환기는  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , 1개 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 가지형 알킬 또는 알케닐, 3개 내지 10개 탄소 원자를 갖는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 게다가, 이들 치환기 중에서 1개는 H일 수 있고, 그리고 아실 기는 카르보닐 기능성 및 황 원자 사이에 적어도 3개 탄소 원자의 선형 사슬 길이를 갖는다.

[0088] 본 발명의 배경에서 이용을 위한 추가의 메이탄시노이드에는 화학식 (III)으로 표시되는 화합물이 포함된다:

[0090] [화학식 III]



[0091]

[0093] 여기서 Y'는

[0094]  $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p(\text{C}\equiv\text{C})_q\text{A}_o(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$ 이고,

[0095] 여기서  $\text{R}_1$ 과  $\text{R}_2$ 는 각각 독립적으로  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서  $\text{R}_2$ 는 또한, H일 수 있고,

[0096] 여기서 A, B, D는 3-10개 탄소 원자를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순한 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로환상 방향족, 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고,

[0097] 여기서  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$ ,  $\text{R}_7$ ,  $\text{R}_8$ ,  $\text{R}_9$ ,  $\text{R}_{10}$ ,  $\text{R}_{11}$ , 그리고  $\text{R}_{12}$ 는 각각 독립적으로 H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족, 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고,

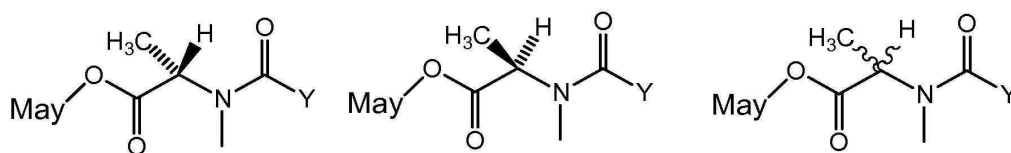
[0098] 여기서 l, m, n, o, p, q, r, s, 그리고 t는 각각 독립적으로 0 또는 1 내지 5의 정수이고, 단서로써 l, m, n, o, p, q, r, s, 그리고 t 중에서 적어도 2개는 임의의 한때에 0이 아니고, 그리고

[0099] 여기서 Z는 H, SR 또는 COR이고, 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤테로환상 방향족, 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이다.

[0100] 화학식 (III)의 바람직한 구체예에는 (a)  $\text{R}_1$ 이 H이고,  $\text{R}_2$ 가 메틸이고, 그리고 Z가 H이고, (b)  $\text{R}_1$ 과  $\text{R}_2$ 가 메틸이고, 그리고 Z가 H이고, (c)  $\text{R}_1$ 이 H이고,  $\text{R}_2$ 가 메틸이고, 그리고 Z가  $-\text{SCH}_3$ 이고, 그리고 (d)  $\text{R}_1$ 과  $\text{R}_2$ 가 메틸이고, 그리고 Z가  $-\text{SCH}_3$ 인 화학식 (III)의 화합물이 포함된다.

[0101] 이런 추가의 메이탄시노이드에는 또한, 화학식 (IV-L), (IV-D), 또는 (IV-D,L)로 표시되는 화합물이 포함된다:

[0102] [화학식 IV-L] [화학식 IV-D] [화학식 IV-D,L]



[0103]

[0104]

[0105] 여기서 Y는  $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ 이고,

[0106] 여기서  $R_1$ 과  $R_2$ 는 각각 독립적으로  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서  $R_2$ 는 또한, H일 수 있고,

[0107] 여기서  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , 그리고  $R_8$ 는 각각 독립적으로 H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고,

[0108] 여기서 1, m, 그리고 n은 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고, 그리고 추가하여, n은 0일 수 있고,

[0109] 여기서 Z는 H, SR, 또는 COR이고, 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 가지형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고

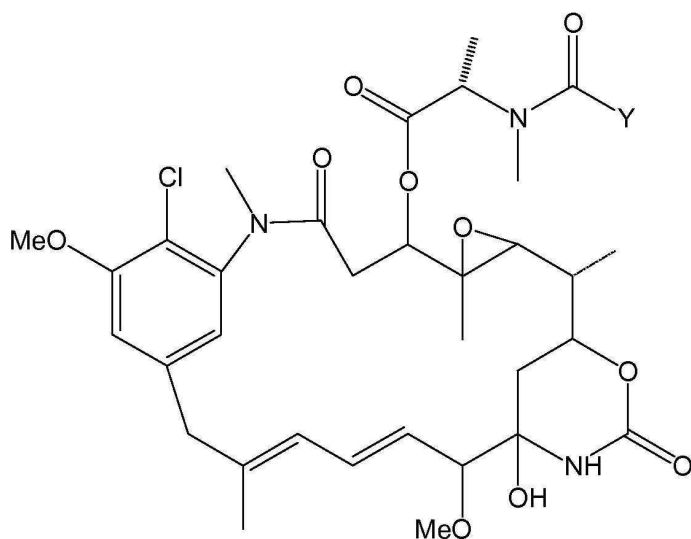
[0110] May는 C-3, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 메스메틸에서 측쇄를 보유하는 메이탄시노이드이다.

[0111] 화학식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 바람직한 구체예에는 (a)  $R_1$ 이 H이고,  $R_2$ 가 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , 그리고  $R_8$ 이 각각 H이고, 1과 m이 각각 1이고, n이 0이고, 그리고 Z가 H이고, (b)  $R_1$ 과  $R_2$ 가 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 이 각각 H이고, 1과 m이 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 H이고, (c)  $R_1$ 은 H이고,  $R_2$ 가 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , 그리고  $R_8$ 이 각각 H이고, 1과 m이 각각 1이고, n이 0이고, 그리고 Z가  $-SCH_3$ 이고, 또는 (d)  $R_1$ 과  $R_2$ 가 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 이 각각 H이고, 1과 m이 1이고, n이 0이고, 그리고 Z가  $-SCH_3$ 인 화학식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 화합물이 포함된다.

[0112] 바람직하게는, 세포독성제는 화학식 (IV-L)로 표시된다.

[0113] 추가의 바람직한 메이탄시노이드에는 또한, 화학식 (V)로 표시되는 화합물이 포함된다:

[0114] [화학식 V]



[0115]

[0117] 여기서 Y는  $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ 이고,

[0118] 여기서  $R_1$ 과  $R_2$ 는 각각 독립적으로  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서  $R_2$ 는 또한, H일 수 있고,

[0119] 여기서  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , 그리고  $R_8$ 는 각각 독립적으로 H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고,

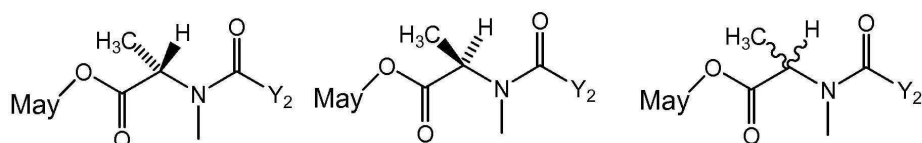
[0120] 여기서 1, m, 그리고 n은 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고, 그리고 추가하여, n은 0일 수 있고, 그리고

[0121] 여기서 Z는 H, SR 또는 COR이고, 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이다.

[0122] 화학식 (V)의 바람직한 구체예에는 (a)  $R_1$ 이 H이고,  $R_2$ 가 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , 그리고  $R_8$ 이 각각 H이고; 1과 m이 각각 1이고; n이 0이고; 그리고 Z가 H이고, (b)  $R_1$ 과  $R_2$ 가 메틸이고;  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 이 각각 H이고, 1과 m이 1이고; n이 0이고; 그리고 Z가 H이고, (c)  $R_1$ 이 H이고,  $R_2$ 가 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , 그리고  $R_8$ 이 각각 H이고, 1과 m이 각각 1이고, n이 0이고, 그리고 Z가  $-SCH_3$ 이고, 또는 (d)  $R_1$ 과  $R_2$ 가 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 이 각각 H이고, 1과 m이 1이고, n이 0이고, 그리고 Z가  $-SCH_3$ 인 화학식 (V)의 화합물이 포함된다.

[0123] 또 다른 바람직한 메탄시노이드에는 화학식 (VI-L), (VI-D), 또는 (VI-D,L)로 표시되는 화합물이 포함된다:

[0124] [화학식 VI-L] [화학식 VI-D] [화학식 VI-D, L]



[0125]

[0127] 여기서  $Y_2$ 는  $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$ 이고,

[0128] 여기서  $R_1$ 과  $R_2$ 는 각각 독립적으로  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서  $R_2$ 는 또한, H일 수 있고,

[0129] 여기서  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ , 그리고  $R_8$ 은 각각 독립적으로 H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 환상 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고,

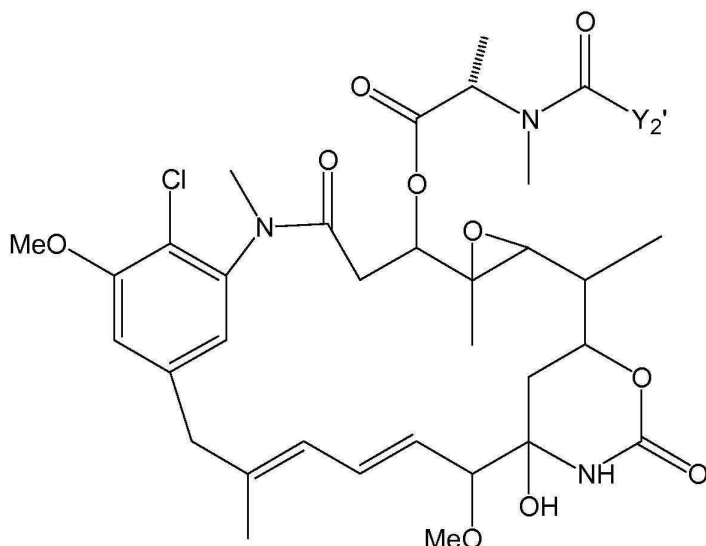
[0130] 여기서 1, m, 그리고 n은 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고, 그리고 추가하여, n은 0일 수 있고,

[0131] 여기서  $Z_2$ 는 SR 또는 COR이고, 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고

[0132] 여기서 May는 메이탄시노이드의 거대환상 고리 구조이다.

[0133] 추가의 바람직한 메이탄시노이드에는 화학식 (VII)로 표시되는 화합물이 포함된다:

[0134] [화학식 VII]



[0135]

[0137] 여기서  $Y_{2'}$ 는

[0138]  $(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_{qA_0}(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$ 이고,

[0139] 여기서  $R_1$ 과  $R_2$ 는 각각 독립적으로  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 가지형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 추가하여,  $R_2$ 는 H일 수 있고,

[0140] 여기서 A, B, 그리고 D는 각각 독립적으로 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순한 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고,

[0141] 여기서  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ , 그리고  $R_{12}$ 는 각각 독립적으로 H,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ , 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고,

[0142] 여기서 1, m, n, o, p, q, r, s, 그리고 t는 각각 독립적으로 0 또는 1 내지 5의 정수이고, 단서로써 1, m, n, o, p, q, r, s, 그리고 t 중에서 적어도 2개는 임의의 한때에 0이 아니고, 그리고

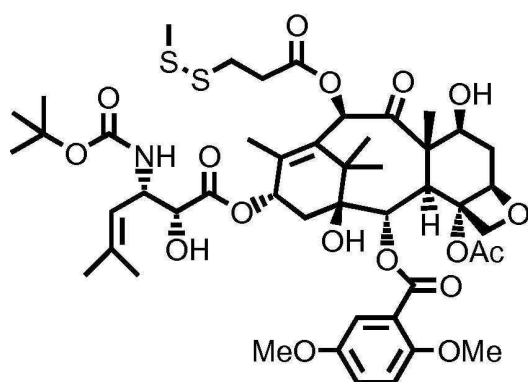
[0143] 여기서  $Z_2$ 는 SR 또는 -COR이고, 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 가지형 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이다.

[0144] 화학식 (VII)의 바람직한 구체예에는  $R_1$ 이 H이고, 그리고  $R_2$ 가 메틸인 화학식 (VII)의 화합물이 포함된다.

[0145] 메이탄시노이드 이외에, 접합체에 이용되는 세포독성제는 탁산 또는 이의 유도체일 수 있다. 탁산은 파클리탁셀 (Taxol®), 세포독성 자연 산물, 그리고 도세탁셀 (Taxotere®), 반-합성 유도체를 포함하는 화합물의 패밀리인데, 이들 둘 모두 암의 치료에서 폭넓게 이용된다. 탁산은 튜불린의 해중합화를 저해하여 세포 사멸을 유발하는 유사분열방추 독물이다. 도세탁셀과 파클리탁셀은 암의 치료에서 유용한 작용제이긴 하지만, 정상 세포를 향한 비-특이적 독성으로 인하여 그들의 항종양 활성이 제한된다. 게다가, 파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은 화합물은 그 자체로는, 세포-결합 작용제의 접합체에서 이용될 만큼 충분히 유효하지 않다.

[0146] 세포독성 접합체의 제조에서 이용을 위한 바람직한 탁산은 화학식 (VIII)의 탁산이다:

[0147] [화학식 VIII]



[0148]

[0150] 본 발명의 배경에서 이용될 수 있는 탁산을 합성하기 위한 방법은 탁산을 세포-결합 작용제, 예를 들면, 항체에 접합하기 위한 방법과 함께, U.S. 특허 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,596,757, 6,706,708, 6,716,821, 그리고 7,390,898에서 상세하게 설명된다.

[0151] 세포독성은 또한, CC-1065 또는 이의 유도체일 수 있다. CC-1065는 스트렙토미세스 젤렌시스 (*Streptomyces zelensis*)의 배양 액체배지로부터 분리된 강력한 항-종양 항생제이다. CC-1065는 시험관내에서, 통상적으로 이용되는 항-암 약물, 예를 들면, 독소루비신, 메토크사트, 그리고 빈크리스틴보다 약 1000-배 더 유효하다 (Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42: 3532-3537 (1982)). CC-1065와 이의 유사체는 U.S. 특허 5,585,499, 5,846,545, 6,340,701, 그리고 6,372,738에서 개시된다. CC-1065의 세포독성 효능은 이의 알킬화 활성 및 DNA-결합 또는 DNA-삽입 활성과 상관하였다. 이들 2가지 활성은 분자의 별개 부분에 존재한다. 이와 관련하여, 알킬화 활성은 시클로프로파피롤로인돌 (CPI) 아단위에 있고, 그리고 DNA-결합 활성은 CC-1065의 2개 피롤로인돌 아단위에 존재한다.

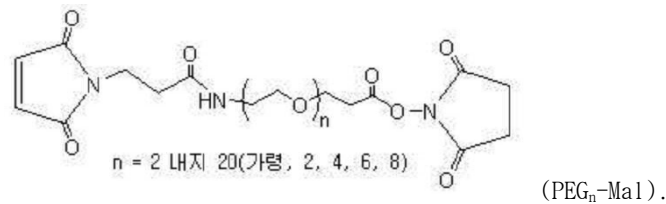
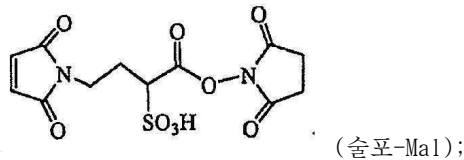
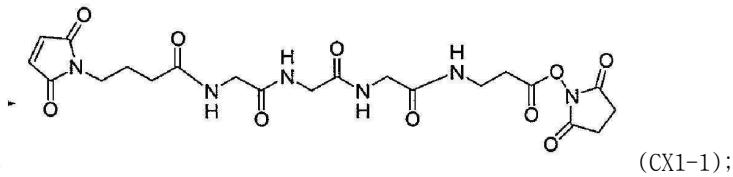
[0152] 몇몇 CC-1065 유사체는 당분야에 알려져 있고, 또한 접합체에서 세포독성제로서 이용될 수 있다 (예로써, Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, 31: 590-603 (1988)을 참조한다). 일련의 CC-1065 유사체가 개발되었는데, 여기서 CPI 모이어티는 시클로프로파벤즈인돌 (CBI) 모이어티에 의해 대체된다 (Boger et al., *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833 (1990), 그리고 Boger et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1: 115-120 (1991)). 이들 CC-1065 유사체는 생쥐에서 지연 독성을 유발하지 않으면서, 부모 약물의 높은 시험관내 효능을 유지한다. CC-1065와 유사하게, 이들 화합물은 DNA의 마이너 그루브에 공유 결합하여 세포 사멸을 유발하는 알킬화제이다.

[0153] CC-1065 유사체의 치료 효능은 종양 부위에 표적화된 전달을 통해 생체내 분포를 변화시켜 비-표적화된 조직에 대한 더욱 낮은 독성, 그리고 따라서, 더욱 낮은 전신 독성을 유발함으로써 크게 향상될 수 있다. 이를 위하여, CC-1065의 유사체와 유도체 및 종양 세포를 특이적으로 표적으로 하는 세포-결합 작용제의 접합체가 산출되었다 (예로써, U.S. 특허 5,475,092, 5,585,499, 그리고 5,846,545를 참조한다). 이들 접합체는 전형적으로, 시험관내에서 높은 표적-특이적 세포독성, 그리고 생쥐의 인간 종양 이종이식편 모델에서 항-종양 활성을 나타낸다

(예로써, Chari et al., *Cancer Res.*, 55: 4079-4084 (1995)를 참조한다).

- [0154] CC-1065 유사체를 합성하기 위한 방법은 U.S. 특허 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 6,534,660, 6,586,618, 6,756,397, 그리고 7,329,760에서 상세하게 기술된다.
- [0155] 메토트렉사트, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 칼리케마이신, 튜블리신과 튜블리신 유사체, 두오카르마이신과 두오카르마이신 유사체, 돌라스타틴과 돌라스타틴 유사체와 같은 약물 역시 본 발명의 세포독성제로서 이용될 수 있다. 독소루비신과 다우노루비신 화합물 (예로써, U.S. 특허 6,630,579을 참조한다) 역시 세포독성제로서 이용될 수 있다.
- [0156] 세포-결합 작용제 세포독성제 접합체는 시험관내 방법에 의해 제조될 수 있다. 세포독성제를 항체에 연결하기 위하여, 연결 기가 이용된다. 적절한 연결 기는 당분야에 널리 알려져 있고, 여기에는 이황화 기, 산 불안정성 기, 광불안정성 기, 펩티다아제 불안정성 기, 그리고 에스테라아제 불안정성 기뿐만 아니라 비개열가능 연결 기가 포함된다. 가령, 세포 결합 작용제는 이황화 결합, 산 불안정성 결합, 광불안정성 결합, 펩티다아제 불안정성 결합, 티오에테르 결합, 그리고 에스테라아제 불안정성 결합으로 구성된 군에서 선택되는 화학적 결합을 거쳐 세포독성제에 화학적으로 커플링될 수 있다.
- [0157] 본 발명에 따라서, 세포-결합 작용제는 이작용성 가교 시약을 거쳐 세포독성제와 연결된다. 본원에서 이용된 바와 같이, "이작용성 가교 시약"은 2개의 반응성 기를 갖는 시약을 지칭한다; 이들 중에서 하나는 세포-결합 작용제와 반응할 수 있는 반면, 다른 하나는 세포독성제와 반응하여 세포-결합 작용제를 세포독성제와 연결하고, 따라서 접합체를 형성할 수 있다.
- [0158] 임의의 적절한 이작용성 가교 시약은 과도한 독성 없이, 각각 세포독성제와 세포-결합 작용제의 치료적, 예를 들면, 세포독성, 그리고 표적화 특성의 유지를 제공하기만 하면, 본 발명과 관련하여 이용될 수 있다. 바람직하게는, 링커 분자는 세포독성제 및 세포-결합 작용제가 서로에 화학적으로 커플링 (가령, 공유 결합)되도록, 화학적 결합 (앞서 기술된 바와 같음)을 통해 세포독성제를 세포-결합 작용제에 결합한다.
- [0159] 한 구체예에서, 이작용성 가교 시약은 비-개열가능 링커를 포함한다. 비-개열가능 링커는 안정된 공유 방식으로, 세포독성제, 예를 들면, 메이탄시노이드, 탁산, 또는 CC-1065 유사체를 세포-결합 작용제에 연결할 수 있는 임의의 화학적 모이어티이다. 따라서 비-개열가능 링커는 세포독성제 또는 세포-결합 작용제가 활성 상태로 존속하는 조건에서, 산-유도된 개열, 광-유도된 개열, 펩티다아제-유도된 개열, 에스테라아제-유도된 개열, 그리고 이황화 결합 개열에 실질적으로 저항한다.
- [0160] 세포독성제와 세포-결합 작용제 사이에 비-개열가능 링커를 형성하는 적절한 가교 시약은 당분야에 널리 알려져 있다. 한 구체예에서, 세포독성제는 티오에테르 결합을 통해 세포-결합 작용제에 연결된다. 비-개열가능 링커의 실례에는 세포독성제와의 반응을 위한 말레이미도- 또는 할로아세틸-기초된 모이어티를 갖는 링커가 포함된다. 이런 이작용성 가교 작용제는 당분야에 널리 알려져 있고 (U.S. 특허 출원 공개 번호 2010/0129314, 2009/0274713, 2008/0050310, 2005/0169933, 2009/0274713, 2010/0129314, 그리고 Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA로부터 구입가능한 것들), 여기에는 N-숙신이미드 4-(말레이미도메틸) 시클로헥산카복실레이트(SMCC), N-숙신이미드 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카복시-(6-아미도카프로에이트) (이것은 SMCC의 "긴 사슬" 유사체 (LC-SMCC)이다),  $\kappa$ -말레이미도운데칸산 N-숙신이미드 에스테르 (KMUA),  $\gamma$ -말레이미도부티르산 N-숙신이미드 에스테르 (GMBS),  $\epsilon$ -말레이미도카프로산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (EMCS), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르 (MBS), N-( $\alpha$ -말레이미도아세톡시)-숙신이미드 에스테르 (AMAS), 숙신이미드 6-( $\beta$ -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트 (SMPH), N-숙신이미드 4-(p-말레이미도페닐)-부티레이트 (SMPB), 그리고 N-(p-말레이미도페닐)이소시아네이트 (PMPI)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 할로아세틸-기초된 모이어티를 포함하는 가교 시약에는 N-숙신이미드 4-(요오드아세틸)-아미노벤조에이트 (SIAB), N-숙신이미드 요오드아세테이트 (SIA), N-숙신이미드 브로모아세테이트 (SBA), 그리고 N-숙신이미드 3-(브로모아세타미도)프로피오네이트 (SBAP), 비스-말레이미도폴리에틸렌글리콜 (BMPEO), BM(PEO)<sub>2</sub>, BM(PEO)<sub>3</sub>, N-( $\beta$ -말레이미도프로필옥시)숙신이미드 에스테르 (BMPS), 5-말레이미도발레르 산 NHS, HBVS, 4-(4-N-말레이미도페닐)-부티르산 히드라지드·HCl (MPBH), 숙신이미드-(4-비닐술포닐)벤조에이트 (SVSB), 디티오비스-말레이미도에탄 (DTME), 1,4-비스-말레이미도부탄 (BMB), 1,4 비스말레이미드-2,3-디히드록시부탄 (BMDB), 비스-말레이미도헥산 (BMH), 비스-말레이미도에탄 (BMOE), 술포숙신이미드 4-(N-말레이미도-메틸)시클로헥산-1-카복실레이트(술포-SMCC), 술포숙신이미드 4-(요오드-아세틸)아미노벤조에이트 (술포-SIAB), m-말레이미도벤조일-N-히드록시술포숙신이미드 에스테르 (술포-MBS), N-( $\gamma$ -말레이미도부틸록시)술포숙신이미드 에스테르 (술포-GMBS), N-( $\epsilon$ -말레이미도카프로일옥시)술포숙시미드 에스테르 (술포-EMCS), N-( $\kappa$ -말레이미

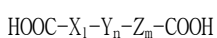
도운테카노일옥시)술포숙신이미드 에스테르 (술포-KMUS), 술포숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)부티레이트 (술포-SMPB) CX1-1, 술포-Mal, 그리고 PEGn-Mal이 포함된다. 바람직하게는, 이작용성 가교 시약은 SMCC이다.



한 구체예에서, 연결 시약은 개열가능 링커이다. 적절한 개열가능 링커의 실례에는 이황화 링커, 산 불안정성 링커, 광불안정성 링커, 펩티다아제 불안정성 링커, 그리고 에스테라아제 불안정성 링커가 포함된다. 이황화 내포 링커는 생리학적 조건 하에 일어날 수 있는 이황화 교환을 통해 개열가능한 링커이다. 산 불안정성 링커는 산성 pH에서 개열가능한 링커이다. 가령, 일정한 세포내 구획, 예를 들면, 엔도솜과 리소솜은 산성 pH (pH 4-5)를 갖고, 그리고 산 불안정성 링커를 개열하는데 적절한 조건을 제공한다. 광 불안정성 링커는 광에 영향받기 쉬운 신체 표면에서 및 많은 체강 내에서 유용하다. 게다가, 적외선은 조직을 통과할 수 있다. 펩티다아제 불안정성 링커는 세포 내외부에서 일정한 펩티드를 개열하는데 이용될 수 있다 (예로써, Trouet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 626-629 (1982), 그리고 Umemoto et al., *Int. J. Cancer*, 43: 677-684 (1989)를 참조한다). 한 구체예에서, 개열가능 링커는 온화한 조건, 다시 말하면, 세포독성제의 활성이 영향을 받지 않는 세포 내에 조건 하에 개열된다.

다른 구체예에서, 세포독성제는 이황화 결합을 통해 세포-결합 작용제에 연결된다. 링커 분자는 세포-결합 작용제와 반응할 수 있는 반응성 화학적 기를 포함한다. 세포-결합 작용제와의 반응을 위한 바람직한 반응성 화학적 기는 N-숙신이미딜 에스테르 및 N-술포숙신이미딜 에스테르이다. 부가적으로, 링커 분자는 세포독성제와 반응하여 이황화 결합을 형성할 수 있는 반응성 화학적 기, 바람직하게는 디티오피리딜 기를 포함한다. 이황화 결합을 거쳐 세포-결합 작용제와 세포독성제의 연쇄를 가능하게 하는 이작용성 가교 시약은 당분야에 알려져 있고 여기에는 예로써, N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) (예로써, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)를 참조한다), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트 (SPDB) (예로써, U.S. 특허 4,563,304를 참조한다), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP) (예로써, CAS 등록 번호 341498-08-6을 참조한다), 그리고 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)2-술포 부타노에이트 (술포-SPDB) (예로써, U.S. 특허 출원 공개 번호 2009/0274713을 참조한다)가 포함된다. 이황화 기를 도입하는데 이용될 수 있는 다른 이작용성 가교 시약은 당분야에 알려져 있고 U.S. 특허 6,913,748과 6,716,821, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 2009/0274713과 2010/0129314에서 설명되고, 이들 모두 본원에 전체로서 참고문헌으로 편입된다.

비-개열가능 링커를 형성하는 황 원자가 없는 다른 가교 시약 역시 본 발명의 방법에 이용될 수 있다. 이런 링커는 디카르복실 산 기초된 모이어티로부터 유래될 수 있다. 적절한 디카르복실 산 기초된 모이어티에는 일반식 (IX)의  $\alpha, \omega$ -디카르복실 산이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다:



(IX),

여기서 X는 2 내지 20개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 가지형 알킬, 알케닐, 또는 알킬닐 기이고, Y는 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐 기이고, Z는 6 내지 10개 탄소 원자를 갖는 치환된 또는 치

환되지 않은 방향족 기, 또는 치환된 또는 치환되지 않은 헤테로환상 기이고, 여기서 헤테로 원자는 N, O 또는 S에서 선택되고, 그리고 l, m, 그리고 n은 각각, 0 또는 1이고, 단서로써 l, m, 그리고 n은 동시에 모두 0이지는 않다.

[0170] 본원에서 개시된 많은 비-개열가능 링커는 U.S. 특허 출원 공개 번호 2005/0169933 A1에서 상세하게 설명된다.

[0172] 하기 실시예는 본 발명을 더욱 예시하지만, 이의 범위를 한정하는 것으로 간주되지 않는다.

[0174] 실시예 1

[0175] 인간화 CD37-3 항체는 기존에 설명된 방법 (가령, U.S. 특허 5,208,020)뿐만 아니라 본 출원의 요부인 일-단계 방법을 이용하여, 헤테로이작용성 가교 시약 SMCC 및 메이탄시노이드 DM1과 반응되었다.

[0176] 기존에 기술된 방법의 경우에, huCD37-3 (15 mg/mL)은 먼저, 변형된 항체를 형성하기 위해 SMCC (항체의 양에 비하여 6.5-배 몰 과량)와 반응되었다. 변형 반응은 16°C에서, 2 mM EDTA와 10% DMA를 내포하는 50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.9)에서 90분 동안 수행되었다. 반응은 pH를 4.5로 조정하기 위해 1 M 아세트산으로 진정되고, 그리고 변형된 항체는 2 mM EDTA를 내포하는 20 mM 아세트산나트륨 (pH 4.5)에서 평형화되고 용리된 Sephadex G-25F 수지의 칼럼을 이용하여 정제되었다. 정제 후, 변형된 항체 (5 mg/mL)는 접합된 항체를 형성하기 위해 메이탄시노이드 DM1 (항체의 양에 비하여 6.8-배 몰 과량; 항체 상에서 링커의 측정된 양에 비하여 1.3-배 과량)과 반응되었다. 접합 반응은 20°C에서, 2 mM EDTA와 5% DMA를 내포하는 20 mM 아세트산나트륨 완충액 (pH 5.0)에서 대략 20시간 동안 수행되었다. 반응 혼합물은 이후, 10 mM 숙신산나트륨 (pH 5.0)에서 평형화되고 용리된 Sephadex G-25F 수지의 칼럼을 이용하여 정제되었다.

[0177] 본 발명의 방법의 경우에, huCD37-3 (2.5 mg/mL)은 DM1 (항체의 양에 비하여 6.2-배 몰 과량) 및 그 이후, SMCC (항체의 양에 비하여 5.2-배 과량)와 혼합되었다. 반응은 20°C에서, 2 mM EDTA와 10% DMA를 내포하는 50 mM EPPS [(4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진프로판술폰산] 완충액 (pH 8.1)에서 대략 4시간 동안 수행되었다. 반응은 pH를 5.0으로 조정하기 위해 1 M 아세트산을 첨가함으로써 진정되었다. 반응 혼합물은 이후, 2-8°C에서 대략 20시간 동안 유지되었다. 유지 후, 반응 혼합물은 0.2 µm PVDF 필터를 통해 여과되고, 그리고 정제되고 집선 유동 여과 (TFF)를 이용하여 10 mM 숙신산나트륨 (pH 5.0) 내로 정용여과되었다.

[0178] 이들 2가지 방법으로부터 도출된 접합체는 농도 및 세포독성제 적하의 경우에 UV 분광법 (메이탄시노이드 대 항체 비율, MAR); 비-접합된 링커 수준의 결정의 경우에 질량 분석법; 비-환원성 종류의 수준의 결정의 경우에 환원된 SDS PAGE 전기영동; 접합체 단위체의 결정의 경우에 SEC-HPLC; 그리고 접합체 단위체와 유리 메이탄시노이드 방출에 대하여 보관 동안 안정성에 의해 분석되었다.

[0179] 농도 및 메이탄시노이드 대 항체 비율 (MAR)은 UV-VIS 분광광도계에서 252와 280 nm에서 접합체의 흡광도를 측정하고, 그리고 이들 2가지 파장에서 DM1과 항체의 몰 흡광 계수 (molar extinction coefficient)를 이용하여 항체와 DM1의 몰 농도를 계산함으로써 결정되었다.

[0180] 접합체의 비-접합된 링커 수준은 질량 분석법에 의해 분석되었다: 개별 접합체 종류 (비-접합된 링커를 갖거나 갖지 않는 접합체 포함)의 피크 구역이 측정되었다; 비-접합된 링커 수준은 비-접합된 링커를 내포하는 구역의 합계 (링커의 숫자에 가중됨) 대 모든 접합체 종류의 구역의 합계 (링커의 숫자에 의해 가중됨)의 비율에 의해 계산되었다.

[0181] 접합체의 비-환원성 종류 수준은 환원된 SDS 겔 전기영동에 의해 분석되었다: 개별 환원된 접합체 종류 (환원된 경쇄, 환원된 중쇄, 가교된 경쇄-경쇄, 가교된 경쇄-중쇄 등을 포함)의 피크 구역이 측정되었다; 비-환원성 종류 수준은 비-환원성 종류의 구역의 합계 대 모든 종류의 구역의 합계의 비율에 의해 계산되었다.

[0182] 접합체의 단위체 수준은 크기 배제 HPLC에 의해 분석되었다: 단위체, 이합체, 집합체 및 저분자량 종류의 피크 구역은 252 nm 또는 280 nm의 파장에 설정된 흡광도 검출기를 이용하여 측정되었다; 단위체 수준은 단위체 구역 대 전체 구역의 비율에 의해 계산되었다.

[0183] 접합체 내에 존재하는 유리 메이탄시노이드의 양은 이중 칼럼 (HiSep와 C18 칼럼) HPLC에 의해 분석되었다: 전체 유리 메이탄시노이드 종류 (구배에서 용리되고 공지된 표준과 용리 시간의 비교에 의해 확인됨)의 피크 구역은 252 nm의 파장에 설정된 흡광도 검출기를 이용하여 측정되었다; 유리 메이탄시노이드의 양은 공지된 양의 표

준의 피크 구역에 의해 산출된 표준 곡선을 이용하여 계산되었다.

[0184] 하기 표 1에서 도시된 바와 같이, 본 발명의 방법을 이용하여 제조된 접합체는 비-접합된 링커, 비-환원성 종류 및 접합체 단위체에 대하여, 기존에 설명된 방법을 이용하여 제조된 접합체보다 우수하였다. 이에 더하여, 본 발명의 방법에 의해 만들어진 접합체의 안정성은 4℃에서 5개월 동안 보관 후 유리 메이탄시노이드 방출에 대하여 훨씬 우수하였다. 양쪽 방법에 의해 만들어진 접합체의 단위체 수준은 안정하였다.

표 1

[0186] 기존 방법과 비교하여 본 발명의 방법에 의해 제조된 CD37-3 접합체의 핵심 성질의 비교

|                              | 기존 방법 | 본 발명의 방법 |
|------------------------------|-------|----------|
| 접합체 농도                       | 3.9   | 8.1      |
| 메이탄시노이드 대 항체 비율              | 4.1   | 3.4      |
| 접합되지 않은 링커 (%)               | 12    | < 1      |
| 비-환원성 종류 (%)                 | 9.4   | 0.9      |
| 접합체 단위체, (%) (t=0)           | 97.8  | 98.9     |
| 접합체 단위체, (%) (4℃에서 5개월 후)    | 97.8  | 98.4     |
| 유리 메이탄시노이드, (%) (t=0)        | 0.4   | 0.2      |
| 유리 메이탄시노이드, (%) (4℃에서 5개월 후) | 3.3   | 0.5      |

[0187] 본 실시예에서 반영된 실험의 결과는 실질적으로 높은 순도의 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체를 제조하기 위한 향상된 방법을 증명한다. 본 발명의 방법을 이용함으로써 접합체 순도와 안정성에서 향상에 더하여, 2가지 가공처리 단계 (변형 반응 및 변형된 항체의 정제)의 제거로 인하여 가공처리 시간과 편의성 역시 향상된다.

[0188] 실시예 2

[0189] 인간화 엽산염 수용체 항체 huMov19 (U.S. 특허 출원 공개 2012/0009181을 참조한다)는 2가지 기존에 기술된 방법뿐만 아니라, 본 출원의 요부인 향상된 방법을 이용하여, 헤테로이작용성 가교 시약 술포-SPDB 및 메이탄시노이드 DM4와 반응되었다.

[0190] 기존에 기술된 방법 A (2-단계 방법, 예로써 Chari et al., US 5,208,020)의 경우에, huMov19 항체 (20 mg/mL)는 먼저, 변형된 항체를 형성하기 위해 술포-SPDB (항체의 양에 비하여 5.7-배 몰 과량, DMA, 디메틸아세트아미드에서 용해됨)와 반응되었다. 변형 반응은 20℃에서, 5% DMA를 내포하는 50 mM EPPS (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-프로판술포산) 완충액 (pH 8.1)에서 180분 동안 수행되었다. 변형된 항체는 2 mM EDTA (에틸렌디아민 테트라아세트산)을 포함하는 50 mM EPPS (pH 8.1)에서 평형화되고 용리된 Sephadex G-25F 수지의 칼럼을 이용하여 정제되었다. 정제 후, 변형된 항체 (5.0 mg/mL)는 접합된 항체를 형성하기 위해 메이탄시노이드 DM4 (DMA에서 용해됨; 항체의 양에 비하여 9.7-배 몰 과량; 항체 상에서 링커의 측정된 양에 비하여 1.7-배 과량)와 반응되었다. 접합 반응은 실온에서, 2 mM EDTA와 5% DMA를 내포하는 50 mM EPPS (pH 8.1)에서 대략 18시간 동안 수행되었다. 반응 혼합물은 이후, 10 mM 숙신산나트륨 (pH 5.0)에서 평형화되고 용리된 Sephadex G-25F 수지의 칼럼을 이용하여 정제되었다.

[0191] 기존에 기술된 방법 B (일-포트 방법, Dai et al., U.S. 특허 7,811,572)의 경우에, huMov19 항체 (10 mg/mL)는 먼저, 변형된 항체를 형성하기 위해 술포-SPDB (항체의 양에 비하여 4.9-배 몰 과량, DMA에 용해됨)와 반응되었다. 변형 반응은 20℃에서, 2mM EDTA와 10% DMA를 내포하는 50 mM EPPS 완충액 (pH 7.5)에서 60분 동안 수행되었다. 변형된 항체는 접합 반응 이전에 정제되지 않았다. 대신에, 비-정제된 변형된 항체는 접합된 항체를 형성하기 위해 10 mg/mL에서 메이탄시노이드 DM4 (항체의 양에 비하여 8.3-배 몰 과량, DMA에 용해됨)와 반응되었다. 접합 반응은 실온에서, 2 mM EDTA와 10% DMA를 내포하는 50mM EPPS 완충액 (pH 7.5)에서 대략 18시간 동안 수행되었다. 반응 혼합물은 이후, 10 mM 숙신산나트륨 (pH 5.0)에서 평형화되고 용리된 Sephadex G-25F 수지의 칼럼을 이용하여 정제되었다.

[0192] 접합체를 정제하기 위해 Sephadex G-25가 이용된 본 발명의 방법 (방법 C, 일-단계 방법)의 경우에, huMov19 항

체 (6.0 mg/mL)는 DM4 (항체의 양에 비하여 9.7-배 몰 과량, DMA에 용해됨)와 혼합되고, 그 이후 술포-SPDB (항체의 양에 비하여 5.7-배 과량, DMA에 용해됨)가 첨가되었다. 반응은 20℃에서, 2 mM EDTA와 10% DMA를 내포하는 50 mM EPPS 완충액 (pH 8.1)에서 대략 20시간 동안 수행되었다. 반응 혼합물은 이후, 10 mM 숙신산나트륨 (pH 5.0)에서 평형화되고 용리된 Sephadex G-25F 수지의 칼럼을 이용하여 정제되었다.

[0193] 접합체를 정제하기 위해 접선 유동 여과 (TFF)가 이용된 본 발명의 방법 (방법 D, 일-단계 방법)의 경우에, huMov19 항체 (5.0 mg/mL)는 DM4 (항체의 양에 비하여 10.2-배 몰 과량, DMA에 용해됨)과 혼합되고, 그 이후 술포-SPDB (항체의 양에 비하여 6.0-배 과량, DMA에 용해됨)과 혼합되었다. 반응은 20℃에서, 2 mM EDTA와 10% DMA를 내포하는 50 mM EPPS 완충액 (pH 8.5)에서 대략 20시간 동안 수행되었다. 반응 혼합물은 이후, 정제되고 TFF를 이용하여 10 mM 숙신산나트륨 (pH 5.0) 내로 정용여과되었다.

[0194] 이들 상이한 방법으로부터 도출된 접합체는 UV 분광법 (농도 및 메이탄시노이드 대 항체 비율, MAR의 경우에); 유리 메이탄시노이드의 결정의 경우에 역상 HPLC; 접합되지 않은 링커 수준 및 질량 분포 프로파일의 결정의 경우에 질량 분석법; 비-환원성 종류의 수준의 결정의 경우에 환원된 SDS PAGE 전기영동; 단편화의 수준의 결정의 경우에 비-환원된 SDS PAGE 전기영동; 접합체 단위체의 결정의 경우에 SEC-HPLC에 의해 분석되었다. 보관 시에 안정성은 접합체 단위체와 유리 메이탄시노이드 방출에 대하여 평가되었다. 이들 분석 방법에 관한 추가의 상세는 실시예 1에서 제공된다.

[0195] 하기 표 2에서 도시된 바와 같이, 본 발명의 방법을 이용하여 제조된 접합체는 단위체에 대하여, 기존에 기술된 방법을 이용하여 제조된 접합체보다 우수하였다. 접합체의 최종 정제가 Sephadex G-25를 이용하여 수행된 일-포트와 일-단계 방법, 각각 방법 B와 C를 이용하여 제조된 접합체는 2 단계 방법, 방법 A를 이용하여 제조된 접합체보다 더욱 높은 수준의 유리 메이탄시노이드를 가졌다. 하지만, 상이한 최종 정제 방법, TFF가 이용될 때 (방법 D), 유리 메이탄시노이드의 수준은 최초 정제 후 및 6주 동안 4℃에서 보관 후, 매우 낮고 2-단계 방법에서 관찰된 것에 필적하였다. 다른 중요한 접합체 속성 (가령, 단편화, 비-환원성 종류, 질량 분포 프로파일 및 접합되지 않은 링커)에 대하여, 본 발명의 방법을 이용하여 제조된 접합체는 기존에 기술된 방법에 의해 제조된 것에 동등하였다.

## 표 2

[0197] 기존 방법과 비교하여 본 발명의 방법에 의해 제조된 huMov19 접합체의 핵심 성질의 비교

| 방법                           | 방법 A*   | 방법 B* | 방법 C* | 방법 D** |
|------------------------------|---------|-------|-------|--------|
| 단위 작업의 횟수                    | 5       | 4     | 3     | 3      |
| 농도 (mg/mL)                   | 1.0     | 1.0   | 1.0   | 4.2    |
| MAR (UV)                     | 4       | 3.8   | 3.7   | 3.6    |
| t = 0에서 접합체 단위체, (%)         | 94.8    | 97.4  | 98.9  | 98.6   |
| t = 6주, 4℃에서 접합체 단위체, (%)    | 94.4    | 97.5  | 98.8  | 98.1   |
| t = 0에서 유리 메이탄시노이드, (%)      | 0.6     | 6.3   | 3.1   | 0.1    |
| t = 6주, 4℃에서 유리 메이탄시노이드, (%) | 0.6     | 5.4   | 2.7   | 0.4    |
| 비-환원성 겔-칩에 의한 단편화 (%)        | 10      | 14    | 14    | 12     |
| 환원성 겔-칩에 의한 비-환원성 종류 (%)     | 0.7     | 0.8   | 0.7   | 0.5    |
| 질량 분포 프로파일 (MDP)             | 유사      |       |       |        |
| 접합되지 않은 링커 (MDP)             | 검출되지 않음 |       |       |        |

[0198] \* Sephadex G-25로 정제됨

[0199] \*\* TFF를 이용하여 정제됨

[0201] 본 실시예에서 반영된 실험의 결과는 실질적으로 높은 순도의 세포-결합 작용제-세포독성제 접합체를 제조하기 위한 향상된 방법을 증명한다. 본 발명의 방법을 이용함으로써 접합체 순도와 안정성에서 향상에 더하여, 2가지 가공처리 단계 (변형 반응 및 변형된 항체의 정제)의 제거로 인하여, 가공처리 시간과 편의성 역시 향상된다.

[0203] 실시예 3

[0204] 본 실시예에서는 본원에서 기술된 일-단계 방법이 다양한 링커와 메이탄시노이드 세포독성제로 시작하는 접합체를 만드는데 이용될 수 있다는 것을 예시한다.

[0205] 인간화 huN901 항체는 메이탄시노이드 (DM1 또는 DM4), 그 이후 링커 (술포-SMCC, SMCC, SPDB, 또는 SPP)와 혼합되었다. 반응은 20℃에서, 2 mM EDTA와 10% DMA를 내포하는 50 mM 포스페이트 완충액 (pH 7.5)에서 대략 20-24시간 동안 수행되었다. 반응 혼합물은 이후, 10 mM 숙신산나트륨 (pH 5.0)에서 평형화되고 용리된 Sephadex G25F 수지의 칼럼을 이용하여 정제되었다.

[0206] 하기 표 3에 도시된 바와 같이, 일-단계 반응은 상이한 링커와 메이탄시노이드 조합에서 수행되고 우수한 MAR과 단위체 수준을 갖는 접합체를 산출할 수 있다.

**표 3**

[0208] 상이한 링커와 메이탄시노이드 조합을 이용함으로써 접합체 제조

|                | 링커     | DMx | 접합체 MAR | 접합체 단위체 (%) |
|----------------|--------|-----|---------|-------------|
| 2-단계           | SPP    | DM1 | 3.5     | 96.8        |
| 일-단계<br>(본 발명) | SPP    | DM1 | 3.4     | 97.5        |
|                | SPDB   | DM1 | 4.6     | 97.7        |
|                | SMCC   | DM4 | 4.5     | 95.1        |
|                | S-SMCC | DM1 | 3.5     | 98.0        |
|                | SPDB   | DM4 | 3.8     | 97.3        |

[0209] 본원에서 언급된 간행물, 특허 출원, 그리고 특허를 비롯한 모든 참고문헌은 마치 이들 각각이 참고문헌으로 편입되는 것으로 개별적으로 및 명백히 지시되고 본원에서 온전히 그대로 진술되는 것처럼 동일한 정도로, 참고문헌으로 편입된다. 본 발명을 기술하는 문맥에서 (특히, 하기 청구항의 문맥에서) 이용된 부정관사, 정관사 및 유사한 지시 대상은 본원에서 달리 지시되거나 문맥에 의해 명백하게 부정되지 않으면, 단수와 복수 둘 모두를 포함하는 것으로 해석된다. 용어 "포함하는", "갖는", "함유하는", 그리고 "내포하는"은 달리 명시되지 않으면, 개방적인 용어 (즉, "포함하지만 국한되지 않는"을 의미함)로서 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위의 열거는 본원에서 달리 지시되지 않으면, 상기 범위 내에 속하는 각 개별 값을 단순히 개별적으로 지칭하는 속기 방법으로서 기능하는 것으로 의도되고, 그리고 각 개별 값은 마치 본원에서 개별적으로 지칭되는 것처럼 본 명세서 내로 편입된다. 본원에서 기술되는 모든 방법은 본원에서 달리 지시되거나 문맥에 의해 명백하게 부정되지 않으면, 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본원에서 제공된 임의의 모든 실례, 또는 예시의 어법 (가령, "예를 들면")의 이용은 본 발명을 더욱 충실하게 조명하기 위한 것으로 의도되고, 그리고 만약 그렇지 않으면 청구되는 본 발명의 범위를 한정하지 않는다. 본 명세서에서 어떤 어법도 발명의 실시예 필수적인 임의의 비-청구된 요소를 지시하는 것으로 해석되지 않는다.

[0210] 본 발명을 수행하기 위한 본 발명자들에게 공지된 최적 양식을 비롯하여, 본 발명의 바람직한 구체예가 본원에서 기술된다. 이들 바람직한 구체예에서 변화는 상기 설명을 읽어보면 당업자에게 명백해질 것이다. 본 발명자들은 당업자가 적절하면 이런 변화를 이용할 것으로 예상하고, 그리고 본 발명자들은 본 발명이 본원에서 구체적으로 기술된 것과 달리 실시될 수 있는 것으로 의도한다. 따라서 본 발명은 적용 법률에 의해 허용되는, 본 명세서에 첨부된 청구항에서 언급된 요부의 모든 변형과 등가물을 포함한다. 게다가, 모든 가능한 변화에서 앞서 기술된 요소의 임의의 조합은 본원에서 달리 지시되거나, 또는 문맥에 의해 달리 명백하게 부정되지 않으면 본 발명에 포함된다.

## 서 열 목 록

<110> ImmunoGen, Inc.

<120> PREPARATION OF MAYTANSINOID ANTIBODY CONJUGATES BY A ONE-STEP

PROCESS

<130> IPP-2013-0330

<150> US 61/468,997

<151> 2011-03-29

<160> 11

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR1

<400> 1

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR2

<220><221> PEPTIDE

<222> (14)

<223> MISC\_FEATURE Xaa is Lys, Gln, His, or Arg

<220><221> PEPTIDE

<222> (16)

<223> MISC\_FEATURE Xaa is Gln, His, Asn, or Arg

<220><221> PEPTIDE

<222> (17)

<223> MISC\_FEATURE Xaa is Gly, Glu, Thr, Ser, Ala, or Val

<400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR3

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR2

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1 5

<210>

> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain CDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain CDR2

<400> 7

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145                      150                      155                      160  
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
                                  165                      170                      175  
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
                                  180                      185                      190  
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
                                  195                      200                      205  
  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
                                  210                      215                      220  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225                      230                      235                      240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
                                  245                      250                      255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
                                  260                      265                      270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
  
                                  275                      280                      285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
                                  290                      295                      300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
                                  325                      330                      335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
                                  340                      345                      350  
  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
                                  355                      360                      365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
                                  370                      375                      380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385                      390                      395                      400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405 410 415  
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430  
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain Variable Domain

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Phe

20 25 30

Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His Met

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain Variable Domain

<400> 10

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain Variable Domain

<400> 11

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 85  |     | 90  |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg |
|     | 100 |     |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |