



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0022112
(43) 공개일자 2022년02월24일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 47/68</i> (2017.01) <i>A61K 31/5365</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/5513</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/40</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 47/6871</i> (2017.08)
 <i>A61K 31/5365</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7034077
 (22) 출원일자(국제) 2020년03월20일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년10월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2020/023897
 (87) 국제공개번호 WO 2020/191306
 국제공개일자 2020년09월24일
 (30) 우선권주장
 62/821,707 2019년03월21일 미국(US)
 62/856,942 2019년06월04일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 이뮤노젠 아이엔씨
 미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830</p> <p>(72) 발명자
 힐더브랜드, 스콧 에이.
 미국 01907 메사추세츠주 스왈스컷 로렌스 테라스 19
 밀라노, 다니엘 에프.
 미국 01867 메사추세츠주 리딩 스타지스 로드 53</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 이상남</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 239 항

(54) 발명의 명칭 **세포-결합 제제-약물 콘쥬게이트를 준비하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스템인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘쥬게이트를 준비하는 방법을 제공한다. 본원에서 기재된 방법들에 의해 준비된 콘쥬게이트, 약제학적 조성물 및 이를 이용하는 방법들이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/5513 (2013.01)

A61K 47/6803 (2017.08)

A61K 47/6849 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/40 (2013.01)

명세서

청구범위

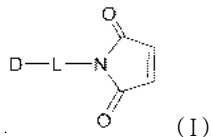
청구항 1

세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트를 준비하는 방법에 있어서, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함하는, 방법:

(a) 캡핑제로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;

(b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고:



이로 인하여 해당 콘주게이트가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 세포-결합 제제는 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 그리고 단계 (b)의 CysCBA는 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:

D는 세포독성 제제이며; 그리고

L은 링커다.

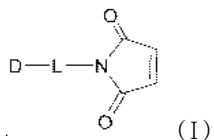
청구항 2

세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트를 준비하는 연속 방법에 있어서, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함하는, 연속 방법:

(a) 캡핑제로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;

(b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고:



이로 인하여 해당 콘주게이트가 형성되며,

이때 단계 (a)의 환원된 세포-결합 제제는 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 단계 (b)의 CysCBA는 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (c)에서 선택된 임의의 하나 또는 그 이상의 단계는 연속적으로 수행되며, 이때:

D는 세포독성 제제이며; 그리고

L은 링커다.

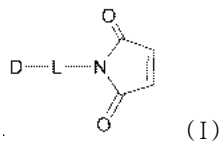
청구항 3

청구항 2에 있어서, 이때 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행되는, 방법.

청구항 4

세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법에 있어서, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함하는, 연속 방법:

- (a) 캡핑제로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;
- (b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고
- (c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고:



이로 인하여 해당 콘주게이트가 형성되며; 그리고

- (d) 콘주게이트안된 화학식 (I)의 화합물을 제거하고;

이때 단계 (a)의 환원된 세포-결합 제제는 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 단계 (b)의 CysCBA는 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (d)에서 선택된 임의의 하나 또는 그 이상의 단계는 연속적으로 수행되며; 그리고 이때:

D는 세포독성 제제이며; 그리고

L은 링커다.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 이때 단계 (a) ~ (d)는 연속적으로 수행되는, 방법.

청구항 6

청구항 4 또는 5에 있어서, 이때 해당 방법은 상기 콘주게이트를 안정적 완충액으로 교환하는 단계 (e)를 더 포함하는, 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 이때 단계 (e)는 연속적으로 수행되는, 방법.

청구항 8

청구항 4-7중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF) 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여, 상기 콘주게이트안된 화학식 (I)의 화합물 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환하는, 방법.

청구항 9

청구항 2-8중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (a)에서, 상기 반응이 진행되고, 적어도 하나의 산물이 형성된 후에, cCysCBA 및/또는 상기 환원 제제는 연속적으로 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 이때 상기 반응 혼합물이 연속적으로 회수되고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안 cCysCBA

및 환원 제제를 연속적으로 상기 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 이때 유동상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가하는 상기 환원 제제 및 cCysCBA의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 12

청구항 2-11중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b)에서, 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제는 상기 반응이 진행되고, 적어도 하나의 산물이 형성된 후에, 연속적으로 반응 용기에 추가되는, 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 이때 상기 반응 혼합물이 연속적으로 회수되고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안 상기 환원된 세포-결합 제제 및 선택적 산화 제제를 연속적으로 상기 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 이때 상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가하는 환원된 세포-결합 제제 및 선택적 산화 제제의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 15

청구항 2-14중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (c)에서, CysCBA 및 화학식 (I)의 화합물은 상기 반응이 진행되고, 적어도 하나의 산물이 형성된 후에 연속적으로 반응 용기에 추가되는, 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 이때 상기 반응 혼합물이 연속적으로 회수되고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안 CysCBA 및 화학식 (I)의 화합물을 연속적으로 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 이때 상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가하는 CysCBA 및 화학식 (I)의 화합물의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 18

청구항 9-17중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 반응 용기는 연속적으로 교반되는 탱크 반응기 (CSTR)인, 방법.

청구항 19

청구항 10, 11, 13, 14 및 16-18중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 유동 반응기는 플러그 유동 반응기 (PFR)인, 방법.

청구항 20

청구항 3-19중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF)를 이용하여 콘쥬게이트안된 약물을 제거하는, 방법.

청구항 21

청구항 3-19중 임의의 한 항에 있어서, 이때 역전류 정용여과를 이용하여 콘쥬게이트안된 약물을 제거하는, 방법.

청구항 22

청구항 6-21중 임의의 한 항에 있어서, 이때 SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여 ADC를 안정적 완충액으로 교환하는, 방법.

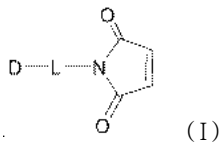
청구항 23

청구항 1-22중 임의의 한 항에 있어서, 이때 CysCBA는 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며, 이 방법은 다음의 단계들을 포함하는, 방법:

(a) 환원 제제에 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb) 또는 캡핑제로 캡이 씌워진, 하나 또는 그 이상의 공작된 시스테인 잔기들을 갖는 이의 항원-결합 단편과 반응시켜 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고, 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb를 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 반응시키고:



이로 인하여 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 그리고 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:

D는 세포독성 제제이며; 그리고

L은 링커다.

청구항 24

청구항 1 또는 23에 있어서, 이때 단계 (a), (b) 및 (c)는 동일한 반응 용기에서 실행된다.

청구항 25

청구항 1-24중 임의의 한 항에 있어서, 이때 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb) 또는 이의 항원-결합 단편에서 하나 또는 그 이상의 쇠-간 이황화물 결합은 단계 (a)에서 환원되는, 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 이때 상기 하나 또는 그 이상의 쇠-간 이황화물 결합은 단계 (b)에서 재-형성되는, 방법.

청구항 27

청구항 1-26중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염소산염 (TCEP), 트리스히드록시프로필 포스핀 (THPP), 트리스 (2-시아노에틸)포스핀, 디티오프레톨 (DTT), 디사이클로헥실포스피노)벤젠술폰산, 비스(p-술포네이트페닐)페닐포스핀, (디페닐포스피노)벤젠술폰산, (디페닐포스피노)벤조산, 2-(디페닐포스피노)-N,N,N-트리메틸벤질암모늄 트라이플레이트, (디페닐포스피노)에틸아민, 2-(디이소프로필포스피노)에틸아민, 또는 3-(디페닐포스피노)프로필아민 (DPPA)인, 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 TCEP 또는 DPPA인, 방법.

청구항 29

청구항 1-28중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 산화 제제는 데하이드로아스코르빈산 (DHAA), 황산구리, 산소 또는 공기인, 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 이때 상기 산화 제제는 DHAA인, 방법.

청구항 31

청구항 1-30중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (a)의 반응은 pH 5.0 ~ 8.5 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 이때 단계 (a)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.5 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 33

청구항 1-32중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b)의 반응은 pH 5.0 ~ 8.5 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 이때 단계 (b)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.5 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 35

청구항 1-34중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (c)의 반응은 pH 5.0 ~ 8.5 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 이때 단계 (c)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.5 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 37

청구항 1-34중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (c)의 반응은 pH 5.5 ~ 6.5 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 이때 단계 (c)의 반응은 pH 6.0에서 실행되는, 방법.

청구항 39

청구항 1-38중 임의의 한 항에 있어서, 이때 해당 방법은 단계 (b) 이후, 단계 (c)에서 CysCBA에 세포독성 제제를 반응시키기 전, 반응 혼합물의 pH를 조정하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 40

청구항 1-38중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysCBA에 세포독성 제제를 반응시키기 전, 조정되지 않는, 방법.

청구항 41

청구항 1-26중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 TCEP이며, 단계 (a)의 반응은 pH 6.0 ~ 8.0 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 42

청구항 1-26중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 TCEP이며, 단계 (a)의 반응은 pH 7.5에서 실행되는, 방법.

청구항 43

청구항 41 또는 42에 있어서, 이때 상기 산화 제제는 DHAA이며, 단계 (b)의 반응은 pH 7.5에서 실행되는, 방법.

청구항 44

청구항 41-43중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysCBA에 세포독성 제제를 반응시키기 전, pH 7.5에서 pH 6.0로 조정되는, 방법.

청구항 45

청구항 1-26중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 DPPA이며, 단계 (a)의 반응은 pH 6.0 ~ 8.0사이에서 실행되는, 방법.

청구항 46

청구항 1-26중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 DPPA이며, 단계 (a)의 반응은 pH 6.5에서 실행되는, 방법.

청구항 47

청구항 45 또는 46에 있어서, 이때 상기 산화 제제는 DHAA이며, 단계 (b)의 반응은 pH 6.5에서 실행되는, 방법.

청구항 48

청구항 1-47중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 콘쥬게이트는 접선 유동 여과 (TFF), 흡착 크로마토그래피, 비-흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전 또는 이의 조합에 의해 정제되는, 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 이때 상기 콘쥬게이트는 접선 유동 여과에 의해 정제되는, 방법.

청구항 50

청구항 1-49중 임의의 한 항에 있어서, 이때 cCysCBA에 대해 과량의 환원 제제가 단계 (a)에서 이용되는, 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 이때 환원 제제 대 cCysCBA의 몰 비율은 1:1 ~ 50:1, 2:1 ~ 30:1, 또는 5:1 ~ 25:1인, 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 이때 환원 제제 대 cCysCBA의 비율은 15:1 ~ 20:1인, 방법.

청구항 53

청구항 1-52중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (a)의 환원 제제 대 단계 (b)의 산화 제제의 몰 비율은 2:1 ~ 1:2인, 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 이때 상기 환원 제제 대 산화 제제의 몰 비율은 1.2:1 ~ 1:1.5인, 방법.

청구항 55

청구항 53에 있어서, 이때 상기 환원 제제 대 산화 제제의 몰 비율은 1:1 ~ 1:1.5인, 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 이때 상기 환원 제제 대 산화 제제의 몰 비율은 1:1인, 방법.

청구항 57

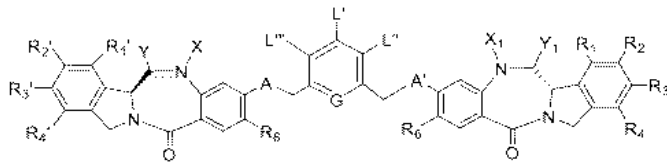
청구항 55에 있어서, 이때 상기 환원 제제 대 산화 제제의 몰 비율은 1:1.5인, 방법.

청구항 58

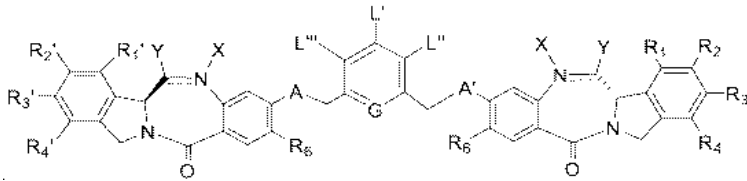
청구항 1-57중 임의의 한 항에 있어서, 이때 CysCBA에 대해 과량의 화학식 (I)의 화합물이 단계 (c)에서 이용되는, 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 이때 각 CysCBA 당량에 대해 2 ~ 5 몰 당량의 화학식 (I)의 화합물이 이용되는, 방법.



(D-IC); 또는



(D-ID);

또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이며, 이때:

N와 C 사이에 이중선 $=$ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H 또는 (C₁-C₄)알킬이며; 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H 또는 아민 보호 모이어티이며, Y는 -OH 또는 -SO₃H이며, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고;

L', L'', 및 L''' 중 하나는 다음의 식으로 나타내며:

$-Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-$ (A'), 또는

$-N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-$ (D');

그리고 나머지 두 개는 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로젠, 구아니디늄 $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, -SOR', -SO₂R', -SO₃H, -OSO₃H, -SO₂NR'R'', 시아노, 아지도, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''에서 각각 독립적으로 선택되며;

Z₁ 및 Z₂ 중 하나는 -C(=O)-이며, 다른 하나는 -NR₆-이며;

P₁은 아미노산 잔기 또는 2 ~ 20개 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드이며;

R_{x1}은 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알킬닐이며;

R^e는 -H, 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알킬닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ 이며, 이때 R^k는 -H, 임의선택적으로 2차 아미노 (가령, -NHR¹⁰¹) 또는 3차 아미노 (-NR¹⁰¹R¹⁰²) 기를 보유하는, 1 ~ 6개의 탄소 원자를 갖는 선형, 분기형 사이클릭 알킬, 또는 5-구성원 또는 6-구성원 질소 함유하는 헤테로사이클이며, 이때 R¹⁰¹ 및 R¹⁰²는 각각 독립적으로 선형, 분기형, 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알킬닐이며;

각 경우에서, R은 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 ~ 18개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 아릴, 임의선택적으로 치환된 5-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유), 또는 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 함유하는)으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며;

R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 그리고 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 갖는)로부터 선택되며;

R^c 는 -H 또는 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 선형 또는 분기형 알킬이며;

n은 1 ~ 24의 정수이고;

X_1 은 -H, 아민-보호기, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 ~ 18개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 아릴, 임의선택적으로 치환된 5-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유), 그리고 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 함유하는)으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며;

Y_1 은 -H, 옥소기, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 임의선택적으로 치환된 6-구성원 ~ 18-구성원의 아릴, 임의선택적으로 치환된 5-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유하는), 1 ~ 6개 헤테로원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환에서 선택되며;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' 및 R_4' 는 각각 독립적으로 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로젠, 구아니디늄 $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', -SO₂R', -SO₃H, -OSO₃H, -SO₂NR'R'', 시아노, 아지도, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로 구성된 군에서 선택되며;

R_6 은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, 또는 할로젠이며;

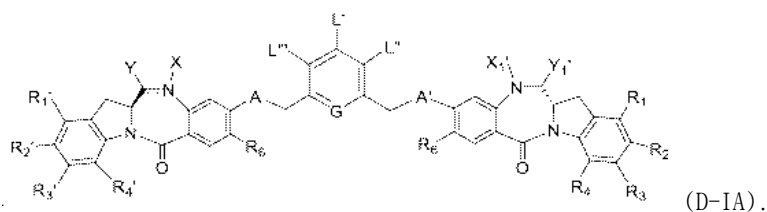
G는 -CH- 또는 -N-이며;

A 및 A'는 동일하거나 또는 상이하며, -O-, 옥소 (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ 및 -CRR'N(R₅)-로부터 독립적으로 선택되며; 그리고

각 경우에서, R_5 는 독립적으로 -H 또는 임의선택적으로 치환된 선형 또는 분기형 알킬이다.

청구항 68

청구항 67에 있어서, 이때 D는 다음 화학식으로 나타내거나, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:



청구항 69

청구항 67 또는 68에 있어서, 이때 X_1 은 -H, -OH, (C₁-C₃)알킬, 할로(C₁-C₃)알킬, 또는 페닐이며; 그리고 Y_1' 은 -H, 옥소기, (C₁-C₃)알킬 또는 할로(C₁-C₃)알킬인, 방법.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 이때 X_1 은 -H, -OH 또는 -Me이며; 그리고 Y_1 은 -H 또는 옥소인, 방법.

청구항 71

청구항 69에 있어서, 이때 X_1 은 -H이며; 그리고 Y_1 은 -H인, 방법.

청구항 72

청구항 67-71중 임의의 한 항에 있어서, 이때 A 및 A'는 동일하거나 또는 상이하며, -O- 및 -S-에서 선택되는, 방법.

청구항 73

청구항 72에 있어서, 이때 A 및 A'는 -O-인, 방법.

청구항 74

청구항 67-73중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R₆은 -OMe인, 방법.

청구항 75

청구항 67-74중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' 및 R₄'는 독립적으로 -H, 할로젠, -NO₂, -OH, (C₁-C₃)알킬, 할로(C₁-C₃)알킬 또는 (C₁-C₃)알콕시인, 방법.

청구항 76

청구항 75에 있어서, 이때 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' 및 R₄'는 모두 -H인, 방법.

청구항 77

청구항 67-76중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R, R', R'' 및 R₅는 각각 독립적으로 -H 또는 (C₁-C₃)알킬인, 방법

청구항 78

청구항 67 또는 68에 있어서, 이때:

R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' 및 R₄'는 모두 -H이고;

R₆은 -OMe이며;

X₁ 및 Y₁는 모두 -H이고; 그리고

A 및 A'는 -O-인, 방법.

청구항 79

청구항 67-78중 임의의 한 항에 있어서, 이때 L', L'' 및 L''' 중 하나는 화학식 (A') 또는 (D')으로 나타내며, 나머지 다른 것들은 -H, 1 ~ 6개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬, 할로젠, -OH, (C₁-C₆)알콕시, 또는 -NO₂인, 방법.

청구항 80

청구항 79에 있어서, 이때 L'은 화학식 (A')으로 나타내고; 그리고 L'' 및 L''' 는 모두 -H인, 방법.

청구항 81

청구항 79에 있어서, L'은 화학식 (D')으로 나타내고; 그리고 L'' 및 L''' 는 모두 -H인, 방법.

청구항 82

청구항 67-81중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R_{x1}은 할로젠, -OH, (C₁-C₃)알킬, (C₁-C₃)알콕시, 할로(C₁-C₃)알킬, 또는 하전된 치환체 또는 이온화가능한 기 Q로 임의선택적으로 치환된 선형, 1 ~ 6개 탄소 원자를 갖는 분기형 또는 사이클릭 알킬인, 방법.

청구항 83

청구항 67-82중 임의의 한 항에 있어서, 이때 L'은 다음의 식으로 나타내는, 방법:

$-NR_5-P_1-C(=O)-(CR_aR_b)_s-C(=O)- (B1')$;

$-NR_5-P_1-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{s1'}-C(=O)- (B2')$;

$-C(=O)-P_1-NR_5-(CR_aR_b)_s-C(=O)- (C1')$, 또는

$-C(=O)-P_1-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{s1'}-C(=O)- (C2')$

이때:

각 경우에서, R_a 및 R_b 는 각각 독립적으로 $-H$, (C_1-C_3) 알킬 또는 하전된 치환체 또는 이온화가능한 기 Q 이며;

s 는 1 ~ 6의 정수이고;

$s1'$ 은 0 또는 1 ~ 6의 정수이고; 그리고

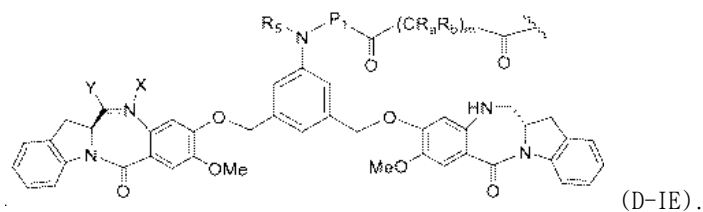
Cy 는 할로젠, $-OH$, (C_1-C_3) 알킬, (C_1-C_3) 알콕시, 또는 할로 (C_1-C_3) 알킬로 임의선택적으로 치환된, 5 또는 6개 탄소 원자를 갖는 사이클릭 알킬이다.

청구항 84

청구항 83에 있어서, 이때 화학식 (B2') 및 (C2')에서 Cy 는 사이클로헥산이며; 그리고 $s1'$ 은 0 또는 1인, 방법.

청구항 85

청구항 83에 있어서, 이때 D 는 다음 화학식으로 나타내거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:



청구항 86

청구항 83-85중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R_a 및 R_b 는 모두 H 이며; 그리고 R_5 는 H 또는 Me 인, 방법.

청구항 87

청구항 67-85중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 하전된 치환체 또는 이온화가능한 기 Q 는 i) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$, 또는 $-Z'-NR_{11}R_{12}$, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이거나; 또는, ii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 또는 $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 이며; Z' 는 임의선택적으로 치환된 알킬렌, 임의선택적으로 치환된 사이클로알킬렌 또는 임의선택적으로 치환된 페닐렌이며; $R_{14} \sim R_{16}$ 는 각각 독립적으로 임의선택적으로 치환된 알킬이며; 그리고 X^- 는 약제학적으로 수용가능한 음이온인, 방법.

청구항 88

청구항 87에 있어서, 이때 Q 는 $-SO_3H$ 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법.

청구항 89

청구항 67-88중 임의의 한 항에 있어서, 이때 P_1 은 2 ~ 10개 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드인, 방법.

청구항 90

청구항 89에 있어서, 이때 P_1 은 2 ~ 5개의 아미노산 잔기들을 함유하는 펩티드인, 방법.

청구항 91

청구항 89 또는 90에 있어서, 이때 P₁은 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드인, 방법.

청구항 92

청구항 89에 있어서, 이때 P₁은 중앙 조직에서 발현된 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드인, 방법.

청구항 93

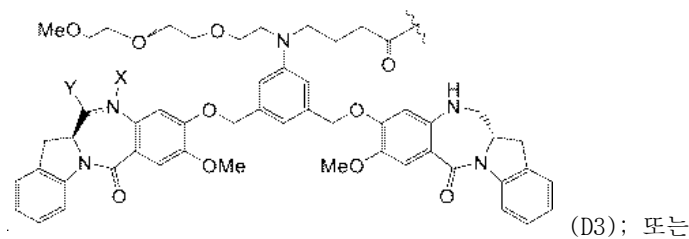
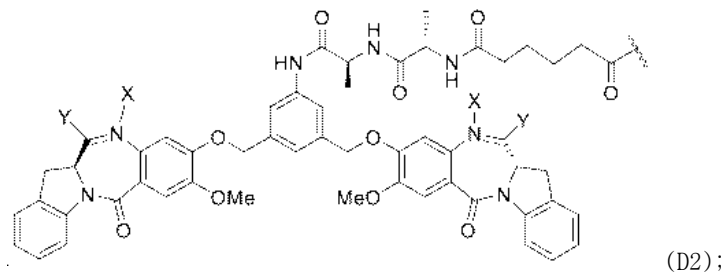
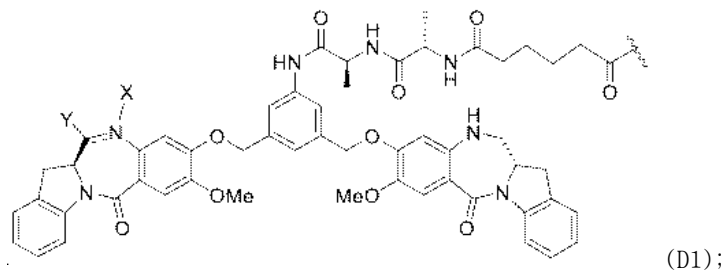
청구항 67-88중 임의의 한 항에 있어서, 이때 P₁은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁰-토실-Arg, Phe-N⁰-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 56), β-Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (서열 식별 번호: 58), Val-Arg, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe 및 Gln-Ala인, 방법.

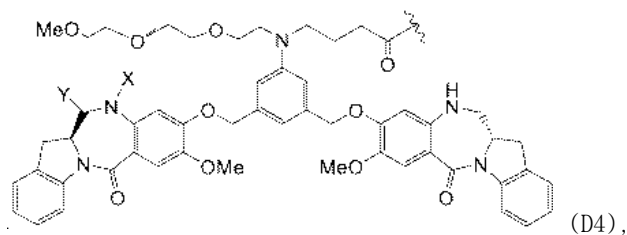
청구항 94

청구항 93에 있어서, 이때 P₁은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, 또는 D-Ala-D-Ala인, 방법.

청구항 95

청구항 67에 있어서, 이때 D는 다음의 구조 화학식으로 나타내거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:

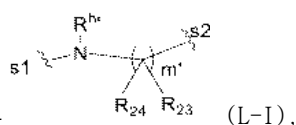




이때 N와 C 사이에 이중선 =은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며; 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이고, 그리고 Y는 -OH 또는 -SO₃H이거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이다.

청구항 96

청구항 67-95중 임의의 한 항에 있어서, 이때 -L-은 다음의 구조 화학식으로 나타내거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:



이때:

s1은 D에 공유적으로 연결된 부위이며; s2는 말레이미드기에 공유 결합된 부위이고;

각 경우에서 R₂₃ 및 R₂₄는 독립적으로 H 또는 임의선택적으로 치환된 알킬이며;

m'은 0 ~ 10 사이의 정수이고; 그리고

R^{h'}은 H 또는 임의선택적으로 치환된 알킬이다.

청구항 97

청구항 96에 있어서, 이때 R₂₃ 및 R₂₄는 모두 H이며; 그리고 m'은 1 ~ 6 사이의 정수인, 방법.

청구항 98

청구항 96 또는 97에 있어서, 이때 R^{h'}는 H인, 방법.

청구항 99

청구항 96에 있어서, 이때 L은 다음의 구조 화학식으로 나타내거나, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:

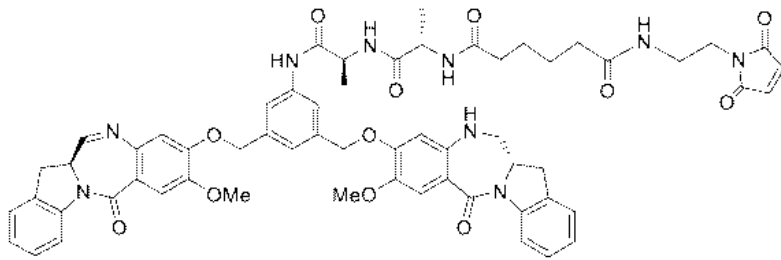


청구항 100

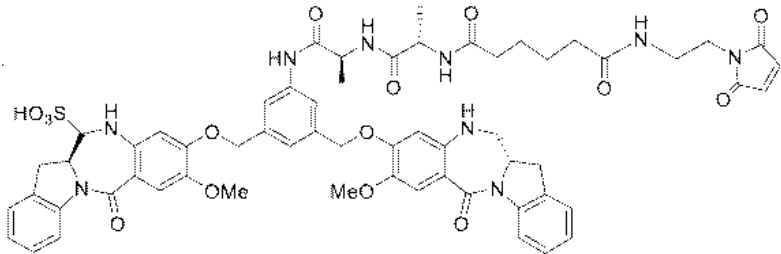
청구항 67-99중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 약제학적으로 수용가능한 염은 나트륨염 또는 칼륨 염인, 방법.

청구항 101

청구항 1-64중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 화합물은 다음의 식으로 나타내거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:



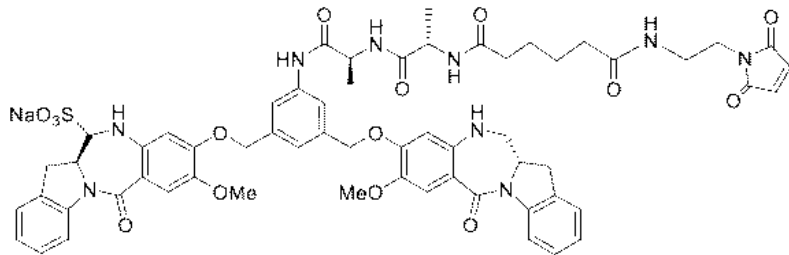
(I1), 또는



(I2).

청구항 102

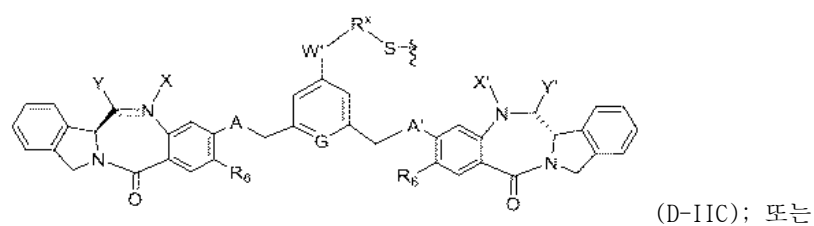
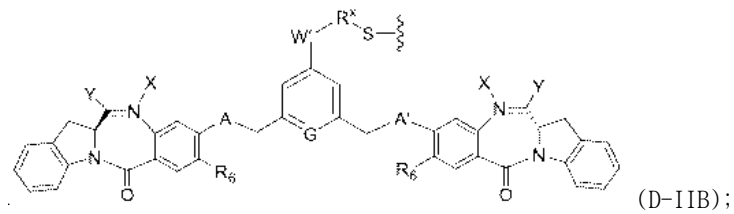
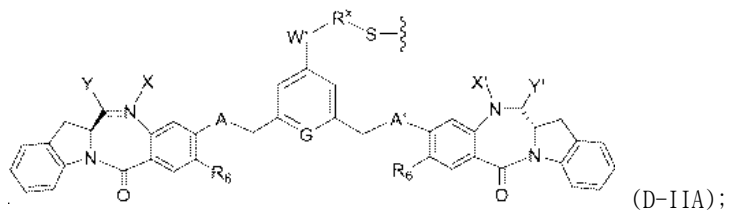
청구항 101에 있어서, 이때 상기 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 방법:

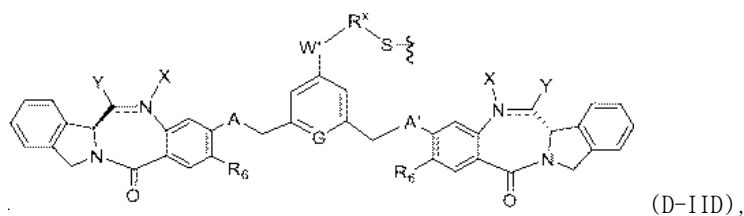


(I3).

청구항 103

청구항 1-64중 임의의 한 항에 있어서, 이때 D는 다음 화학식으로 나타내는, 방법:





이때:

N와 C 사이에 이중선 $=$ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H 또는 (C₁-C₄)알킬이며; 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H 또는 아민 보호 모이어티이며, Y는 -OH 또는 -SO₃H이며, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고;

X'는 -H, -OH, 치환된 또는 치환안된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 페닐, 및 아민-보호기로 구성된 군에서 선택되며;

Y'는 -H, 옥소기, 치환된 또는 치환안된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐로 구성된 군에서 선택되며;

A 및 A'는 -O- 및 -S-에서 선택되며;

W'는 존재하지 않거나, 또는 -O-, -N(R^c)-, -N(R^c)-C(=O)-, -N(C(=O)R^c)-, -S- 또는 -CH₂-S-, -CH₂NR^c-에서 선택되며;

R^x는 존재하지 않거나, 또는 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬에서 선택되며;

R^c는 -H, 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐 또는 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k이며, 이때 R^k는 -H, 임의 선택적으로 2차 아미노 (가령, -NHR¹⁰¹) 또는 3차 아미노 (-NR¹⁰¹R¹⁰²) 기를 보유하는, 1 ~ 6개의 탄소 원자를 갖는 선형, 분기형 사이클릭 알킬, 또는 5-구성원 또는 6-구성원의 질소 함유하는 헤테로사이클이며, 이때 R¹⁰¹ 및 R¹⁰²는 각각 독립적으로 선형, 분기형, 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐이며;

n은 1 ~ 24의 정수이고;

G는 -CH- 또는 -N-에서 선택되고;

R₆은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, 또는 할로젠이며; 그리고

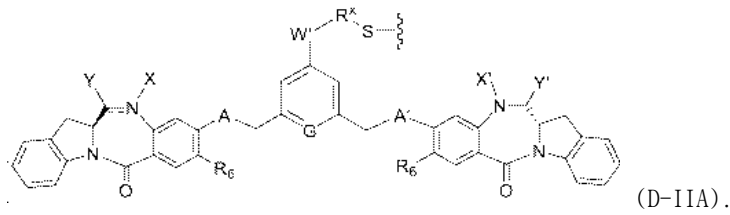
각 경우에서, R은 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 -(CH₂CH₂O)_n-R^c, 6 ~ 18개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 아릴, 임의선택적으로 치환된 5-구성원 ~ 18-구성원 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유), 또는 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 함유하는)으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며;

R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 -(CH₂CH₂O)_n-R^c, 그리고 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 갖는)로부터 선택되며;

R^c는 -H 또는 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 선형 또는 분기형 알킬이다.

청구항 104

청구항 103에 있어서, 이때 D는 다음의 구조 화학식으로 나타내거나, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인 방법:



청구항 105

청구항 103 또는 104에 있어서, 이때:

X' 및 Y'는 모두 -H이고;

A 및 A'는 모두 -O-이고;

R₆은 -OMe이고;

W'는 -N(R^e)- 또는 -N(R^e)-C(=O)-이며;

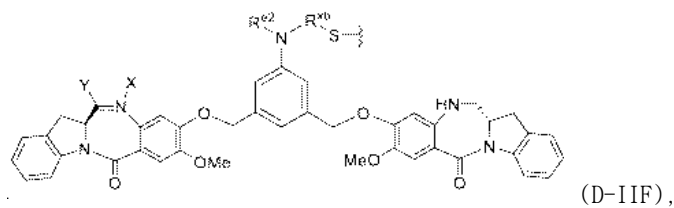
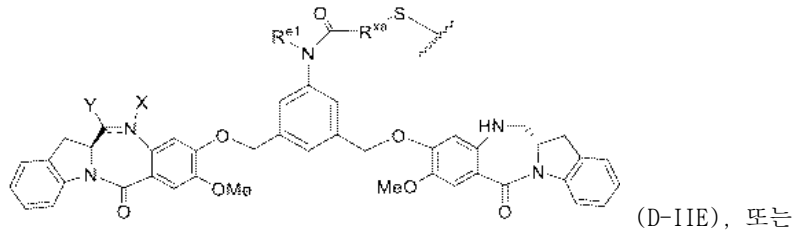
R^e는 -H, 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬 또는 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k이며, 이때 R^k는 -H, 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬이며;

n은 2 ~ 6의 정수이고; 그리고

R^x는 1 ~ 6개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬이다.

청구항 106

청구항 103에 있어서, 이때 D는 다음의 구조 화학식으로 나타내는, 방법:



이때:

R^{e1}은 H 또는 (C₁-C₆)알킬이며;

R^{xa}는 (C₁-C₆)알킬이며;

R^{e2}는 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k이며;

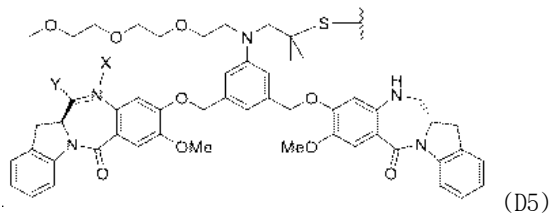
n은 2 ~ 6의 정수이고;

R^k는 -H 또는 -Me이며; 그리고

R^{xb}는 (C₁-C₆)알킬이다.

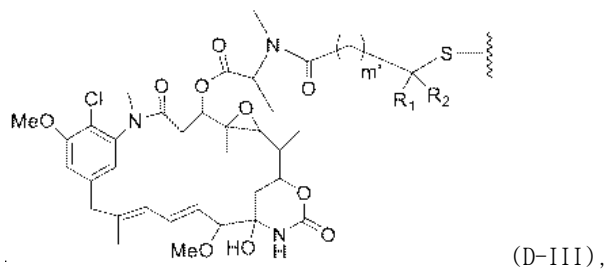
청구항 107

청구항 106에 있어서 이때 D는 다음 화학식으로 나타내거나, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:



청구항 108

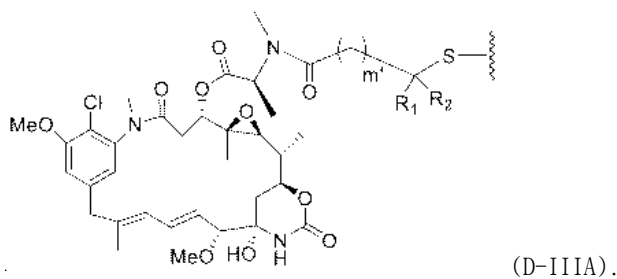
청구항 1-64중 임의의 한 항에 있어서, 이때 D는 다음 화학식으로 나타내는, 방법:



이때 m'는 1 또는 2 이며; 그리고 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 -H 또는 (C1-C3)알킬이다.

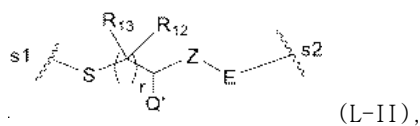
청구항 109

청구항 108에 있어서, 이때 D는 다음 화학식으로 나타내는, 방법:



청구항 110

청구항 103-109중 임의의 한 항에 있어서, 이때 L은 다음의 구조 화학식으로 나타내는, 방법:



s1은 D에 공유적으로 연결된 부위이며, 그리고 s2는 말레이미드기에 공유 결합된 부위이고;

E는 -(CR₁₀R₁₁)_q-, 사이클로알킬, 또는 사이클로알킬알킬이며;

Z는 존재하지 않음, -SO₂NR₉-, -NR₉SO₂-, -C(=O)-NR₉-, -NR₉-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-NR₉-(CH₂CH₂O)_p-, -NR₉-C(=O)-(CH₂CH₂O)_p-, -(OCH₂CH₂)_p-C(=O)NR₉-, 또는 -(OCH₂CH₂)_p-NR₉-C(=O)-이며;

p는 1 ~ 24의 정수이고;

Q는 H, 하전된 치환체, 또는 이온화가능한 기이며;

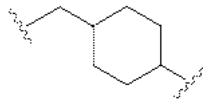
R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, 및 R₁₃은 각 경우에서, 독립적으로 H 또는 임의선택적으로 치환된 알킬이며; 그리고,

q 및 r은 각 경우에서, 독립적으로 0 ~ 10 사이의 정수인, 방법.

청구항 111

청구항 110에 있어서, 이때 E는 $-(CR_{10}R_{11})_q-$ 인, 방법.

청구항 112



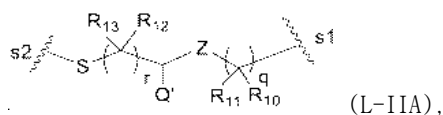
청구항 111에 있어서, 이때 E는 . 인, 방법.

청구항 113

청구항 110-112중 임의의 한 항에 있어서, 이때 Z는 $-C(=O)-NR_9-$ 또는 $-NR_9-C(=O)-$ 인, 방법.

청구항 114

청구항 110에 있어서, 이때 L은 다음의 구조 화학식으로 나타내는, 방법:



이때 R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , 및 R_{13} 은 각 경우에서, 독립적으로 -H 또는 (C_1-C_3) 알킬이다.

청구항 115

청구항 110-114중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R_9 는 -H인, 방법.

청구항 116

청구항 110-115중 임의의 한 항에 있어서, 이때 Q'는 다음과 같은, 방법:

i) H이고;

ii) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$, 또는 $-Z'-NR_{14}R_{15}$, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고; 또는,

iii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 또는 $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 이고;

이때 Z'는 임의선택적으로 치환된 알킬렌, 임의선택적으로 치환된 사이클로알킬렌, 또는 임의선택적으로 치환된 페닐렌이며;

R_{14} , R_{15} 및 R_{16} 은 각각 독립적으로 임의선택적으로 치환된 알킬이며; 그리고,

X^- 는 약제학적으로 수용가능한 음이온이다.

청구항 117

청구항 116에 있어서, 이때 Q'는 H 또는 $-SO_3H$ 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법.

청구항 118

청구항 110-117중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , 및 R_{13} 는 모두 H이고; 그리고 q 및 r은 각각 독립적으로 1 ~ 6 사이의 정수인, 방법.

청구항 119

청구항 114에 있어서, 이때:

R_{12} 및 R_{13} 은 각 경우에서, 각각 독립적으로 H 또는 (C_1-C_3) 알킬이며;

Q는 H 또는 $-SO_3H$ 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고,

Z는 $-C(=O)-NR_9-$ 또는 $-NR_9-C(=O)-$ 이며;

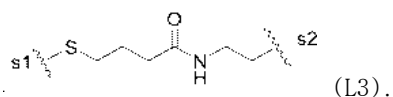
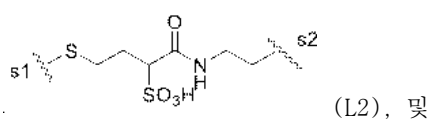
R_9 는 H 또는 (C_1-C_3) 알킬이며;

R_{10} 및 R_{11} 은 각 경우에서, 독립적으로 H 또는 (C_1-C_3) 알킬이며; 그리고

q 및 r은 각각 1 ~ 5 사이의 정수인, 방법.

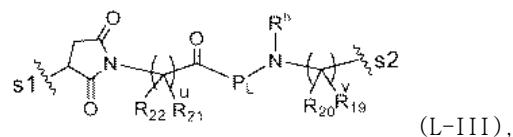
청구항 120

청구항 119에 있어서, 이때 L은 다음 구조 화학식중 임의의 하나로 나타내거나, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:



청구항 121

청구항 103-109중 임의의 한 항에 있어서, 이때 L은 다음의 구조 화학식으로 나타내는, 방법:



청구항 124

청구항 123에 있어서, 이때 P_L 은 2 ~ 5개의 아미노산 잔기들을 함유하는 펩티드인, 방법.

청구항 125

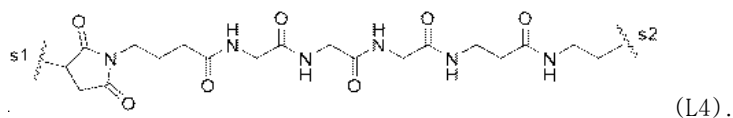
청구항 110에 있어서, 이때 P_L 은 다음으로 구성된 군에서 선택되는, 방법: Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Cit-Val, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-토실-Arg, Phe-N⁹-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 55), β -Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 56), Gly-Phe-Leu-Gly (서열 식별 번호: 57), Val-Arg, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala., Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe, Gln-Ala, Gly-Gly-Gly, Ala-Ala-Ala, D-Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala-D-Ala, Ala-Val-Cit, Ala-Val-Ala, 및 β -Ala-Gly-Gly-Gly(서열 식별 번호: 58).

청구항 126

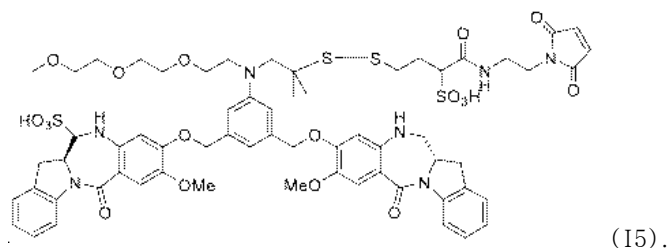
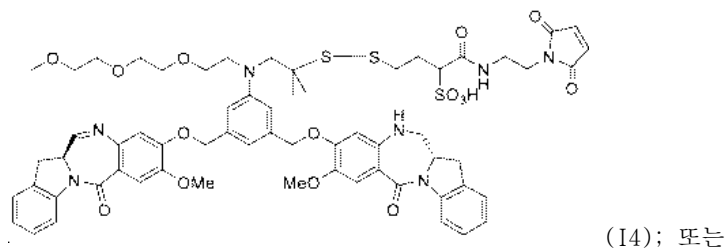
청구항 125에 있어서, 이때 P_L 은 Gly-Gly-Gly, Ala-Ala-Ala, D-Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Val-Ala, 또는 β -Ala-Gly-Gly-Gly인, 방법.

청구항 127

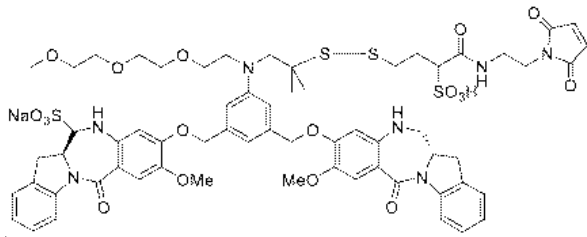
청구항 121에 있어서, 이때 L은 다음의 구조 화학식으로 나타내거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:

**청구항 128**

청구항 1-64중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:

**청구항 129**

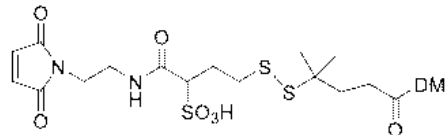
청구항 128에 있어서, 이때 상기 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 방법:



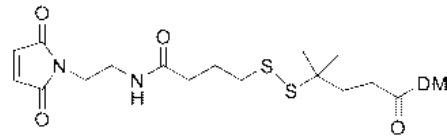
(I6).

청구항 130

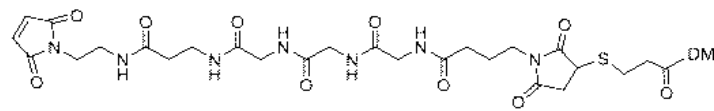
청구항 1-64중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내거나 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염인, 방법:



(I7);

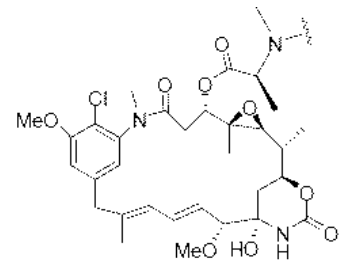


(I8); 또는



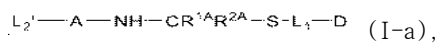
(I9)

이때 DM은 다음 화학식으로 나타낸 약물 모이어티이다:



청구항 131

청구항 1-64중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 방법:



이때:

L_2' 는 말레이미드 모이어티를 품고 있는 스페이서이며;

A는 아미노산 또는 2 내지 20개 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드이며;

R^{1A} 및 R^{2A} 는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-3} 알킬이며;

L_1 은 스페이서이며; 그리고

D- L_1 -SH는 세포독성 제제다.

청구항 132

청구항 131에 있어서, 이때 R^{1A} 및 R^{2A} 중 적어도 하나는 H인, 방법.

청구항 133

청구항 131에 있어서, 이때 R^{1A} 및 R^{2A} 는 각각 독립적으로 H 또는 Me인, 방법.

청구항 134

청구항 131에 있어서, 이때 R^{1A} 및 R^{2A} 중 하나는 H이고, 그리고 다른 하나는 Me인, 방법.

청구항 135

청구항 133에 있어서, 이때 R^{1A} 및 R^{2A} 는 모두 H인, 방법.

청구항 136

청구항 131-135중 임의의 한 항에 있어서, 이때 L_1 은 $-L_1'-C(=O)-$ 이며; 그리고 L_1' 은 알킬렌 또는 사이클로알킬렌인, 방법.

청구항 137

청구항 136에 있어서, 이때 L_1' 은 C_{1-10} 알킬렌인, 방법.

청구항 138

청구항 137에 있어서, 이때 L_1 은 $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$ 이며; R^{3A} 및 R^{4A} 는 각각 독립적으로 H 또는 Me인, 방법.

청구항 139

청구항 138에 있어서, 이때 L_1 은 $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{3-5}-C(=O)-$ 인, 방법.

청구항 140

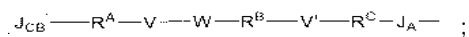
청구항 138 또는 139에 있어서, 이때 R^{3A} 및 R^{4A} 는 모두 Me인, 방법.

청구항 141

청구항 139에 있어서, 이때 L_1 은 $-(CH_2)_{4-6}-C(=O)-$ 인, 방법.

청구항 142

청구항 131-141중 임의의 한 항에 있어서, 이때 L_2' 는 다음의 구조 화학식으로 나타내는, 방법:



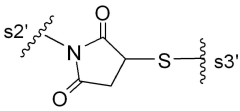
이때:

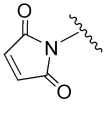
R^A 는 알킬렌, 사이클로알킬알킬렌 또는 아릴렌이며;

R^B 및 R^C 는 각각 독립적으로 존재하지 않음, 알킬렌, 시클알킬렌, 또는 아릴렌이며;

V 및 V' 는 각각 독립적으로 $-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$, 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_{p1}-$ 이며;

$p1$ 는 0 또는 1 ~ 10의 정수이고;

W는 존재하지 않음, , $s2' \text{---} \text{C}(=\text{O})\text{---}\text{NH}\text{---} s3'$ 또는 $s2' \text{---} \text{NH}\text{---}\text{C}(=\text{O})\text{---} s3'$ 이며, 이때 $s2'$ 는 V, R^A 또는 J_{CB}'에 연결된 부위를 나타내고, $s3'$ 는 R^B, V', R^C 또는 J_A에 연결된 부위를 나타내고;

 J_{CB}'는 이며; 그리고

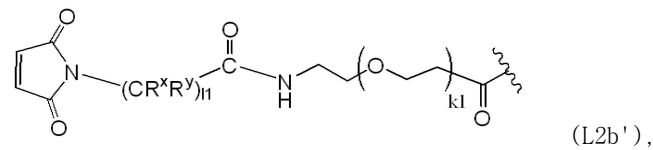
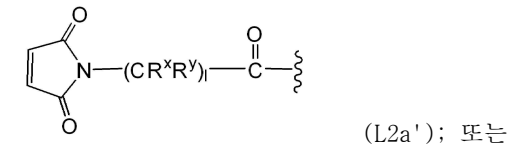
J_A는 -C(=O)-이다.

청구항 143

청구항 142에 있어서 이때 p1은 0이고, R^C는 존재하지 않는, 방법.

청구항 144

청구항 131-142중 임의의 한 항에 있어서, 이때 L₂'는 다음의 구조 화학식으로 나타내는, 방법:



이때:

R^x 및 R^y은 각 경우에서, 독립적으로 H, -OH, 할로젠, -O-(C₁₋₄ 알킬), -SO₃H, -NR₄₀R₄₁R₄₂⁺, 또는 -OH, 할로젠, -SO₃H 또는 NR₄₀R₄₁R₄₂⁺로 임의선택적으로 치환된 C₁₋₄ 알킬이며, 이때 R₄₀, R₄₁ 및 R₄₂는 각각 독립적으로 H 또는 C₁₋₄ 알킬이며;

l 및 11은 각각 독립적으로 1 ~ 10의 정수이며;

kl 1 ~ 12의 정수이다.

청구항 145

청구항 144에 있어서, 이때 R^x 및 R^y는 모두 H인, 방법.

청구항 146

청구항 144 또는 145에 있어서, 이때 l 및 11은 각각 2 ~ 6 사이의 정수인, 방법.

청구항 147

청구항 131-146중 임의의 한 항에 있어서, 이때 A는 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드인, 방법.

청구항 148

청구항 126에 있어서, 이때 A는 중앙 조직에서 발현된 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드인, 방법.

청구항 149

청구항 131-146중 임의의 한 항에 있어서, 이때 A는 Ala, Arg, Asn, Asp, Cit, Cys, 셀리노-Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 및 Val (각각 독립적으로 L-또는 D-이성질체임)로 구성된 군에서 선택되며, $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 에 공유적으로 연계된 아미노산을 갖는 펩티드인, 방법.

청구항 150

청구항 131-149중 임의의 한 항에 있어서, 이때 $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 에 연계된 아미노산은 L 아미노산인, 방법.

청구항 151

청구항 147-150중 임의의 한 항에 있어서, 이때 A는 2 ~ 5개의 아미노산 잔기들을 함유하는 펩티드인, 방법.

청구항 152

청구항 131-147중 임의의 한 항에 있어서, 이때 A는 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, D-Val-Ala, Val-Cit, D-Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-토실-Arg, Phe-N⁹-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Ala-Ala, D-Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala-D-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 56), β -Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (서열 식별 번호: 58), Val-Arg, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe, Gln-Ala, D-Ala-Pro, 및 D-Ala-tBu-Gly로 구성된 군에서 선택되며, 이때 각 펩티드의 첫 번째 아미노산은 L₂ 기에 연결되며, 각 펩티드의 마지막 아미노산 $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 에 연결되는, 방법.

청구항 153

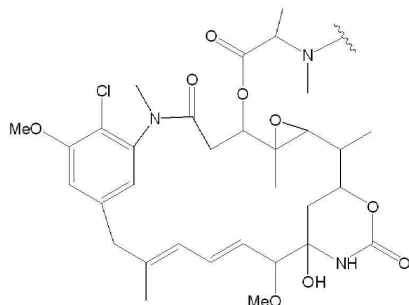
청구항 152에 있어서, 이때 A는 Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, 또는 D-Ala-tBu-Gly인, 방법.

청구항 154

청구항 131-153중 임의의 한 항에 있어서, 이때 D는 메이탄시노이드인, 방법.

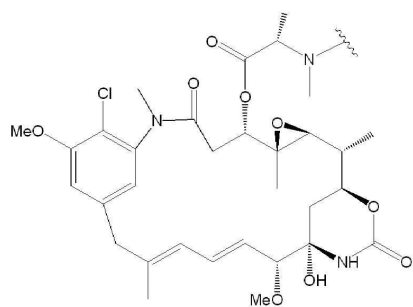
청구항 155

청구항 154에 있어서, 이때 D는 다음 화학식으로 나타내는, 방법:



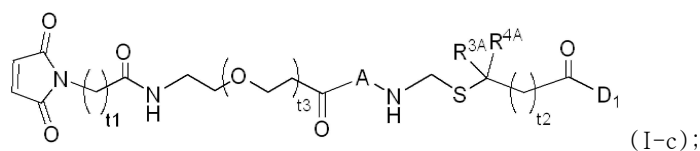
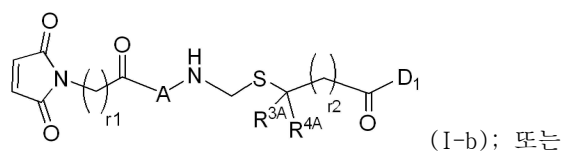
청구항 156

청구항 155에 있어서, 이때 D는 다음 화학식으로 나타내는, 방법:



청구항 157

청구항 131-154중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 방법:



이때:

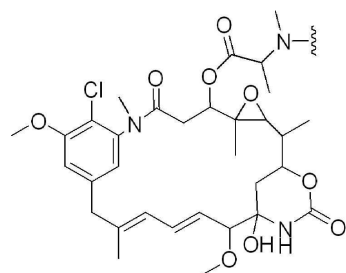
R^{3A} 및 R^{4A} 는 각각 독립적으로 H 또는 Me이고;

$r1$ 및 $t1$ 은 각각 독립적으로 1 ~ 6의 정수이며;

$r2$ 및 $t2$ 는 각각 독립적으로 1 ~ 7의 정수이며;

$t3$ 은 1 ~ 12의 정수이며;

D_1 은 다음의 식으로 나타낸다:



청구항 158

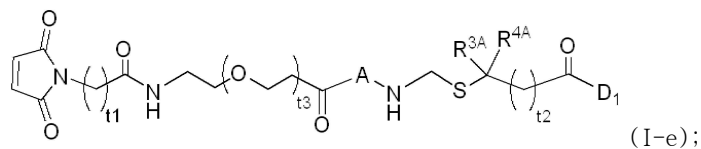
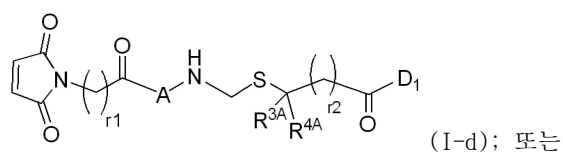
청구항 157에 있어서, 이때 A는 Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, 또는 D-Ala-tBu-Gly인, 방법.

청구항 159

청구항 157 또는 158에 있어서, 이때 $r1$ 은 2 ~ 4의 정수이며; 그리고 $r2$ 는 3 ~ 5의 정수인, 방법.

청구항 160

청구항 159에 있어서, 이때 상기 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 방법:



이때:

r1 및 t1은 각각 2 ~ 6의 정수이며;

r2 및 t2는 각각 2 ~ 5의 정수이며; 그리고

t3는 각각 2 ~ 12의 정수이다.

청구항 161

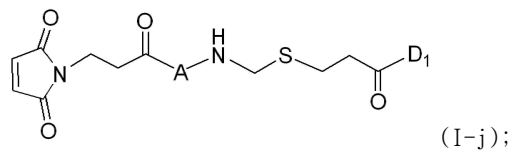
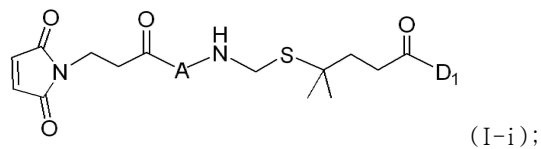
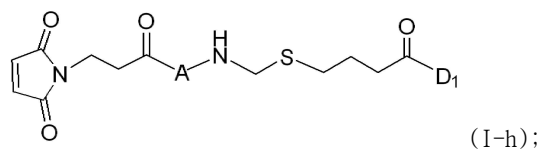
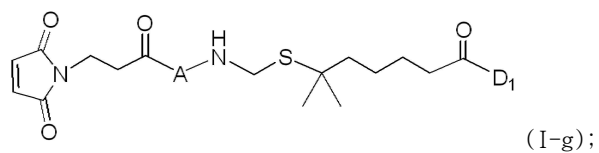
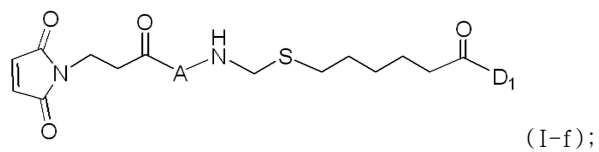
청구항 157-160중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R^{3A} 및 R^{4A}는 모두 Me인, 화합물.

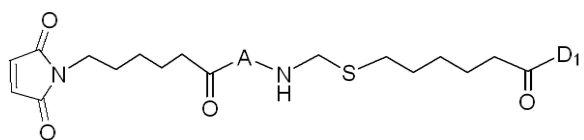
청구항 162

청구항 157-160중 임의의 한 항에 있어서, 이때 R^{3A} 및 R^{4A}는 모두 H인, 화합물.

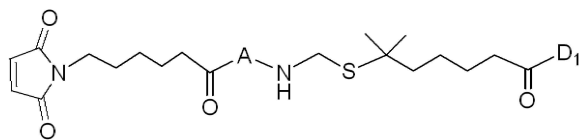
청구항 163

청구항 157에 있어서, 이때 상기 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 화합물:

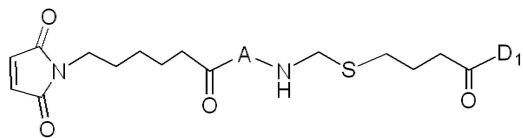




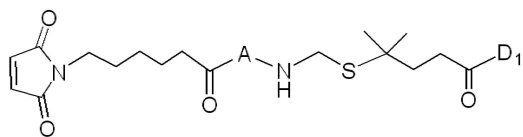
(I-k);



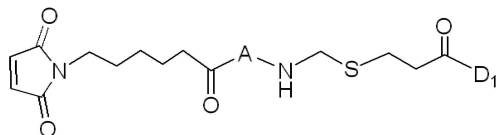
(I-l);



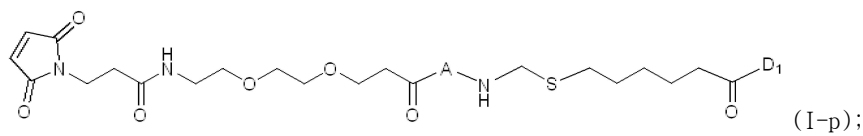
(I-m);



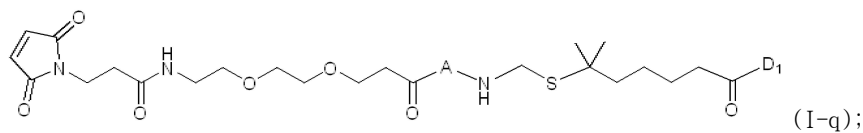
(I-n);



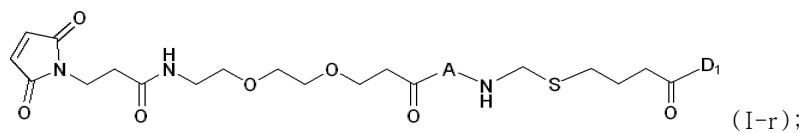
(I-o);



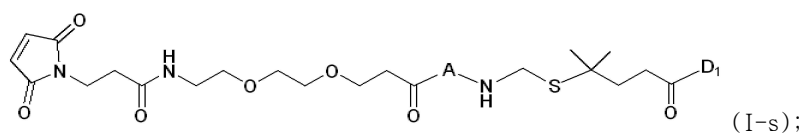
(I-p);



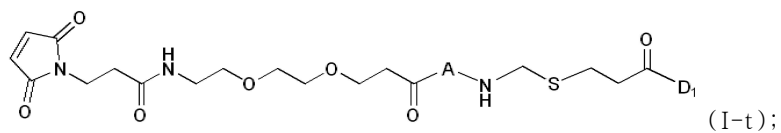
(I-q);



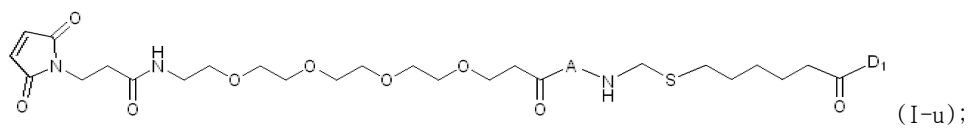
(I-r);



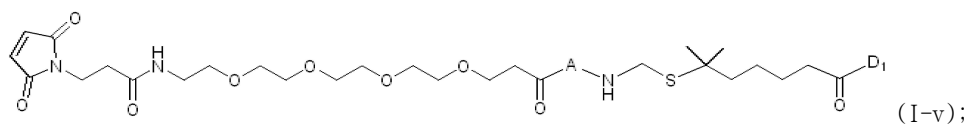
(I-s);



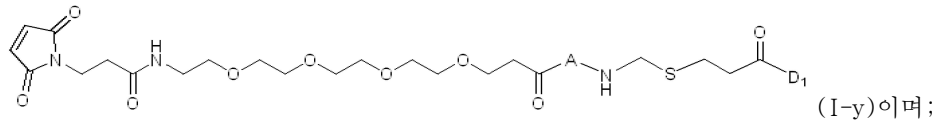
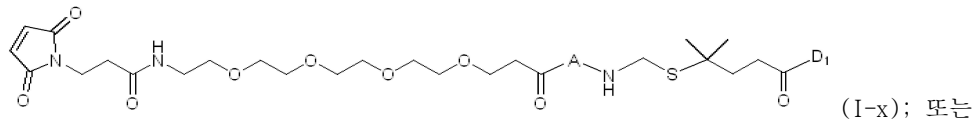
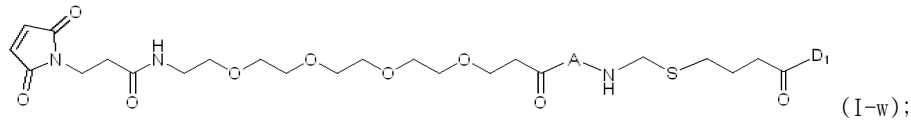
(I-t);



(I-u);



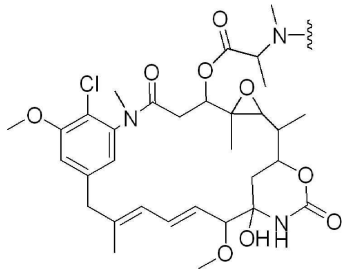
(I-v);



이때:

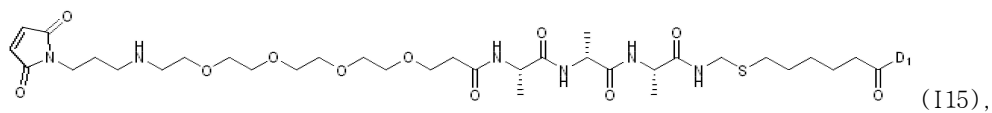
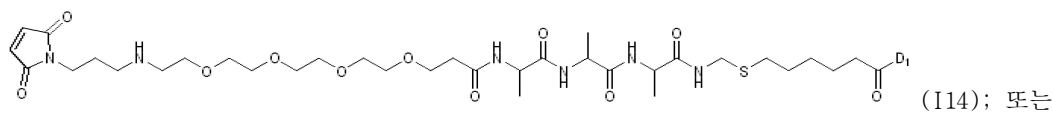
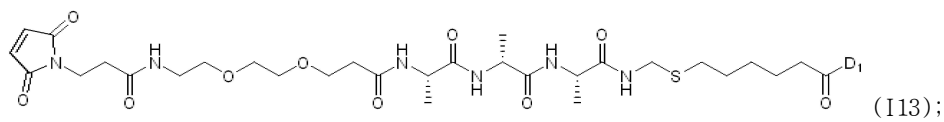
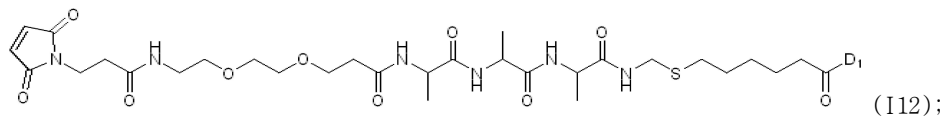
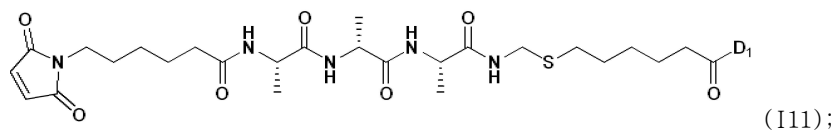
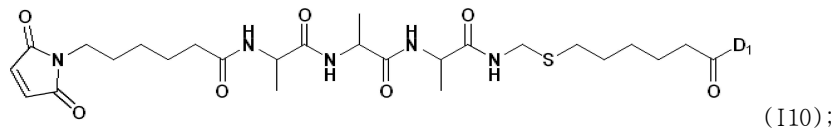
A는 Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, 또는 D-Ala-tBu-Gly이며; 그리고

D₁은 다음의 식으로 나타낸다:

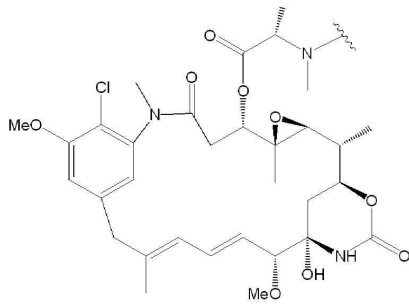


청구항 164

청구항 163에 있어서, 이때 상기 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 방법:

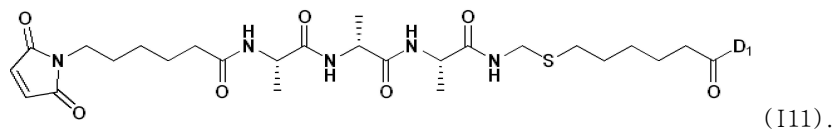


이때 D₁은 다음의 식으로 나타낸다:



청구항 165

청구항 164에 있어서, 이때 상기 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내는, 방법:



청구항 166

청구항 23-165중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항-엽산 수용체 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-EGFR 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-CD19 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-Muc1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-CD37 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-cMet 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

청구항 167

청구항 23-165중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 시스테인-공작된 항체 또는 항원-결합 단편은 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

청구항 168

청구항 167에 있어서, 이때 상기 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 a) 서열 식별 번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H1}, 서열 식별 번호: 5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H2}, 및 서열 식별 번호: 6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H3}을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 그리고 b) 서열 식별 번호: 1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{L1}, 서열 식별 번호: 2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{L2}, 및 서열 식별 번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{L3}을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 169

청구항 167에 있어서, 이때 상기 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 식별 번호: 7의 V_H 서열과 서열 식별 번호: 9의 V_L 서열을 포함하는, 방법.

청구항 170

청구항 167에 있어서, 이때 상기 항-CD123 항체는 다음을 포함하는, 방법: (a) 서열 식별 번호: 8에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄, 그리고

b) 서열 식별 번호: 10에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄.

청구항 171

청구항 23-165중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

청구항 172

청구항 171에 있어서, 이때 상기 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 ADAM9 및 cyno ADAM9에 특이적으로 결합하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

청구항 173

청구항 172에 있어서, 이때 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 a) 서열 식별 번호: 24에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H1}, 서열 식별 번호: 25에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H2}, 및 서열 식별 번호: 26에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H3}을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역; 그리고 b) 서열 식별 번호: 21에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{L1}, 서열 식별 번호: 22에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{L2}, 및 서열 식별 번호: 23에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{L3}을 포함하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 174

청구항 172 또는 173에 있어서, 이때 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 식별 번호: 27의 중쇄 가변 도메인 (V_H) 서열과 서열 식별 번호: 28의 경쇄 가변 도메인 (V_L) 서열을 포함하는, 방법.

청구항 175

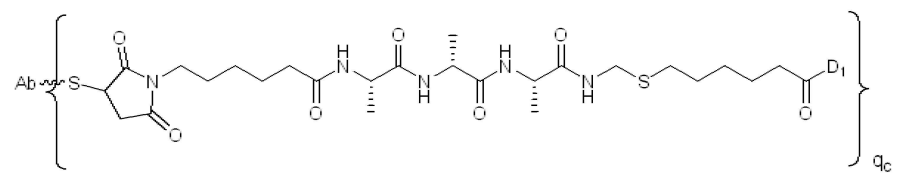
청구항 174에 있어서, 이때 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 식별 번호: 29에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄; 그리고 서열 식별 번호: 30에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는, 방법.

청구항 176

청구항 171-175중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 ADAM9-이의 결합 단편은 키메라 또는 뮤린 부계 항체와 비교하였을 때, cyno ADAM9에 대한 결합 친화력은 적어도 100-배 강화되고, 인간 ADAM9에 대해 높은 결합 친화력을 유지하도록 최적화되는, 방법.

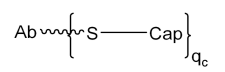
청구항 177

다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 방법:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

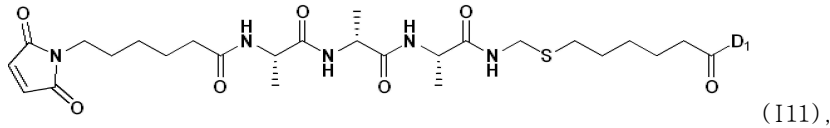
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썬워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고:



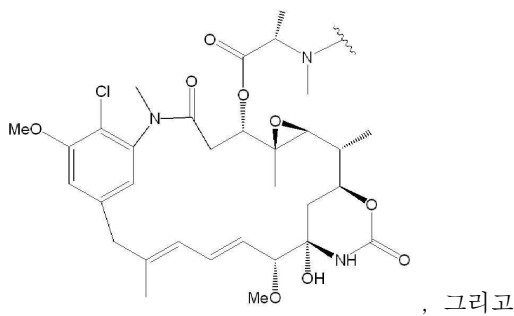
이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며,

이때:

Ab~S—는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인, 및 CDR_{H3} 도메인, 그리고 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인, 및 CDR_{L3} 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

q_c는 1 또는 2이며;

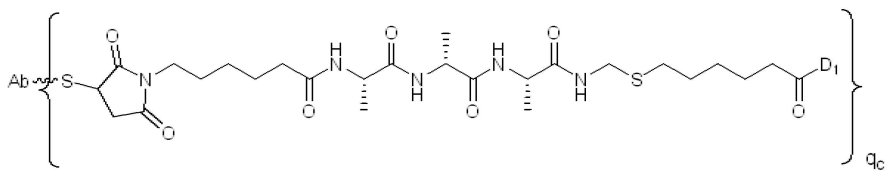
D₁은 다음의 식으로 나타낸다:



Cap는 캡핑제다.

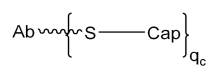
청구항 178

다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

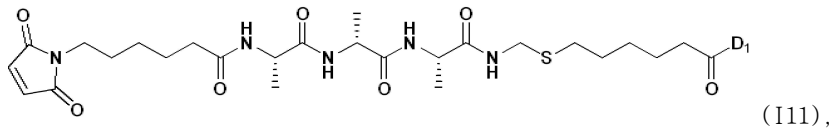
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썬워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고:



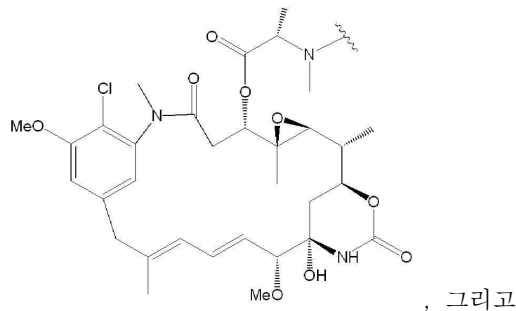
이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행되며, 그리고

이때:

Ab~S—는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인, 및 CDR_{H3} 도메인, 그리고 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인, 및 CDR_{L3} 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

q_c는 1 또는 2이며;

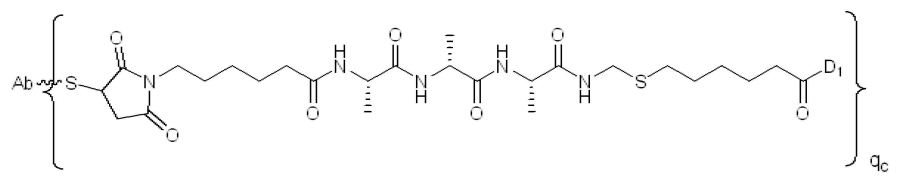
D₁은 다음의 식으로 나타낸다:



Cap는 캡핑제다.

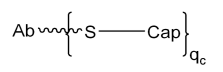
청구항 179

다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

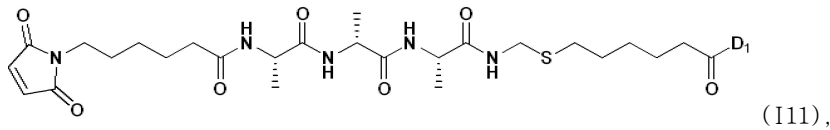
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썬워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며;

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고:



이로 인하여 ADC가 형성되며; 그리고

(d) 콘쥬게이트안된 화학식 (I11)의 화합물을 제거하고;

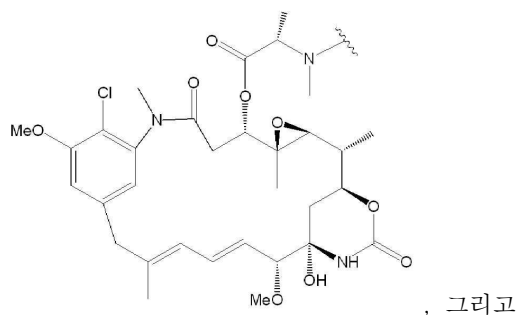
이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (d)는 연속적으로 수행되며, 그리고

이때:

Ab~S—는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인, 및 CDR_{H3} 도메인, 그리고 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인, 및 CDR_{L3} 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

q_c는 1 또는 2이며;

D₁은 다음의 식으로 나타내며:



Cap는 캡핑제다.

청구항 180

청구항 179에 있어서, 이때 해당 방법은 상기 콘쥬게이트를 안정적 완충액으로 교환하는 단계 (e)를 더 포함하는, 방법.

청구항 181

청구항 180에 있어서, 이때 단계 (e)는 연속적으로 수행되는, 방법.

청구항 182

청구항 179-181중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF) 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여, 상기 콘쥬게이트안된 화학식 (I)의 화합물 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환하는, 방법.

청구항 183

청구항 179-182중 임의의 한 항에 있어서, 이때 역전류 정용여과를 이용하여, 단계 (d)에서 콘쥬게이트안된 화학식 (I)의 화합물을 제거하는, 방법.

청구항 184

청구항 178-183에 있어서, 이때 단계 (a)에서, 상기 반응 혼합물이 연속적으로 회수되고, 유동 반응기를 통해

공급되는 동안 cCysAb 및 환원 제제를 연속적으로 상기 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 185

청구항 184에 있어서, 이때 유동상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가하는 상기 환원 제제 및 cCysAb의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 186

청구항 178-185중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b)에서, 상기 반응 혼합물이 연속적으로 회수되고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안 상기 환원된 항체 및 선택적 산화 제제를 연속적으로 상기 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 187

청구항 186에 있어서, 이때 상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가하는 환원된 항체 및 선택적 산화 제제의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 188

청구항 178-187중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (c)에서, 상기 반응 혼합물을 반응 용기로부터 연속적으로 회수하고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안, CysAb 및 화학식 (I11)의 화합물을 연속적으로 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 189

청구항 188에 있어서, 이때 상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가되는 CysAb 및 화학식 (I11)의 화합물의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 190

청구항 182-189중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 반응 용기는 연속적으로 교반되는 탱크 반응기 (CSTR)인, 방법.

청구항 191

청구항 182-190중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 유동 반응기는 플러그 유동 반응기 (PFR)인, 방법.

청구항 192

청구항 177-191중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 ADAM9-이의 결합 단편은 서열 식별 번호:27 및 서열 식별 번호:28의 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 (V_H)과 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함하는, 방법.

청구항 193

청구항 177-191중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 인간화된 항-ADAM9 항체는 차례로, 서열 식별 번호:29 및 서열 식별 번호:30의 서열을 갖는 중쇄와 경쇄를 포함하는, 방법.

청구항 194

청구항 177-193중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 DPPA인, 방법.

청구항 195

청구항 194에 있어서, 이때 단계 (a)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 10 ~ 20 몰 당량의 DPPA가 이용되는, 방법.

청구항 196

청구항 194에 있어서, 이때 단계 (a)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 15 ~ 17 몰 당량의 DPPA가 이용되는, 방법.

청구항 197

청구항 194에 있어서, 이때 단계 (a)에서 cCysAb의 각 1 당량에 대해 16 당량의 DPPA가 이용되는, 방법.

청구항 198

청구항 177-197중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (a)에서 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 또는 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행되는, 방법.

청구항 199

청구항 198에 있어서, 이때 단계 (a)에서 반응은 pH 6.5에서 실행되는, 방법.

청구항 200

청구항 177-199중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 산화 제제는 DHAA인, 방법.

청구항 201

청구항 200에 있어서, 이때 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 20 ~ 30 몰 당량의 DHAA가 이용되는, 방법.

청구항 202

청구항 200에 있어서, 이때 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 23 ~ 25 몰 당량의 DHAA가 이용되는, 방법.

청구항 203

청구항 200에 있어서, 이때 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 24 몰 당량의 DHAA가 이용되는, 방법.

청구항 204

청구항 177-203중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b)에서 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 또는 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행되는, 방법.

청구항 205

청구항 204에 있어서, 이때 단계 (b)에서 반응은 pH 6.5에서 실행되는, 방법.

청구항 206

청구항 177-205중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (c)에서 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 또는 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행되는, 방법.

청구항 207

청구항 206에 있어서, 이때 단계 (c)에서 반응은 pH 6.5에서 실행되는, 방법.

청구항 208

청구항 177-207중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (c)에서 CysAb의 각 당량에 대해 2 ~ 10 몰 당량의 화학식 (I11)의 화합물이 이용되는, 방법.

청구항 209

청구항 208에 있어서, 이때 CysAb의 각 당량에 대해 4.6 몰 당량의 화학식 (I11)의 화합물이 이용되는, 방법.

청구항 210

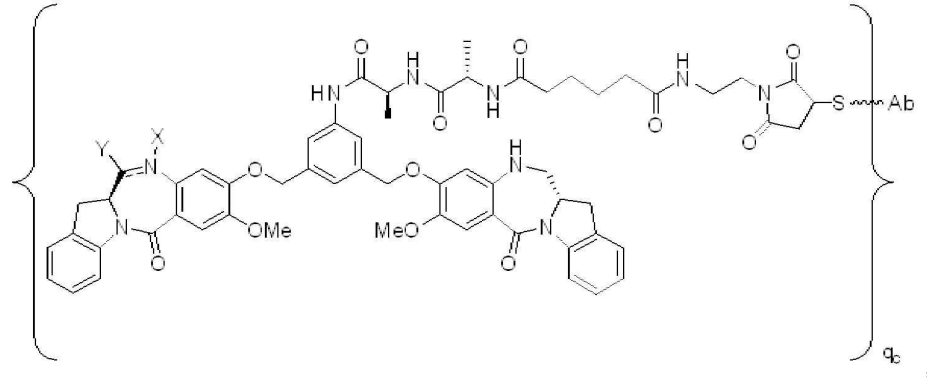
청구항 177-209중 임의의 한 항에 있어서, 이때 Cap은 시스테인, 글루타티온 또는 이의 조합인, 방법.

청구항 211

청구항 177-210중 임의의 한 항에 있어서, 이때 q_c 는 2인, 방법.

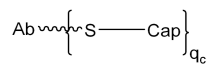
청구항 212

다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 방법:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

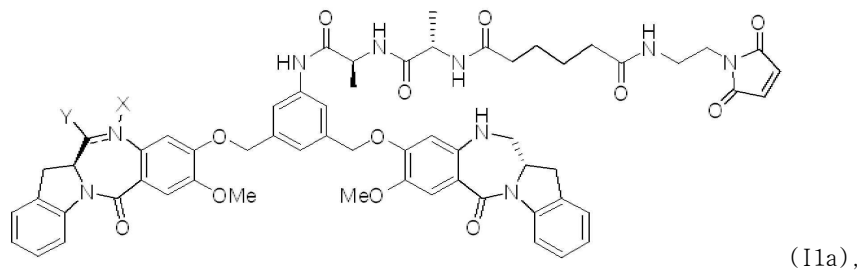
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



(IIa),

이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때: N과 C 사이의 이중선 ==은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 $-\text{SO}_3\text{M}$ 이며, 그리고 M은 H^+ 또는 양이온이며;

$\text{Ab} \sim \text{S} -$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H1}, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H2}, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_{H3}을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가

변 영역; 그리고

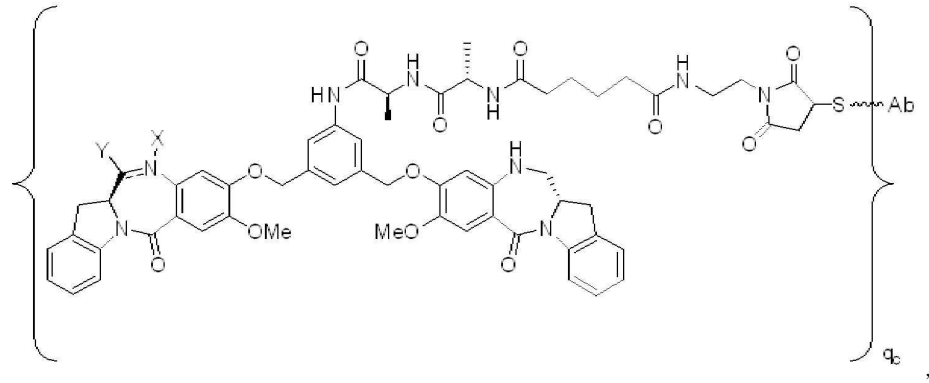
b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가변 영역;

q_c는 1 또는 2이며; 그리고

Cap는 캡핑제다.

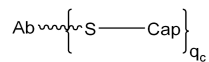
청구항 213

다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

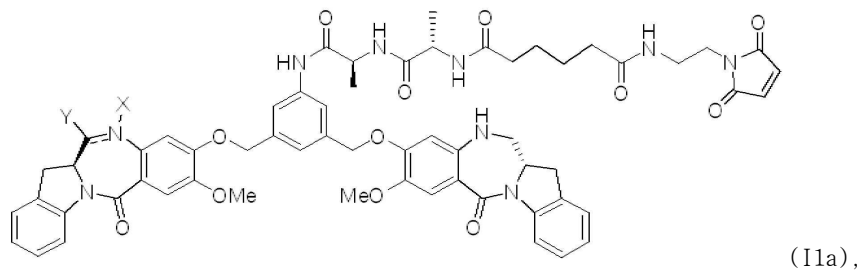
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썬워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



(IIa),

이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며; 그리고 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행되며,

이때:

N과 C 사이의 이중선 ==은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 -SO₃M이며, 그리고 M은 H⁺ 또는 양

이온이며;

$Ab \sim S$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

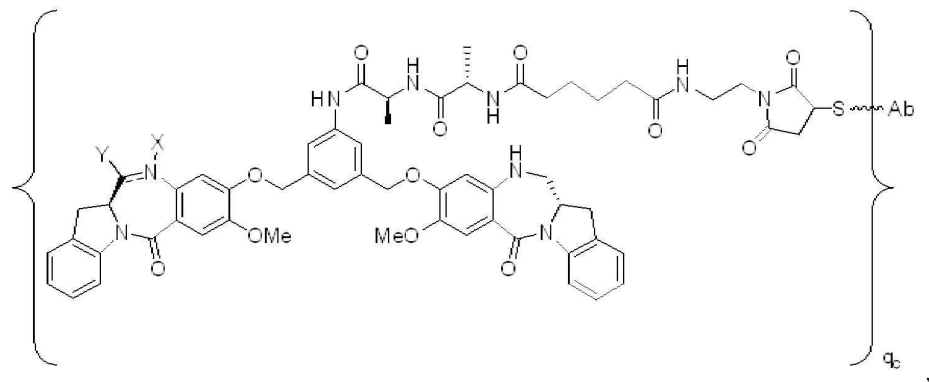
- a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고
- b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가변 영역;

q_c 는 1 또는 2이며; 그리고

Cap는 캡핑제다.

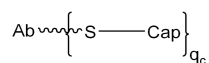
청구항 214

다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

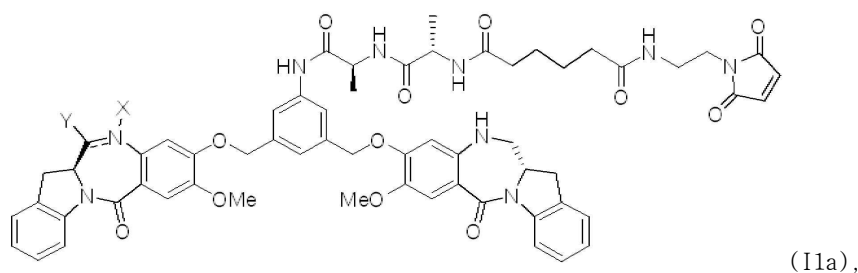
- (a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

- (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

- (c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



이로 인하여 ADC가 형성되며; 그리고

(d) 콘쥬게이트안된 화학식 (I1a)의 화합물을 제거하고, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며; 그리고 단계 (a) ~ (d)는 연속적으로 수행되며,

이때:

N과 C 사이의 이중선 $=$ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 $-SO_3M$ 이며, 그리고 M은 H^+ 또는 양이온이며;

$Ab \sim S$ — 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고

b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가변 영역;

q_c 는 1 또는 2이며; 그리고

Cap는 캡핑제다.

청구항 215

청구항 214에 있어서, 이때 해당 방법은 상기 콘쥬게이트를 안정적 완충액으로 교환하는 단계 (e)를 더 포함하는, 방법.

청구항 216

청구항 215에 있어서, 이때 단계 (e)는 연속적으로 수행되는, 방법.

청구항 217

청구항 214-216중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF) 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여 상기 콘쥬게이트안된 화학식 (I)의 화합물을 제거하고 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환하는, 방법.

청구항 218

청구항 214-216중 임의의 한 항에 있어서, 이때 역전류 정용여과를 이용하여 단계 (d)에서 콘쥬게이트안된 화학식 (I)의 화합물을 제거하는, 방법.

청구항 219

청구항 213-218중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (a)에서, 상기 반응 혼합물이 연속적으로 회수되고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안 cCysAb 및 환원 제제를 연속적으로 상기 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 220

청구항 219에 있어서, 이때 유동상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가하는 상기 환원 제제 및 cCysAb의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 221

청구항 213-220중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b)에서, 상기 반응 혼합물이 연속적으로 회수되고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안 상기 환원된 항체 및 선택적 산화 제제를 연속적으로 상기 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 222

청구항 221에 있어서, 이때 상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가하는 환원된 항체 및 선택적 산화 제제의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 223

청구항 213-222중 임의의 한 항에 있어서, 단계 (c)에서, 상기 반응 혼합물을 반응 용기로부터 연속적으로 회수하고, 유동 반응기를 통해 공급되는 동안, CysAb 및 화학식 (I1a)의 화합물을 연속적으로 반응 용기에 추가하는, 방법.

청구항 224

청구항 223에 있어서, 이때 상기 반응 용기로부터 반응 혼합물을 회수하기 위한 체적 유속은 상기 반응 용기에 추가되는 CysAb 및 화학식 (I1a)의 화합물의 복합 유속과 동일한, 방법.

청구항 225

청구항 219-224중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 반응 용기는 연속적으로 교반되는 탱크 반응기 (CSTR)인, 방법.

청구항 226

청구항 219-225중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 유동 반응기는 플러그 유동 반응기 (PFR)인, 방법.

청구항 227

청구항 212-214중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 식별 번호: 7의 V_H 서열과 서열 식별 번호: 9의 V_L 서열을 포함하는, 방법.

청구항 228

청구항 212-214중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 항-CD123 항체는 다음을 포함하는, 방법:

- a) 서열 식별 번호: 8에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄; 그리고
- b) 서열 식별 번호: 10에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄.

청구항 229

청구항 212-228중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 DPPA 또는 TCEP인, 방법.

청구항 230

청구항 229에서, 이때 상기 환원 제제는 TCEP인, 방법.

청구항 231

청구항 212-230중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (a)에서 반응은 pH 5.0 ~ 8.5, 7.0 ~ 8.0 또는 7.5 ~ 7.7에서 실행되는, 방법.

청구항 232

청구항 231에 있어서, 이때 단계 (a)의 반응은 pH 7.5에서 실행되는, 방법.

청구항 233

청구항 212-232중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 산화 제제는 DHAA인, 방법.

청구항 234

청구항 212-233중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (b)에서 반응은 pH 5.0 ~ 8.5, 7.0 ~ 8.0 또는 7.5 ~ 7.7에서 실행되는, 방법.

청구항 235

청구항 233에 있어서, 이때 단계 (b)에서 반응은 pH 7.5에서 실행되는, 방법.

청구항 236

청구항 212-235중 임의의 한 항에 있어서, 이때 단계 (c)의 반응은 pH 5.0 ~ 8.5, 5.5 ~ 6.5 또는 5.8 ~ 6.2 사이에서 실행되는, 방법.

청구항 237

청구항 236에 있어서, 이때 단계 (c)의 반응은 pH 6.0에서 실행되는, 방법.

청구항 238

청구항 212-237중 임의의 한 항에 있어서, 이때 상기 환원 제제는 TCEP이며; 단계 (a)에서 반응은 pH 7.5에서 실행되며; 상기 산화 제제는 DHAA이며; 단계 (b)에서 반응은 pH 7.5에서 실행되며; 그리고 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysAb와 세포독성 제제를 반응시키기 전, pH 7.5에서 pH 6.0으로 조정되는, 방법.

청구항 239

청구항 212-238중 임의의 한 항에 있어서, 이때 캡핑 시약은 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온 또는 이의 조합인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원들

[0002] 본 출원은 2019년 3월 21일자로 제출된 U.S. 가출원 번호 62/821,707 및 2019년 6월 4일자로 제출된 U.S. 가출원 번호 62/856,942에 대해 우선권을 주장하며, 이들 각 내용은 이들 전문이 본원 참고자료로 편입된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 세포-결합 제제를 포함하는 세포-결합 제제-약물 콘주게이트를 만드는 방법에 일반적으로 관계한다.

배경 기술

[0005] 발명의 배경

[0006] 세포 결합제-약물 콘주게이트 (이를 테면, 항체-약물 콘주게이트 (ADC))는 광범위한 암에 걸쳐 효과를 갖는 강력한 부류의 항-종양 제로 부상하고 있다. 세포 결합제-약물 콘주게이트 (이를 테면, ADCs)는 일반적으로 별개의 세 가지 요소로 구성된다: 세포-결합제 (가령, 항체); 링커; 그리고 세포독성 모이어티(세포독성 모이어티). 상기 세포독성 약물 모이어티는 티올-반응기, 이를 테면, 말레이미드기를 통하여 당해 항체 상의 시스테인 티올기들에 공유적으로 연계되어(linked), 부위-특이적 ADCs를 형성할 수 있다. 시스테인-공작된 항체들을 부위-특이적 ADCs를 만드는데 이용할 수 있다. 그러나, 항체를 생산하는 동안, 상기 공작된 시스테인들은 이황화물을 형성하기 위해, 다른 티올-함유하는 모이어티, 이를 테면 시스테인 또는 글루타티온에 의해 대개 캡핑된다. 세포독성 제제와 콘주게이션 전, 캡핑 부분을 제거하고, 세포독성제와 반응하기 위한 유리(free) 티올을 형성하도록 이들 이황화물을 환원 제제로 처리해야 한다. 이러한 처리는 항체 쇄-간 이황화물 결합 또한 환원시키는데,

이들은 해당 공작된 시스테인 상의 유리 티올기의 재-산화없이, 선택적 산화 단계를 통하여 재-형성될 필요가 있다. 상기 선택적 산화는 순환 산화 제제의 사용, 그리고 환원 제제 및 시스테인 및/또는 글루타티온과 같은 캡핑제의 제거에 의해 이루어진다. 이러한 환원 및 선택적 산화 단계는 시스테인 공작된 항체들을 이용하여 ADCs를 만드는 과정에 복잡성을 끌어들이고, 이들은 대개 여러차례 정제 단계를 필요로 하고, 이런 것들에 의해 ADCs의 대규모 제조를 위해 프로세스는 번거롭고, 효율적이지 못하게 된다.

[0007] 따라서, 대규모 제조 공정에 적합한 공작된 시스테인 항체의 ADCs를 제조하기 위한 새롭고 효율적인 방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 요약

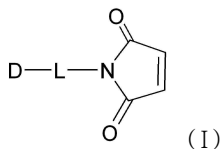
[0009] 본 발명은 반응 단계들 사이에 정제를 요하지 않는 원-포트 프로세스에 의해 고-순도 및 고-반응율로 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체를 포함하는 ADCs를 만들 수 있다는 놀라운 발견에 기반된다. 더욱이, 비교 데이터에서 원-포트 프로세스는 반응 단계 사이에 정제를 필요로 하는 다중-단계 프로세스를 통하여 준비된 ADC와 비교하였을 때, 최종 ADC 산물의 단량체 백분율을 기대이상으로 증가시킨다는 것을 보여준다 (실시예 5 참고).

[0010] 특정 구체예들에서, 본 발명은 세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트를 준비하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

[0011] (a) 캡핑제(capping agent)로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0012] (b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0013] (c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고:



[0014] 이로 인하여 해당 콘주게이트가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 세포-결합 제제는 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 그리고 단계 (b)의 CysCBA는 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:

[0016] D는 세포독성 제제이며; 그리고

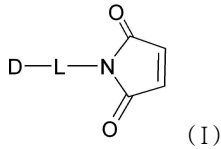
[0017] L은 링커다.

[0018] 특정 구체예들에서, 본 발명은 세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

[0019] (a) 캡핑제로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0020] (b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0021] (c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고:



[0022]

[0023]

[0024]

[0025]

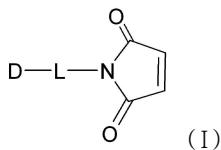
[0026]

[0027]

[0028]

[0029]

[0030]



[0031]

[0032]

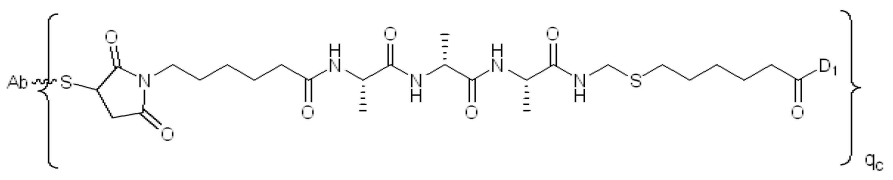
[0033]

[0034]

[0035]

[0036]

[0037]



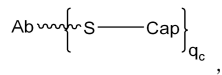
[0038]

[0039]

[0040]

이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

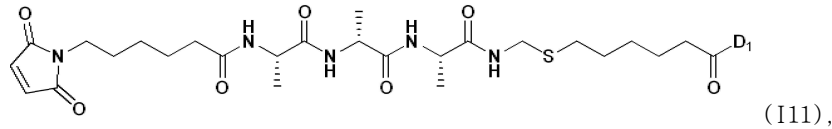
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썩어진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고



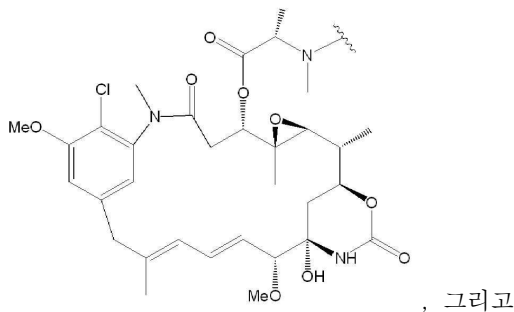
이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며,

이때:

$\text{Ab} \sim \text{S} -$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인, 및 CDR_H3 도메인, 그리고 CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인, 및 CDR_L3 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

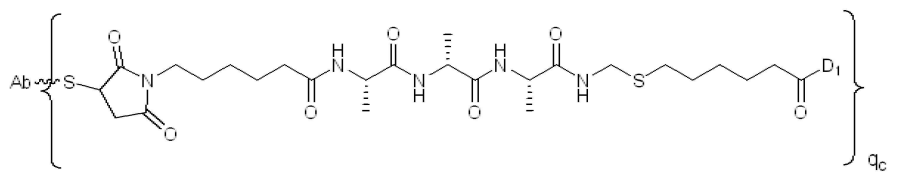
q_c 는 1 또는 2이며;

D₁은 다음의 식으로 나타내며:



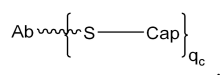
Cap는 캡핑제다.

특정 구체예들에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공한다:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

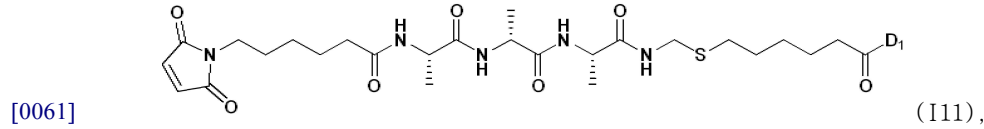
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썩어진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



[0058] 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

[0059] (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0060] (c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고



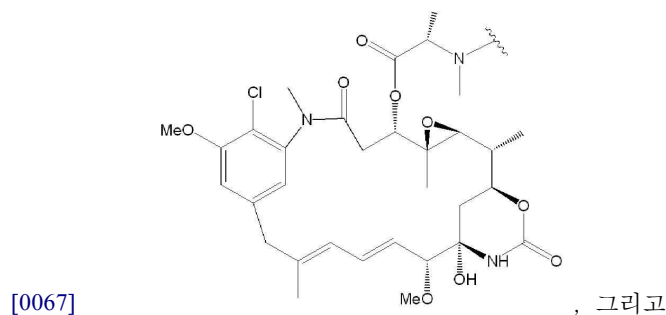
[0062] 이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행되며, 그리고

[0063] 이때:

[0064] $Ab \sim S-$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인, 및 CDR_H3 도메인, 그리고 CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인, 및 CDR_L3 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

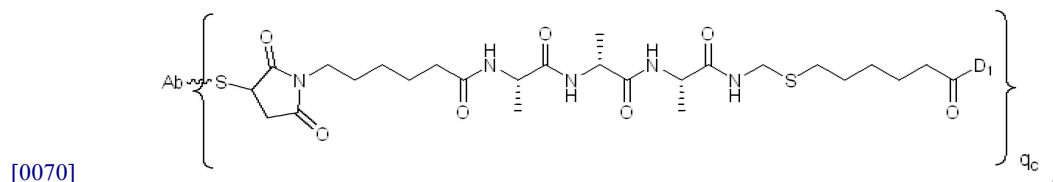
[0065] q_c 는 1 또는 2이며;

[0066] D_1 은 다음의 식으로 나타내며:



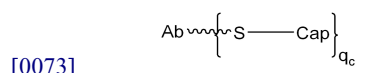
[0068] Cap는 캡핑제다.

[0069] 특정 구체예들에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공한다:



[0071] 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

[0072] (a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:

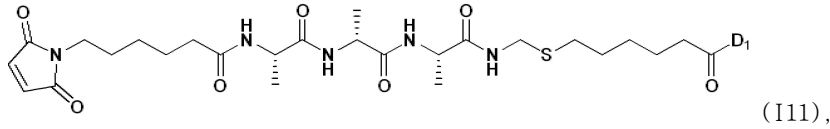


[0074] 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제

거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며;

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고



이로 인하여 ADC가 형성되며; 그리고

(d) 콘쥬게이트안된 화학식 (I11)의 화합물을 제거하고;

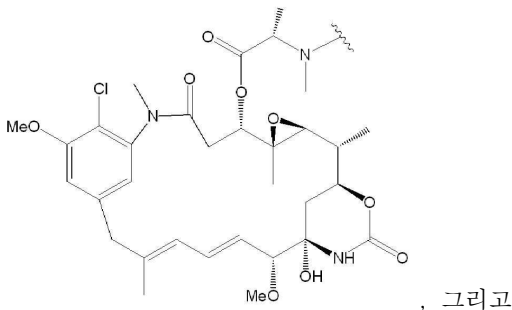
이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (d)는 연속적으로 수행되며, 그리고

이때:

Ab~S—는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인, 및 CDR_{H3} 도메인, 그리고 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인, 및 CDR_{L3} 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

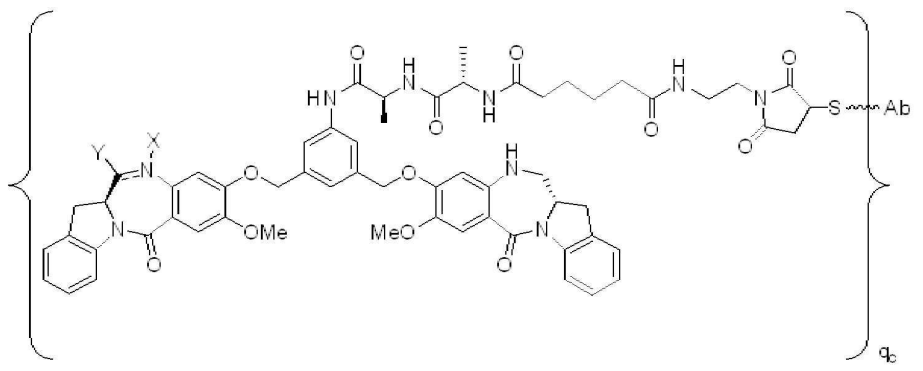
q_c는 1 또는 2이며;

D₁은 다음의 식으로 나타내며:



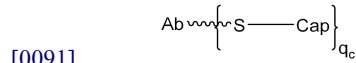
Cap는 캡핑제다.

특정 구체예들에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 방법을 제공한다:



[0089] 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

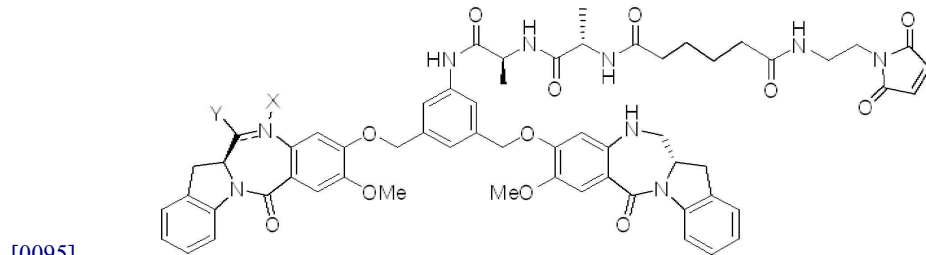
[0090] (a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



[0092] 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0093] (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0094] (c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:

[0096] N과 C 사이의 이중선 =은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 -SO₃M이며, 그리고 M은 H⁺ 또는 양이온이며;

[0097] Ab~S~는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

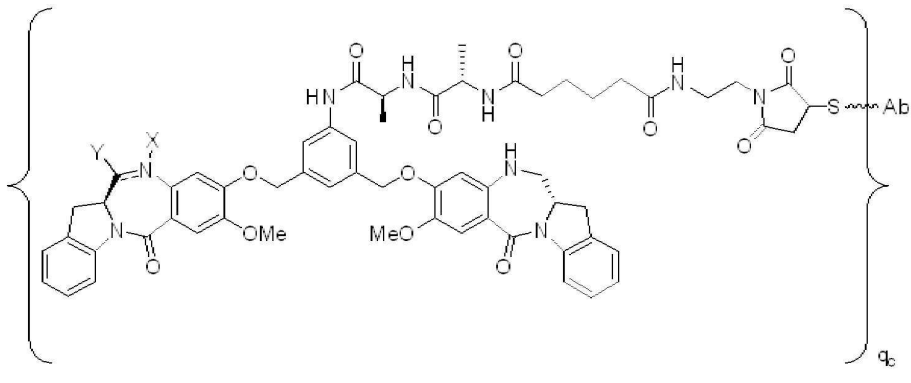
[0098] a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고

[0099] b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가변 영역;

[0100] q_c는 1 또는 2이며; 그리고

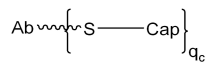
[0101] Cap는 캡핑제다.

[0102] 특정 구체예들에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공한다:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

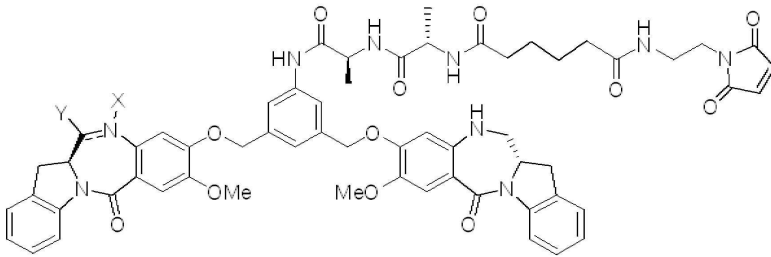
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



(IIa),

이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며; 그리고 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행되며,

이때:

N과 C 사이의 이중선 ==은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 -SO₃M이며, 그리고 M은 H⁺ 또는 양이온이며;

Ab~S—는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고

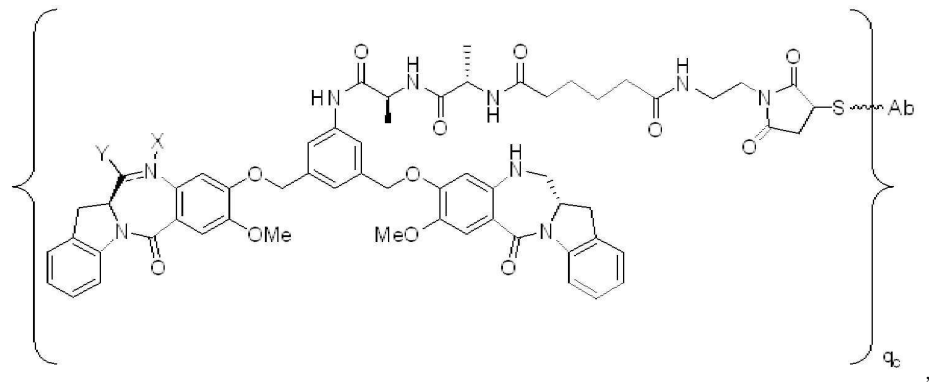
b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가

변 영역;

q_c 는 1 또는 2이며; 그리고

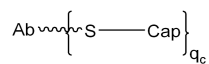
Cap는 캡핑제다.

특정 구체예들에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘주게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공한다:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

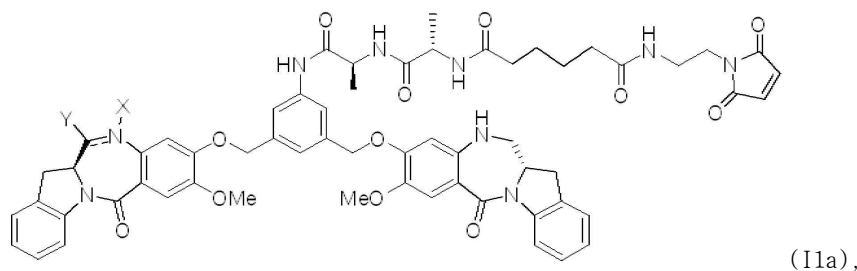
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



이로 인하여 ADC가 형성되며; 그리고

(d) 콘주게이트안된 화학식 (I1a)의 화합물을 제거하고, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며; 그리고 단계 (a) ~ (d)는 연속적으로 수행되며,

이때:

N과 C 사이의 이중선 =은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 $-SO_3M$ 이며, 그리고 M은 H^+ 또는 양이온이며;

$Ab \sim S -$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체

또는 항원-결합 단편이며:

- [0133] a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고
- [0134] b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가변 영역;
- [0135] q_c는 1 또는 2이며; 그리고
- [0136] Cap는 캡핑제다.
- [0137] 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들의 단계중 임의의 한 단계는 비활성 대기 (가령, N₂)에서 실행될 수 있다. 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들은 비활성 대기 (가령, N₂) 하에서 실행된다. 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들의 단계중 임의의 한 단계는 O₂ 존재 하에서 실행될 수 있다. 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들은 O₂ 존재 하에서 실행된다.
- [0138] 본 발명의 한 측면 (그러나 다른 것들에서는 설명되지 않거나, 다른 구체예들에서 반복되지 않는)에서만 설명되고, 그리고 실시예에서만 기술된 것들을 포함하는 본원에 기술된 한 구체예는 명시적으로 회피하거나, 또는 적용할 수 없는 경우를 제외하고, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 다른 구체예들과 조합될 수 있는 것이 고려된다.

도면의 간단한 설명

- [0139] 도면의 간단한 설명
- 도 1에서는 DAR에 이용된 산화 제제 DHAA 및 환원 제제 2-디페닐포스포히노에틸아민의 양에 대한 효과를 나타낸다.
- 도 2에서는 DAR에서 TCEP 환원에 있어서 반응 시간 및 온도의 효과를 나타낸다.
- 도 3은 TCEP 환원에 있어서 단량체 백분율에 대한 반응 시간 및 온도의 효과를 나타낸다.
- 도 4는 DAR에서 환원 반응에 이용된 TCEP의 양의 효과를 나타낸다.
- 도 5는 실시예 5에서 기술된 CD123-표적으로 하는 항체 약물 콘쥬게이트 (ADC)의 통합된 연속 제조 공정을 나타낸다. Ab는 항-CD123 단일클론 항체 G4723A를 말한다.
- 도 6은 실시예 5에서 기술된 CD123-표적으로 하는 ADC의 통합된 제조 공정에 있어서 역전류(countercurrent) TFF 정제를 나타낸다.
- 도 7에서는 인-라인 공정 자동화 기술 (PAT)을 사용하여 제어 및 검출가능성을 어떻게 증가시키는 지를 보여준다.
- 도 8에서는 상승된 온도에서 콘쥬게이션 반응 펄스화에 사용할 수 있는 가열 및 냉각 반응기의 개략도를 보여준다. 펄싱 반응기 (“PR”로 표시됨)에서, 재킷 온도가 상승되고, 코일 안에 함유된 반응 구성요소들은 일시적으로 가열되어, 짧은 온도 변동이 유도된다. 그 다음, 냉각 반응기 (“CR”로 표시됨), 코일 내의 반응 구성요소들이 상승된 온도에서 다시 냉각되도록, 재킷 온도는 더 낮은 온도로 유지된다. 이로써 해당 반응 중에 발생하는 응집의 양을 줄일 수 있다. 체류 시간 반응기 (RTR)는 펄싱이 완료된 후에도 원하는 반응 온도를 유지하며, 그 부피는 원하는 반응 시간을 기반으로 할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0140] 발명의 상세한 설명

- [0141] 1. 정의

- [0142] 본 발명의 이해를 돕기 위해, 다수의 용어 및 구문이 아래에 정의되어 있다.
- [0143] 본원에서 사용된 용어 “항체 약물 콘주게이트” (ADC) 및 “면역콘주게이트”는 세포 결합제 (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)에 연계된 화합물 또는 이의 유도체를 지칭하며, 다음의 일반식으로 정의된다: D-L-A, 이때 D = 세포독성 약물, L = 링커, 및 A = 항체 또는 항체 단편. ADCs는 또한 상기 일반식의 역순으로 정의될 수 있다: A-L-D. ADC는 하나의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 기준으로 다수의 약물 및 링커를 포함할 수 있다, 가령, (D-L)₄-A 또는 A-(L-D)₂. 용어 “항체 약물 콘주게이트”와 “면역콘주게이트”는 본원에서 호환-사용된다.
- [0144] 용어 “(인간) IL-3R α ”, “인터루킨-3 수용체 알파”, 또는 “CD123”은 본원에서 호환되며, 다른 언급이 없는 한, 임의의 고유의 (인간) IL-3R α 또는 CD123을 지칭한다. CD123 단백질은 이중이량체 사이토킨 수용체 (IL-3 수용체, 또는 IL-3R)의 인터루킨 3-특이적 하위단위이다. IL-3R은 리간드 특이적 알파 하위단위, 그리고 인터루킨 3 (IL3), 콜로니 자극 인자 2 (CSF2/GM-CSF), 및 인터루킨 5 (IL5)에 대한 수용체들에 의해 공유되는 신호 변환 공통 베타 하위단위 (CD131로도 공지됨)로 구성된다. CD123/IL-3R α 의 IL3에 결합은 베타 하위단위에 따라 달라진다. 상기 베타 하위단위는 리간드 결합에 의해 활성화되며, IL3의 생물학적 활성에 요구된다.
- [0145] CD123에 관한 상기 용어 모두는 본원에 표시된 바와 같이, 단백질 또는 핵산 서열을 지칭할 수 있다. 상기 용어 “CD123/IL-3R α ”, 프로세스안된 CD123/IL-3R α 뿐만 아니라, 상기 세포로부터 가공처리에 의해 결과된 임의의 형태의 CD123/IL-3R α 를 포괄한다. 상기 용어는 CD123/IL-3R α 단백질 또는 핵산의 자연 발생적 변이체, 가령, 스플라이스 변이체, 대립유전자 변이체 및 아이소폼(isoforms)를 또한 포괄한다. 본원에서 기술된 CD123/IL-3R α 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 다양한 원천, 이를 테면, 인간 조직 유형 또는 또다른 원천으로부터 분리되거나, 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 준비될 수 있다. CD123/IL-3R α 서열의 예들은 NCBI 참조 번호 NP_002174 & NM_002183 (인간 CD123 변이체 1의 단백질 및 핵산 서열), 및 NP_001254642 & NM_001267713 (인간 CD123 변이체 2의 단백질 및 핵산 서열)을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.
- [0146] 용어 “ADAM9”란 디스인테그린 및 메탈로프로테아제 도메인-함유하는 단백질 9를 지칭하며, ADAM 패밀리의 분자 구성원이다. 그것은 비-활성 형태로 합성되고, 활성 효소를 생성하기 위해 단백질 분해로 절단된다. 상류 부위에서의 가공처리는 프로엔자임(proenzyme) 활성화에 특히 중요하다. ADAM9는 섬유모세포 (Zigrino, P. *et al.* (2011) “*The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts*,” J. Biol. Chem. 286:6801-6807), 활성화된 맥관 평활근 세포 (Sun, C. *et al.* (2010) “*ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signalling*,” Cardiovasc. Res. 87:348-355), 단핵구 (Namba, K. *et al.* (2001) “*Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes*,” Cell. Immunol. 213:104-113), 활성화된 대식세포 (Oksala, N. *et al.* (2009) “*ADAM-9, ADAM-15, And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries - Tampere Vascular Study*,” Ann. Med. 41:279-290)에서 발현된다. 대표적인 인간 ADAM9 폴리펩티드는 NCBI 서열 NP_003807이다. ADAM9 폴리펩티드의 819개 아미노산 잔기중 잔기 1-28은 신호 서열이며, 잔기 29-697은 세포외 도메인이며, 잔기 698-718은 막경유 도메인이며, 그리고 잔기 719-819는 세포내 도메인이다. 다음의 세 개의 구조적 도메인은 세포외 도메인 안에 위치한다: 레프토리신 (M12B) 패밀리의 아연 메탈로프로테아제 도메인 (대략적으로 잔기 212-406에서); 디스인테그린 도메인 (대략적으로 잔기 423-497에서); 그리고 EGF-유사 도메인 (대략적으로 잔기 644-697에서). 많은 해독-후 변형 및 아이소폼들이 확인되었으며, 단백질은 형질 막에 도달하여 성숙한 단백질을 생성하기 전, 트랜스-골지(Golgi) 네트워크에서 단백질 분해로 절단된다. 프로-도메인의 제거는 두 개의 다른 부위에서 절단을 통해 발생한다. 프로-도메인과 촉매 도메인 사이(Arg-205/Ala-206)의 경계에서 퓨린과 같은 전-단백질 전환효소에 의해 대부분 가공처리된다. 추가적인 상류 절단 전-단백질 전환효소 부위 (Arg-56/Glu-57)는 ADAM9의 활성화에 중요한 역할을 한다. 대표적인 시노물구스 원숭이 ADAM9 폴리펩티드는 NCBI 서열 XM_005563126.2이며, 아마도 28개의 아미노산 잔기 신호 서열이 내포된다. 당해 단백질의 레프토리신 (M12B) 패밀리의 아연 메탈로프로테아제 도메인은 대략적으로 잔기 212-406에 있고; 당해 단백질의 디스인테그린 도메인은 대략적으로 잔기 423-497에 있다.
- [0147] 용어 “항체”는 면역 글로불린 분자의 가변 영역 내에서 하나 또는 그 이상의 항원 인지 부위를 통하여, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질 또는 전술한 것들의 조합과 같은 표적을 인지하고, 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 “항체”는 무손상(intact) 폴리클로날 항체, 무손상 모노클로날 항체, 항체 단편들 (이를 테면, Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편

들), 단일쇄 Fv (scFv) 돌연변이체, 다중특이적 항체 이를 테면, 이중특이적 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정 부분을 포함하는 융합 단백질, 그리고 당해 항체가 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항원 인지 부위를 포함하는 임의의 기타 변형된 면역글로불린 분자를 포괄한다. 항체는 5 가지 주요 부류의 면역글로불린 중 하나일 수 있다: 알파, 델타, 입실론, 감마, 그리고 뮤(mu)로 차례로 언급되는 이들의 중쇄 불변 도메인의 정체성(identity)에 근거하여, IgA, IgD, IgE, IgG, 그리고 IgM, 또는 이의 하위부류(아이소형)(가령, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2). 상이한 부류의 면역글로불린은 상이하고, 잘 알려진 하위단위 구조 및 3-차원 구성을 갖는다. 항체는 네이키드(naked)이거나, 독소, 방사성동위원소 등과 같은 다른 분자에 콘주게이트될 수 있다.

[0148] 일부 구체예들에서, 항체는 비-자연 발생적 항체다. 일부 구체예들에서, 항체는 자연 구성요소들로부터 정제된다. 일부 구체예들에서, 항체는 재조합적으로 만들어진다. 일부 구체예들에서, 항체는 하이브리도마에 의해 만들어진다.

[0149] 용어 "항-CD123 항체" 또는 "항-IL-3R α" 또는 "CD123/IL-3R α에 (특이적으로) 결합하는 항체"란 일반적으로 충분한 친화력으로 CD123/IL-3R α에 결합할 수 있는 항체로써, 당해 항체는 CD123/IL-3R α를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료 물질로 유용하다. 별도의 언급이 없는 한, 무관한, 비-CD123/IL-3R α 단백질에 대한 항-CD123/IL-3R α 항체의 결합 정도는 예를 들어, 방사선면역분석법 (RIA)에 의해 측정될 때, CD123/IL-3R α에 대한 이 항체의 결합에 대해 약 10% 미만일 수 있다. 특정 구체예들에서, CD123/IL-3R α에 결합하는 항체는 ≤ 0.5 nM, ≤ 0.3 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.05 nM, 또는 ≤ 0.01 nM의 해리 상수 (K_d)를 갖는다. 한 구체예에서, 항-CD123/IL-3R α 항체는 공통 베타 쇠 CD131에 결합하지 않는다. 한 구체예에서, 항-CD123/IL-3R α 항체는 공지의 그리고 상업적으로 이용가능한 CD123 항체, 이를 테면, 7G3 (마우스 IgG_{2a}), 6H6 (마우스 IgG₁), 및 9F5 (마우스 IgG₁)가 결합되는 CD123의 동일한 에피토프에 결합하지 않는다(Sun *et al.*, *Blood* 87(1): 83-92, 1996).

[0150] 항-CD123/IL-3R α 항체들 및 항원-결합 단편들의 서열들이 본원에서 제공된다.

[0151] 용어 “항체 단편”은 무손상 항체의 일부분으로, 무손상 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편들의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 F_v 단편들, 선형 항체, 단일쇄 항체, 그리고 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 용어 항체의 “항원-결합 단편”에는 항원에 특이적으로 결합하는 능력이 유지된 항체의 하나 또는 그 이상의 단편들이 포함된다. 상기 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 특정 단편들에 의해 실행될 수 있음이 밝혀졌다. 용어 항체의 “항원-결합 단편” 안에 포괄되는 결합 단편들의 예로는 다음을 포함한다(제한 없음): (i) Fab 단편, V_L, V_H, C_L, 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 단가(monovalent) 단편 (가령, 항체를 펩신으로 절단하면 3개 단편들이 생성된다: 2개의 항원-결합 Fab 단편과 하나의 Fc 단편-이것은 항원에 결합하지 않음); (ii) F(ab')₂ 단편, 힌지 영역에서 이황화다리에 의해 연계된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가(bivalent) 단편 (가령, 항체를 펩신으로 절단하면 2개 단편들이 생성된다: 이가 항원-결합 F(ab')₂ 단편, 및 pFc' 단편- 이것은 항원에 결합하지 않음) 및 이와 관련된 F(ab') 단가 단위; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 F_d 단편 (즉, Fab에 포함된 중쇄 부분); (iv) 항체의 단일 암(arm)의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성된 F_v 단편, 그리고 관련된 이황화물 연계된 F_v; (v) dAb (도메인 항체) 또는 sdAb (단일 도메인 항체) 단편 (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989), 이는 V_H 도메인으로 구성되며; 그리고 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR).

[0152] “단일클론(monoclonal) 항체”는 단일 항원 결정 인자, 또는 에피토프를 매우 특이적으로 인지하고, 결합에 관여하는 동질성(homogeneous) 항체를 지칭한다. 이는 상이한 항원 결정기를 지향하는 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체와 대조된다. 용어 “단일클론 항체”는 무손상 및 전장 모노클로날 항체, 뿐만 아니라 항체 단편 (예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, F_v), 단일 쇠 (scFv) 돌연변이체, 항체 일부분을 포함하는 융합 단백질, 그리고 항원 인지 부위를 포함하는 임의의 기타 변형된 면역글로불린 분자를 포괄한다. 더욱이, “단일클론 항체”는 하이브리도마, 파아지 선별, 재조합 발현 및 이식유전자를 가진 동물을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 임의의 여러 방식으로 만들어진 항체를 지칭한다.

[0153] 용어 “인간화된(humanized) 항체”란 특이적 면역글로불린 쇠, 키메라 면역글로불린 또는 아주 작은 비-인간(가령, 뮤린) 서열을 함유하는 이의 단편인 비-인간(가령, 뮤린) 항체를 지칭한다. 전형적으로, 인간화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이의 상보성 결정 영역 (CDR)이 비-인간 종(가령, 마우스, 랫, 토끼, 햄스터)의 CDR

의 잔기로 대체되고, 원하는 특이성, 친화력, 그리고 능력을 갖는 인간 면역글로불린이다(Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1988; Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536, 1988).

[0154] 일부 경우들에서, 인간 면역글로불린의 F_v 프레임워크 영역 (FR) 잔기들은 원하는 특이성, 친화력 및 역량 (capability)을 갖는 비-인간 종으로부터의 항체에서 상응하는 잔기로 대체된다. 인간화된 항체는 F_v 프레임워크 영역 및/또는 대체된 비-인간 잔기 내에서 추가의 잔기의 치환에 의해 추가로 변형되어, 항체 특이성, 친화력, 및/또는 역량을 개선하고, 최적화시킨다. 일반적으로, 인간화된 항체는 비-인간 면역글로불린에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역을 함유하는 최소한 1개, 전형적으로 2개 또는 3개의 실질적으로 모든 가변 도메인을 포함하지만, 반면 FR의 모든 영역 또는 실질적으로 모든 영역은 인간 면역글로불린 공통(consensus) 서열의 영역이다. 상기 인간화된 항체는 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인 (F_c)의 최소한 일부분, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 또한 포함할 수 있다. 인간화된 항체를 만드는데 이용되는 방법의 예로는 U.S. 특허 5,225,539 및 5,639,641, Roguska *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(3):969-973, 1994; 그리고 Roguska *et al.*, *Protein Eng.* 9(10):895-904, 1996 (모두는 본원의 참고자료에 편입됨)에 기술된다. 일부 구체예들에서, "인간화된 항체"는 재포장된(resurfaced) 항체다. 일부 구체예들에서, "인간화된 항체"는 CDR-접목된(grafted) 항체다.

[0155] 항체의 "가변 영역"이란 단독으로 또는 조합에 의해 이 항체 경쇄의 가변 영역 또는 이 항체 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 초가변(hypervariable) 영역으로도 알려진 3 개의 상보성 결정 영역 (CDRs)에 의해 연결된 4 개의 프레임워크 영역 (FR)으로 구성된다. 각 쇠의 CDRs은 FRs에 의해 서로 근접하게 유지되고, 다른 쇠의 CDRs과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDRs을 결정하는 데는 최소한 두 가지 기술이 있다: (1) 종-간(cross-species) 서열 변이에 기초한 접근법(가령, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (제 5 ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 그리고 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기반한 접근법(Al-lazikani *et al.*, *J. Molec. Biol.* 273:927-948 (1997)). 또한, 때때로 CDRs을 결정하기 위해 당업계에서 이들 두 접근법의 조합이 사용된다.

[0156] Kabat 번호매김 시스템은 가변 도메인에서 잔기를 언급할 때 일반적으로 이용된다(경쇄의 대략적으로 잔기 1-107과 중쇄의 잔기 1-113)(가령, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 제 5 Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0157] Kabat에서와 같은 아미노산 위치 번호매김은 Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 제 5 Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)(본원 참고자료에 편입됨)에서 항체 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용되는 번호매 시스템을 지칭한다. 이 번호매김 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축(shortening)에 대응하는 소수의 또는 추가 아미노산, 또는 이들 안으로 삽입(insertion)을 함유할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입 (Kabat에 따라, 잔기 52a)과 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (가령, Kabat에 따라, 잔기 82a, 82b, 및 82c, 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 Kabat 번호매김은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" Kabat 번호가 매겨진 서열의 정렬에 의해 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다. 대신, Chothia는 구조 루프(structural loops)의 위치를 나타낸다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987). Kabat 번호 매김 규칙을 사용하여, 번호 매겨질 때, Chothia CDR-H1 루프의 단부는 루프의 길이에 따라, H32와 H34 사이에서 가변적이다. 그 이유는 Kabat 번호매김 체계가 H35A와 H35B에 삽입을 배치하기 때문이며-만일 35A 또는 35B가 존재하지 않는다면, 이 루프는 32에서 끝나고; 만일 오직 35A만 존재한다면, 이 루프는 33에서 끝나고; 만일 35A와 35B가 모두 존재한다면, 이 루프는 34에서 끝난다. AbM 초 가변 영역은 Kabat CDRs와 Chothia 구조 루프 사이의 절충을 나타내며, Oxford Molecular's AbM 항체 모델링 소프트웨어가 이용된다.

루프	Kabat	AbM	Chiothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
(Kabat 번호매김)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
(Chiothia 번호매김)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0158]

[0159] Kabat 또는 EU 번호매김 방식에서와 같은 EU 인덱스 또는 EU 인덱스는 Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85의 인간 IgG1 Eu 항체를 기반으로 하는 번호매김 시스템을 지칭하며, 이는 본원에 참고자료에 편입된다.

[0160] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생산된 항체, 또는 당분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여 만들어진 인간에 의해 생산된 항체에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 특정 구체예들에서, 상기 인간 항체는 비-인간 서열을 갖지 않는다. 인간 항체의 정의에는 무손상 또는 전장 항체 또는 이의 항원-결합 단편들을 포함한다.

[0161] 용어 "키메라(chimeric)" 항체란 면역글로블린의 아미노산 서열이 2 종 또는 그 이상의 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 가변 영역은 원하는 특이성, 친화력 및 능력을 갖는 한 종의 포유 동물 (예를 들어, 마우스, 랫, 토끼 등)로부터 유래된 항체의 가변 영역에 상응하고, 한편 불변 영역은 다른 종 (일반적으로 인간)으로부터 유래된 항체의 서열과 상동성이어서 그 종에서 면역 반응을 유발하는 기회를 회피하거나 또는 감소시킨다. 특정 구체예들에서, 키메라 항체는 최소한 하나의 인간 중쇄 폴리펩티드 및/또는 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 이를 테면, 예를 들면, 듀린 경쇄 폴리펩티드 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함할 수 있다.

[0162] 용어 "에피토프(epitope)" 또는 "항원 결정인자(antigenic determinant)"는 본원에서 상호 호환적으로 사용되며, 특정 항체에 의해 인지되고, 특이적으로 결합될 수 있는 항원 부분을 지칭한다. 상기 항원이 폴리펩티드인 경우, 에피토프는 단백질의 3 차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산과 비연속 아미노산 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성시 유지되지만, 3 차원 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 변성시 손실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간 형태에서 최소한 3 개, 보다 일반적으로는 최소한 5 개 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다.

[0163] "결합 친화력"이란 일반적으로 분자의 단일 결합 부위 (예를 들면, 항체)와 이의 결합 짝 (예를 들면, 항체) 사이에 비공유 상호작용의 총 강도를 말한다. 다른 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "결합 친화력(binding affinity)"이란 결합 쌍의 구성요소들간 (예컨대, 항체와 항원)에 1:1 상호작용을 반영한 고유한 결합 친화력을 지칭한다. 분자 X가 이의 짝 Y에 대한 친화력은 해리 상수 (K_d) 또는 최대 효과-절반의 농도 (EC_{50})으로 나타낼 수 있다. 친화력은 본 명세서에서 설명된 것이 포함된 당분야에 공지된 공통적 방법들에 의해 측정될 수 있다. 낮은-친화력 항체는 일반적으로 항원을 천천히 결합 시키며 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 높은-친화력 항체는 일반적으로 항원을 더 빨리 결합시키고, 더 오랫동안 결합하는 경향이 있다. 결합 친화력을 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 이들 중 임의의 것이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적인 실시예들이 여기에 설명된다.

[0164] "~에 특이적으로 결합한다"는 것은 일반적으로 항체가 그의 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하고, 결합은 항원-결합 도메인과 에피토프 사이에 약간의 상보성을 수반한다는 것을 의미한다. 이 정의에 따르면, 항체는 그것이 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합할 때 임의의 관련되지 않은 에피토프에 결합하는 것보다 더 쉽게 에피토프에 결합할 때 에피토프에 "특이적으로 ~에 결합한다"라고 한다. 용어 "특이성(specificity)"은 본원에서 특정 항체가 특정 에피토프에 결합하는 상대 친화도를 확인하기 위해 사용된다. 예를 들면, 항체 "A"는 항체 "B"보다 주어진 에피토프에 대해 더 높은 특이성을 갖는 것으로 간주될 수 있거나, 또는 항체 "A"는 관

런 에피토프 "D"에 대한 것보다 더 높은 특이성으로 에피토프 "C"에 결합하는 것으로 언급될 수 있다.

[0165] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “면역콘주게이트”, “콘주게이트”, 또는 “ADC”는 세포 결합체 (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)에 연계된 화합물 또는 이의 유도체를 지칭한다.

[0166] “링커”는 화합물, 통상적으로 약물, 이를 테면, 본원에서 기술된 세포독성제(가령, IGN (인돌리노벤조디아제핀) 화합물들)를 세포-결합체, 이를 테면, 항체 또는 이의 단편에 안정적이며, 공유적 방식으로 연계시킬 수 있는 임의의 화학적 모이어티다. 링커는 당해 화합물 또는 당해 항체가 활성을 유지하는 조건 하에서, 산-유도된 절단, 광-유도된 절단, 펩티다제-유도된 절단, 에스테라제-유도된 절단, 그리고 이황화물 결합 절단에 예민하거나(susceptible), 또는 실질적으로 저항성일 수 있다. 적합한 링커에는 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 디설파이드기, 티오에테르 기, 산-불안정 기, 광-불안정 기, 펩티다제-불안정 기 및 에스테라제-불안정 기가 내포된다. 링커에는 본원에 기술되고, 당업계에 공지된 하진된 링커 및 그의 친수성 형태가 또한 내포된다.

[0167] 용어 “시스테인-공작된 항체”에는 항체 경쇄 또는 중쇄의 주어진 잔기에 정상적으로 존재하지 않는 적어도 하나의 Cys를 갖는 항체가 내포된다. 이러한 Cys는 “공작된 Cys”이라고 또한 불릴 수도 있는데, 임의의 통상적인 분자 생물학 또는 재조합 기술 (가령, 표적 잔기에서 비-Cys 잔기에 대한 코딩 서열을 Cys에 대한 코딩 서열로 대체함으로써)을 이용하여 공작될 수 있다. 예를 들면, 상기 원래 잔기가 5'-UCU-3'의 코딩 서열을 갖는 Ser이라면, 이 코딩 서열은 (가령, 부위-지향된 돌연변이생성에 의해)로 5'-UGU-3'로 돌연변이될 수 있고, 이것은 Cys를 인코딩한다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 Cys 공작된 항체는 중쇄에 공작된 Cys를 갖는다. 특정 구체예들에서, 상기 공작된 Cys는 중쇄의 CH3 도메인에 존재하거나, 또는 이 부근에 존재한다.

[0168] 용어 “쌍을 형성하지 않은 시스테인”이란 세포-결합 제제의 또다른 시스테인 잔기와 이황화물 결합 형성에 연루되지 않는, 세포-결합 제제 (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편) 상에 위치한 시스테인 잔기를 지칭한다. 특정 구체예들에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쌍을 형성하지 않은 시스테인은 쇠-간 또는 쇠-내 이황화물 결합 형성에 연루되지 않은 시스테인 잔기다. 특정 구체예들에서, 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인은 공작된 시스테인 잔기다.

[0169] 용어 “캡핑제”란 CBA의 쌍을 형성하지 않은 시스테인과 이황화물을 형성할 수 있는 티올 -SH 기를 갖는 시약을 지칭한다. 특정 구체예들에서, 상기 캡핑제는 CBA (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)의 생산 또는 정제에 이용된 티올-함유하는 시약, 이를 테면, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하기 위해 배양 배지에 이용된 하나 또는 그 이상의 티올-함유하는 시약이다. 특정 구체예들에서, 상기 캡핑제는 시스테인, 글루타티온, 호모세스테인, 또는 이의 조합이다. 특정 구체예들에서, 상기 캡핑제는 고정된 티올-함유하는 시약 또는 티올-친화성 수지 (가령, 티오프로필 Sepharose 6B)다. Guo, J. *et al.*, Nat Protoc. 2014 Jan; 9(1): 64-75 참고 (본원의 참고자료에 편입됨).

[0170] 본원에 사용된 용어 “연속 공정”이란 반응이 진행되는 동안, 그리고 적어도 하나의 반응 산물이 형성된 후, 하나 또는 그 이상의 반응 시약을 반응에 계속 첨가하는 공정을 지칭한다. 상기 반응 산물은 반응이 진행됨에 따라 반응으로부터 계속 빼낼 수 있다.

[0171] 본원에 사용된 용어 “유동(flow) 반응기”란 연속 반응 화학에 사용되는 임의의 반응기 용기, 전형적으로 튜브형 반응기를 지칭한다. 유동 반응기는 스테인리스 스틸, 유리, 폴리머 등으로 만들 수 있다.

[0172] 본 명세서에 사용된 용어 “필터”는 유체에서 종(species)의 분리를 허용하는 선택적 장벽을 의미한다. 분리는 하나 또는 그 이상의 다른 종의 통과를 지연시키면서, 해당 필터를 통해 하나 또는 그 이상의 유체 종의 선택적으로 통과(침투)함으로써 달성된다.

[0173] 본원에 사용된 용어 “공급물(feed) 스트림”은 필터 또는 막에서 구성성분들의 분리를 위해 필터 또는 막에 공급되는 유체를 지칭한다.

[0174] 본원에 사용된 용어 “잔류액(retentate)”이란 필터를 통과하지 않는 공급물 스트림의 부분을 지칭한다.

[0175] 본원에 사용된 용어 “투과액(permeate)”이란 필터를 통과하는 공급물 스트림의 부분을 지칭한다.

[0176] 본원에 사용된 용어 “접선 흐름 여과(TFF)”란 공급물 스트림이 막면에 평행하게 통과하는 막 기반 여과 공정을 지칭한다. 공급 스트림의 한 부분은 막(투과물)을 통과하는 반면, 나머지(잔류액)는 공급 저장소로 다시 재순환된다. TFF는 교차-흐름 여과라고도 한다. TFF를 수행하기 위한 시스템이 알려져 있으며, 예를 들어, Pellicon-유형 시스템 (Millipore, Billerica, MA), Sartocore Cassette 시스템 (Sartorius AG, Edgewood,

NY), 및 Centrasette-유형 시스템 (Pall Corporation, East Hills, NY)이 내포된다.

- [0177] 본원에 사용된 용어 “단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF)”란 공급물 스트림이 여과막을 한 번만 통과하는 접선 흐름 여과 공정을 의미한다. SPTFF를 실행하기 위한 시스템은 알려져 있으며, 예를 들면, Cadance-유형 시스템 (Pall Corporation, Westborough, MA)이 내포된다. SPTFF를 수행하기 위한 시스템 및 방법들은 예를 들면, U.S. 특허 번호 7,384,549, U.S. 특허 번호 7,510,654, U.S. 특허 번호 7,682,511, U.S. 특허 번호 7,967,987, U.S. 특허 번호 8,157,999, 및 U.S. 특허 번호 8,231,787에 기재되어 있고, 이들 특허는 각각 전문이 본원 참고 자료에 편입된다.
- [0178] 본원에 사용된 용어 “연속 정용여과(diafiltration)”란 공급물 스트림을 희석제와 혼합하고, 이를 막을 가로질러 펌핑함으로써 용질의 선택적 분리가 연속 방식으로 달성되는 정용여과 공정을 지칭하고, 이때 투과액과 잔유액을 빼낸다. 여과가 진행됨에 따라, 생성물이 용기 안에서 형성되지 않습지만; 대신 여과 과정에서 시스템으로부터 지속적으로 회수된다. “역전류 정용여과”란 공정 스트림 (가령, 투과액 또는 잔류액)은 정용여과 단계에서 재순화되는 연속 정용여과 공정을 지칭한다.
- [0179] 용어 “인-라인 모니터링”이란 예를 들어, 생산 또는 정제 공정 동안 실시간으로 분석물을 모니터링하는 것을 지칭한다. 인-라인 모니터링은 실-시간 피드백을 제공하지 않는 공정-내 샘플링 또는 오프라인 분석과 구별된다.
- [0180] 용어 “인-라인 공정 자동화 기술”이란 공정 중에 피분석물 모니터링에 사용되는 모든 인-라인 측정 장치를 지칭한다.
- [0181] 본 명세서에서 사용된 용어 “피분석물(analyte)”이란 광범위한 용어이며, 분석할 수 있는 유체의 물질 또는 화학 성분을 제한 없이 지칭된다. 피분석물에는 자연 발생 물질, 인공 물질, 대사 산물 및/또는 반응 생성물이 내포될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법에서 측정용 피분석물은 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 약물, 링커, 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 결합된 링커, 약물에 결합된 링커, 항체-약물 콘주게이트(ADC), 약물-대비-항체 비율 (DAR), 및/또는 불순물이다.
- [0182] 본원에 사용된 용어 “제형 완충액”이란 활성 성분의 생물학적 활성을 허용하고, 제형이 투여될 대상에게 허용할 수 없을 정도로 독성이 있는 추가 성분을 함유하지 않는 완충제를 지칭한다.
- [0183] “암” 및 “암성(cancerous)”이라는 용어는 세포 집단이 조절불능의 세포 성장을 특징으로 하는 포유 동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 또는 기술한다. “종양” 및 “신생물(neoplasm)”이란 양성 (비-암성) 또는 전-암성 병변을 포함한 악성 (암성)의, 과도한 세포 성장 또는 증식으로 인한 하나 또는 그 이상의 세포를 지칭한다.
- [0184] 암의 예로는 폐암 (이를 테면, 비-소-세포 폐암), 결장직장암, 방광암, 위암, 췌장암, 신장 세포 암종, 전립선암, 식도암, 유방암, 두경부암, 자궁암, 난소암, 간암, 자궁경부암, 갑상선암, 고환암, 골수암, 흑색종 및 림프암이 내포된다. 특정 구체예들에서, 상기 암은 비-소-세포 폐암, 결장직장암, 위암 또는 췌장암이다. 특정 구체예들에서, 암은 비-소-세포 폐암 (편평 세포, 비-편평 세포, 선암종, 또는 거대-세포 미분화된 암종), 결장직장암 (선암종, 위장관 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양, 원발성 결장직장 림프종, 평활근육종, 또는 편평 세포 암종) 또는 유방암 (이를 테면, 삼중 음성 유방암 (TNBC))이다. 특정 구체예들에서, 암은 림프종 및 백혈병이다. 특정 구체예들에서, 암의 예로는 AML, CML, ALL (가령, B-ALL), CLL, 골수이형성 증후군, 기본 혈질세포양(plasmacytoid) DC 신생물(BPDCN) 백혈병, 비-호지킨 림프종(NHL)을 포함하는 B-세포 림프종, 전구체 B-세포 림프아구 백혈병/림프종 및 성숙 B-세포 신생물, 이를 테면, B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL)/작은 림프구성 림프종 (SLL), B-세포 전림프구성 백혈병, 림프구형질세포성 림프종, 맨틀 세포 림프종 (MCL), 낮은-등급, 중간-등급 및 고등-등급 FL을 포함하는 여포성 림프종 (FL), 피부 모낭 중앙 림프종, 경계 구역 B-세포 림프종 (MALT 유형, 종양(nodal) 및 비장 유형), 털 세포 백혈병 (HCL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 버킷(Burkitt) 림프종, 형질세포종, 혈장 세포 골수종, 이식-후 림프증식성 장애, 발덴스트롬(Waldenstrom) 마크로글로불린혈증, 역형성 거대-세포 림프종 (ALCL), 및 호지킨(Hodgkin) 백혈병 (HL)이 내포된다. 특정 구체예들에서, 상기 암은 BPDCN 백혈병이다. 특정 구체예들에서, 상기 암은 ALL이다. 다른 구체예들에서, 상기 암은 AML이다.
- [0185] 용어 “대상체(subject)”는 특정 치료를 받는 인간, 비-인간 영장류, 설치류 및 이와 유사한 것들을 포함하지만, 이에 국한되지 않는 임의의 동물 (예를 들어, 포유 동물)을 지칭한다. 전형적으로, 용어 “대상체”와 “환자”는 인간 대상과 관련하여 본원에서 호환적으로 사용된다.
- [0186] 용어 “약학적 조성물”은 활성 성분의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하기 위한 형태의 조제물을 지칭하며, 조

성물이 투여되는 대상에게 수용불가능한 독성을 주는 추가 성분들은 포함하지 않는다. 이러한 조성물은 무균일 수 있다.

[0187] 본원에 개시된 바와 같은 면역곤주게이트의 "치료요법적 유효량"이란 구체적으로 명시된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "치료요법적 유효량"은 언급된 목적과 관련하여 경험적으로 그리고 통상적인 방식으로 결정될 수 있다.

[0188] 본원에 사용된 "알킬" 또는 "선형 또는 분기형 알킬"이란 포화된 선형 또는 분기형 단가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 바람직한 구체예들에서, 직쇄 또는 분기-쇄 알킬은 30개 또는 이보다 적은 탄소 원자 (가령, 직쇄 알킬기의 경우 C_1-C_{30} , 분기형 알킬의 경우 C_3-C_{30})를 갖고, 더욱 바람직하게는 20개 또는 이보다 적은 탄소 원자를 갖는다. 더더욱 바람직하게는, 직쇄 또는 분기-쇄 알킬은 10개 또는 이보다 적은 탄소 원자 (가령, 직쇄 알킬기의 경우 C_1-C_{10} , 분기형 알킬의 경우 C_3-C_{10})를 갖는다. 다른 구체예들에서, 직쇄 또는 분기-쇄 알킬은 6개 또는 이보다 적은 탄소 원자 (가령, 직쇄 알킬기의 경우 C_1-C_6 또는 분기-쇄 알킬의 경우 C_3-C_6)를 갖는다. 알킬의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 메틸, 에틸, 1-프로필, 2-프로필, 1-부틸, 2-메틸-1-프로필, $-CH_2CH(CH_3)_2$, 2-부틸, 2-메틸-2-프로필, 1-펜틸, 2-펜틸 3-펜틸, 2-메틸-2-부틸, 3-메틸-2-부틸, 3-메틸-1-부틸, 2-메틸-1-부틸, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, 2-메틸-2-펜틸, 3-메틸-2-펜틸, 4-메틸-2-펜틸, 3-메틸-3-펜틸, 2-메틸-3-펜틸, 2,3-디메틸-2-부틸, 3,3-디메틸-2-부틸, 1-헵틸, 1-옥틸, 및 이와 유사한 것들. 더욱이, 명세서, 실시예 및 청구범위 전반에 걸쳐 사용된 용어 "알킬"은 "치환안된 알킬" 및 "치환된 알킬"을 모두 포함하는 것으로 의도되며, 후자의 경우는 탄화수소 골격의 하나 또는 그 이상의 탄소에서 수소를 대체하는 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, (C_x-C_{xx}) 알킬 또는 C_{x-xx} 알킬이란 $x-xx$ 개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬을 의미한다.

[0189] "알케닐" 또는 "선형 또는 분기형 알케닐"이란 적어도 하나의 불포화 부위, 가령, 탄소-탄소 이중 결합을 갖고, 2~20개 탄소 원자의 선형 또는 분기-쇄 단가 탄화수소 라디칼을 지칭하며, 이때 알케닐 라디칼에는 "시스" 및 "트랜스" 배향(orientations) 또는 대안적으로 "E" 및 "Z" 배향을 갖는 라디칼이 내포된다. 예로는 에틸에닐 또는 비닐 ($-CH=CH_2$), 알릴 ($-CH_2CH=CH_2$), 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 바람직하게는, 알케닐은 2~10개의 탄소 원자를 갖는다. 더욱 바람직하게는, 알킬은 2~4개의 탄소 원자를 갖는다.

[0190] "알키닐" 또는 "선형 또는 분기형 알키닐"이란 적어도 하나의 불포화 부위, 가령, 탄소-탄소, 삼중 결합을 갖는, 2~20개 탄소 원자의 선형 또는 분기형 단가 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 예로는 에티닐, 프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-펜티닐, 헥시닐, 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 바람직하게는, 알키닐은 2~10개의 탄소 원자를 갖는다. 더욱 바람직하게는, 알키닐은 2~4개의 탄소 원자를 갖는다.

[0191] 용어 "사이클릭 알킬" 및 "사이클로알킬"은 호환적으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이 용어는 포화된 카르보사이클릭 환의 라디칼을 의미한다. 바람직한 구체예들에서, 사이클로알킬은 환 구조에서 3~10개의 탄소 원자를 갖고, 더욱 바람직하게는 환 구조에서 5~7개의 탄소 원자를 갖는다. 일부 구체예들에서, 두 개의 사이클릭 환은 두 개 또는 그 이상의 원자를 공통으로 보유할 수 있고, 가령, 해당 환들은 "융합된 환"이다. 적합한 사이클로알킬에는 사이클로헵틸, 사이클로헥실, 사이클로펜틸, 사이클로부틸 및 사이클로프로필이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 사이클로알킬은 일-사이클릭이다. 일부 구체예들에서, 사이클로알킬은 이-사이클릭이다. 일부 구체예들에서, 사이클로알킬은 삼-사이클릭이다.

[0192] 용어 "사이클로알킬알킬"이란 사이클로알킬기로 치환된, 상기에서 기재된 알킬기를 지칭한다.

[0193] 용어 "사이클릭 알케닐"이란 환 구조에서 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 카르보사이클릭 환 라디칼을 지칭한다.

[0194] 용어 "사이클릭 알키닐"이란 환 구조에서 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 카르보사이클릭 환 라디칼을 지칭한다.

[0195] 용어 "아릴" 또는 "방향족 환"은 본원에서 사용된 바와 같이, 환의 각 원자가 탄소인, 치환된 또는 치환안된 단일-환 방향족 기들이 내포된다. 바람직하게는, 해당 환은 5-구성원 내지 7-구성원의 환, 더욱 바람직하게는, 6-구성원의 환이다. 아릴기에는 페닐, 페놀, 아닐린, 및 이와 유사한 것들이 포함되나, 이에 국한되지 않는다. 용어 "아릴"에는 2개 또는 그 이상의 환을 갖는 "폴리사이클일", "폴리사이클", 및 "폴리사이클릭" 환 시스템

템이 내포되는데, 이때 2개 또는 그 이상의 원자가 두 개 인접 환에 공통적이며, *가령*, 해당 환은 "융합된 환"이며, 이때 환중에서 적어도 하나는 방향족이며, *가령*, 다른 사이클릭 환은 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 또는 방향족 환일 수 있다. 일부 바람직한 구체예들에서, 폴리사이클은 2-3개의 환을 갖는다. 특정 바람직한 구체예들에서, 폴리사이클릭 환 시스템은 두 개의 사이클릭 환을 갖고, 이때 모든 환은 방향족이다. 폴리사이클의 각 환은 치환되거나, 또는 치환안될 수 있다. 특정 구체예들에서, 폴리사이클의 각 환은 해당 환에서 3~10개의 탄소 원자, 바람직하게는 5~7개의 탄소 원자를 함유한다. 예를 들면, 아릴기에는 페닐, 톨릴, 안트라세닐, 플루오레닐, 인데닐, 아줄레닐 및 나프틸, 뿐만 아니라 벤조-융합된 카르보사이클릭 모이어티, 이를 테면 5,6,7,8-테트라히드로나프틸, 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구체예들에서, 아릴은 일-환 방향족기다. 일부 구체예들에서, 아릴은 이-환 방향족기다. 일부 구체예들에서, 아릴은 삼-환 방향족기다.

[0196] 용어 "헤테로사이클", "헤테로사이클일", 및 "헤테로사이클릭 환"은 본원에서 사용된 바와 같이, 3-구성원 내지 18-구성원의 환, 바람직하게는 3-구성원 내지 10-구성원의 환, 더욱 바람직하게는 3-구성원 내지 7-구성원의 치환된 또는 치환안된 비-방향족 환을 지칭하며, 이때 환 구조에는 적어도 하나의 헤테로원자, 바람직하게는 1~4개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 1개 또는 2개의 헤테로원자가 내포된다. 특정 구체예들에서, 환 구조는 2개의 사이클릭 환을 가질 수 있다. 일부 구체예들에서, 2개 사이클릭 환은 2개 또는 그 이상 원자를 공통으로 보유하며, *가령*, 환은 "융합된 환"이다. 헤테로사이클일기에는 예를 들면, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 몰포롤린, 락톤, 락탐, 및 이와 유사한 것들이 내포된다. 헤테로사이클은 Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 특히 Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950, 현재까지), 구체적으로 Volumes 13, 14, 16, 19, 및 28; 그리고 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566에서 기술된다. 헤테로사이클릭 환에는 테트라히드로퓨란, 디히드로퓨란, 테트라히드로티엔, 테트라히드로피란, 디히드로피란, 테트라히드로티오피란, 티오폴로롤린, 티록산, 호모피페라진, 아제티딘, 옥세탄, 티에탄, 호모피페리딘, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 몰포롤린, 옥세판, 티에판, 옥사제핀, 디아제핀, 티아제핀, 2-피롤린, 3-피롤린, 인돌린, 2H-피란, 4H-피란, 디옥산, 1,3-디옥솔란, 피라졸린, 디티안, 디티올란, 디히드로피란, 디히드로티엔, 디히드로퓨란, 피라졸리디닐이미다졸린, 이미다졸리딘, 3-아자비시클로[3.1.0]헥산, 3-아자바이사이클로[4.1.0]헵탄, 및 아자바이사이클로[2.2.2]헥산이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 스피로 모이어티는 이 정의의 범위 안에 또한 포함된다.

[0197] 환의 원자들이 옥소 (=O) 모이어티로 치환된, 헤테로사이클릭 기의 예로는 피리미디노닐 및 1,1-디옥소-티오폴로롤린이다.

[0198] 용어 "헤테로아릴" 또는 "헤테로방향족 환"이란 본원에서 사용된 바와 같이, 치환된 또는 치환안된 방향족 단일 환 구조, 바람직하게는 6-구성원 내지 18-구성원의 환, 바람직하게는 5-구성원 내지 7-구성원의 환, 더욱 바람직하게는 5-구성원 내지 6-구성원의 환을 지칭하며, 이의 환 구조에는 적어도 하나의 헤테로원자 (*가령*, O, N, 또는 S), 바람직하게는 1~4개 또는 1~3개의 헤테로원자, 더욱 바람직하게는 1개 또는 2개의 헤테로원자가 내포된다. 2개 또는 그 이상의 헤테로원자가 헤테로아릴 환에 존재하는 경우, 이들은 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 용어 "헤테로아릴"에는 2개 또는 그 이상의 사이클릭 환을 갖는 "폴리사이클일", "폴리사이클", 및 "폴리사이클릭" 환 시스템이 내포되는데, 이때 2개 또는 그 이상의 환 원자가 두 개 인접 환에 공통적이며, *가령*, 해당 환은 "융합된 환"이며, 이때 해당 환의 적어도 하나는 헤테로방향족이며, *가령*, 다른 사이클릭 환은 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로방향족, 및/또는 헤테로사이클일일 수 있다. 일부 바람직한 구체예들에서, 폴리사이클릭 헤테로아릴은 2-3개의 환을 갖는다. 특정 구체예들에서, 바람직한 폴리사이클릭 헤테로아릴은 두 개의 사이클릭 환을 갖고, 이들 환은 모두 방향족이다. 특정 구체예들에서, 폴리사이클의 각 환은 해당 환에서 3~10개의 원자, 바람직하게는 5~7개의 원자를 함유한다. 예를 들면, 헤테로아릴기에는 다음의 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 피롤, 푸란, 티오펜, 이미다졸, 옥사졸, 티아졸, 피라졸, 피리딘, 피라진, 피리다진, 퀴놀린, 피리미딘, 인돌리진, 인돌, 인다졸, 벤즈이미다졸, 벤조티아졸, 벤조푸란, 벤조티오펜, 신놀린, 프탈라진, 퀴나졸린, 카바졸, 페녹사진, 퀴놀린, 퓨린 및 이와 유사한 것들. 일부 구체예들에서, 헤테로아릴은 일-환 방향족기다. 일부 구체예들에서, 헤테로아릴은 이-환 방향족기다. 일부 구체예들에서, 헤테로아릴은 삼-환 방향족기다.

[0199] 헤테로사이클 또는 헤테로아릴 기는 이러한 것들이 가능하다면, 탄소 (탄소-연계된), 또는 질소 (질소-연계된) 부착된 것일 수 있다. 예를 들자면, 탄소 결합된 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 피리딘의 위치 2, 3, 4, 5, 또는 6, 피리다진의 위치 3, 4, 5, 또는 6, 피리미딘의 위치 2, 4, 5, 또는 6, 피라진의 위치 2, 3, 5, 또는

6, 퓨란, 테트라히드로퓨란, 티오퍼란, 티오펜, 피롤 또는 테트라히드로피롤의 위치 2, 3, 4, 또는 5, 옥사졸, 이미다졸 또는 티아졸의 위치 2, 4, 또는 5, 이소옥사졸, 피라졸, 또는 이소티아졸의 위치 3, 4, 또는 5, 아지리딘의 위치 2 또는 3, 아제티딘의 위치 2, 3, 또는 4, 퀴놀린의 위치 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 또는 이소퀴놀린의 위치 1, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8에서 결합되나, 이에 국한되지 않는다.

[0200] 예로써, 질소 결합된 헤테로사이클 또는 헤테로아릴은 아지리딘, 아제티딘, 피롤, 피롤리딘, 2-피롤린, 3-피롤린, 이미다졸, 이미다졸리딘, 2-이미다졸린, 3-이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 2-피라졸린, 3-피라졸린, 피페리딘, 피페라진, 인돌, 인돌린, 1H-인다졸의 위치 1, 이소인돌, 또는 이소인돌린의 위치 2, 몰포린의 위치 4, 그리고 카르바졸, 또는 0-카르보린의 위치 9에서 결합되나, 이에 국한되지 않는다.

[0201] 헤테로아릴 또는 헤테로사이클일에 존재하는 헤테로 원자에는 산화된 형태, 이를 테면 NO, SO, 및 SO₂들이 내포된다.

[0202] 일부 구체예들에서, 헤테로방향족 환은 5-구성원 내지 18-구성원의 환이다.

[0203] 용어 “할로” 또는 “할로겐”이란 플루오린 (F), 염소 (Cl), 브롬 (Br) 또는 요오드 (I)를 지칭한다. 일부 구체예들에서, 할로겐은 플루오린이다. 일부 구체예들에서, 할로겐은 염소다. 일부 구체예들에서, 할로겐은 브롬이다. 일부 구체예들에서, 할로겐은 요오드다. 본원에서 사용된 바와 같이, 본원에서 정의된 바와 같이, 용어 “할로알킬”이란 본원에서 정의된 하나 또는 그 이상의 할로게에 의해 치환되는 알킬을 지칭한다. 상기 할로알킬이란 모노-할로알킬, 디할로알킬 또는 폴리할로알킬일 수 있다. 모노할로알킬은 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 요오드 치환기를 가질 수 있다. 디할로알킬 또는 폴리할로알킬은 2개 또는 그 이상의 동일한 할로 원자로 치환될 수 있거나, 또는 상이한 할로기의 조합으로 치환될 수 있다. 할로알킬의 예로는 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 클로로메틸, 디클로로메틸, 트리클로로메틸, 펜타플루오로메틸, 헵타플루오로프로필, 디플루오로클로로메틸, 디클로로플루오로메틸, 디플루오로에틸, 디플루오로프로필, 디클로로에틸 및 디클로로프로필이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0204] 본원에 이용된 “알콕시”는 알킬-O-을 지칭하며, 이때 알킬은 본원에서 상기에 정의된 바와 같다. 알콕시의 예로는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 2-프로폭시, 부톡시, tert-부톡시, 펜틸옥시, 헥실옥시, 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0205] 상기에서 기술된 알킬, 할로알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클릭 알킬, 사이클릭 알케닐, 사이클릭 알키닐, 카르보사이클일, 아릴, 헤테로사이클일 및 헤테로아릴은 하나 또는 그 이상의 (가령, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의) 치환체에 의해 임의선택적으로 치환된다.

[0206] “치환되지 않은”으로 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원의 화학적 모이어티에 대한 언급에서 치환된 변이체가 또한 내포된 것으로 이해된다. 예를 들면, “알킬”기 또는 모이어티에 대한 언급에는 명시적으로 치환된 변이체 및 치환안된 변이체가 모두 내포된다. 화학적 모이어티에서 치환체의 예로는 할로겐, 히드록실, 카르보닐 (이를 테면, 카르복실, 알콕시카르보닐, 포르밀, 또는 아실), 티오키카르보닐 (이를 테면 티오에스테르, 티오아세테이트, 또는 티오포르메이트), 알콕실, 알킬티오, 아실옥시, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프히드릴, 알킬티오, 술페이트, 설포네이트, 설파모일, 설포아미도, 설포닐, 헤테로사이클일, 아랄킬, 또는 아릴 또는 헤테로아릴 모이어티가 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0207] “선택적” 또는 “선택적으로”는 이후에 설명되는 상황이 발생하거나 또는 발생하지 않을 수 있음을 의미하며, 따라서 본 출원에는 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우가 내포된다. 예를 들면, “임의선택적으로 치환된”이라는 문구는 비-수소 치환체가 주어진 원자에 존재할 수도 있고, 또는 존재하지 않을 수도 있음을 의미하고, 따라서, 본 출원은 비-수소 치환체가 존재하는 구조 및 비-수소 치환체가 존재하지 않는 구조가 내포된다.

[0208] 용어 “치환된”이란 하나 또는 그 이상의 탄소, 질소, 산소 또는 황 원자 상의 수소를 대체하는 치환체를 보유하는 모이어티를 지칭한다. “치환” 또는 “~로 치환된”은 이러한 치환이 치환된 원자 및 치환체의 허용된 원자에 따르며, 따라서 치환에 의해 안정된 화합물, 예를 들어, 재배열, 고리화, 제거 등과 같이 자발적으로 변형을 겪지 않는 안정한 화합물이 생성된다는 묵시적 단서가 내포된 것으로 이해될 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “치환된”이란 유기 화합물의 모든 가능한 치환체들이 내포된 것으로 간주된다. 넓은 측면에서, 허용되는 치환체는 유기 화합물의 비환식(acyclic) 및 환식, 분 지형 및 비분지형, 탄소 환식 및 헤테로 환식, 방향족 및 비-방향족 치환체들이 내포된다. 허용가능한 치환체는 적합한 유기 화합물에 대해 하나 또는 그 이상의, 그리고 동일한 또는 상이한 치환체일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 헤테로원자 이를 테면, 질소는 수소 치환체

를 보유할 수 있거나 및/또는 헤테로원자의 원자가를 만족시키는 본원에서 기술된 유기 화합물의 임의의 허용가능한 치환체를 보유할 수 있다. 치환체에는 본원에서 기술된 임의의 치환체가 내포될 수 있는데, 예를 들면, 할로젠, 히드록실, 카르보닐 (이를 테면 카르복실, 알콕시카르보닐, 포르밀, 또는 아실), 티오키르보닐 (이를 테면, 티오에스테르, 티오아세테이트, 또는 티오포르메이트), 알콕실, 알킬티오, 아실옥시, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로, 아지도, 설프히드릴, 알킬티오, 술페이트, 설프네이트, 설프아미도, 설프닐, 헤테로사이클릴, 아랄킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티가 될 수 있다. 설명을 위해, 모노플루오로알킬은 플루오로 치환체로 치환된 알킬이며, 디플루오로알킬은 2개의 플루오로 치환체로 치환된 알킬이다. 치환체에 하나 이상의 치환이 있는 경우, 각각의 비-수소 치환기는 동일하거나 또는 상이할 수 있음을 인식해야 한다(달리 언급되지 않는 한).

[0209] 치환체의 탄소가 치환체 목록 중 하나 또는 그 이상으로 임의선택적으로 치환되는 것으로 기술되는 경우, 탄소 상의 수소들 중 하나 또는 그 이상(임의의 존재하는 정도까지)은 개별적으로 및/또는 함께 독립적으로 선택된 임의의 치환체로 대체될 수 있다. 치환체의 질소가 치환체 목록 중 하나 또는 그 이상으로 임의선택적으로 치환되는 것으로 기술되는 경우, 질소 상의 수소들 중 하나 또는 그 이상(임의의 존재하는 정도까지)은 각각 독립적으로 선택된 임의의 치환체로 대체될 수 있다. 하나의 예시적인 치환체는 $-NR'R''$ 로 묘사될 수 있으며, 이때 R' 및 R'' 는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 헤테로사이클릭 환을 형성할 수 있다. R' 및 R'' 에서 형성된 헤테로사이클릭 환은 이들이 부착된 질소 원자와 함께 부분적으로 또는 완전히 포화될 수 있다. 일부 구체예들에서, 상기 헤테로사이클릭 환은 3 ~ 7개 원자로 구성된다. 다른 구체예들에서, 상기 헤테로사이클릭 환은 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 이속사졸릴, 피리딜 및 티아졸릴에서 선택된다.

[0210] 본 명세서에서는 용어 “치환체”, “라디칼”, 및 “기(group)”를 호환적으로 사용한다.

[0211] 치환체 그룹이 치환체 목록 중 하나 또는 그 이상에 의해 임의선택적으로 치환되는 것으로 집합적으로 기술되는 경우, 해당 기에는 다음이 내포될 수 있다: (1) 대체불가능한 치환체, (2) 임의선택적 치환체에 의해 치환되지 않은 대체가능한 치환체, 및/또는 (3) 하나 또는 그 이상의 임의선택적 치환체에 의해 치환된 대체가능한 치환체.

[0212] 치환체가 최대 특정 수의 비-수소 치환체로 임의선택적으로 치환되는 것으로 기술되는 경우, 해당 치환체는 (1) 치환되지 않거나; 또는 (2) 최대 특정 수의 비-수소 치환체, 또는 치환체 상의 대체가능한 위치들중 최대 수, 단, 어느 경우든 더 적은 수로 치환될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 만약 치환체가 최대 3개의 비-수소 치환체로 임의선택적으로 치환된 헤테로아릴로 기술되는 경우, 그 다음 3개 미만의 대체가능한 위치를 갖는 임의의 헤테로아릴은 헤테로아릴이 대체가능한 위치를 갖는 만큼만 비-수소 치환체로 임의선택적으로 치환될 것이다. 이러한 치환체는 다음으로부터 선택될 수 있지만, 이들은 비-제한적인 예시다: 1 ~ 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 할로젠, 구아니디늄 $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, $-SOR^{101}$ 로 나타낸 술폭시드, $-SO_2R^{101}$ 로 나타낸 술폰, 술포네이트 $-SO_3M$, 술페이트 $-OSO_3M$, $-SO_2NR^{101}R^{102}$ 로 나타낸 술폰아미드, 시아노, 아지도, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ 및 폴리에틸렌 글리콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$, 이때 M은 H 또는 양이온 (이를 테면 Na^+ 또는 K^+)이며; R^{101} , R^{102} 및 R^{103} 은 각각 독립적으로 H, 1 ~ 10개 탄소 원자를 갖는 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $(-OCH_2CH_2)_nR^{104}$ 이며 (이때 n은 1~24이며), 6 ~ 10개 탄소 원자를 갖는 아릴, 3 ~ 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로사이클릭 환, 그리고 5 ~ 10개 탄소 원자를 갖는 헤테로아릴; 그리고 R^{104} 는 H 또는 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬이며, 이때 R^{100} , R^{101} , R^{102} , R^{103} 및 R^{104} 로 나타낸 기들에서 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클릭 알킬, 사이클릭 알케닐, 사이클릭 알키닐, 카르보사이클릴, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴에 대한 치환체에는 할로젠, $-CN$, $-NR^{102}R^{103}$, $-CF_3$, $-OR^{101}$, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, $-SR^{101}$, $-SOR^{101}$, $-SO_2R^{101}$ 및 $-SO_3M$ 이 내포된다.

[0213] 기들 내의 탄소 원자의 수는 본원에서 접두사 " C_{x-xx} "로 지정될 수 있으며, 이때 x 및 xx는 정수이다. 예를

들면, “C₁₋₄알킬” 또는 “C1-C4 알킬”은 1 ~ 4개의 탄소 원자를 갖는 알킬이다.

- [0214] 용어 “화합물”, “세포독성 제제”, 또는 “세포독성 화합물”은 호환사용된다. 이들은 구조 또는 화학식 또는 이의 임의의 유도체가 본 발명에 개시된 화합물 또는 참고자료에 편입된 구조 또는 화학식 또는 이의 임의의 유도체들이 내포된다는 의도이다. 상기 용어는 또한 본 발명에 개시된 모든 화학식의 화합물의 입체이성질체, 기하 이성질체, 호변체(tautomers), 용매화물(solvates), 대사산물(metabolites) 및 염 (예를 들어, 약제적으로 허용되는 염)을 포함한다. 상기 용어는 또한 상기 중 임의의 것의 임의의 용매화물, 수화물(hydrates) 및 다형체(polymorphs)를 포함한다. 본 출원에서 기술된 본 발명의 특정 측면들에서 “입체이성질체”, “기하 이성질체”, “호변체”, “용매화물”, “대사체”, “염”, “콘주게이트”, “콘주게이트 염”, “용매화물”, “수화물” 또는 “다형체”의 구체적인 언급은 상기 용어 “화합물”이 이러한 다른 형태의 언급없이 사용되는 경우, 본 발명의 다른 측면들에서 이러한 형태의 의도된 생략으로 간주 해석되어서는 안된다.
- [0215] “키랄(chiral)”이라는 용어는 거울상 짝의 비-중첩성 (non-superimposability) 특성을 갖는 분자를 지칭하는 반면, “아키랄(achiral)”이라는 용어는 그들의 거울상 짝에 중첩가능한 분자를 지칭한다.
- [0216] 용어 “입체이성질체(stereoisomer)”는 동일한 화학적 구성 및 연결성(connectivity)을 갖지만, 단일 결합에 대한 회전에 의해 상호전환될 수 없는 공간에서 원자의 상이한 배향(orientations)을 갖는 화합물을 지칭한다.
- [0217] “부분입체이성질체(diastereomer)”는 둘 또는 그 이상의 키랄 중심을 가지며, 이들 분자는 서로 거울상이 아닌 입체 이성질체를 지칭한다. 부분입체이성질체는 상이한 물리적 성질, 예를 들어, 상이한 용점, 비점, 스펙트럼 특성 및 반응성을 갖는다. 부분입체이성질체의 혼합물은 결정화, 전기영동 및 크로마토그래피와 같은 고해상도 분석 절차 하에서 분리될 수 있다.
- [0218] “거울상이성질체(enantiomers)”는 서로 중첩될 수 없는 거울상인 화합물의 2 개 입체이성질체를 지칭한다.
- [0219] 본원에 사용된 입체화학적 정의 및 규칙은 일반적으로 다음과 같다: S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill, *Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 그리고 Eliel, E. and Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. 본 발명의 화합물은 비대칭 또는 키랄 중심을 함유할 수 있으며, 따라서 상이한 입체이성질체 형태로 존재한다. 부분입체이성질체, 거울상이성질체 및 회전장애이성질체(atropisomers) 뿐만 아니라, 라섬체(racemic) 혼합물과 같은 이들의 혼합물을 포함하는 본 발명의 화합물의 모든 입체이성질체 형태는 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 의도된다. 많은 유기 화합물이 광학 활성 형태로 존재하는데, 즉, 이들은 평면-편광(plane-polarized light)을 회전시키는 능력을 갖는다. 광학 활성 화합물을 기술함에 있어서, 접두사 D와 L, 또는 R과 S는 키랄 중심(들)에 대한 분자의 절대적 배열을 나타내기 위해 사용된다. 접두사 d와 l, 또는 (+)와 (-)는 화합물에 의한 평면-편광의 회전의 표시를 나타내기 위해 사용되며, (-) 또는 l은 화합물이 좌회전성(levorotatory)임을 의미한다. (+) 또는 d의 접두사가 붙은 화합물은 우회전성(dextrorotatory)이다. 주어진 화학 구조에 대해, 이들 입체이성질체는 서로 거울상 인 점을 제외하고는 동일하다. 특정 입체이성질체는 또한 거울상이성질체로 지칭될 수 있고, 이러한 이성질체의 혼합물은 종종 거울상이성질체 혼합물로 불린다. 거울상이성질체의 50:50 혼합물은 라섬체 혼합물 또는 라섬체로 지칭되며, 이는 화학 반응 또는 공정에서 입체선택 또는 입체 특이성이 없는 경우에 발생할 수 있다. 용어 “라섬체 혼합물” 및 “라섬체”는 광학 활성이 없는, 2 개의 거울상이성질체 종(species)의 등몰(equimolar) 혼합물을 지칭한다.
- [0220] 용어 “호변체” 또는 “호변체 형태”는 낮은 에너지 장벽을 통해 상호전환 가능한 상이한 에너지의 구조적 이성질체를 지칭한다. 예를 들면, 양성자 호변체(양성자 이전성(prototropic) 호변체로도 알려져 있음)는 케토-에놀(keto-enol) 및 이민-에나민(imine-enamine) 이성질화와 같은 양성자의 이동을 통한 상호전환을 포함한다. 원자가(valence) 호변체는 일부 결합 전자의 재구성에 의한 상호전환을 포함한다.
- [0221] 본원에 사용된 어구 “약제학적으로 허용되는 염”은 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용되는 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 염은 술페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브롬화물, 요오드화물, 질산염, 중황산염, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 바이타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레이트, 젠티지네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루코루네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설폰에이트 “메실레이트”, 에탄설폰에이트, 벤젠설폰 에이트, p-톨루엔설폰에이트, 파모에이트(가령, 1,1'-메틸렌-비스-(2-히드록시-3-나프토에이트)) 염, 알칼리 금속(가령, 나트륨 및 칼륨) 염, 알칼리 토금속(가령, 마그네슘) 염, 그리고 암모늄 염을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 염은 아

세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 다른 반대 이온(counter ion)과 같은 또다른 분자의 함입과 관련될 수 있다. 상기 반대 이온은 부모 화합물의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 부분일 수 있다. 또한, 약제학적으로 허용되는 염은 이의 구조에서 하나 이상의 하전된 원자를 가질 수 있다. 다수의 하전된 원자가 약제학적으로 허용되는 염의 일부인 경우에는 다수의 반대 이온을 가질 수 있다. 그런 이유로, 약제학적으로 허용되는 염은 하나 또는 그 이상의 하전된 원자 및/또는 하나 또는 그 이상의 반대 이온을 가질 수 있다.

[0222] 본 발명의 화합물이 염기인 경우, 바람직한 약제학적으로 허용되는 염은 당분야에서 이용가능한 임의의 적합한 방법에 의해 준비될 수 있는데, 예를 들면, 자유 염기를 무기 산, 이를 테면, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 메탄설폰산, 인산 및 이와 유사한 것들로 처리, 또는 유기 산, 이를 테면, 아세트산, 말레산, 숙신산, 만델산, 푸마르산, 말론산, 피루브산, 옥살산, 글리콜산, 살리실산, 피라노시딜산, 예컨대 글루쿠론산 또는 갈락투론산, 알파 히드록시산, 이를 테면, 시트르산 또는 타르타르산, 아미노산, 이를 테면, 아스파르트산 또는 글루타민산, 방향족산, 이를 테면, 벤조산 또는 시남산, 술폰산, 이를 테면, p-톨루엔술폰산 또는 에탄술폰산, 또는 이와 유사한 것들로 처리함으로써, 준비될 수 있다.

[0223] 본 발명의 화합물이 산인 경우, 바람직한 약제학적으로 허용되는 염은 임의의 적합한 방법, 예를 들어 자유 산을 무기 또는 유기 염기, 예컨대, 아민 (1 차, 2 차 또는 3 차), 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물, 또는 이와 유사한 것으로 처리함으로써, 준비될 수 있다. 적합한 염의 예시적인 예는 아미노산, 이를 테면, 글리신 및 아르기닌, 암모니아, 1 차, 2 차 및 3 차 아민, 그리고 사이클릭 아민, 이를 테면, 피페리딘, 몰폴린 및 피페라진 그리고 나트륨, 칼슘, 칼륨, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연, 알루미늄 및 리튬으로부터 유도된 무기 염을 포함하지만, 이에 국한되지는 않는다.

[0224] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "용매화물"은 비-공유 분자간 힘에 의해 결합된, 화학량론적 또는 비-화학량론적 양의 용매, 이를 테면, 물, 이소프로판올, 아세톤, 에탄올, 메탄올, DMSO, 에틸 아세테이트, 아세트산 및 에탄올아민 디클로로메탄, 2-프로판올, 또는 이와 유사한 것들을 추가로 포함하는 화합물을 의미한다. 화합물의 용매화물 또는 수화물은 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올 또는 물과 같은 최소한 한 가지의 물 당량을 당해 화합물에 추가함으로써, 이민 모이어티의 용해화 또는 수화를 야기하여 용이하게 준비된다.

[0225] "약제학적으로 허용되는"이라는 문구는 물질 또는 조성물이 제제를 포함하는 다른 성분 및/또는 이런 것들로 처리되는 포유 동물과 화학적으로 및/또는 독성학적으로 양립가능해야 함을 나타낸다.

[0226] 용어 "아미노산"이란 자연적으로 생성되는 아미노산 또는 비-자연적으로 생성되는 아미노산을 지칭한다. 한 구체예에서, 아미노산은 $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}})\text{-C(=O)OH}$ 이며, 이때 R^{aa} 및 R^{aa} 는 각각 독립적으로 H, 1~10개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알킬닐, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릭이며, 또는 R^{aa} 과 N-말단 질소원자는 함께 헤테로사이클릭 고리(가령, 프롤린에서와 같은)를 형성할 수 있다. 용어 "아미노산 잔기"란 한 개 수소 원자를 아민 및/또는 아미노산의 카르복시 말단으로부터 제거할 때 대응하는 잔기, 이를 테면, $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}})\text{-C(=O)-}$ 를 지칭한다.

[0227] 용어 "양이온"은 양전하를 갖는 이온을 지칭한다. 양이온은 단가 (가령, Na^+ , K^+ , NH_4^+ 등), 2-가(가령, Ca^{2+} , Mg^{2+} , 등) 또는 다가 (가령, Al^{3+} 등)일 수 있다. 바람직하게는, 상기 양이온은 단가이다.

[0228] 용어 "티올-반응성 기"란 공유 결합을 형성하기 위해 티올 (-SH) 기와 반응할 수 있는 기를 지칭한다. 예시적인 티올-반응성 기에는 말레이미드, 할로아세틸, 할로아세트아미드, 비닐 술폰, 비닐 술폰아미드 또는 비닐 피리딘을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 한 구체예에서, 상기 티올-반응성 기는 말레이미드이다.

[0229] 본 명세서에서 "포함하는"이라는 언어는 구체예들이 기술되는 경우, 그렇지 않으면 "구성되는" 및/또는 "본질적으로 구성되는"의 관점에서 설명된 유사한 구체예들이 또한 제공되는 것으로 이해된다.

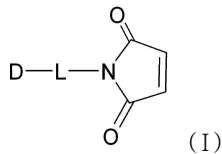
[0230] 따라서, 구절에서 사용된 용어 "및/또는", 이를 테면 "A 및/또는 B"는 "A와 B", "A 또는 B", "A", 및 "B"를 포함한다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 문구에 사용된 "및/또는"이라는 용어는 다음 각 구체예를 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A와 C; A와 B; B와 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0231] 2. 번역공유제이트를 준비하는 방법

[0232] 제 1 측면에서, 본 발명은 세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스

테인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘쥬게이트를 준비하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

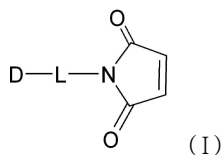
- [0233] (a) 캡핑제로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;
- [0234] (b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고
- [0235] (c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고:



- [0236] 이로 인하여 해당 콘쥬게이트가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 세포-결합 제제는 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 그리고 단계 (b)의 CysCBA는 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:
- [0237] D는 세포독성 제제이며; 그리고
- [0238] L은 링커다.

[0240] 제 2 측면에서, 본 발명은 세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘쥬게이트(ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

- [0241] (a) 캡핑제로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;
- [0242] (b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고
- [0243] (c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고:



- [0244] 이로 인하여 해당 콘쥬게이트가 형성되며,
- [0245] 이때 단계 (a)의 환원된 세포-결합 제제는 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 단계 (b)의 CysCBA는 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (c)에서 선택된 임의의 하나 또는 그 이상의 단계는 연속적으로 수행되며, 이때:

- [0247] D는 세포독성 제제이며; 그리고
- [0248] L은 링커다.

[0249] 일부 구체예들에서, 상기 기재된 제 2 측면의 방법들에서 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행된다.

[0250] 본원에서 제공된 연속 방법에서, 구성 요소들은 진행 중인 공정에 계속 추가되고, 산물은 해당 공정이 끝날 때 한꺼번에 빼내는 대신, 해당 공정 전반에 걸쳐 빼낼 수 있다. 예를 들면, 상기 기술된 연속 방법의 단계 (a) (환원 단계)에서, 환원 제제 및/또는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)를 해당 반응이 지속되는 동안, 그리고 적어도 하나의 산물, 즉 환원된 세포-결합 제제가 형성된 후에도 해당 환원 반응에 지속적으로 투입된다. 상기 기술된 연속 방법의 단계 (b) (산화 단계)에서, 상기 환원된 세포-결합 제제 및/또는 선택적 산화 제제는 해당 반응이 지속되는 동안, 그리고 적어도 하나의 산물, 즉 가령, CysCBA가 형성된 후에도 해당 산화 반응에

지속적으로 투입된다. 상기 기술된 연속 방법의 단계 (c) (콘주게이션 단계)에서, CysCBA 및/또는 화학식 (I)의 화합물은 해당 반응이 지속되는 동안, 그리고 적어도 하나의 콘주게이션 반응 산물 (ADC)이 형성된 후에서 해당 콘주게이션 반응에 지속적으로 투입된다. 유사하게, 하류 연속 농축 공정, 정제 공정, 및/또는 완충제 교환 공정에서, ADCs, 완충제, 및/또는 기타 구성요소들은 이들 공정이 진행되고, 농축되고, 정제되는 동안 농축 정제, 및/또는 완충제 교환 공정에 지속적으로 투여되고, 그리고 완충제 교환된 ADCs는 이들 진행 공정으로부터 지속적으로 빼낼 수 있다. 따라서, 전체 ADC 공정은 연속적일 수 있다 (가령, 도 5 및 도 6).

[0251] 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 ADCs를 제조하는 방법이 유동 반응기를 사용하여 연속적으로 수행될 수 있음을 입증하였다. 유동 반응기를 사용하면, 해당 반응이 진행되는 동안 그리고 적어도 하나의 반응 산물이 형성된 후에, 하나 또는 그 이상의 시약을 해당 반응에 연속적으로 첨가할 수 있다. 연속 방법에서 유동 반응기를 사용하면, 반응을 제어하고 방법의 다양성이 허용되고 (가령, 빠른 온도 변화/더 엄격한 온도 제어, 확산에 의해 매개되는 혼합으로 더 균일해지고, 용기 또는 제품군 제한에 의한 제약 없음) 및 방법의 확장성 향상(즉, 배치(batch) 가공처리의 기존 규모-확장 위험이 적용되지 않고, 시-공간 수율이 최적화됨 (가령, 현재 공정을 더 오래 실행하여 의사(pseudo) 규모 확장(생산력 증가) 수행)이 가능하다.

[0252] 특정 구체예들에서, 플러그 유동 반응기 (PFRs)는 본 발명의 연속 방법에 이용된다.

[0253] 특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 시약을 유동 반응기에 추가하기 전, 반응물의 연속 추가를 위해 반응 용기 (가령, 연속적으로 교반되는 탱크 반응기 (CSTR))가 이용된다. 반응 용기 (가령, CSTRs) 및 유동 반응기 (가령, 플러그 유동 반응기)를 직렬로 사용하면 필요한 전체 부피 요구 사항을 줄이고, 반응물 스트림 간의 혼합을 개선시키고, 그리고 체류 시간 분포의 확장을 비롯한 위험 완화 기능 증가의 장점을 갖는다.

[0254] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 연속 방법의 환원 단계 (a)에서, 환원 제제 및 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)를 해당 반응이 지속되는 동안, 그리고 적어도 하나의 산물, 가령, 상기 환원된 세포-결합 제제가 형성된 후에도 연속적으로 반응 용기 (가령, CSTR)에 추가한다 (가령, 환원 제제의 경우 공급 펌프를 이용하고, cCysCBA의 경우 별도의 공급 펌프를 이용)에 연속적으로 추가한다. 반응 혼합물은 펌프 (가령, 연동 펌프)를 이용하여 반응 용기 (가령, CSTR)에서 연속적으로 빼내고, 유동 반응기 (가령, PFR)를 통하여 공급한다. 일부 구체예들에서, 반응 용기(가령, CSTR)에서 물질을 회수하기 위한 체적 유속은 CSTR로 추가되는 환원 제제 및 cCysCBA의 결합 유량과 동일하며, 가령, 반응 용기(가령, CSTR)로의 진출 유속은 동일하다.

[0255] 유사하게, 본원에서 기술된 연속 방법의 선택적 재-산화(re-oxidation) 단계 (b), 상기 환원된 세포-결합 제제 및 선택적 산화 제제는 해당 반응이 지속되는 동안, 그리고 적어도 하나의 산물, 가령, CysCBA가 형성된 후에도 연속적으로 반응 용기 (가령, CSTR)에 추가한다 (가령, 상기 환원된 세포-결합 제제의 경우 공급 펌프를 이용하고, 선택적 산화 제제의 경우 별도의 공급 펌프를 이용한다). 반응 혼합물은 펌프 (가령, 연동 펌프)를 이용하여 반응 용기 (가령, CSTR)에서 연속적으로 빼내고, 유동 반응기 (가령, PFR)를 통하여 공급한다. 일부 구체예들에서, 반응 용기(가령, CSTR)에서 물질을 회수하기 위한 체적 유속은 CSTR로 추가되는 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제의 결합 유량과 동일하며, 가령, 반응 용기(가령, CSTR)로의 진출 유속은 동일하다.

[0256] 일부 구체예들에서, 본원에서 기술된 연속 방법의 콘주게이션 단계 (c)에서, CysCBA 및 화학식 (I)의 화합물은 해당 반응이 지속되는 동안, 그리고 적어도 하나의 산물, 가령, ADC가 형성된 후에도 연속적으로 반응 용기 (가령, CSTR)에 추가한다 (가령, CysCBA의 경우 공급 펌프를 이용하고, 화학식 (I)의 화합물의 경우 별도의 공급 펌프를 이용한다). 반응 혼합물은 펌프 (가령, 연동 펌프)를 이용하여 반응 용기 (가령, CSTR)에서 연속적으로 빼내고, 유동 반응기 (가령, PFR)를 통하여 공급한다. 일부 구체예들에서, 반응 용기(가령, CSTR)에서 물질을 회수하기 위한 체적 유속은 반응 용기(가령, CSTR)로 추가되는 CysCBA 및 화학식 (I)의 화합물의 결합 유량과 동일하며, 가령, 반응 용기(가령, CSTR)로의 진출 유속은 동일하다.

[0257] 일부 구체예들에서, 각 반응에 대한 동역학 데이터가 생성되고, 각 반응에 대한 원하는 표적 전환이 명시된다. 이러한 결과를 기반으로, 각 반응에 대한 CSTR 및 PFR 부피는 사용된 튜브의 내부 직경과 각 반응 단계에서 원하는 체류 시간 달성에 필요한 부피 유량을 기준으로 지정된다.

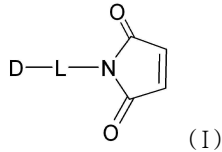
[0258] 제 3 측면에서, 본 발명은 세포독성 제제에 공유적으로 연계된, 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스템인 잔기들을 포함하는 세포-결합 제제 (CysCBA)를 포함하는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트(ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

[0259] (a) 캡핑제로 캡이 씌워진 하나 또는 그 이상의 쌍을 형성하지 않은 시스템인 잔기들을 갖는 캡이 씌워진 세포-결합 제제 (cCysCBA)와 환원 제제를 반응시켜, 환원된 세포-결합 제제를 형성시키고, 이때 환원된 세포-결합 제

제에서 유리 티올기 (-SH)를 형성하도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0260] (b) 상기 환원된 세포-결합 제제와 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysCBA를 만들고, 이때 상기 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기에서 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0261] (c) 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 CysCBA를 반응시키고;



[0262] 이로 인하여 해당 콘주게이트가 형성되며;

[0263] (d) 콘주게이트안된 화학식 (I)의 화합물을 제거하고; 그리고 임의선택적으로

[0264] (e) 해당 콘주게이트를 안정한 완충액으로 교환하는 단계;

[0265] 이때 단계 (a)의 환원된 세포-결합 제제는 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 단계 (b)의 CysCBA는 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (e)에서 선택된 임의의 하나 또는 그 이상의 단계는 연속적으로 수행되며, 그리고 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF) 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여 콘주게이트안된 약물을 빼내고, 및/또는 ADC를 안정한 완충액으로 교환하고; 그리고 이때:

[0266] D는 세포독성 제제이며; 그리고

[0267] L은 링커다.

[0268] 일부 구체예들에서, 상기 제 3 측면에서 기술된 연속 방법의 경우, 해당 방법은 단계 (a) ~ (d)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 단계 (a) ~ (d)는 모두 연속적으로 수행된다. 일부 구체예들에서, 오로지 단계 (d)만 연속적으로 수행된다.

[0269] 일부 구체예들에서, 상기 제 3 측면에서 기술된 연속 방법의 경우, 해당 방법은 단계 (a) ~ (e)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 단계 (a) ~ (e)는 모두 연속적으로 수행된다. 일부 구체예들에서, 오로지 단계 (d)와 단계 (e)만 연속적으로 수행된다.

[0270] 일부 구체예들에서, 상기 제 3 측면에서 기술된 연속 방법의 경우, 해당 방법은 단계 (a) ~ (e)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 단계 (a) ~ (e)는 모두 연속적으로 수행된다. 일부 구체예들에서, 오로지 단계 (d)와 단계 (e)만 연속적으로 수행된다.

[0271] 본 발명자들은 또한 단일-통과 접선 흐름 여과 (SPTFF)를 사용하여 연속 ADC 가공처리가 달성될 수 있음을 입증했고, ADCs로부터 콘주게이트안된 약물 (가령, 화학식 (I)의 화합물)을 성공적으로 분리할 수 있다. ADC 가공처리에는 ADC (가령, 본원에서 기술된 단계 (c))의 콘주게이션 (형성), ADC의 농축, ADC의 정제, 및/또는 ADC의 제형화가 연루될 수 있다. 비록 ADC 콘주게이션에서 제형화까지 전체 공정이 연속적인 것이 특히 유용할 수 있지만, 연속 가공처리 단계를 채워 가공처리 단계들의 조합 또한 가능하다. 추가적으로, 상류 가공처리 단계들 (가령, 항체의 준비, 가령, 본원에서 기술된 방법에서 단계 (a) 및 단계 (b))은 연속적이며, ADC 콘주게이션으로 연속적 공급도 가능하다.

[0272] 벌크 (재래식) 정용여과는 접선 유동 여과 (TFF) 시스템을 제 1 완충제 A (산물이 최초로 들어있는 완충제)로 프라이밍시키는 작업이 관련된다. 그 다음, 해당 산물은 일차 부피와 혼합되는 잔류액 용기에 추가된다. 잔류액 용기용 공급 펌프는 잔류액으로부터 TFF 막에 걸쳐 산물을 펌핑하며, 여기에서 잔류액이 유지되거나 (그리고 잔류액으로 회수되며) 또는 폐기물로 버려진다. 또다른 펌프 (정용여과 펌프)는 용기로부터 별도의 용기(산물이 교환될 완충제)에 함유된 완충액 B로 공급하는데, 해당 용기에서 잔류액 용기로의 공급 라인을 통해 공급한다. 두 펌프는 모두 작동시작되고, 잔류액 용기에서 산물이 TFF 막을 통과하기 시작한다. 완충액이 폐기물 스트림을 통해 제거되면, 완충액 B (동일한 부피)를 잔류액 용기에 추가함으로써 잔류액의 부피는 유지된다. 그 결과, 해당 산물은 완충액 B로 서서히 교환된다.

[0273] SPTFF는 초기에 완충액 A의 제품을 완충액 B로 교환하는 관련 개념을 사용한다. 그러나, 산물은 막을 한 번만 통과하므로 완전한 완충제 교환을 달성하기 위해, 완충제 B의 적절한 양이 취득되어야 한다. 이를 위해, SPTFF는 다중 단계(stacked stages)에 걸쳐 완충액 B를 추가할 수 있다. 따라서, 산물은 완충액 A에 진입하고, 완충액 B에 있는 모듈을 빠져나오게 되어, 막을 한 번만 통과하게 된다.

[0274] 유사하게, 연속 ADC 가공처리는 역전류 정용여과를 이용하여 이루어질 수 있다. 역전류 정용여과에는 2개 또는 그 이상 SPTFF (가령, 모듈 1, 모듈 2 등등,)이 연루된다. 일부 구체예들에서, 역전류 정용여과에는 두 개 모듈

의 SPTFF가 연루되는데, 모듈 1의 잔류액을 정용여과 완충액의 추가 공급물과 결합시키고 모듈 2로 바로 공급하고, 모듈 2의 투과액을 재순환시켜, 모듈 1로 가는 공급물과 복합시킨다. 예시적인 역전류 정용여과는 도 6에 나타난다. 정제안된 미가공 ADC 산물과 정용여과 (DF) 완충액의 스트림과 복합시키고, 그 다음 역전류 TFF 정제 단위의 모듈 1로 공급한다. 모듈 1의 투과액은 폐기물 스트림을 통해 제거되고, 모듈 1의 잔류액은 DF 완충액의 추가 공급물과 복합되고, 그 다음 모듈 2를 통하여 공급된다. 정제된 ADC를 모듈 2의 잔류액으로부터 회수하고, 모듈 2의 투과액은 재순환시키고, 모듈 1로 가는 공급물과 복합시킨다.

[0275] 따라서, 본원에서 제공되는 연속 ADC 가공처리 방법 (가령, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용)으로 배취 ADC 가공처리와 비교하여, 가공처리 시간을 단축하고, 수율을 개선하고, 산물 일관성을 개선할 수 있다. 본원에서 제공되는 연속 ADC 가공처리 방법 (가령, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용)은 배취 콘주게이션 공정에서 이용되는 보류(hold) 단계를 또한 없앨 수 있다. 본원에서 제공되는 연속 ADC 가공처리 방법 (가령, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용)은 또한 더 작은 장비의 사용을 가능하게 할 수 있다. SPTFF는 항체들이 잠재적으로 전단력에 의해 야기되는 산화에 민감하기 때문에 유익하며, 이들 항체는 SPTFF에 더 적합할 수 있다.

[0276] SPTFF의 사용으로 콘주게이션 반응으로부터 구성요소들을 연속 추가 및/또는 제거하는 것이 가능할 수 있다. 따라서, SPTFF를 이용하여 ADC 콘주게이션용 시약 및 어셈블리된 ADCs를 가공처리하기 위한 시약을 준비할 수 있다. SPTFF는 특정 ADC를 위한 처리 단계 모두 (또는 이의 하위단계) (가령, 생산, 농축, 정제, 및/또는 제형) 동시에 일어나는 것이 가능하도록 연속적으로 ADC를 가공처리를 가능하게 한다. 역전류 정용여과를 또한 이용하여 ADC 콘주게이션용 시약 및 어셈블리된 ADCs를 가공처리하기 위한 시약을 준비할 수 있다.

[0277] 본원에서 제공되는 방법들에 따라, SPTFF를 이용하여 ADC를 농축시키고, ADC를 정제하고, 및/또는 ADC를 제형화시킬 수 있다 (가령, ADC를 제형 완충액으로 교환시킴으로써). SPTFF를 이용하여 제 1 완충제로부터 제 2 완충액으로 ADC를 이전시킬 수 있다. 역전류 정용여과를 이용하여 ADC를 농축시키고, ADC를 정제하고, 및/또는 ADC를 제형화시킬 수 있고 (가령, ADC를 제형 완충액으로 교환시킴으로써), 그리고 역전류 정용여과는 제 1 완충제로부터 제 2 완충액로 ADC로 이전에 또한 이용될 수 있다.

[0278] 본원에서 제공되는 일부 방법들에서, SPTFF를 ADC 생산, 정제, 및 제형화에 이용하여, ADC 생산에서 제형화에 이르는 전체 공정을 연속적으로 만들 수 있다. 본원에서 제공되는 일부 방법들에서, 역전류 정용여과를 ADC 생산, 정제, 및 제형화에 이용하여, ADC 생산에서 제형화에 이르는 전체 공정을 연속적으로 만들 수 있다.

[0279] 본원에서 제공되는 일부 방법들에서, SPTFF는 종래의 TFF와 함께 사용되어, 공정의 일부는 연속적이며, 반면 다른 일부분은 배취로 수행된다. 예를 들면, 콘주게이션 전, 재래식 (배취) TFF를 사용하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 완충액-교환할 수 있고, 그 다음 연속 공정으로 공급하며, 이때 SPTFF는 하류 공정에 이용된다. 이러한 방법에서 역전류 정용여과는 SPTFF를 대신하여 이용되거나, 이와 복합 이용될 수 있다.

[0280] 콘주게이션을 위해 완충액에 항체를 넣는 공정이 배취 방식이건 또는 연속적 방식이건 상관없이, 콘주게이션 반응의 하류에서 ADC 농축 및 정제 공정은 SPTFF를 사용하여 연속 방식으로 수행하거나, 또는 재래식 TFF를 사용하여 배취 방식으로 수행할 수 있다. 유사하게, 콘주게이션을 위해 완충액에 항체를 넣는 공정이 배취 공정이건 또는 연속적 공정이건 상관없이, 그리고 ADC가 배취 공정 또는 연속식 공정을 사용하여 농축 및 정제되는지 여부에 관계없이, ADC는 연속 방식으로 SPTFF를 사용하거나, 또는 배취 방식으로 재래식 TFF를 사용하여 제형화할 수 있다. 이러한 방법에서 역전류 정용여과는 SPTFF를 대신하여 이용되거나, 이와 복합 이용될 수 있다.

[0281] 일부 구체예들에서, ADC 공정에서 적어도 두 단계는 SPTFF를 이용하여 실행된다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, SPTFF를 이용하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 콘주게이션 완충액으로 이전시키고, ADC가 형성된 후 이를 농축 및 정제에 이용하며, 한편 SPTFF 또는 TFF는 ADC를 제형 완충액으로 교환하는데 이용된다. 일부 구체예들에서, SPTFF를 이용하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 콘주게이션 완충액으로 이전시키고, 이를 이용하여 정제된 ADC를 제형 완충액으로 교환시키고, 한편 SPTFF 또는 TFF를 이용하여 ADC가 형성된 후, 이를 농축 및 정제시킨다. 일부 구체예들에서, SPTFF를 이용하여 ADC를 농축 및 정제시키고, 이를 이용하여 농축 정제된 ADC를 제형 완충액으로 교환시키고, 이때 SPTFF 또는 TFF는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 콘주게이션 완충액으로 이전시키는데 이용된다.

[0282] SPTFF는 가령, ADC를 농축시키는 방법에서 한외여과 막을 이용할 수 있다. SPTFF는 가령, ADC를 정제하는 방법 및/또는 ADC를 완충액 (가령, 제형 완충액)으로 이전시키는 방법에서 정용여과 막을 이용할 수 있다.

[0283] 일부 구체예들에서, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여 ADC 공정에서 적어도 두 단계가 실행된다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 콘

주게이션 완충액을 이전시키고, 이를 이용하여 ADC가 형성된 후, 이를 농축 및 정제시키고, 한편 SPTFF, 역전류 정용여과, 및/또는 TFF를 이용하여 ADC를 제형 완충액으로 교환한다. 일부 구체예들에서, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 콘주게이션 완충액으로 이전시키고, 이를 이용하여 정제된 ADC를 제형 완충액으로 교환하고, 한편 SPTFF, 역전류 정용여과, 및/또는 TFF를 이용하여 ADC가 형성된 후, 이를 농축 및 정제시킨다. 일부 구체예들에서, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용하여 ADC를 농축 및 정제시키고, 이를 이용하여 농축 정제된 ADC를 제형 완충액으로 교환시키고, 이때 SPTFF, 역전류 정용여과, 및/또는 TFF를 이용하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 콘주게이션 완충액으로 이전시킨다.

[0284] 컬럼 크로마토그래피는 본원에서 제공되는 연속 ADC 공정 방법 (가령, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과와 복합되어)에서 관통-방식으로 또한 이용될 수 있다. 예를 들면, 콘주게이션 반응 (가령, 연속 콘주게이션 반응)은 관통-컬럼 크로마토그래피로 공급되어 해당 콘주게이션 반응으로부터 콘주게이트안된 약물을 제거할 수 있다. 그 다음, 관통-컬럼 크로마토그래피를 통하여 정제된 ADCs는 제형 완충액으로 완충제 교환을 위한 SPTFF 공정으로 공급될 수 있다. 그 다음, 관통-컬럼 크로마토그래피를 통하여 정제된 ADCs는 제형 완충액으로 완충제 교환을 위한 역전류 정용여과 공정으로 또한 공급될 수 있다.

[0285] 일부 경우들에서, 본원에서 제공된 연속 방법의 반응 매개변수는 신속하게 변경될 수 있거나, 또는 "펄스된 (pulsed)" 수 있다. 예를 들면, 본원에서 제공된 연속 방법에서, 온도는 예를 들어 수조, 캡슐화된 반응기, 히터, 열전 소스를 사용하고 및/또는 반응물이 흐르는 코일 및/또는 튜브의 섹션을 절연함으로써, 빠르게 변경될 수 있다. 추가적으로, 연속 유동 콘주게이션에서 가령, 산 또는 염기의 추가에 의해, pH는 신속하게 변경될 수 있다. 따라서, 특정 경우들에서, 펄스된 매개변수를 이용하여 연속 반응이 실행된다. 펄스된 매개변수의 사용으로, 예를 들면, 산물 질의 손상없이 반응 시간을 감소시키고(가령, 반응 속도를 증가시키고), 이 온도를 급격히 떨어뜨림으로써 일시적으로 반응을 소강 또는 중단시키고, 또다른 변화가 도입되기 전 (가령, 또다른 화학적 시약의 추가) 용액내 콘주게이트를 안정화시키고, 한편으로 동일한 매개변수에 더 오래 노출되면 산물의 질이나 또는 산물의 안정성이 크게 저하될 수 있다.

[0286] 특정 경우들에서, 연속 반응은 지정된 횟수 동안 지정된 시간의 증분 동안 변경된 (가령, 증가된 또는 감소된) 온도에 노출된다. 예를 들면, 하나의 예에서, 온도는 적어도 2℃, 적어도 3℃, 적어도 4℃, 또는 적어도 5℃ 증가된다. 따라서, 온도는 적어도 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 또는 35℃로 증가 또는 감소될 수 있다. 예를 들면, 온도는 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 또는 35℃로 증가 또는 감소될 수 있다. 온도는 5℃ ~ 10℃, 10℃ ~ 15℃, 15℃ ~ 20℃, 20℃ ~ 25℃, 25℃ ~ 30℃, 또는 30℃ ~ 35℃로 또한 증가 또는 감소될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 온도는 (가령, 약 20℃에서) 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 또는 55℃로 상승될 수 있다. 온도는 또한 (가령, 약 25℃에서) 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 또는 55℃로 상승될 수 있다. 특정 경우들에서, 온도는 55℃를 초과하지 않는다. 특정 경우에서, 온도는 (가령, 20℃에서) 35℃ ~ 55℃ 또는 40℃ ~ 50℃ 범위로 상승될 수 있다. 특정 경우들에서, 온도는 (가령, 20℃에서) 60℃로, 70℃로, 80℃로, 90℃로, 또는 100℃로 상승된다 (가령, 이를 태면, 10 초의 짧은 증분 시간 동안). 특정 경우들에서, 온도는 (가령, 20℃에서) 60℃ ~ 70℃의 범위, 70℃ ~ 80℃의 범위, 80℃ ~ 90℃의 범위, 또는 90℃ ~ 100℃ (가령, 10 초의 짧은 증분 시간 동안) 범위로 상승된다. 특정 경우들에서, 온도를 상승된 온도 또는 하강된 온도로 올리거나 또는 내리는 데 걸리는 시간은 2분을 넘지 않는다. 특정 경우들에서, 온도를 상승된 온도 또는 하강된 온도로 올리거나 또는 내리는 데 걸리는 시간은 1분을 넘지 않는다.

[0287] 특정 경우들에서, 연속 반응은 지정된 횟수 동안 지정된 시간의 증분 동안 변경된 (가령, 증가된 또는 감소된) pH에 노출된다. 예를 들면, 하나의 예에서, pH는 1, 2, 3, 4, 또는 5로 증가 또는 감소된다. 하나의 예에서, pH는 1에서 2로, 2에서 3으로, 3에서 4로, 또는 4에서 5로 증가된다. 따라서, 예를 들면, pH는 (가령, 4에서) 5, 6, 7, 8, 또는 9로 증가될 수 있다. PH는 또한 (가령, 5에서) 6, 7, 8, 또는 9로 증가될 수 있다. PH는 또한 (가령, 9에서) 8, 7, 6, 5, 또는 4로 감소될 수 있다.

[0288] 특정 경우들에서, 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 pH에 노출)은 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 6 분, 7 분, 8 분, 9 분, 10 분, 15 분, 30 분, 1 시간, 1.5 시간, 또는 2 시간 동안 발생된다. 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 노출)은 예를 들면, 30 초 ~ 1 분, 1 분 ~ 2 분, 2 분 ~ 3 분, 3 분 ~ 4 분, 4 분 ~ 5 분, 6 분 ~ 7 분, 7 분 ~ 8 분, 8 분 ~ 9 분, 또는 9 분 ~ 10 분 동안 발생할 수 있다. 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 노출)는 예를 들면, 1 ~ 10 분, 1 ~ 15 분, 1 ~ 30 분, 1 분 ~ 1 시간, 1 분 ~ 1.5 시간, 또는 1 분 ~ 2 시간 동안 또한 발생할 수 있다. 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 노출)는 예를 들면, 1 ~ 5 분, 또는 5 ~ 10 분, 10 ~ 15 분, 15 분 ~ 30 분, 30 분 ~ 1 시간, 1 시간 ~ 1.5 시간, 또는 1.5 시간 ~ 2 시간 동안 또한 발생할 수 있다. 특정 경우들에서, 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 pH에 노출)는 2

시간, 1 시간, 30 분, 20 분, 또는 15 분을 초과하지 않는다.

[0289] 특정 경우들에서, 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 pH에 노출)는 한 번만 발생된다. 특정 경우들에서, 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 노출)는 두 번, 세 번, 네 번, 다섯 번, 여섯 번, 일곱 번, 여덟 번, 아홉 번, 또는 열 번 반복된다. 특정 경우들에서, 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 노출)는 1 ~ 5회 발생된다. 특정 경우들에서, 상기 펄스 (가령, 변경된 온도 및/또는 노출)는 2 ~ 20 회 또는 5 ~ 10회 발생된다.

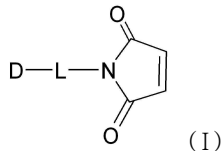
[0290] 연속 방법 (가령, SPTFF 및/또는 역전류 정용여과를 이용)은 인-라인 모니터링 공정 (아래에서 논의됨)과 함께, 또는 이런 모니터링 공정 없이 이용될 수 있다.

[0291] 제 1 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 임의의 구체예들에서 CysCBA는 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며, 이 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

[0292] (a) 환원 제제에 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb) 또는 캡핑제로 캡이 씌워진, 하나 또는 그 이상의 공작된 시스테인 잔기들을 갖는 이의 항원-결합 단편과 반응시켜 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고, 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0293] (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0294] (c) CysAb와 화학식 (I)의 화합물:



[0295] 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고이로 인하여 항체-세포독성 제제 콘주게이트 (ADC)가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며; 그리고 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:

[0297] D는 세포독성 제제이며; 그리고

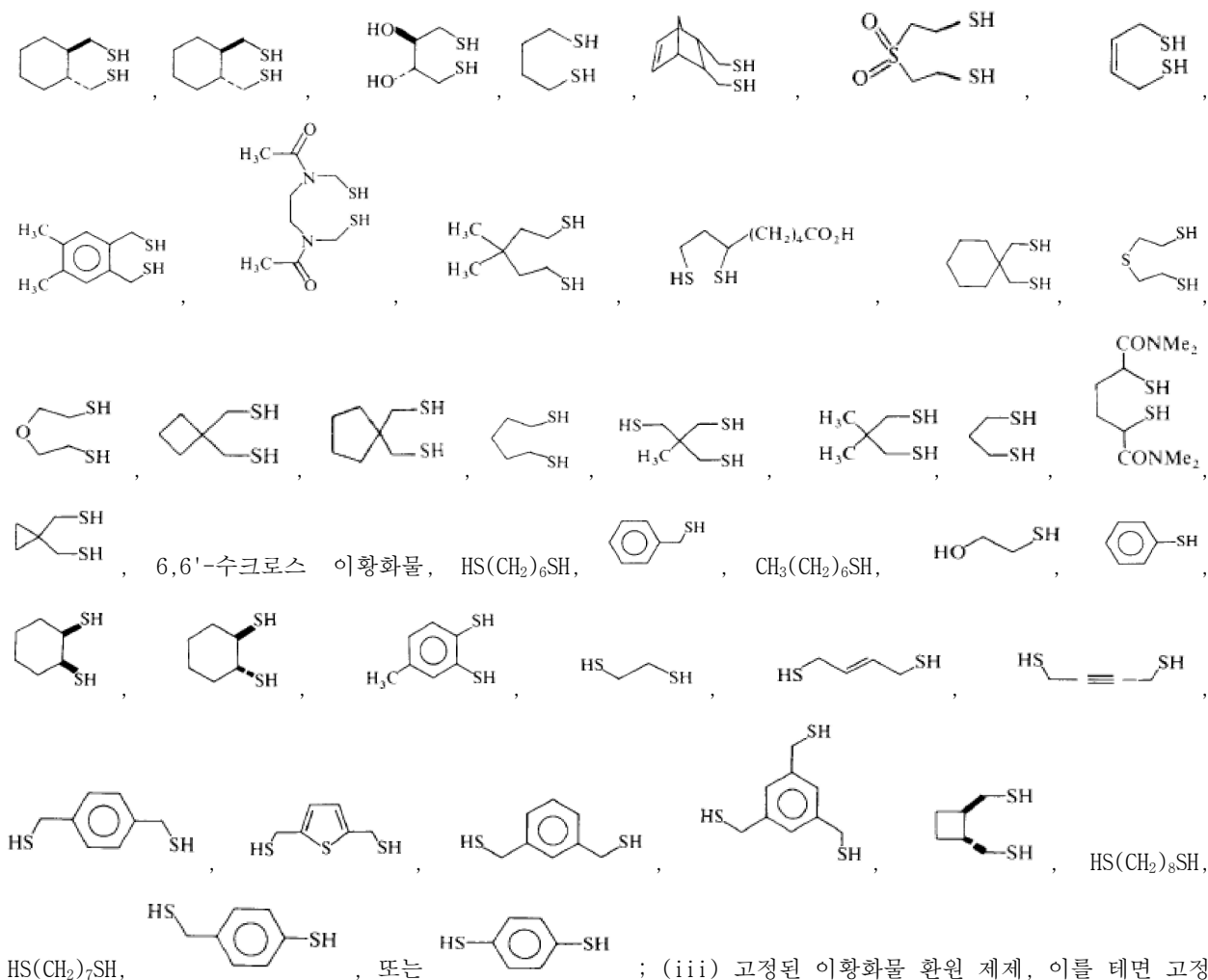
[0298] L은 링커다.

[0299] 특정 구체예들에서, 제 1 측면 또는 제 1 구체예의 방법에서 단계 (a), (b) 및 (c)를 동일한 반응 용기에서 실행한다.

[0300] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb) 또는 이의 항원-결합 단편에서 하나 또는 그 이상의 쇠-간 이황화물 결합은 단계 (a)에서 환원된다. 특정 구체예들에서, 상기 하나 또는 그 이상의 쇠-간 이황화물 결합은 단계 (b)에서 재-형성된다.

[0301] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (a)의 반응에 임의의 적합한 환원 제제가 이용될 수 있다. cCysCBA (가령, cCysAb 또는 이의 항원-결합 단편)를 환원 제제로 처리하면 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기로부터 캡핑제를 제거하여, 유리 티올기 (-SH)를 형성할 수 있고, 세포-결합 제제의 두 개 시스테인 잔기 사이에 형성된 이황화물 결합, 예를 들면, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쇠-간 및/또는 쇠-내 이황화물 결합을 또한 환원시킬 수 있다. 환원 제제의 예로는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: (i) 포스핀 기반의 환원 제제, 이를 테면 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 염소산염 (TCEP), 트리스히드록시프로필 포스핀 (THPP), 트리스 (2-시아노에틸)포스핀, 디사이클로헥실포스피노)벤젠술폰산, 비스(p-술포네이트페닐)페닐포스핀, (디페닐포스피노)벤젠술폰산, (디페닐포스피노)벤조산, 2-(디페닐포스피노)-N,N,N-트리메틸벤질암모니움 트라이플레이트, (디페닐포스피노)에틸아민, 2-(디이소프로필포스피노)에틸아민, 3-(디페닐포스피노)프로필아민 (DPPA), 3,3',3''-포스핀트리일트리벤젠술포네이트 나트륨, 3-(디페닐포스피노)벤젠술포네이트 나트륨, 4-(디페닐포스피노)벤젠술포네이트 나트륨, 비스(p-술포네이트페닐)페닐포스핀 이수화물 이칼륨염, 비스(p-술포네이트페닐)페닐포스핀 이수화물 이칼륨염, 프로판산, 3,3',3''-포스피니디테트리스-, 1,1',1''-트리메틸 에스테르 (TmTCEP), 프로판나트릴 3,3'-(페닐포스핀인텐)비스-벤젠아민 (N,N-비스(시아노에틸)아닐린으로도 알려짐), 4-(디에틸포스피노)-N,N-디메틸-트리스(3-메톡시프로필)포스핀, 2-(디페닐포스피노)아세트산, (S) 2-[2-(디페닐

포스포노)에틸]-피리딘, 2-2-(디페닐포스포노)-1-페닐에틸아민, 2-(디페닐포스포노)에탄이미니움 테트라플루오로보산염, 3-(디페닐포스포노)-프로판산, (아세트산, 2-(디페닐포스포노)-, 에틸 에스테르), 또는 4-(디페닐포스포닐)부탄산; (i) 티올 기반의 환원 제제, 이를 태면 디티오프레톨 (DTT), 1,4-디티오에리트리톨 (DTE), 1,4-부탄디티올, L-1,4-디티오프레톨, (S)-2-아미노부탄-1,4-디티올 염소산염, (2S)-2-아미노부탄-1,4-디티올 (DTBA), 2-아미노에탄 티올 (MEA) (또는 이의 염소산염), 또는 다음중 임의의 하나:



HS(CH₂)₇SH, , 또는  ; (iii) 고정된 이황화물 환원 제제, 이를 테면 고정된 TCEP 이황화물 환원 겔 또는 수지, 고정된 환원 제제 컬럼 함유하는 비드로 된 수지(이 안에 티올-기반의 환원 제제들이 고정됨), 또는 (iv) 기타 환원 제제, 이를 테면 셀레놀, 구아니딘-HCl, 또는 우레아.

[0303]

특정 구체예들에서, 상기 환원 제제는 CBA (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)의 등전점(pI)을 기반으로 선택된다.

[0304]

특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면, 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법은 CBA (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)의 pI를 결정하고, 해당 CBA의 pI를 기반으로 환원 제제를 선택하는 것을 더 포함한다. CBA의 pI는 임의의 적합한 방법을 이용하여 결정될 수 있다.

[0305]

특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (b)의 반응에 임의의 적합한 산화 제제가 이용될 수 있다. 상기 산화 제제는 선택적으로 산화되어, 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기의 유리 티올의 재-산화없이, CBA의 두 개 시스테인 잔기 사이에서 형성된 이황화 결합을 재-형성한다. 특정 구체예들에서, 상기 산화 제제는 쌍을 형성하지 않은 시스테인 잔기의 유리 티올을 재-산화시키지 않고, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 쇄-간 및/또는 쇄-내 이황화물 결합을 선택적으로 재-형성시킨다. 예시적인 산화 제제에는 테하이드로아스코르빈산 (DHAA), 황산구리, 산소, 공기, 또는 Cu(II)-(1,10-페난트롤린)₃ 및 요오드 용액 (Hamdan, F.F. *et al.*, Biochemistry, 2002, 41(24), pp7647-7658, 본원의 참고자료에 편입됨)이 내포되나, 이에 국한되지 않는다.

[0306]

제 2 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예 또는 임의의 구체예

들의 방법에서, 단계 (a)의 환원 제제는 TCEP 또는 DPPA이다.

- [0307] 제 3 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 상기 산화 제제는 DHAA이다.
- [0308] 제 4 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 제 3 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (a)의 방법은 pH 5.0 ~ 8.5 사이에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (a)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.5 사이에서 실행된다.
- [0309] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 제 3 구체예 또는 제 4 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (b)의 반응은 pH 5.0 ~ 8.5 사이에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (b)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.5 사이에서 실행된다.
- [0310] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 제 3 구체예 또는 제 4 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (c)의 반응은 pH 5.0 ~ 8.5 사이에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (c)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.5 사이에서 실행된다. 더욱 더 구체적으로, 단계 (c)의 반응은 pH 5.5 ~ 6.5 사이에서 실행된다. 또다른 특이적 구체예에서, 단계 (c)의 반응은 pH 6.0에서 실행된다. 또다른 특이적 구체예에서, 단계 (c)의 반응은 pH 6.5에서 실행된다.
- [0311] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 제 3 구체예 또는 제 4 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 해당 방법은 단계 (b) 이후, 단계 (c)에서 CysCBA에 세포독성 제제를 반응시키기 전, 반응 혼합물의 pH를 조정하는 단계를 더 포함한다.
- [0312] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 제 3 구체예 또는 제 4 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysCBA에 세포독성 제제를 반응시키기 전에 조정되지 않는다.
- [0313] 제 5 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 제 3 구체예 또는 제 4 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (a)의 환원 제제는 TCEP이며, 단계 (a)의 반응은 pH 7.0 ~ 8.0 사이, 더 구체적으로 7.3 ~ 7.7 사이, 그리고 더욱 더 구체적으로, pH 7.5에서 실행된다.
- [0314] 특정 구체예들에서, 제 5 구체예의 방법의 경우, 상기 산화 제제는 DHAA이며, 단계 (b)의 반응은 pH 7.0 ~ 8.0 사이, 더 구체적으로, 7.3 ~ 7.7 사이, 그리고 더욱 더 구체적으로, pH 7.5에서 실행된다.
- [0315] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 5 구체예의 방법의 경우 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysCBA에 세포독성 제제를 반응시키기 전, pH 7.3 ~ 7.7 (가령, pH 7.5)에서 pH 5.8 ~ 6.2 (가령, pH 6.0)로 조정된다.
- [0316] 제 6 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예 또는 제 3 구체예 또는 제 4 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (a)의 환원 제제는 DPPA이며, 단계 (a)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 사이, 더 구체적으로, 6.3 ~ 6.7 사이, 더욱 더 구체적으로, pH 6.5에서 실행된다.
- [0317] 특정 구체예들에서, 제 6 구체예의 방법의 경우, 상기 산화 제제는 DHAA이며, 단계 (b)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 사이, 더 구체적으로, 6.3 ~ 6.7 사이, 더욱 더 구체적으로 pH 6.5에서 실행된다.
- [0318] 특정 구체예들에서, 제 6 구체예의 방법의 경우 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서, 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysCBA에 세포독성 제제를 반응시키기 전에 조정되지 않고, 단계 (c)의 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 사이, 더 구체적으로, 6.3 ~ 6.7 사이, 더욱 더 구체적으로 pH 6.5에서 실행된다.
- [0319] 제 7 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예, 제 3 구체예, 제 4 구체예, 제 5 구체예, 또는 제 6 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 콘쥬게이트는 접선 유동 여과 (TFF), 흡착 크로마토그래피, 비-흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전 또는 이의 조합에 의해 정제된다. 더욱 구체적으로, 상기 콘쥬게이트는 TFF에 의해 정제된다.
- [0320] 정제에 적합한 임의의 TFF 시스템을 사용할 수 있는데, Pellicon 유형 시스템 (Millipore, Billerica, Mass.), Sartoclon Cassette 시스템 (Sartorius AG, Edgewood, N.Y.), TangenX cassette (TangenX Technology Corporation, Shrewsbury, MA) 그리고 Centrasette 유형 시스템 (Pall Corp., East Hills, N.Y.)이 내포된다.

- [0321] 임의의 적합한 흡착 크로마토그래피 수지가 정제에 이용될 수 있는데, 이때 이 수지는 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트를 잡아두고, 불순물의 용리를 허용하거나, 또는 불순물을 잡아두고, 세포-결합 제제-세포독성 제제 콘주게이트의 용리를 허용할 수 있다. 바람직한 흡착 크로마토그래피 수지에는 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 전하 유도 크로마토그래피 (HCIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 혼합 모드 이온 교환 크로마토그래피, 고정된 금속 친화력 크로마토그래피 (IMAC), 염료 리간드 크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피 및 이들의 조합을 내포된다. 적합한 히드록시아파타이트 수지에는 세라믹 히드록시아파타이트 (CHT 유형 I 및 유형 II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), HA Ultrogel 히드록시아파타이트 (Pall Corp., East Hills, N.Y.), 그리고 세라믹 플루오르아파타이트 (CFT 유형 I 및 유형 II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)가 내포된다. 적합한 HCIC 수지의 예로는 MEP Hypercel 수지 (Pall Corp., East Hills, N.Y.)이다. 적합한 HIC 수지의 예시에는 부틸-Sepharose, 헥실-Sepharose, 페닐-Sepharose, 그리고 옥틸 Sepharose 수지 (모두 GE Healthcare, Piscataway, N.J.의 제품), 뿐만 아니라 Macro-prep 메틸 및 Macro-Prep t-부틸 수지 (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)가 내포된다. 적합한 이온 교환 수지의 예시에는 SP-Sepharose, CM-Sepharose, 그리고 Q-Sepharose 수지 (모두 GE Healthcare, Piscataway, N.J.의 제품), 그리고 Unosphere S 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)가 내포된다. 적합한 혼합 모드 이온 교환기의 예시에는 Bakerbond ABx 수지 (JT Baker, Phillipsburg N.J.)가 내포된다. 적합한 IMAC 수지의 예시에는 Chelating Sepharose 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 및 Profinity IMAC 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)가 내포된다. 적합한 염료 리간드 수지의 예시에는 Blue Sepharose 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 및 Affi-겔 Blue 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)가 내포된다. 적합한 친화력 수지의 예시에는 Protein A Sepharose 수지 (이를 테면, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.)-여기에서 상기 세포-결합 제제는 항체이며-, 그리고 렉틴 친화력 수지, 이를 테면, Lentil Lectin Sepharose 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)-여기에서 상기 세포-결합 제제는 적절한 렉틴 결합 부위를 품고 있음-가 내포된다. 대안으로, 상기 세포-결합 제제에 특이적 항체가 이용될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들면, Sepharose 4 Fast Flow 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)에 고정될 수 있다. 적합한 역-상 수지의 예시로는 C4, C8, 그리고 C18 수지 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.)가 내포된다.
- [0322] 정제를 위해 임의의 적합한 비-흡착 크로마토그래피 수지가 이용될 수 있다. 적합한 비-흡착 크로마토그래피 수지의 예시로는 SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ 수지 (이를 테면, S-200 및 S-300), SUPERDEX™ 수지 (이를 테면, SUPERDEX™ 75 및 SUPERDEX™ 200), BIO-GEL® 수지 (이를 테면, P-6, P-10, P-30, P-60, 및 P-100), 그리고 당분야의 당업자에게 공지된 기타 다른 것들이 내포되지만, 이에 국한되지 않는다.
- [0323] 일부 구체예들에서, 상기 콘주게이트는 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF)에 의해 정제된다. 일부 구체예들에서, 상기 콘주게이트는 역전류 정용여과에 의해 정제된다.
- [0324] 일부 구체예들에서, SPTFF를 이용하여 콘주게이트안된 약물을 제거하거나 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다. 일부 구체예들에서, 관통-컬럼 크로마토그래피를 이용하여 콘주게이트안된 약물을 제거하고, SPTFF를 이용하여 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다.
- [0325] 일부 구체예들에서, 역전류 정용여과를 이용하여 콘주게이트안된 약물을 제거하고 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다. 일부 구체예들에서, 관통-컬럼 크로마토그래피를 이용하여 콘주게이트안된 약물을 제거하고, 역전류 정용여과를 이용하여 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다.
- [0326] 일부 구체예들에서, SPTFF는 한외여과 막을 이용한다. 일부 구체예들에서, SPTFF는 정용여과 막을 이용한다.
- [0327] 일부 구체예들에서, 해당 방법은 ADC 생산의 일관성을 개선시킨다. 일부 구체예들에서, 해당 방법은 ADC 생산을 위한 시간을 감소시킨다.
- [0328] 일부 구체예들에서, SPTFF는 ADC 생산의 일관성을 개선시킨다. 일부 구체예들에서, SPTFF는 ADC 농축, 정제, 또는 전달을 위한 시간을 감소시킨다. 일부 구체예들에서, SPTFF는 이용된 완충액의 양을 감소시킨다.
- [0329] 일부 구체예들에서, 역전류 정용여과 ADC 생산의 일관성을 개선시킨다. 일부 구체예들에서, 역전류 정용여과는 ADC 농축, 정제, 또는 전달을 위한 시간을 감소시킨다. 일부 구체예들에서, 역전류 정용여과는 이용된 완충액의 양을 감소시킨다.
- [0330] 특정 구체예들에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면, 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예,

제 3 구체예, 제 4 구체예, 제 5 구체예, 제 6 구체예 또는 제 7 구체예, 임의의 구체예들의 방법에서, 해당 방법은 단계 (c) 이후, 상기 콘쥬게이트는 정제되기 전, 반응 혼합물의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예들에서, 단계 (c) 이후, 반응 혼합물의 pH는 pH 4.0 ~ 6.0, 4.0 ~ 5.5, 4.0 ~ 5.0, 4.5 ~ 5.0, 또는 4.6 ~ 4.8 사이로 조정된다. 특이적 구체예에서, pH는 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0으로 조정된다. 또 다른 특이적 구체예에서, pH는 4.7로 조정된다.

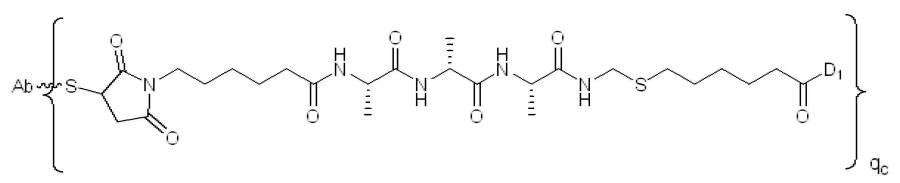
[0331] 제 8 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면, 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예, 제 3 구체예, 제 4 구체예, 제 5 구체예, 제 6 구체예 또는 제 7 구체예, 임의의 구체예들의 방법에서, cCysCBA 대비 과량의 환원 제제가 단계 (a)에서 이용된다. 더 구체적으로, cCysCBA (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)에 대한 환원 제제의 몰비율은 1:1 ~ 50:1, 2:1 ~ 30:1, 5:1 ~ 25:1, 또는 10:1 ~ 25:1이다. 더욱 더 구체적으로, 상기 몰 비율은 15:1 ~ 20:1이다.

[0332] 제 9 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면, 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예, 제 3 구체예, 제 4 구체예, 제 5 구체예, 제 6 구체예, 제 7 구체예, 또는 제 8 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (b)의 산화 제제에 대한 단계 (a)의 환원 제제의 몰 비율은 20:1 ~ 1:20, 10:1 ~ 1:10, 5:1 ~ 1:5, 2:1 ~ 1:2, 1.2:1 ~ 1:1.5, 1:1 ~ 1:20, 또는 1:1 ~ 1:10이다. 더 구체적으로, 상기 산화 제제에 대한 환원 제제의 몰 비율은 1:1 ~ 1:1.5이다. 더욱 더 구체적으로, 상기 산화 제제에 대한 환원 제제의 몰 비율은 1:1.5이다.

[0333] 제 10 구체예에서, 본원에서 기술된 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면, 또는 제 1 구체예, 제 2 구체예, 제 3 구체예, 제 4 구체예, 제 5 구체예, 제 6 구체예, 제 7 구체예, 제 8 구체예, 제 9 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, CysCBA (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편) 또는 이의 항원-결합 단편 대비 과량의 화학식 (I)의 화합물이 단계 (c)에서 이용된다. 더 구체적으로, CysCBA의 각 당량에 대해 화학식 (I)의 화합물의 1.1 ~ 20, 1.5 ~ 20, 2 ~ 20, 2 ~ 10, 2 ~ 5, 3.5 ~ 5, 4.2 ~ 5, 4.3 ~ 4.9, 4.4 ~ 4.8, 또는 4.5 ~ 4.7 몰 당량이 이용된다. 특이적 구체예에서, CysCBA의 각 당량에 대해 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0 몰 당량의 화학식 (I)의 화합물이 이용된다. 또다른 특이적 구체예에서, CysCBA의 각 당량에 대해 4.6 몰 당량의 화학식 (I)의 화합물이 이용된다.

[0334] 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1 구체예, 제 2 구체예, 제 3 구체예, 제 4 구체예, 제 5 구체예, 제 6 구체예, 제 7 구체예, 제 8 구체예, 제 9 구체예, 또는 제 10 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에 대해), CysAb는 해당 항체에서 EU/OU 번호매김 위치 40, 43, 84, 88, 103, 112, 113, 114, 115, 118, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 161, 168, 172, 179, 187, 209, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 244, 245, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 265, 267, 270, 272, 274, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 289, 293, 295, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 334, 338, 339, 340, 341, 343, 345, 360, 361, 362, 371, 373, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 391, 413, 422, 423, 424, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 440, 442, 443 및 446에서 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서 공작된 시스테인 잔기를 갖는 항체다. 다른 구체예들에서, CysAb는 Kabat 번호매김 위치 15, 43, 106, 108, 110, 112, 113, 119, 120, 121, 142, 144, 149, 153, 156, 158, 168, 173, 175, 205 및 207에서 선택된 하나 또는 그 이상의 위치에서 공작된 시스테인 잔기를 갖는 항체다. 특정 구체예들에서, CysAb는 WO 2016/040856 및 U.S. 특허 번호 7,521,541 (각각은 본원의 참고자료에 편입됨)에서 기술된 하나 또는 그 이상의 위치에서 공작된 시스테인 잔기를 갖는 항체다. 더 구체적으로, CysAb는 항체의 중쇄에서 EU/OU 번호매김 위치 442에서 공작된 시스테인 잔기를 갖는 항체다. 더욱 더 구체적으로, CysAb는 두 중쇄 모두의 EU/OU 번호매김 위치 442에서 공작된 시스테인 잔기를 갖는 항체다.

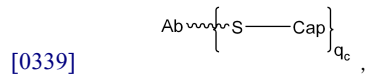
[0335] 제 11 구체예에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 방법을 제공한다:



[0336]

[0337] 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

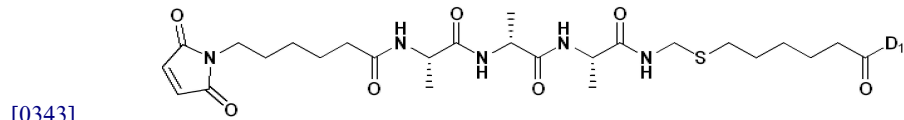
[0338] (a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썩워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



[0340] 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

[0341] (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0342] (c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고



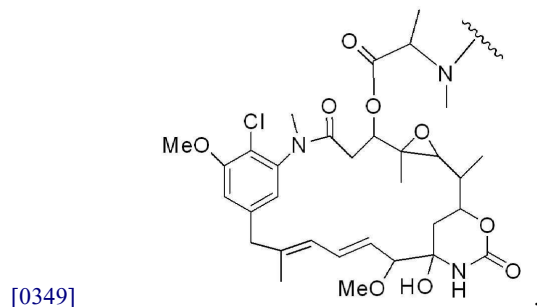
[0344] 이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:

[0345] $\text{Ab} \sim \text{S} -$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인, 및 CDR_{H3} 도메인, 그리고 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인, 및 CDR_{L3} 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

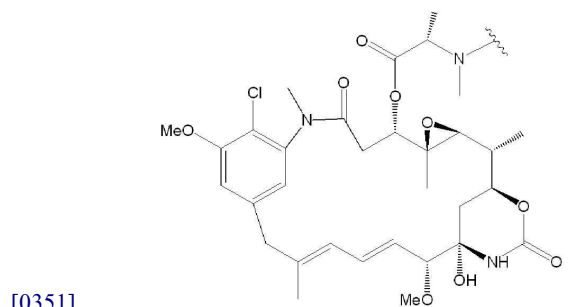
[0346] q_c 는 1 또는 2이며;

[0347] Cap는 캡핑제이며; 그리고

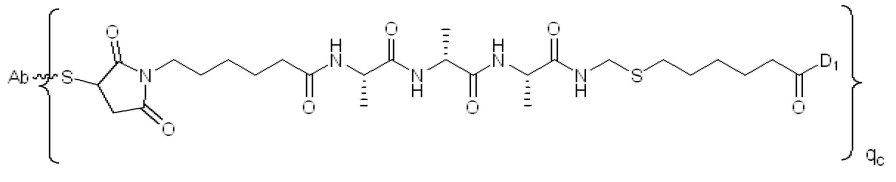
[0348] D₁은 다음의 식으로 나타내며:



[0350] 바람직하게는, D₁은 다음의 식으로 나타내며:

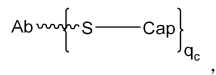


[0352] 제 12 구체예에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘주게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공한다:



이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

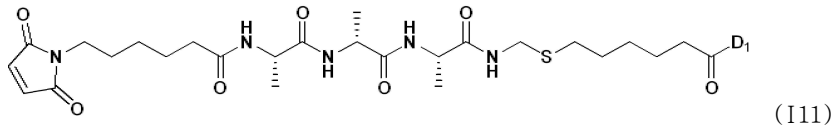
(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썬워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고:



이로 인하여 ADC가 형성되며,

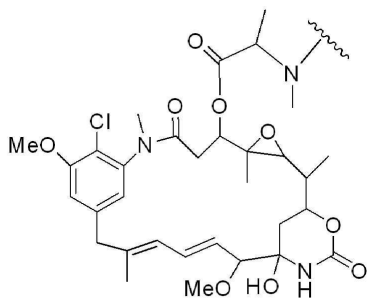
이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행되며, 그리고 이때:

$Ab \sim S$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로, 서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인, 및 CDR_H3 도메인, 그리고 CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인, 및 CDR_L3 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

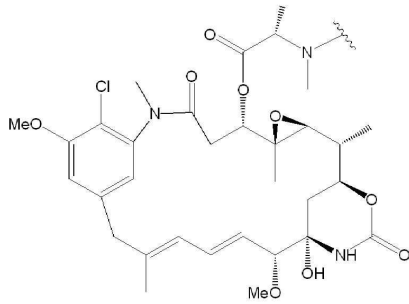
q_c 는 1 또는 2이며;

Cap는 캡핑제이며; 그리고

D_1 은 다음의 식으로 나타내며:



바람직하게는, D_1 은 다음의 식으로 나타낸다:



[0369]

[0370]

제 13 구체예에서, 본원에 기술된 제 11 또는 제 12 구체예의 방법은 다음 단계들을 더 포함한다: (d) 콘쥬게이트안된 화학식 (I11)의 화합물을 제거하는 단계; 그리고 임의선택적으로 (e) ADC를 안정적 완충액으로 교환시키는 단계.

[0371]

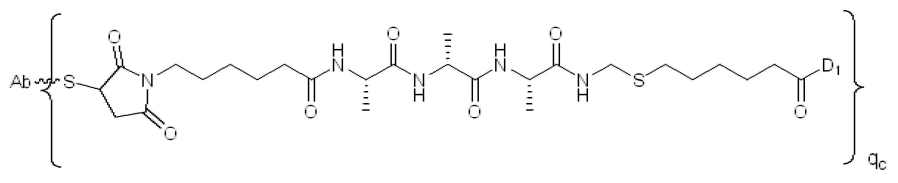
일부 구체예들에서, SPTFF를 이용하여 콘쥬게이트안된 약물을 제거하거나 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다. 일부 구체예들에서, 역전류 정용여과를 이용하여 콘쥬게이트안된 약물을 제거하고 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다.

[0372]

특정 구체예들에서, 단계 (d) 및 단계 (e)는 연속적으로 수행된다.

[0373]

제 14 구체예에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공한다:

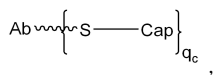


[0374]

이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

[0375]

(a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 씌워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



[0377]

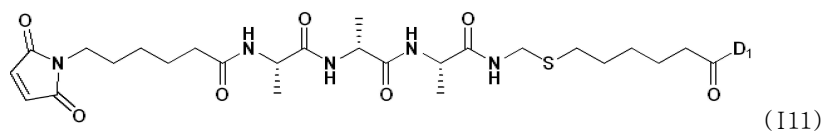
이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제 (Cap)는 제거되며;

[0378]

(b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0379]

(c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염을 반응시키고:



[0381]

이로 인하여 ADC가 형성되며; 그리고

[0382]

(d) 역전류 정용여과를 통하여 콘쥬게이트안된 화학식 (I11)의 화합물을 제거하고;

[0383]

이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (d)는 연속적으로 수행되며, 그리고 이때:

[0384]

Ab~S~는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 (CysAb) 또는 이의 항원-결합 단편이며; 그리고 이때 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 차례로,

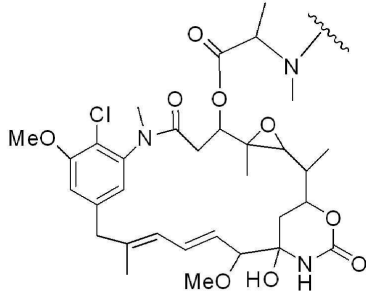
[0385]

서열 식별 번호: 24, 25, 및 26, 그리고 서열 식별 번호: 21, 22, 23의 서열을 갖는 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인, 및 CDR_{H3} 도메인, 그리고 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인, 및 CDR_{L3} 도메인을 포함하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편이며;

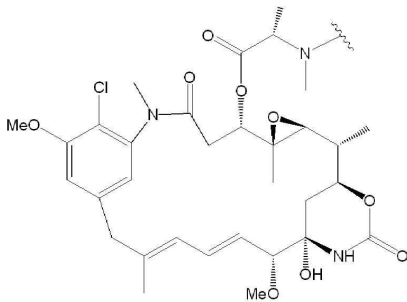
q_c는 1 또는 2이며;

Cap는 캡핑제이며; 그리고

D₁은 다음의 식으로 나타낸다:



바람직하게는, D₁은 다음의 식으로 나타낸다:



특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 ADAM9-결합 단편은 서열 식별 번호:27 및 서열 식별 번호:28의 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 (V_H)과 경쇄 가변 도메인 (V_L)을 포함한다.

특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 상기 인간화된 항-ADAM9 항체는 서열 식별 번호:29 및 서열 식별 번호:30의 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 상기 환원 제제는 DPPA이다. 특정 구체예들에서, 단계 (a)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 10 ~ 20 몰 당량의 DPPA가 이용된다. 더 구체적으로, 단계 (a)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 15 ~ 17 몰 당량의 DPPA가 이용된다. 더욱 더 구체적으로, 단계 (a)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 16 몰 당량의 DPPA가 이용된다.

특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (a)에서 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 또는 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (a)에서 반응은 pH 6.5에서 실행된다.

특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 상기 산화 제제는 DHAA이다. 특정 구체예들에서, 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 20 ~ 30 몰 당량의 DHAA가 이용된다. 더 구체적으로, 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 23 ~ 25 몰 당량의 DHAA가 이용된다. 더욱 더 구체적으로, 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 23 ~ 25 몰 당량의 DHAA가 이용된다. 더욱 더 구체적으로, 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 24 몰 당량의 DHAA가 이용된다.

특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의

의 구체예들의 방법에서, 단계 (b)에서 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 또는 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (b)에서 반응은 pH 6.5에서 실행된다.

[0398] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (c)에서 반응은 pH 6.0 ~ 7.0 또는 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (c)에서 반응은 pH 6.5에서 실행된다.

[0399] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, CysAb (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편) 또는 이의 항원-결합 단편 대비 과량의 화학식 (I11)의 화합물이 단계 (c)에서 이용된다. 더 구체적으로, CysAb의 각 당량에 대해 화학식 (I11)의 화합물의 1.1 ~ 20, 1.5 ~ 20, 2 ~ 20, 2 ~ 10, 2 ~ 5, 3.5 ~ 5, 4.2 ~ 5, 4.3 ~ 4.9, 4.4 ~ 4.8, 또는 4.5 ~ 4.7 몰 당량이 이용된다. 특이적 구체예에서, CysAb의 각 당량에 대해 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0 몰 당량의 화학식 (I11)의 화합물이 이용된다. 또다른 특이적 구체예에서, CysAb의 각 당량에 대해 4.6 몰 당량의 화학식 (I11)의 화합물이 이용된다.

[0400] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (a)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 15 ~ 17 몰 당량의 DPPA가 이용되며; 단계 (a)에서 반응은 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행되며; 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 23 ~ 25 몰 당량의 DHAA가 이용되며; 단계 (b)에서 반응은 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행되며; 그리고 단계 (c)에서 반응은 pH 6.3 ~ 6.7에서 실행된다.

[0401] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 단계 (a)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 16 몰 당량의 DPPA가 이용되며; 단계 (a)에서 반응은 pH 6.5에서 실행되며; 단계 (b)에서 cCysAb의 각 당량에 대해 24 몰 당량의 DHAA가 이용되며; 단계 (b)에서 반응은 pH 6.5에서 실행되며; 그리고 단계 (c)에서 반응은 pH 6.5에서 실행된다.

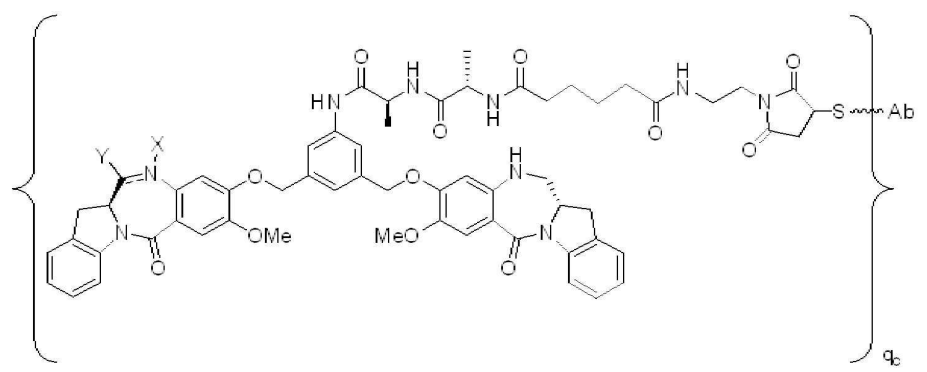
[0402] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 해당 방법은 단계 (c) 이후, 상기 콘쥬게이트는 정제되기 전 (가령, 단계 (d) 이전), 반응 혼합물의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예들에서, 단계 (c) 이후, 반응 혼합물의 pH는 pH 4.0 ~ 6.0, 4.0 ~ 5.5, 4.0 ~ 5.0, 4.5 ~ 5.0, 또는 4.6 ~ 4.8 사이로 조정된다. 특이적 구체예에서, pH는 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0으로 조정된다. 또다른 특이적 구체예에서, pH는 4.7로 조정된다.

[0403] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, 상기 캡핑제는 시스테인, 글루타틴 또는 이의 조합이다.

[0404] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예, 제 12 구체예, 제 13 구체예, 또는 제 14 구체예, 또는 임의의 구체예들의 방법에서, q_c 는 2이다.

[0405] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 제 11 구체예 또는 임의의 구체예들의 방법에 의해 준비된 면역콘쥬게이트를 포함하는 조성물 (가령, 약제학적 조성물)은 1.0 ~ 2.5, 1.5 ~ 2.5, 1.8 ~ 2.2, 또는 1.9 ~ 2.1 범위의 DAR 값을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 DAR은 1.8, 1.9, 2.0 또는 2.1이다.

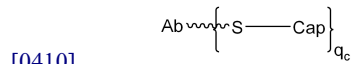
[0406] 제 15 구체예에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 방법을 제공한다:



[0407]

[0408] 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

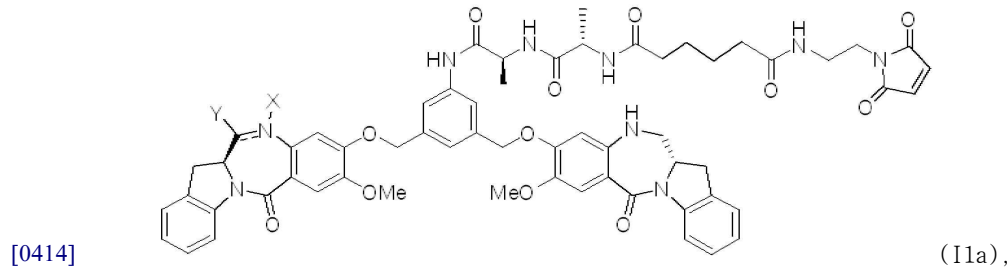
[0409] (a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썩워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



[0411] 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0412] (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0413] (c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



[0415] 이로 인하여 ADC가 형성되며, 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 이때:

[0416] N과 C 사이의 이중선 ==은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 -SO₃M이며, 그리고 M은 H⁺ 또는 양이온이며;

[0417] Ab~S—는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

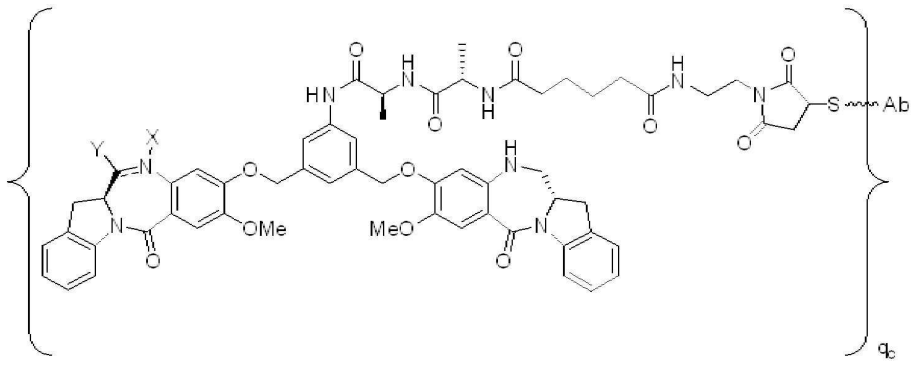
[0418] a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고

[0419] b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가변 영역;

[0420] q_c는 1 또는 2이며; 그리고

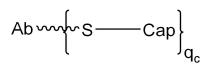
[0421] Cap는 캡핑제다.

[0422] 제 16 구체예에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공하고:



[0423] 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

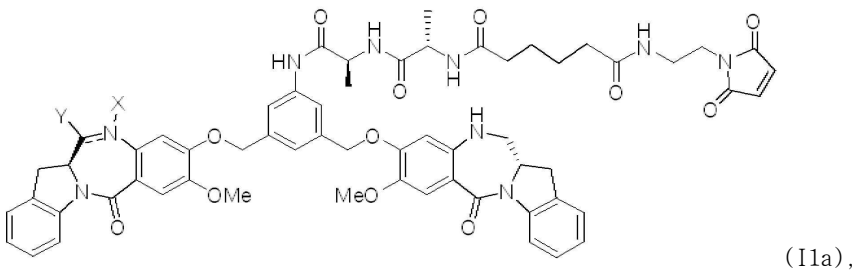
[0425] (a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썩워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:



[0427] 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0428] (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0429] (c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



(11a),

[0431] 이로 인하여 ADC가 형성되며,

[0432] 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (c)는 연속적으로 수행되며, 이때:

[0433] N과 C 사이의 이중선 ==은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 -SO₃M이며, 그리고 M은 H⁺ 또는 양이온이며;

[0434] Ab~S~는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

[0435] a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고

[0436] b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가

변 영역;

[0437] q_c 는 1 또는 2이며; 그리고

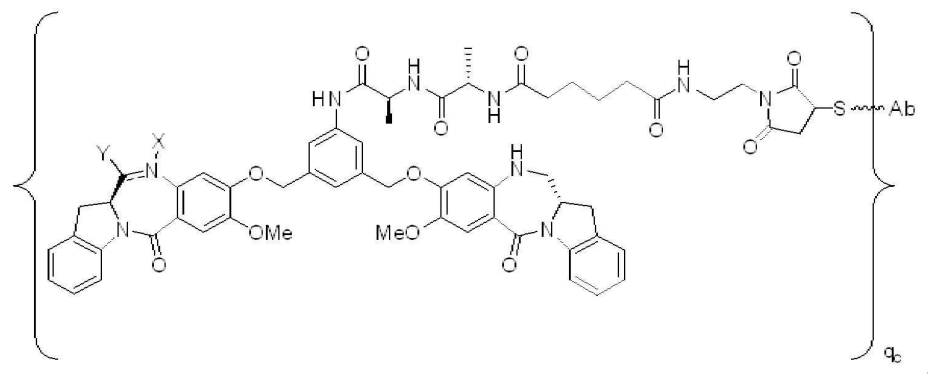
[0438] Cap는 캡핑제다.

[0439] 제 17 구체예에서, 본원에 기술된 제 15 구체예 또는 제 16 구체예의 방법은 다음 단계들을 더 포함한다: (d) 콘쥬게이트안된 화학식 (I1a)의 화합물을 제거하는 단계; 그리고 임의선택적으로 (e) ADC를 안정적 완충액으로 교환시키는 단계.

[0440] 일부 구체예들에서, SPTFF를 이용하여 콘쥬게이트안된 약물을 제거하거나 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다. 일부 구체예들에서, 역전류 정용여과를 이용하여 콘쥬게이트안된 화학식 (I1a)의 화합물을 제거하고 및/또는 ADC를 안정적 완충액으로 교환한다.

[0441] 특정 구체예들에서 단계 (d) 및 단계 (e)는 연속적으로 수행된다.

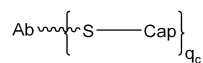
[0442] 제 18 구체예에서, 본 발명은 다음 식으로 나타내는 항체-세포독성 제제 콘쥬게이트 (ADC)를 준비하는 연속 방법을 제공한다:



[0443]

[0444] 이 방법은 다음 단계들을 포함한다:

[0445] (a) 환원 제제와 다음 식으로 나타낸 캡이 썩워진 시스테인-공작된 항체 (cCysAb)를 반응시켜, 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만들고:

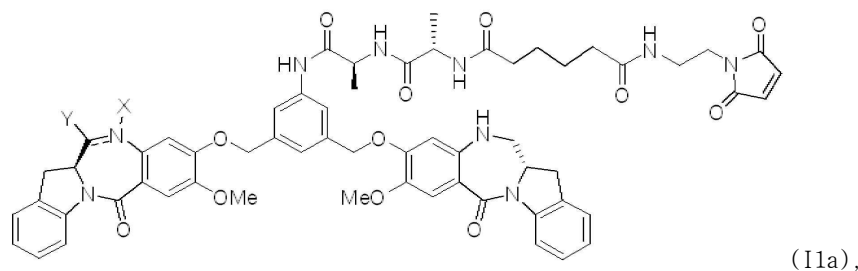


[0446]

[0447] 이때 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서 유리 티올기 (-SH)가 형성되도록 상기 캡핑제는 제거되며;

[0448] (b) 상기 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 선택적 산화 제제를 반응시켜 CysAb를 만들고, 이때 상기 공작된 시스테인 잔기내 유리 티올기는 산화되지 않으며; 그리고

[0449] (c) CysAb와 다음 식으로 나타내는 화합물 또는 약제학적으로 수용가능한 이의 염을 반응시키고



[0450]

[0451] 이로 인하여 ADC가 형성되며; 그리고

[0452] (d) 역전류 정용여과를 통하여 콘쥬게이트안된 화학식 (I1a)의 화합물을 제거하고;

[0453] 이때 단계 (a)의 환원된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (b)에서 이용되며, 단계 (b)의 CysAb 또는 이의 항원-결합 단편은 정제하지 않고 단계 (c)에서 이용되며, 단계 (a) ~ (d)는 연속적으로 수행되

며, 이때:

[0454] N과 C 사이의 이중선 $\equiv$ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내며, 전제조건으로 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며, 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이며, Y는 $-\text{SO}_3\text{M}$ 이며, 그리고 M은 H^+ 또는 양이온이며;

[0455] $\text{Ab}\sim\text{S}\text{---}$ 는 공작된 시스테인 잔기 상에 위치한 티올기를 통하여 세포독성 제제에 공유적으로 연계된 시스테인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며; 이때 상기 시스테인-공작된 항체는 다음을 포함하는 항-CD123 항체 또는 항원-결합 단편이며:

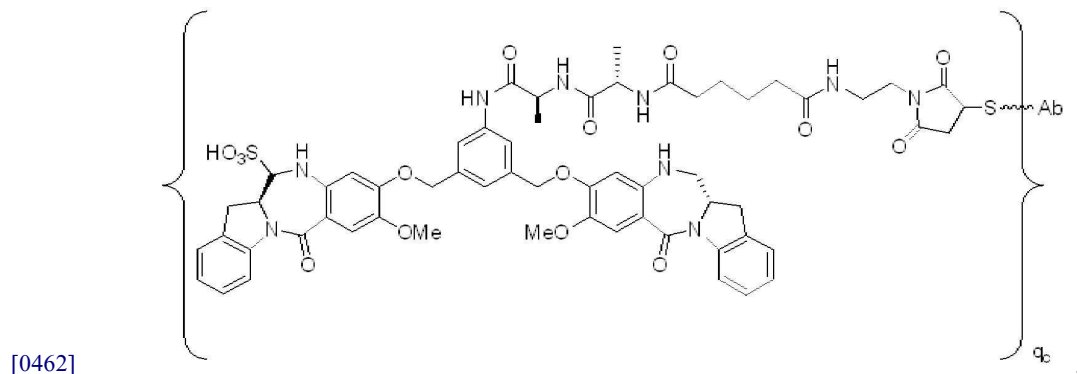
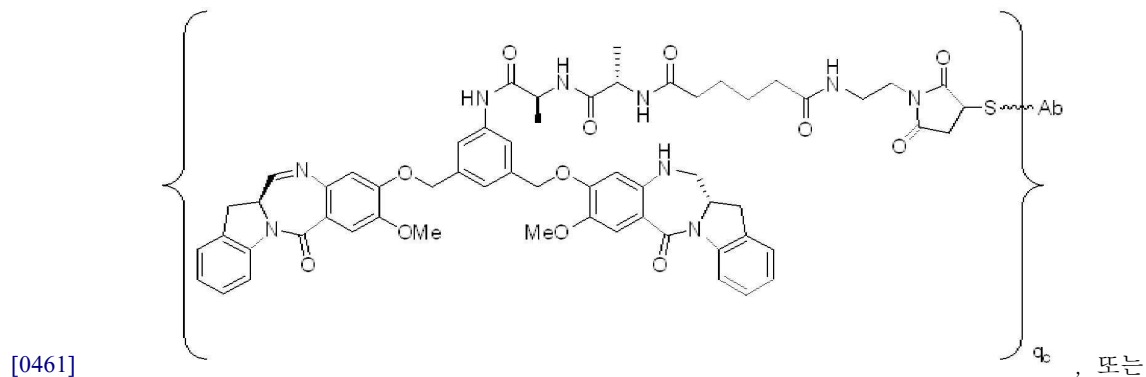
[0456] a) 서열 식별 번호:4에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 $\text{CDR}_{\text{H}1}$, 서열 식별 번호:5에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 $\text{CDR}_{\text{H}2}$, 그리고 서열 식별 번호:6에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 $\text{CDR}_{\text{H}3}$ 을 포함하는 면역글로블린 중쇄 가변 영역; 그리고

[0457] b) 서열 식별 번호:1에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 $\text{CDR}_{\text{L}1}$, 서열 식별 번호:2에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 $\text{CDR}_{\text{L}2}$, 그리고 서열 식별 번호:3에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 $\text{CDR}_{\text{L}3}$ 을 포함하는 면역글로블린 경쇄 가변 영역;

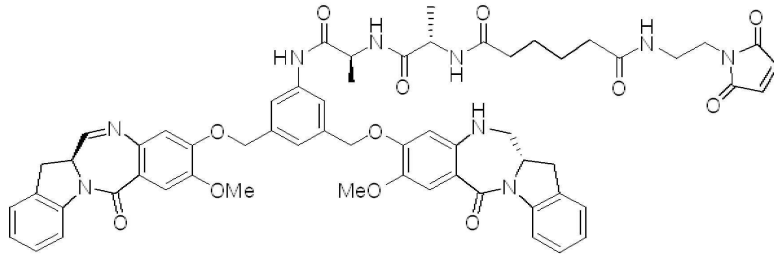
[0458] q_c 는 1 또는 2이며; 그리고

[0459] Cap는 캡핑제다.

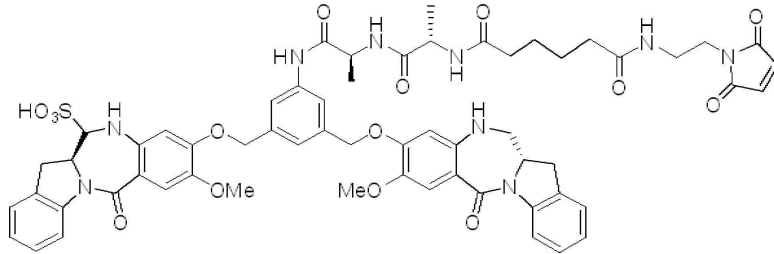
[0460] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예 및 제 18 구체예의 방법에 의해 준비된 콘주게이트는 다음의 식:



[0463] 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타내며, 상기 화합물은 다음의 식으로 나타낸다:



[0464] , 또는



[0465] ,

[0466] 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염.

[0467] 특정 구체예들에서, 상기 약제학적으로 수용가능한 염은 나트륨 염 또는 칼륨 염이다. 특정 구체예에서, 상기 약제학적으로 수용가능한 염은 나트륨 염이다.

[0468] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열 식별 번호: 7의 V_H 서열과 서열 식별 번호: 9의 V_L 서열을 포함한다.

[0469] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 항-CD123 항체는 다음을 포함한다:

[0470] a) 서열 식별 번호: 8에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄; 그리고

[0471] b) 서열 식별 번호: 10에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄.

[0472] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 상기 환원 제제는 DPPA 또는 TCEP이다. 특정 구체예들에서, 상기 환원 제제는 TCEP이다.

[0473] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 단계 (a)에서 반응은 pH 5.0 ~ 8.5, 7.0 ~ 8.0 또는 7.3 ~ 7.7에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (a)의 반응은 pH 7.5에서 실행된다.

[0474] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 상기 산화 제제는 DHAA이다.

[0475] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 단계 (b)에서 반응은 pH 5.0 ~ 8.5, 7.0 ~ 8.0 또는 7.3 ~ 7.7에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (b)의 반응은 pH 7.5에서 실행된다.

[0476] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 단계 (c)의 반응은 pH 5.0 ~ 8.5 사이, 5.5 ~ 6.5 또는 5.8 ~ 6.2에서 실행된다. 더 구체적으로, 단계 (c)의 반응은 pH 6.0에서 실행된다.

[0477] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서, CysAb (가령, 항체 또는 이의 항원-결합 단편) 또는 이의 항원-결합 단편 대비 과량의 화학식 (I1a)의 화합물이 단계 (c)에서 이용된다. 더 구체적으로, CysAb의 각 당량에 대해 화학식 (I1a)의 화합물의 1.1 ~ 20, 1.5 ~ 20, 2 ~ 20, 2 ~ 10, 2 ~ 5, 3.5 ~ 5, 4.2 ~ 5, 4.3 ~ 4.9, 4.4 ~ 4.8, 또는 4.5 ~ 4.7 몰 당량이 이용된다. 특이적 구체예에서, CysAb의 각 당량에 대해 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0 몰 당량의 화학식 (I1a)의 화합물이 이용된다. 또다른 특이적 구체예에서, CysAb의 각 당량에 대해 4.6 몰 당량의 화학식 (I11)의 화합물이 이용된다.

[0478] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 상기 환원 제

제는 TCEP이며; 단계 (a)에서 반응은 pH 7.3 ~ 7.7에서 실행되며; 상기 산화 제제는 DHAA이며; 단계 (b)에서 반응은 pH 7.3 ~ 7.7에서 실행되며; 그리고 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysAb와 세포독성 제제를 반응시키기 전, pH 7.3 ~ 7.7에서 pH 5.8 ~ 6.2로 조정된다.

[0479] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 상기 환원 제제는 TCEP이며; 단계 (a)에서 반응은 pH 7.5에서 실행되며; 상기 산화 제제는 DHAA이며; 단계 (b)에서 반응은 pH 7.5에서 실행되며; 그리고 단계 (b) 이후 반응 혼합물의 pH는 단계 (c)에서 CysAb와 세포독성 제제를 반응시키기 전, pH 7.5에서 pH 6.0으로 조정된다.

[0480] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 제 17 구체예, 또는 제 18 구체예의 방법에서, 해당 방법은 단계 (c) 이후, 상기 콘주게이트는 정제되기 전, (가령, 단계 (d) 이전) 반응 혼합물의 pH를 조정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예들에서, 단계 (c) 이후, 반응 혼합물의 pH는 pH 4.0 ~ 6.0, 4.0 ~ 5.5, 4.0 ~ 5.0, 4.5 ~ 5.0, 또는 4.6 ~ 4.8 사이로 조정된다. 특이적 구체예에서, pH는 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 또는 5.0으로 조정된다. 또다른 특이적 구체예에서, pH는 4.7로 조정된다.

[0481] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 또는 제 17 구체예의 방법에서, 캡핑 시약은 시스테인, 글루타티온 또는 이의 조합이다.

[0482] 특정 구체예들에서, 제 15 구체예, 제 16 구체예, 또는 제 17 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예의 방법에 의해 준비된 면역콘주게이트를 포함하는 조성물 (가령, 약제학적 조성물)은 1.0 ~ 2.5, 1.5 ~ 2.5, 1.8 ~ 2.2, 또는 1.9 ~ 2.1 범위의 DAR 값을 갖는다. 일부 구체예들에서, 상기 DAR은 1.8, 1.9, 2.0 또는 2.1이다.

[0483] 본 발명의 방법에 의해 준비된 콘주게이트는 실질적으로 고-순도 및 안정성을 갖는다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 방법에 의해 준비된 콘주게이트는 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5% 이상의 단량체 백분율을 갖는다. 특정 구체예들에서, 본 발명의 방법에 의해 준비된 콘주게이트는 고-분자량 종의 약 10% 미만, 약 5% 미만 (가령, 약 4%, 3%, 2%, 1% 미만이거나 이에 등가의, 또는 0%)을 갖는다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 “고-분자량 종(high molecular weight species)” 또는 “HMW” 이란 분자량이 높은 항체-함유하는 또는 콘주게이트-함유하는 종(species)을 지칭한다. 상기 고-분자량 종은 항체 또는 콘주게이트 또는 이의 조합의 응집에 의해 형성된 이량체, 삼량체 또는 기타 고차 올리고머일 수 있다. 상기 고-분자량 종은 SEC-HPLC에 의해 식별되며, 이의 양이 결정될 수 있다.

[0484] 특정 구체예들에서, 상기 콘주게이트 조성물에서 CysCBA (가령, DAR) 대비 세포독성 제제의 평균 몰 비율은 1.0 ~ 2.5, 1.5 ~ 2.5, 1.7 ~ 2.3, 1.8 ~ 2.2, 또는 1.9 ~ 2.1이다. 또다른 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 준비된 콘주게이트 조성물의 DAR은 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 또는 2.5이다. 한 구체예에서, 상기 DAR은 2.0이다. 상기 DAR 값은 당분야에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 한 구체예에서, DAR 값은 각각 항체 및 세포독성 제제에 대한 과장에서의 흡광도 값을 사용하여 UV/Vis 분광법에 의해 결정될 수 있다. 대안으로, 상기 DAR 값은 질량 분광분석법 및/또는 HPLC에 의해 결정될 수 있다.

[0485] 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9, 제 10, 제 11, 제 12, 제 13, 제 14, 제 15, 제 16, 제 17 또는 제 18 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법), 단계 (a)의 반응, 단계 (b) 또는 단계 (c)는 완충액 용액에서 실행된다. 임의의 적합한 완충액이 본 발명의 방법들에서 이용될 수 있다. 예시적인 완충제에는 다음이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: 구연산염 완충액, 아세트이트 완충액, 숙신산염 완충액, 인산염 완충액, MES ((2-(N-몰포리노)에탄술폰산)) 완충액, 비스-트리스 메탄 (2-[비스(2-히드록시에틸)아미노]-2-(히드록시메틸)프로판-1,3-디올) 완충액, ADA (N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산) 완충액, ACES (N-2-아미노에탄술폰산) 완충액, PIPES (피페라진-N,N' 비스(2-에탄술폰산)), MOPSO (β -히드록시-4-몰포롤린프로판술폰산) 완충액, 비스-트리스 프로판 (1,3-비스(트리스(히드록시메틸)메틸아미노)프로판) 완충액, BES (N,N-비스(2-히드록시에틸)-2-아미노에탄술폰산), TES (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]-2-아미노에탄술폰산) 완충액, HEPES (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄술폰산) 완충액, DIPSO, (3-(N,N-비스[2-히드록시에틸]아미노)-2-히드록시프로판술폰산 또는 N,N-비스(2-히드록시에틸)-3-아미노-2-히드록시프로판술폰산), MOBS (4-(N-몰포리노)부탄술폰산) 완충액, TAPSO (3-[[1,3-디히드록시-2-(히드록시메틸)프로판-2-일]아미노]-2-히드록시프로판-1-술폰산) 완충액, 트리즈마(트리스 또는 2-아미노-2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올) 완충액, HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-히드록시프로판술폰산)) 완충액, POPSO (피페라진-1,4-비스-(2-히드록시-프로판-술폰산) 탈수화물) 완충액, EPPS (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-프로판술폰산) 완충액, 트리신 (N-(2-히드록시-1,1-비스(히드록시메틸)에틸)글리신) 부퍼, gly-gly, 바이신 (2-(비스(2-히드록시에틸)아미노)아세트산) 완충액, HEPBS (N-(2-히드록시에틸)피

페라진-N'-(4-부탄술포산)) 완충액, TAPS (3-[[1,3-디히드록시-2-(히드록시메틸)프로판-2-일]아미노]프로판-1-술포산) 완충액, AMPD (2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올) 완충액, TABS (N-트리스(히드록시메틸)메틸-4-아미노부탄술포산) 완충액, AMPSO (N-(1,1-디메틸-2-히드록시에틸)-3-아미노-2-히드록시프로판술포산) 완충액, 또는 이의 조합. 특정 구체예들에서, 상기 완충액은 인산염 완충액이다.

[0486] 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9, 제 10, 제 11, 제 12, 제 13 제 14, 제 15, 제 16, 제 17 또는 제 18 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법에서)에서, 단계 (a)의 반응, 단계 (b) 또는 단계 (c)는 소량의 유기 용매 존재하에서 실행된다. 더 구체적으로, 상기 유기 용매는 디메틸아세트아미드 (DMA)이다. 상기 유기 용매 (가령, DMA)는 반응 혼합물 총 부피에 대해 1%-20%, 1-15%, 2-15%, 5-15%, 또는 5-10% 부피의 양으로 존재할 수 있다.

[0487] 특정 구체예들에서, 상기 본원에서 기술된 본 발명의 방법들에 있어서, 단계 (a)의 반응, 단계 (b)의 반응 또는 단계 (c)의 반응은 완전하게 또는 실질적으로 완전하게, 예를 들면, 2 분 ~ 1 주, 1 시간 ~ 48 시간, 1 시간 ~ 36 시간, 1 시간 ~ 24 시간, 1 시간 ~ 12 시간, 1 시간 ~ 8 시간, 5 시간 ~ 15 시간, 5 시간 ~ 10 시간, 1 시간 ~ 5 시간, 30 분 ~ 2 시간, 또는 5 분 ~ 30 분의 기간 동안 진행이 허용된다. 특정 구체예들에서, 단계 (a)의 반응은 1 시간 ~ 12 시간, 1 시간 ~ 8 시간, 2 시간 ~ 8 시간, 3 시간 ~ 7 시간, 또는 4 시간 ~ 6 시간 동안 진행이 허용된다. 특이적 구체예에서, 단계 (a)의 반응은 5 시간 동안 진행이 허용된다. 특정 구체예들에서, 단계 (b)의 반응은 1 시간 ~ 12 시간, 1 시간 ~ 8 시간, 3 시간 ~ 9 시간, 4 시간 ~ 8 시간, 또는 5 시간 ~ 7 시간 동안 진행이 허용된다. 특이적 구체예에서, 단계 (b)의 반응은 6 시간 동안 진행이 허용된다. 특정 구체예들에서, 단계 (c)의 반응은 1 시간 ~ 24 시간, 5 시간 ~ 15 시간, 6 시간 ~ 14 시간, 7 시간 ~ 13 시간, 8 시간 ~ 12 시간 또는 9 시간 ~ 11 시간 동안 진행이 허용된다. 특이적 구체예에서, 단계 (c)의 반응은 10 시간 동안 진행이 허용된다.

[0488] 특정 구체예들에서, 상기 본원에서 기술된 본 발명의 방법들에 있어서, 단계 (a)의 반응, 단계 (b)의 반응, 또는 단계 (c)의 반응은 임의의 적합한 온도에서 실행될 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 반응은 10 °C ~ 50 °C, 10 °C ~ 40 °C, 또는 10 °C ~ 30 °C의 온도에서 실행될 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 반응은 15 °C ~ 30 °C, 20 °C ~ 30 °C, 15 °C ~ 25 °C, 16 °C ~ 24 °C, 17 °C ~ 23 °C, 18 °C ~ 22 °C 또는 19 °C ~ 21 °C의 온도에서 실행될 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 반응은 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C 또는 25 °C의 온도에서 실행될 수 있다.

[0489] 특정 구체예들에서, 상기 본원에서 기술된 본 발명의 방법들에서 단계 (a)의 반응, 단계 (b)의 반응 또는 단계 (c)의 반응에 있어서, 상기 세포-결합 제제 (가령, 항체)에 대한 농도는 1 mg/mL ~ 50 mg/mL, 1 mg/mL ~ 20 mg/mL, 1 mg/mL ~ 15 mg/mL, 1 mg/mL ~ 10 mg/mL, 1 mg/mL ~ 6 mg/mL, 또는 2 mg/mL ~ 5 mg/mL 범위 안에 있을 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합 제제 (가령, 항체)에 대한 농도는 3 mg/mL ~ 5 mg/mL 범위 안에 있다.

[0490] 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들에서, 상기 안정적 완충액은 ADC에 대한 제형 완충액이다.

[0491] 3. 인-라인 공정 자동화 기술 (인-라인 PAT)

[0492] 본원에 기술된 연속 방법, 가령, 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면에서 기술된, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 항체 약물 콘주게이트 (ADCs)를 만들고, 가공하는 방법들에 이용된 인-라인 공정 자동화 기술들이 본원에서 제공된다. 이러한 기술은 오프-라인 분석을 제거하고, 작업자의 재료 취급을 줄일 수 있는 직접 측정을 제공한다. 인-라인 모니터링을 사용하여 ADC (단백질) 농도 및 유리 약물 제거를 모니터링할 수 있다. 이를 통해 공정 (가령, 정제 공정)에 사용되는 특정 부피 또는 투석-부피를 기반으로 하는 대신, 인-라인 관독값에서 얻은 데이터를 기반으로 최종 ADC 농도를 표적으로 할 수 있다. PAT 구현으로 제어 및 탐지 가능성 향상 (가령, 정상-상태 작업 중 변경 사항을 사용하여 산물의 질에 영향을 미치기 전에 문제를 감지할 수 있고)이 허용되며, 여러가지 PAT 모듈(가령, FlowVPE, UV 센서, pH 측정기, 전도도 측정기, 압력 센서 또는 유량 측정기)을 사용하면 개별 단위 장치 작업에서 강력한 공정 성능을 보장할 수 있다.

[0493] 인-라인 모니터링을 이용하여, 예를 들면, 항체 환원 및/또는 산화 반응에서 및/또는 ADC 콘주게이션 반응 (가령, 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 방법에서 기재된 반응)에서 임의의 펌프로부터 공급물 스트림에서의 유동 속도를 예를 들면, 모니터링할 수 있다. 인-라인 모니터링을 이용하여, 예를 들면, 항체 환원 및/또는 산화 반응에서 및/또는 ADC 콘주게이션 반응 (가령, 제 1 측면, 제 2 측면 또는 제 3 측면 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 방법에서 기재된 반응)에 추가되는

구성요소의 농도를 예를 들면, 모니터링할 수 있다. 이러한 모니터링으로 상기 반응들의 화학량론에 대한 적절한 제어를 확보할 수 있다. 상기 인-라인 모니터링은 예를 들면, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 환원 제제, 산화 제, 세포독성 제제 또는 세포독성 제제-링커 화합물 (가령, 화학식 (I)로 나타난 화합물), 및/또는 콘주게이션 완충액의 유동 속도 또는 농도를 모니터링할 수 있다. 상기 인-라인 모니터링으로 콘주게이션 반응 완충액으로 가는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 농도의 유동 속도를 모니터링할 수 있다.

[0494] 인-라인 모니터링을 또한 이용하여 예를 들면, 콘주게이션 반응을 언제 중단시킬 것인지의 결정, 가령, 콘주게이션 완충액의 추가를 중단하거나, 콘주게이션 완충액 순환을 중단하거나, 및/또는 콘주게이션 완충액을 행귀내거나 또는 제거를 시작하는 시기를 결정할 수 있다. 본원에서 제공되는 일부 구체예들에서, 콘주게이트안된 약물 (가령, 화학식 (I)의 화합물)의 인-라인 모니터링이 이용될 수 있다. 콘주게이트안된 약물의 측정은 콘주게이션 반응에서 달성된 항체당 약물의 평균 수(DAR)를 추론하는 데 사용할 수 있다. 따라서, 목표로 한 DAR에 도달될 때, 콘주게이션 반응이 중단될 수 있다.

[0495] 인-라인 모니터링을 또한 이용하여 ADC의 농축 및/또는 정제를 모니터링할 수 있다. 농축 및/또는 정제는 여과 (가령, 한외여과, 정용여과)를 이용할 수 있다. 상기 여과는 SPTFF를 비롯한 접선 유동 여과일 수 있다. 상기 여과는 역전류 정용여과일 수 있다. 여과를 모니터링할 때 이용되는 경우, 인-라인 모니터링은 잔류액 또는 투과액 안에 피분석물을 측정하는데 이용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 잔류액 안에 콘주게이트안된 약물 또는 콘주게이트안된 약물-링커 화합물의 인-라인 모니터링을 이용하여 ADC 정제 정도를 평가할 수 있다. 콘주게이트안된 약물 또는 콘주게이트안된 약물-링커 화합물의 수준은 콘주게이션 반응 직후 잔류액에서는 높지만, 그러나 정제 후 잔류액에서는 낮을 것이다. 잔류액 또는 투과액 안의 ADC의 인-라인 모니터링을 이용하여 농축 및/또는 정제 공정 동안 ADC의 손실을 평가할 수 있다.

[0496] 상기 정제는 크로마토그래피 (가령, 컬럼 크로마토그래피를 통한 유동)를 또한 이용할 수 있다. 크로마토그래피 컬럼의 끝에서 인-라인 모니터링은 예를 들면, ADC 수준을 측정할 수 있고, 이를 이용하여 컬럼이 과부하될 때, 또는 ADC가 돌파(breakthrough)될 때를 결정할 수 있다.

[0497] 인-라인 모니터링을 이용하여 pH를 측정할 수 있는데, 이를 이용하여 예를 들면, 완충제 교환이 완료 여부를 결정할 수 있다.

[0498] 예시적인 인-라인 모니터링 기술은 예를 들면, Fourier Transform Infrared (FTIR) 유동 셀, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 또는 초-고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC)를 이용한다.

[0499] 인-라인 모니터링 기술은 예를 들면, FlowVPE 또는 UV 센서를 이용할 수 있다. 일부 구체예들에서, FlowVPE를 이용하여 인-라인 모니터링을 실시한다. FlowVPE는 연속 모니터링을 위해 유동 셀을 이용한다.

[0500] 접선 유동 여과 (가령, 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF)의 효능은 FlowVPE, UV 센서, pH 미터, 전도성 미터, 압력 센서, 유동 미터, 등등을 이용하여 인-라인으로 모니터링될 수 있다. 역전류 정용여과의 효능 역시 FlowVPE, UV 센서, pH 미터, 전도성 미터, 압력 센서, 유동 미터, 등등을 이용하여 인-라인으로 모니터링될 수 있다.

[0501] 인-라인 모니터링 공정은 본 발명의 연속 방법 (상기에서 논의된), 가령, 단일-통과 접선 유동 여과 및/또는 역전류 정용여과를 이용한 연속 콘주게이션 공정과 복합되어 이용될 수 있거나, 또는 배취 콘주게이션 공정 (당 분야에 공지된)과 복합되어 이용될 수 있다.

[0502] 4. 세포-결합 제제 (CysCBA)

[0503] 본 발명의 면역콘주게이트에서의 세포-결합제는 펩티드 및 비-펩티드를 포함하여, 현재 공지되거나 공지될 임의의 종류일 수 있다. 일반적으로, 이들은 항체(이를 테면, 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체, 특히 모노클로날 항체), 림포킨, 호르몬, 성장 인자들, 비타민 (엽산 등, 세포 표면 수용체, 예를 들어 엽산 수용체에 결합할 수 있는 것들, 영양소-수송 분자 (이를 테면, 트랜스페린) 또는 임의의 다른 세포-결합 분자 또는 물질일 수 있다.

[0504] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합제는 항체, 단일쇄 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 모노클로날 항체, 단일쇄 모노클로날 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 단편 (또는 “항원-결합 부분” 또는 “항원-결합 단편”), 키메라 항체, 표적 세포에 특이적으로 결합하는 키메라 항체 단편 (또는 “항원-결합 부분” 또는 “항원-결합 단편”), 도메인 항체 (가령, sdAb), 또는 표적 세포에 특이적으로 결합하는 도메인 항체 단편이다.

- [0505] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합체는 인간화된 항체, 인간화된 단일쇄 항체, 또는 인간화된 항체 단편 (또는 “항원-결합 부분” 또는 “항원-결합 단편”)이다.
- [0506] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합체는 재포장된 항체, 재포장된 단일쇄 항체, 또는 재포장된 항체 단편 (또는 “항원-결합 부분” 또는 “항원-결합 단편”)이다.
- [0507] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합체는 항체 또는 이의 항원결합 부분 또는 “항원-결합 단편” (항체 유도체들을 비롯하여)일 때, CBA는 표적 세포 상의 리간드, 이를 테면, 세포-표면 수용체들을 비롯한 세포-표면 리간드에 결합할 수 있다.
- [0508] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합 제제는 시스템인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 특정 구체예들에서, 상기 시스템인-공작된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항-엽산 수용체 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-EGFR 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-CD19 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-Muc1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 항-CD37 항체 이의 항원-결합 단편, 항-cMet 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0509] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합체는 다음과 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다: (a) 인간 CD123/IL3-R α 항원의 아미노산 101 내지 346 안에 에피토프에 결합하고, 그리고 (b) 항원-양성(positive) TF-1 세포에서 IL3-의존적 증식을 억제시킨다 (WO2017/004026 참고, 본원의 참고자료에 이들 전체가 편입됨).
- [0510] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합체는 WO2017/004026(본원의 참고자료에 편입됨)에서 기술된 바와 같은 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0511] 특정 구체예들에서, 상기 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때 CDR_L1은 아미노산 서열 RASQDINSYLS (서열 식별 번호: 1)을 갖고, CDR_L2는 아미노산 서열 RVNRLVD (서열 식별 번호: 2)을 갖고, 그리고 CDR_L3은 아미노산 서열 LQYDAFPYT (서열 식별 번호: 3)을 갖고; 그리고 b) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR) 차례로 (CDR) CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때, CDR_H1은 아미노산 서열 SSIMH (서열 식별 번호: 4)을 갖고, CDR_H2는 아미노산 서열 YIKPYNDGTYNEKFKG (서열 식별 번호: 5)을 갖고, 그리고 CDR_H3은 아미노산 서열 EGGNDYYDTMDY (서열 식별 번호: 6)을 갖는다.
- [0512] 특정 구체예들에서, 상기 항-CD123 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H):
- [0513] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKFKGRATLTSRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSS (서열 식별 번호: 7)
- [0514] 그리고 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함한다.
- [0515] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGT KVEIKR (서열 식별 번호: 9).
- [0516] 특정 구체예들에서, 상기 항-CD123 항체는 다음의 전장의 중쇄 서열:
- [0517] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYNDGTYNEKFKGRATLTSRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTEPVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG (서열 식별 번호: 8)
- [0518] 및 다음의 전장의 경쇄 서열을 갖는다:
- [0519] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (서열 식별 번호: 10).

- [0520] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합체는 U.S. 특허 번호 7,342,110 및 7,557,189(본원의 참고자료에 편입됨)에 기술된 바의 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0521] 특정 구체예들에서, 상기 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3의 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때 CDR_L1은 아미노산 서열 KSSQSVFFSSSQKNYLA (서열 식별 번호: 11)을 갖고, CDR_L2는 아미노산 서열 WASTRES (서열 식별 번호: 12)을 갖고, 그리고 CDR_L3은 아미노산 서열 HQYLSRT (서열 식별 번호: 13)을 갖고; 그리고 b) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때, CDR_H1은 아미노산 서열 SYIIH (서열 식별 번호: 14)을 갖고, CDR_H2는 아미노산 서열 VIYPGNDISYNQKFQG (서열 식별 번호: 15)을 갖고, 그리고 CDR_H3은 아미노산 서열 EVRLRYFDV (서열 식별 번호: 16)을 갖는다.
- [0522] 특정 구체예들에서, 상기 항-CD33 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H):
- [0523] QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVSS (서열 식별 번호: 17)
- [0524] 그리고 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함한다.
- [0525] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLA WYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIIYCHQYLSRT FGQGTKLEIKR (서열 식별 번호: 19).
- [0526] 특정 구체예들에서, 상기 항-CD33 항체는 다음의 전장의 중쇄 서열:
- [0527] QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFPLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLXSPG (서열 식별 번호: 18)
- [0528] 및 다음의 전장의 경쇄 서열을 갖는다:
- [0529] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLA WYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIIYCHQYLSRT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호: 20), 이때 서열 식별 번호: 18에서 X는 S 또는 C이다. 한 구체예에서, X는 C이다.
- [0530] 특정 구체예들에서, 상기 항-CD33 항체는 huMy9-6 항체다.
- [0531] 특정 구체예에서, 상기 세포-결합 제제는 WO2018/119196 및 U.S. 가출원 번호 62/690052 및 62/691342 (이들 각각은 본원의 참고자료에 편입됨)에서 기술된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0532] 특정 구체예들에서, 상기 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 ADAM9 및 cyno ADAM9에 특이적으로 결합하는 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0533] 특정 구체예들에서, 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 ADAM9-이의 결합 단편은 키메라 또는 무린 부계 항체와 비교하였을 때, cyno ADAM9에 대한 결합 친화력은 적어도 100-배 강화되고, 인간 ADAM9에 대해 높은 결합 친화력을 유지하도록 최적화된다.
- [0534] 특정 구체예들에서, 상기 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (가령, 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편)은 다음을 포함한다: a) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때 CDR_L1은 아미노산 서열 KASQSVSDYSGDSYMN (서열 식별 번호: 21)을 갖고, CDR_L2는 아미노산 서열 AASDLES (서열 식별 번호: 22)을 갖고, 그리고 CDR_L3은 아미노산 서열 QQSHEDPFT (서열 식별 번호: 23)을 갖고; 그리고 b) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때, CDR_H1은 아미노산

서열 SYWMH (서열 식별 번호: 24)을 갖고, CDR_H2는 아미노산 서열 EIIPIFGHTNYNEKFKS (서열 식별 번호: 25)을 갖고, 그리고 CDR_H3은 아미노산 서열 GGYYYPRQGFLDY (서열 식별 번호: 26)을 갖는다.

[0535] 특정 구체예들에서, 상기 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (가령, 상기 인간화된 항-ADAM9 항체 또는 이의 항원-결합 단편)은 다음의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H):

[0536] EVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVGE **I**IPIFGHTNY **_NEKFKSRFTI** SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG **YYYYPRQGFL** DYWGQGT TTVT VSS (서열 식별 번호: 27)

[0537] 그리고 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함한다.

[0538] DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCK**ASQSV**DYSGDSY**MN**WYQKPGQPPKLLI**Y**A**ASD**LES**G**IPARFSGSG SGTDFLTITIS SLEPEDFATYYC**QQSHEDPFT**FGQGTKLEI K (서열 식별 번호: 28).

[0539] 특정 구체예들에서, 상기 항-ADAM9 항체는 다음의 전장의 중쇄 서열:

[0540] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVGE **I**IPIFGHTNY **NEKFKSRFTI** SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG **YYYYPRQGFL** DYWGQGT TTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS PG (서열 식별 번호: 29)

[0541] 및 다음의 전장의 경쇄 서열을 갖는다:

[0542] DIVMTQSPDLSAVSLGERATISCK**ASQSV**DYSGDSY**MN**WYQKPGQPPKLLI**Y**A**ASD**LES**G**IPARFSGSGSGTDFLTITIS**SLEPEDFATYYCQQSHEDPFTF** GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호: 30).

[0543] 특정 구체예에서, 상기 세포-결합 제제는 U.S. 가출원 번호 62/751,530 (본원의 참고자료에 편입됨)에 기재된 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0544] 특정 구체예들에서, 상기 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때 CDR_L1은 아미노산 서열 RSSRSLHSDGFTYLY (서열 식별 번호: 31)을 갖고, CDR_L2는 아미노산 서열 QTSNLAS (서열 식별 번호: 32)을 갖고, 그리고 CDR_L3은 아미노산 서열 AQNLELPNT (서열 식별 번호: 33)을 갖고; 그리고 b) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때, CDR_H1은 아미노산 서열 NYIIH (서열 식별 번호: 34)을 갖고, CDR_H2는 아미노산 서열 WIYPGNVYIQYNEKFKG (서열 식별 번호: 35)을 갖고, 그리고, CDR_H3은 아미노산 서열 DGPWFAY (서열 식별 번호: 36)을 갖는다.

[0545] 특정 구체예들에서, 상기 항-EpCAM 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H):

[0546] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT**NYIIH**WVRQAPGQRLEYIG**WIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGT**LVTVSS (서열 식별 번호: 37)

[0547] 그리고 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함한다.

[0548] DIVLTQTPLSLSVTPGQPASIS**CRSSRSLHSDGFTYLY**WFLQKPGQSPQLLI**Y****QTSNLAS**GVPDFSSSGSGTDFTLKISRVEADVGVY**CAQNLELPNT** FGQGTKLEIK (서열 식별 번호: 38).

[0549] 특정 구체예들에서, 상기 항-EpCAM 항체는 다음의 전장의 중쇄 서열:

[0550] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT**NYIIH**WVRQAPGQRLEYIG**WIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGT**LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 식별 번호: 39)

[0551] 및 다음의 전장의 경쇄 서열을 갖는다:

[0552] DIVLTQTPLSLSVTPGPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDFRFSSTSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCAQNLELPNT
FGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호: 40), 이때 서열 식별 번호: 39에서 X는 S 또는 C이다. 한 구체예에서, X는 C이다.

[0553] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합 제제는 항-엽산 수용체 항체다. 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합 제제는 U.S. 특허 8,709,432, U.S. 특허 번호 8,557,966, 및 WO2011106528 (이들 모두는 본원의 참고자료에 편입됨)에서 기술된 항-인간 엽산 수용체 1 (FOLR1) 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0554] 특정 구체예들에서, 상기 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음을 포함할 수 있다: a) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_L1, CDR_L2, 및 CDR_L3을 포함하는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때 CDR_L1은 아미노산 서열 KASQSVSFAGTSLMH (서열 식별 번호: 41)을 갖고, CDR_L2는 아미노산 서열 RASNLEA (서열 식별 번호: 42)을 갖고, 그리고 CDR_L3은 아미노산 서열 QQSREYPYT (서열 식별 번호: 43)을 갖고; 그리고 b) 3개의 순차적 상보성-결정 영역 (CDR), 차례로 CDR_H1, CDR_H2, 및 CDR_H3을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 이의 단편, 이때, CDR_H1은 아미노산 서열 GYFMN (서열 식별 번호: 44) 또는 GYTFTGYFMN (서열 식별 번호: 47)을 갖고, CDR_H2는 아미노산 서열 RIHPYDGDTFYNQKFQG (서열 식별 번호: 45) 또는 RIHPYDGDTF (서열 식별 번호: 48)을 갖고, 그리고 CDR_H3은 아미노산 서열 YDGSRAMDY (서열 식별 번호: 46)을 갖는다. 특정 구체예들에서, 상기 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 a) 서열 식별 번호: 41에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호: 42에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 및 서열 식별 번호: 43에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 그리고 b) 서열 식별 번호: 44에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호: 45에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 및 서열 식별 번호: 46에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 구체예들에서, 상기 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 a) 서열 식별 번호: 41에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L1, 서열 식별 번호: 42에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L2, 및 서열 식별 번호: 43에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 그리고 b) 서열 식별 번호: 47에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H1, 서열 식별 번호: 48에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H2, 및 서열 식별 번호: 46에서 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR_H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0555] 특정 구체예들에서, 상기 항-FOLR1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다음의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 (V_H):

[0556] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGGKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGS
RAMDYWGQGTITVTVSS (서열 식별 번호: 49)

[0557] 그리고 다음의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 (V_L)을 포함한다.

[0558] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHVYHQKPGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNI SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF
GGGQTKLEIKR (서열 식별 번호: 50), 또는

[0559] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHVYHQKPGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF
GGGQTKLEIKR (서열 식별 번호: 51).

[0560] 특정 구체예들에서, 상기 항-FOLR1 항체는 다음의 전장의 중쇄 서열:

[0561] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGGKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAVYYCTRYDGS
RAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV

LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGY (서열 식별 번호: 52)

[0562] 및 다음의 전장의 경계 서열을 갖는다:

[0563] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIIISKASQSVSFAGTSLMHVYHQKPGQPRLLIYRASLEAGVPDRFSGSGSKTDFLTNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF
GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호: 53), 또는

[0564] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIIISKASQSVSFAGTSLMHVYHQKPGQPRLLIYRASLEAGVPDRFSGSGSKTDFLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF
GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (서열 식별 번호: 54), 이때 서열 식별 번호: 52에서 X는 C 또는 S이며, 서열 식별 번호: 52에
서 Y는 K 또는 존재하지 않는다. 한 구체예에서, X는 C이다.

[0565] 특정 구체예들에서, 상기 항-FOLR1 항체는 huMov19 또는 M9346A 항체다.

[0566] 특정 구체예들에서, 본원에 기술된 항체는 무인, 비-인간 포유류, 키메라, 인간화된, 또는 인간 항체이다. 예를
들면, 상기 인간화된 항체는 CDR-접목된 항체 또는 재포장된 항체일 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 항체는
전장 항체다. 특정 구체예들에서, 상기 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, 단일쇄 Fv 또는 scFv,
이항화물 연계된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디(intrabody), IgG ΔCH₂, 미니바디(minibody), F(ab')₃,
테트라바디(tetrabody), 트리아바디(triobody), 디아바디(diabody), 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂,
(scFv)₂, 또는 scFv-Fc이다.

[0567] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합 제제는 대체 단백질 스캐폴드, 이를 테면, Centyrin (피브로넥틴 유형 III
(FN3) 반복부의 콘센수스 서열을 기반으로 하는 단백질 스캐폴드; U.S. 특허 공개 2010/0255056, 2010/0216708
및 2011/0274623 본원의 참고자료에 편입됨), Ankyrin 반복부 단백질 (가령, 기획된 안키린 반복부 단백질,
DARPin으로도 공지됨; U.S. 특허 공개 번호 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146, 및 2011/0224100 참고
(본원의 참고자료에 편입됨), 및 C. Zahnd *et al.*, *Cancer Res.* (2010) 70:1595-1605; Zahnd *et al.*, *J. Biol.
Chem.* (2006) 281(46):35167-35175 또한 참고; 그리고 Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., *Nature
Biotechnology* (2005) 23:1257-1268, 본원의 참고자료에 편입됨), 안키린-유사 반복부 단백질 또는 합성 펩티
드 (가령, U.S. 특허 공개 번호 2007/0238667; U.S. 특허 번호 7,101,675; WO 2007/147213; 그리고 WO
2007/062466, 본원의 참고자료에 편입됨), Adnectin (피브로넥틴 도메인 스캐폴드 단백질; US 특허 공개 번호
2007/0082365; 2008/0139791, 본원의 참고자료에 편입됨), Avibody (디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 비
롯한; U.S. 공개 번호 2008/0152586 및 2012/0171115), 듀얼 수용체 재-표적으로 하는 (DART) 분자(P.A. Moore
et al., *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551; Veri MC, *et al.*, *Arthritis Rheum*, 2010 Mar 30; 62(7):1933-43;
Johnson S, *et al.* *J Mol Biol*, 2010 Apr 9;399(3):436-49), 및 세포 침투 과다-하전된 단백질 (*Methods in
Enzymol.* 502, 293-319 (2012)).

[0568] 특정 구체예들에서, 상기 세포-결합 제제는 활성화가능한 항체 또는 활성화가능한 항원-결합 항체 단편 (집합적
으로 AA)이다. 일부 구체예들에서, 상기 활성화가능한 항체 또는 활성화가능한 항원-결합 항체 단편은 마스킹
모이어티 (MM)에 커플링된 표적 세포(또는 "표적") 상에 있는 리간드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결
합 항체 단편 (가령, 본원에서 기술된 항체들 또는 항원-결합 항체 단편들)을 포함하며, 이러한 MM의 커플링으
로 해당 표적에 상기 항체 또는 항원-결합 항체 단편이 결합하는 능력이 감소된다. 일부 구체예들에서, 상기 MM
은 프로테아제에 대한 기질, 예를 들어, 병든 조직에서 활성인 프로테아제 및/또는 대상체의 치료 부위에서 표
적과 공동-국소화된 프로테아제를 포함하는 서열을 통해 커플링된다. 상기 활성화가능한 항체들은 순환계에서
바람직하게 안정적이며, 정상 부위, 가령, 치료 및/또는 진단의 표적이 되지 않은 건강한 조직 또는 기타 조직
에서는 활성화되지 않지만, 치료 및/또는 진단이 의도된 부위에서 활성화되고, 일단 활성화될 때, 대응하는 변
형안된 항체와 적어도 필적되는 수준으로 해당 표적에 결합을 보인다. 일부 구체예들에서, 상기 AAs는 WO
2009/025846, WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933 및 WO 2016/118629에서 공개된 것들이며, 이들
각각은 본원에 이의 전문이 참고자료에 편입된다.

[0569] 일부 구체예들에서, 상기 활성화가능한 항체 또는 항체 단편은 다음을 포함한다:

[0570] (a) 해당 항체 또는 항체 단편에 커플링된 절단가능한 모이어티 (CM) (집합적으로 "AB"), 이때 CM은 프로테아
제에 대한 기질로서의 기능을 하는 폴리펩티드이며; 그리고

- [0571] (b) 해당 항체 또는 항체 단편에 커플링된 마스크 모이어티 (MM), 이때 MM은 절단되지 않은 상태에 있을 때 해당 리간드에 상기 항체 또는 항체 단편이 결합하는 것을 저해하고,
- [0572] 이때 절단되지 않은 상태의 상기 활성화가능한 항체는 N-말단에서 C-말단으로 다음과 같은 구조적 배열을 갖는다: (MM)-(CM)-(AB) 또는 (AB)-(CM)-(MM).
- [0573] 일부 구체예들에서, 상기 마스크 모이어티 (또는 “마스크(mask)”)는 상기 항체에 커플링되거나, 또는 그렇지 않으면 부착되고, 해당 활성화가능한 항체 내에 위치하고, 이로써 상기 마스크 모이어티가 해당 표적에 상기 항체가 특이적으로 결합하는 능력을 감소시킨다. 적합한 마스크 모이어티는 다양한 공지의 기술을 이용하여 확인된다. 예를 들면, 펩티드 마스크 모이어티는 WO 2009/025846에서 기술된 방법들을 이용하여 식별되며, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0574] MM으로 변형된 AB의 표적으로 향하는 K_d 는 MM으로 변형되지 않은 AB, 또는 부모계 AB가 해당 표적을 향하는 K_d 보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 또는 그 이상, 또는 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10,000, 10-100,000, 10-1,000,000, 10-10,000,000, 100-1,000, 100-10,000, 100-100,000, 100-1,000,000, 100-10,000,000, 1,000-10,000, 1,000-100,000, 1,000-1,000,000, 1000-10,000,000, 10,000-100,000, 10,000-1,000,000, 10,000-10,000,000, 100,000-1,000,000, 또는 100,000-10,000,000 배 이상이 될 수 있다. 역으로, MM로 변형된 AB의 표적을 지향하는 결합 친화성은 MM으로 변형되지 않은 AB, 또는 부모계 AB가 해당 표적을 향하는 결합 친화성보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 또는 그 이상, 또는 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10,000, 10-100,000, 10-1,000,000, 10-10,000,000, 100-1,000, 100-10,000, 100-100,000, 100-1,000,000, 100-10,000,000, 1,000-10,000, 1,000-100,000, 1,000-1,000,000, 1000-10,000,000, 10,000-100,000, 10,000-1,000,000, 10,000-10,000,000, 100,000-1,000,000, 또는 100,000-10,000,000 배 더 낮을 수 있다.
- [0575] AB를 지향하는 MM의 해리 상수 (K_d)는 표적을 지향하는 AB의 K_d 보다 일반적으로 더 크다. AB를 지향하는 MM의 K_d 는 AB의 K_d 보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 100,000, 1,000,000-배 또는 심지어 10,000,000-배 더 클 수 있다. 역으로, AB를 지향하는 MM의 결합 친화성은 해당 표적을 지향하는 AB의 결합 친화성보다 일반적으로 더 낮다. AB를 지향하는 MM의 결합 친화성은 해당 표적을 지향하는 AB의 결합 친화성보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 100,000, 1,000,000-배 또는 심지어 10,000,000-배 더 낮을 수 있다.
- [0576] MM으로 변형되지 않은 경우의 상기 AB의 특이적 결합 또는 부모계 AB가 이 표적으로의 특이적 결합과 비교하였을 때, 상기 AB가 MM으로 변형되며, 표적 존재 하에서, 상기 AB가 이의 표적으로의 특이적 결합 감소될 수 있거나 또는 억제될 수 있다. WO 2010/081173에서 기술된 바와 같이, 생체내 또는 시험관내 표적 대체 면역흡착 분석으로 측정하였을 때, 상기 AB가 MM으로 변형되지 않은 경우의 표적으로의 결합 또는 부모계 AB가 이 표적으로의 결합과 비교하였을 때, MM으로 변형된 경우, AB의 이 표적으로의 결합 능력은 최소한 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 또는 96 시간, 또는 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 또는 180 일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 개월 또는 그 이상 동안 최소한 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 심지어 100% 감소될 수 있다.
- [0577] 상기 MM은 해당 표적에 AB의 결합을 저해시킬 수 있다. 상기 MM은 AB의 항원 결합 도메인에 결합하고, 이 AB가 이의 표적에 결합하는 것을 저해시킬 수 있다. 상기 MM은 AB가 해당 표적에 결합하는 것을 공간적으로 저해시킬 수 있다. 상기 MM은 AB가 표적에 결합하는 것을 알로스테릭하게(allosterically) 저해할 수 있다. 상기 AB가 변형되거나, MM에 커플링될 때, 그리고 표적이 존재할 때의 이러한 구체예들에서, WO 2010/081173에서 기술된 바와 같이, 생체내 또는 시험관내 표적 대체 면역흡착 분석으로 측정하였을 때, 적어도 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 시간, 또는 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 개월 또는 그 이상 동안 MM으로 변형안된 AB, 부모계 AB, 또는 MM에 커플링되지 않은 AB가 해당 표적에 대한 결합과 비교하였을 때, 해당 표적에 대한 AB의 결합이 없거나, 또는 실질적으로 없거나, 또는 이러한 결합은 .001%, .01%, .1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 50%를 넘지 않는다.
- [0578] AB가 MM에 커플링되거나, 또는 이에 의해 변형될 때, 해당 MM은 상기 AB가 표적에 특이적으로 결합하는 것을 “마스크(masks)”시킬 수 있거나, 또는 감소, 또는 저해시킬 수 있다. AB가 MM에 커플링되거나, 또는 이에 의해

변형될 때, 이러한 커플링 또는 변형은 이 AB가 이의 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 감소 또는 저해시킬 수 있는 구조적 변화에 영향을 줄 수 있다.

[0579] MM에 커플링되거나, 이로 인해 변형된 AB는 다음의 식으로 나타낼 수 있다(아미노 (N) 말단 영역에서 카르복실 (C) 말단 영역으로의 순서대로):

[0580] (MM)-(AB)

[0581] (AB)-(MM)

[0582] (MM)-L-(AB)

[0583] (AB)-L-(MM)

[0584] 여기에서 MM은 마스킹 모이어티이고, Ab는 항체 또는 표적-결합 항원 단편이며, 그리고 L은 링커다. 많은 구체예들에서, 유현성을 제공하기 위해, 하나 또는 그 이상의 링커들, 가령, 연성(flexible) 링커들을 조성물로 삽입하는 것이 바람직할 수 있다.

[0585] 특정 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 자연적 결합 짝이 아니다. 일부 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 임의의 자연적 결합 짝을 함유하지 않거나 또는 실질적으로 이에 상동적이지 않다. 일부 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 임의의 자연적 결합 짝에 대한 유사성은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80%를 넘지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 임의의 자연적 결합 짝에 대한 동일성은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80%를 넘지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 임의의 자연적 결합 짝에 대한 동일성은 25%를 넘지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 임의의 자연적 결합 짝에 대한 동일성은 50%를 넘지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 임의의 자연적 결합 짝에 대한 동일성은 20%를 넘지 않는다. 일부 구체예들에서, 상기 MM은 Ab의 임의의 자연적 결합 짝에 대한 동일성은 10%를 넘지 않는다.

[0586] 본원에서 제공된 활성화가능 항체들은 절단가능한 모이어티 (CM)를 포함한다. 이러한 AAs는 상기 AB의 표적에 대하여 활성화가능/전환가능한(switchable) 결합을 나타낸다. AAs는 일반적으로 마스킹 모이어티 (MM)에 의해 변형된 또는 연결된 항체 또는 항체 단편 (AB), 그리고 변형가능한 또는 절단가능한 모이어티 (CM)을 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 CM은 관심대상의 프로테아제에 대한 기질로 기능하는 아미노산 서열을 함유한다. 다른 구체예들에서, 상기 CM은 환원에 의해 절단가능한 시스테인-시스테인 이황화물 결합을 제공한다. 여전히 기타 구체예들에서, 상기 CM은 광분해에 의해 활성화가능한 광분해성 기질을 제공한다.

[0587] 일부 구체예들에서, 상기 절단가능한 모이어티 (또는 "기질")는 프로테아제, 보통 세포외 프로테아제의 기질인 아미노산 서열을 포함한다. 적합한 기질은 다양한 공지된 기술을 이용하여 확인된다. 예를 들면, 펩티드 기질들은 US 특허 번호 7,666,817 및 8,563,269; 그리고 WO 2014/026136 (이의 내용은 그 전문이 본원에 참고자료에 편입된다)에서 기술된 방법들을 이용하여 식별된다. (Boulware et al., Biotechnol Bioeng. 106(3):339-346 (2010) 또한 참고). 임의선택적으로, 상기 CM은 이황화물 결합을 형성할 수 있는 시스테인-시스테인 쌍을 포함하며, 이는 환원 제제의 작용에 의해 절단될 수 있다. 상기 CM은 표적 존재 하에서 절단 제제에 의해 절단될 때 (가령, CM의 프로테아제 기질은 프로테아제에 의해 절단되고, 및/또는 상기 시스테인-시스테인 이황화물 결합은 환원 제제에 노출됨으로써 환원에 의해 절단되며), 절단된 상태가 되고, Ab는 표적에 결합하며, 그리고 표적 존재 하에서 절단안된 상태에서는 해당 표적에 Ab의 결합이 MM에 의해 저해되도록, 상기 CM이 위치한다. 상기 CM의 아미노산 서열이 MM과 중첩되거나, 이 내부에 내포될 때, 해당 CM의 전부 또는 일부는 활성화가능한 항체가 절단안된 형태에 있을 때, 해당 Ab의 "마스킹"을 실행한다는 것을 주지해야 한다.

[0588] 일부 구체예들에서, 상기 CM은 조직에서 상기 활성화가능한 항체의 원하는 표적과 공동-국소화되는 프로테아제에 기반하여 선택될 수 있다. 관심대상의 표적이 프로테아제와 공동-국소화되는 다양한 상이한 조건이 알려져 있으며, 여기서 프로테아제의 기질은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 표적 조직은 암 조직, 특히 고형 종양의 암 조직일 수 있다. 많은 암, 예를 들어, 문헌에서 고형 종양에서 공지된 기질을 보유한 증가된 수준의 프로테아제에 관한 많이 보고서들이 있다. 가령, La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421 참고.

[0589] 예시적인 기질에는 다음 효소들중 하나 또는 그 이상에 의해 절단 가능한 기질이 내포되나, 이에 국한되지 않는다: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, PLASMIN, PSA, PSMA, CATHEPSIN D, CATHEPSIN K, CATHEPSIN S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제(Caspase)-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-

5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14, 및 TACE.

[0590] 일부 구체예들에서, 상기 CM은 길이가 최대 15개 아미노산으로 된 폴리펩티드이다.

[0591] 일부 구체예들에서, 상기 CM은 적어도 하나의 매트릭스 메탈로프로테아제 (MMP)의 기질인 제 1 절단가능한 모이어티 (CM1) 및 적어도 하나의 세린 프로테아제 (SP)의 기질인 제 2 절단가능한 모이어티 (CM2)가 내포된 폴리펩티드. 일부 구체예들에서, 상기 CM1-CM2 기질에서 각 CM1 기질 서열 및 CM2 기질 서열은 독립적으로 최대 15개 아미노산으로 된 폴리펩티드이다.

[0592] 일부 구체예들에서, 상기 CM은 레구마인, 플라스민, TMPRSS-3/4, MMP-9, MT1-MMP, 카텝신, 카스파제, 인간 호중구 엘라스타제, 베타-세크레타제, uPA 또는 PSA의 기질이다.

[0593] MM 및 CM으로 변형된 AB의 표적으로 향하는 K_d 는 MM 및 CM으로 변형되지 않은 AB, 또는 부모계 AB가 해당 표적을 향하는 K_d 보다 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 또는 그 이상, 또는 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10,000, 10-100,000, 10-1,000,000, 10-10,000,000, 100-1,000, 100-10,000, 100-100,000, 100-1,000,000, 100-10,000,000, 1,000-10,000, 1,000-100,000, 1,000-1,000,000, 1000-10,000,000, 10,000-100,000, 10,000-1,000,000, 10,000-10,000,000, 100,000-1,000,000, 또는 100,000-10,000,000 배 이상이 될 수 있다. 역으로, MM 및 CM으로 변형된 AB는 이의 표적으로 향하는 결합 친화력은 MM 및 CM으로 변형되지 않은 AB 또는 부모계 AB가 이의 표적을 향하는 결합 친화력보다 최소한 적어도 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1,000,000, 5,000,000, 10,000,000, 50,000,000 또는 그 이상, 또는 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10,000, 10-100,000, 10-1,000,000, 10-10,000,000, 100-1,000, 100-10,000, 100-100,000, 100-1,000,000, 100-10,000,000, 1,000-10,000, 1,000-100,000, 1,000-1,000,000, 1000-10,000,000, 10,000-100,000, 10,000-1,000,000, 10,000-10,000,000, 100,000-1,000,000, 또는 100,000-10,000,000 배 더 낮을 수 있다.

[0594] 상기 Ab가 MM 및 CM으로 변형되고, 표적 존재 하에서, 그러나 변형제 (예를 들면, 효소, 프로테아제, 환원 제제, 광)의 부재 하에서 Ab가 이의 표적에 특이적으로 결합하는 것은 MM 및 CM으로 변형안된 Ab 또는 부모계 Ab가 해당 표적에 대한 특이적 결합과 비교하였을 때, 감소될 수 있거나 또는 저해될 수 있다. 부모계 Ab 또는 MM 및 CM으로 변형안된 Ab가 이의 표적에 결합하는 것과 비교하였을 때, MM 및 CM로 변형될 경우 Ab가 해당 표적에 결합하는 능력은 WO201008117 (본원의 참고자료에 이의 전문이 편입됨)에서 기술된 바와 같이, 생체내 또는 시험관내 표적 대체 면역흡착 분석으로 측정하였을 때, 적어도 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 시간, 또는 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 개월 또는 그 이상 동안 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 심지어 100% 감소된다.

[0595] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 절단된 상태란 프로테아제에 의한 CM의 변형 및/또는 CM의 시스템-시스템인 이황화물 결합의 환원, 및/또는 광활성화 후, AA의 상태를 지칭한다. 용어 절단안된 상태란, 본원에서 사용된 바와 같이, 프로테아제에 의한 CM의 절단이 없거나 및/또는 상기 CM의 시스템-시스템인 이황화물 결합의 환원이 없거나, 및/또는 광의 부재 하에 AA의 상태를 지칭한다. 상기에서 논의된 바와 같이, 본원에서 용어 AA는 절단안된 상태(나이프) 뿐만 아니라, 이의 절단된 상태 모두에 있는 AA를 지칭하는데 이용된다. 일부 구체예들에서, 절단된 AA는 프로테아제에 의한 CM의 절단으로 인하여 MM이 부족할 수 있고, 이로 인하여 적어도 해당 MM이 방출된다 (가령, 여기에서 MM은 공유 결합 (가령, 시스템 잔기들 사이에 이황화물 결합)에 의해 결합되지 않음)는 점은 당업자에게 자명할 것이다.

[0596] 활성화가능 또는 전환가능한이란 상기 AA는 이것이 억제된, 차폐된 또는 절단안된 상태 (가령, 제 1 형태)인 경우 표적에 대하여 결합의 제 1 수준을 나타내고, 그리고 억제안된, 차폐안된 및/또는 절단된 상태 (가령, 제 2 형태)에서는 표적에 대하여 결합의 제 2 수준을 말하며, 여기에서 제 2 수준의 표적 결합은 제 1 수준의 표적 결합보다 더 크다. 일반적으로, CM을 절단할 수 있는 절단 제제 존재 하에서 이러한 절단 제제가 부재한 경우보다, 상기 AA의 Ab가 표적에 접근하는 접근성이 더 크다. 따라서, 상기 AA가 절단안된 상태인 경우, 상기 Ab는 표적 결합이 억제되고, 표적 결합으로부터 차폐될 수 있고 (가령, 제 1 형태는 상기 Ab가 이 표적에 결합할 수 없는 상태임), 그리고 절단된 상태에서의 상기 AB는 표적 결합에 대하여 억제되지 않거나, 또는 차폐되지 않는다.

- [0597] 상기 AA의 CM 및 AB는 이때 이 AB가 관심대상의 표적에 대한 결합 모이어티를 나타내고, 그리고 이 CM은 대상체의 치료 부위에 있는 표적과 공동-국소화되는 프로테아제의 기질을 나타내도록 선택될 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 상기 CM은 시스테인-시스테인 이황화물 결합이며, 이황화물 결합의 환원으로 인한 결과로써 절단가능하다. AAs는 프로테아제- 절단가능한 CM 또는 시스테인-시스테인 이황화물 결합중 적어도 하나를 함유하며, 일부 구체예들에서 두 종류의 CMs이 모두 내포된다. 상기 AAs는 대안으로 또는 추가로 광원에 의해 활성화 가능한 광-불안정 기질을 내포할 수 있다. 본원에 개시된 AAs는 예를 들어, CM에서 부위를 절단할 수 있는 프로테아제는 비-치료 부위(예를 들면, 건강한 조직)의 조직보다, 치료 부위 (예를 들면, 병든 조직; 예를 들면, 치료적 처치 또는 진단적 처치)의 표적-함유 조직 내에서 비교적 높은 수준으로 존재하는 경우 특별한 용도를 찾는다. 본원에 개시된 AAs는 예를 들면, 환원 제제가 비-치료, 비-진단 부위의 조직보다, 치료 부위 또는 진단 부위의 표적-함유 조직에서 상대적으로 더 높은 수준으로 존재하는 경우 특별한 용도를 또한 찾는다. 본원에 개시된 AAs는 광원, 예를 들어, 레이저를 통해 CM의 부위에서 광분해할 수 있는 광원이 치료 부위 또는 진단 부위의 표적-함유 조직으로 유입된 경우 특별한 용도를 또한 찾는다.
- [0598] 일부 구체예들에서 AAs는 만일 Ab가 이의 표적에 대한 차폐되지 않거나 또는 그렇지 않으면, 억제되지 않은 경우 비-처리 부위에서 Ab의 결합으로 인한 독성 및/또는 부작용의 감소를 제공한다. 상기 AA가 이황화 결합의 환원을 촉진하는 환원 제제에 의해 절단될 수 있는 CM을 함유하는 경우, 이러한 AAs의 ABs는 관심대상 표적이 환원 제제의 상승된 수준을 특징으로 하는 원하는 치료 부위에 존재하는 Ab의 활성화를 이용하도록 선택될 수 있고, 이에 따라 해당 환경이 예를 들어, 비-치료 부위의 환경보다 더 높은 환원 가능성을 가지도록 할 수 있다.
- [0599] 일반적으로, 관심대상의 Ab를 선별하고, 상기 AA의 나머지를 구축하여, 구조적으로 구속될 때, MM은 Ab의 마스킹, 또는 상기 Ab가 표적에 결합의 감소를 제공하도록, AA가 기획될 수 있다. 이 기능적 특징을 제공하기 위해 구조적 설계 기준이 고려된다.
- [0600] 억제된 입체형태 대비 억제되지 않은 입체형태에서 표적 결합에 대한 원하는 동적 범위의 전환가능한 표현형을 나타내는 AAs가 제공된다. 동적 범위는 일반적으로 (a) 첫 번째 조건 집합에서 매개변수의 최대 감지 수준 대비 (b) 두 번째 조건 집합에서 해당 매개변수의 최소 감지 값의 비율을 나타낸다. 예를 들면, AA 내용에서, 동적 범위(dynamic range)는 (a) 상기 AA의 CM을 절단할 수 있는 프로테아제 존재 하에서 AA에 대한 표적 단백질 결합의 최대 탐지 수단에 대한 (b) 상기 프로테아제 부재시 AA에 표적 단백질 결합의 최소 탐지된 수준의 비율을 지칭한다. 상기 AA의 동적 범위는 AA 절단 제제 처리의 평형 해리 상수에 대한 AA 절단 제제(가령, 효소) 처리의 평형 해리 상수의 비율로 계산할 수 있다. AA의 동적 범위가 클수록, AA의 전환 가능한 표현형이 더 좋다. 상대적으로 더 높은 동적 범위 값 (가령, 1 초과)을 갖는 AAs는 절단제가 없을 때보다 AA의 CM을 절단할 수 있는 절단 제제 (가령, 효소)의 존재 하에 AA에 의한 표적 단백질 결합이 더 큰 정도로 (가령, 주도적으로 발생) 발생하도록 보다 바람직한 스위칭 표현형을 나타낸다.
- [0601] AAs는 다양한 구조적 배치로 제공될 수 있다. AAs의 예시적인 형태는 하기에서 제공된다. 상기 AB, MM 및 CM의 N-말단으로부터 C-말단으로의 순서는 AA 내에서 역전될 수 있다는 것이 특이적으로 고려된다. 또한, CM 및 MM이 아미노산 서열에서 중첩 수 있다는 것이 구체적으로 고려되어, 예를 들어 CM이 MM 내에 함유되도록 할 수 있다.
- [0602] 예를 들면, AAs는 다음의 식으로 나타낼 수 있다 (아미노 (N) 말단 영역에서 카복실 (C) 말단 영역으로의 순서대로):
- [0603] (MM)-(CM)-(AB)
- [0604] (AB)-(CM)-(MM), 여기에서 MM은 마스킹 모이어티이고, CM은 절단가능한 모이어티이며, 그리고 AB는 항체 또는 이의 단편이다. 상기 식에서 MM과 CM은 아래 공식에서 별개의 성분으로 표시되지만, 본 명세서에서 개시된 모든 예시적인 구체예들(구조식 포함)에서, 상기 MM 및 CM의 아미노산 서열은 중첩될 수 있고, 예를 들면, 상기 CM은 상기 MM 안에 전적으로 또는 부분적으로 함유되는 것이 고려됨을 주지해야 한다. 추가적으로, 상기 식은 상기 AA 요소들에 대하여 N-말단 또는 C-말단에 위치될 수 있는 추가 아미노산 서열을 제공한다.
- [0605] 특정 구체예들에서, 하나 또는 그 이상의 링커, 가령, 연성 링커를 상기 AA 구조체에 삽입하여 상기 MM-CM 접합부, 상기 CM-AB 접합부, 또는 이들 모두중 하나 또는 그 이상에 유연성을 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 예로써, 상기 AB, MM, 및/또는 CM은 바람직한 유연성을 제공하는 충분한 수의 잔기 (가령, GIy, Ser, Asp, Asn, 특별히 GIy 및 Ser, 구체적으로 GIy))를 함유하지 않을 수 있다. 이러한 경우, 이러한 AA 구조체의 전환가능한 표현형은 연성 링커를 제공하기 위한 하나 또는 그 이상의 아미노산의 도입으로부터 잇점을 가질 수 있다. 추가적으로, 하기에서 기술된 바와 같이, 여기에서 상기 AA는 형태학적으로 구속된 구조체로 제공되는 경우, 연성

링커는 비절단된 AA에서 고리 구조의 형성 및 유지를 용이하게 하기 위해 작동가능하도록 삽입될 수 있다.

[0606] 예로써, 특정 구체예들에서, AA는 다음 구조중 하나를 포함한다(여기에서 하기 구조는 N-말단으로부터 C-말단으로의 방향 또는 C-말단에서 N-말단으로의 방향에서 아미노산 서열을 나타낸다):

[0607] (MM)-L₁-(CM)-(AB)

[0608] (MM)-(CM)-L₁-(AB)

[0609] (MM)-L₁-(CM)-L₂-(AB)

[0610] 사이클로[L₁-(MM)-L₂-(CM)-L₃-(AB)]

[0611] 이때 MM, CM, 그리고 AB는 상기에서 정의된 바와 같고; 이때 L₁, L₂ 및 L₃은 각각 독립적으로 최소한 1개의 연성 아미노산 (가령, Gly)를 포함하는 동일하거나 또는 상이한 연성 링커이며, 그리고 임의선택적으로 존재하거나 부재할 수 있고, 여기서 사이클로 존재하는 경우, AA는 AA 내의 한 쌍의 시스테인 사이에 이황화 결합의 존재로 인해 사이클릭 구조의 형태이다. 추가적으로, 상기 식은 상기 AA 요소들에 대하여 N-말단 또는 C-말단에 위치될 수 있는 추가 아미노산 서열을 제공한다. 사이클로[L₁-(MM)-L₂-(CM)-L₃-(AB)] 구조식에서, 이황화 결합을 담당하는 시스테인은 하나 또는 두 개의 꼬리를 허용하도록 AA에 위치할 수 있고이로 인하여 AA가 이황화-결합된 구조에 있을 때 올가미(lasso) 또는 오메가 구조가 생성된다(그리고 따라서 형태적으로 구속된 상태가 된다). 꼬리(들)의 아미노산 서열은 추가적인 AA 특징, 이를 테면, AA의 국소화를 촉진하기 위한 표적 수용체에 대한 결합, AA의 혈청 반감기 증가 및 이와 유사한 것들을 제공할 수 있다. 표적화 모이어티 (가령, 표적 조직에 존재하는 세포의 수용체에 대한 리간드) 및 혈청 반감기 연장 모이어티 (가령, 혈청 단백질, 이를 테면 면역글로블린 (가령, IgG) 또는 혈청 알부민 (가령, 인간 혈청 알부민 (HSA)에 결합하는 폴리펩티드).

[0612] 본원에 기술된 AAs에 사용하기에 적합한 링커는 일반적으로 변형된 AB 또는 AA의 유연성을 제공하여 AB의 표적에 대한 결합의 역제를 촉진하는 것들이다. 이러한 링커는 일반적으로 연성 링커로 지칭된다. 적합한 링커는 바로 선택될 수 있으며, 임의의 적합한 상이한 길이, 이를 테면, 1개의 아미노산 (가령, Gly) 내지 20개의 아미노산, 2개의 아미노산 내지 15개의 아미노산, 3개의 아미노산 내지 12개의 아미노산, 4개의 아미노산 내지 10개의 아미노산, 5개의 아미노산 내지 9개의 아미노산, 6개의 아미노산 내지 8개의 아미노산, 또는 7개의 아미노산 내지 8개의 아미노산이 될 수 있으며, 그리고 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 아미노산 길이가 될 수 있다.

[0613] 예시적인 연성 링커에는 글리신 중합체 (G)_n, 글리신-세린 중합체 (예를 들면, (GS)_n, (GSGGS)_n 및 (GGGS)_n 가 내포되며, 이때 n은 최소한 1의 정수임) 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 당분야에 공지된 다른 연성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 상대적으로 구조화되어 있지 않으므로, 성분들 사이의 중성 테더(tether)로서 작용할 수 있다. 글리신은 심지어 알라닌보다 훨씬 더 많은 파이-사이(phi-psi) 공간에 접근하며, 더 긴 측쇄를 가진 잔기보다 훨씬 덜 제한적이다 (Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992) 참고). 예시적인 연성 링커들에는 Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Ser-Ser-Gly, 및 이와 유사한 것들이 내포되나, 이에 국한되지 않는다. 통상의 기술자는 AA의 디자인이 전부 또는 부분적으로 유연한 링커를 포함할 수 있음을 인식할 것이며, 이러한 링커는 연성 링커 뿐만 아니라 원하는 AA 구조를 제공하기 위해 연성이 덜한 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있다.

[0614] 상기 기재된 요소들에 추가하여, 변형된 ABs 및 AAs는 예를 들어 해당 AA의 아미노산 서열 N-말단 또는 C-말단과 같은 추가 요소들을 함유할 수 있다. 예를 들면, AAs에는 관심 세포 또는 조직으로의 전달을 용이하게 하기 위해 표적화 모이어티들이 내포될 수 있다. 더욱이, 상기 AA는 세포 표면에 AA를 나타내도록 이를 촉진하기 위해 스캐폴드 단백질과 관련하여 제공될 수 있다.

[0615] 일부 구체예들에서, 상기 활성화가능 항체는 또한 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구체예들에서, 상기 신호 펩티드는 스페이서를 경유하여 활성화가능 항체에 콘주게이트된다. 일부 구체예들에서, 상기 스페이서는 신호 펩티드없이 활성화가능 항체에 콘주게이트된다. 일부 구체예들에서, 상기 스페이서는 상기 활성화가능 항체의 MM에 직접적으로 연결된다. 일부 구체예들에서, 상기 스페이서는 스페이서-MM-CM-AB의 N-말단에서 C-말단으로의 구조적 배열에서 활성화 가능한 항체의 MM에 직접 결합된다.

[0616] 적합한 스페이서 및 스페이서 기술은 당업계에 공지되어 있고, 제공된 활성화가능한 항체의 일부 실시 구체예

들에서 스페이서를 혼입하기 위해 일상적으로 사용될 수 있다. 예를 들면, WO 2016/179285 (가령, 페이지 52-53), 이의 내용은 그 전문이 본원에 참고자료에 편입된다.

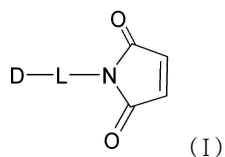
[0617] 일부 구체예들에서, 상기 활성화가능한 항체는 프로테아제에 노출되어, 이에 의해 절단되고, 활성화된 또는 절단된 상태의 상기 활성화된 항체에는 LP2의 적어도 일부분이 내포된 경쇄 서열 및/또는 해당 프로테아제가 CM을 절단한 후, CM 서열이 내포된다.

[0618] 상기 CM은 약 $0.001\text{--}1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 또는 적어도 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 또는 $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 의 비율로 적어도 하나의 프로테아제에 의해 특이적으로 절단된다. 일부 구체예들에서, 상기 CM은 약 $100,000 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 의 비율로 특이적으로 절단된다. 일부 구체예들에서, 상기 CM은 약 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ (가령, 약 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)의 비율로 특이적으로 절단된다.

[0619] 효소에 의한 특이적 절단을 위해, 효소와 CM 사이의 접촉이 이루어진다. MM 및 CM에 커플링된 Ab (가령, 항체 또는 EpCAM-결합 항체 단편)를 포함하는 활성화 가능한 항체가 표적 및 충분한 효소 활성의 존재 하에 있을 때, CM은 절단될 수 있다. 충분한 효소 활성은 효소가 CM과 접촉하여 절단을 수행하는 능력을 지칭할 수 있다. 효소가 CM 근처에 있을 수 있지만, 다른 세포 인자 또는 효소의 단백질 변형으로 인해 절단될 수 없음을 쉽게 생각할 수 있다.

[0620] 5. 세포독성 제제 (D) 또는 세포독성 제제-링커 화합물 (화학식 (I)의 화합물

[0621] 특정 구체예들에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)의 단계 (c)의 경우, CysCBA (가령, CysAb 또는 이의 항원-결합 단편)는 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염과 반응하고:



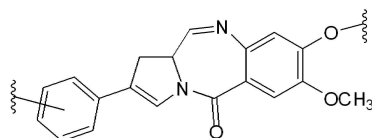
[0622]

[0623] 이로 인하여 해당 콘쥬게이트가 형성되며, 이때 D는 세포독성 제제이며, L은 링커다.

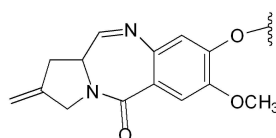
[0624] 특정 구체예들에서, D는 벤조디아제핀 화합물, 이를 테면, 피롤로벤조디아제핀 (PBD), 옥사졸리디노벤조디아제핀 (OBD) 또는 인돌리노벤조디아제핀 (IGN) 화합물이다.

[0625] 본원에서 사용된 바와 같이, “벤조디아제핀” 화합물은 벤조디아제핀 코어 구조를 갖는 화합물이다. 상기 벤조디아제핀 코어는 하나 또는 그 이상의 링 구조로 치환되거나 또는 치환안되거나, 및/또는 융합될 수 있다. 여기에는 링커에 의해 연계된 2개의 벤조디아제핀 코어를 갖는 화합물 또한 포함된다. 벤조디아제핀 코어의 일부분으로써 이민 기능성 (-C=N-)은 환원될 수 있다.

[0626] 본원에서 사용된 바와 같이, “피롤로벤조디아제핀” (PBD) 화합물은 피롤로벤조디아제핀 코어 구조를 갖는 화합물이다. 상기 피롤로벤조디아제핀은 치환되거나 또는 치환안된 것일 수 있다. 여기에는 링커에 의해 연계된 2개의 피롤로벤조디아제핀 코어를 갖는 화합물 또한 포함된다. 인돌리노벤조디아제핀 코어의 일부분으로써 이민 기능성 (-C=N-)은 환원될 수 있다.



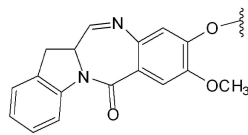
[0627] 특정 구체예들에서, 상기 피롤로벤조디아제핀 화합물은 의 코어 구조를 포함하고, 이는 임의선택적으로 치환될 수 있다.



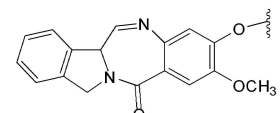
[0628] 특정 구체예들에서, 상기 피롤로벤조디아제핀 화합물은 의 코어 구조를 포함하고, 이는

임의선택적으로 치환될 수 있다.

[0629] 본원에서 사용된 바와 같이, “인돌리노벤조디아제핀” (IGN) 화합물은 인돌리노벤조디아제핀 코어 구조를 갖는 화합물이다. 상기 인돌리노벤조디아제핀은 치환되거나 또는 치환안된 것일 수 있다. 여기에는 링커에 의해 연계된 2개의 인돌리노벤조디아제핀 코어를 갖는 화합물 또한 내포된다. 인돌리노벤조디아제핀 코어의 일부분으로써 이민 기능성 ($-C=N-$)은 환원될 수 있다.

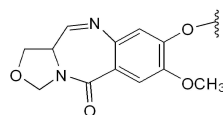


[0630] 특정 구체예들에서, 상기 인돌리노벤조디아제핀 화합물은 의 코어 구조를 포함하고, 이는 임의선택적으로 치환될 수 있다.



[0631] 일부 구체예들에서, 상기 인돌리노벤조디아제핀 화합물은 의 코어 구조를 포함하고, 이는 임의선택적으로 치환될 수 있다.

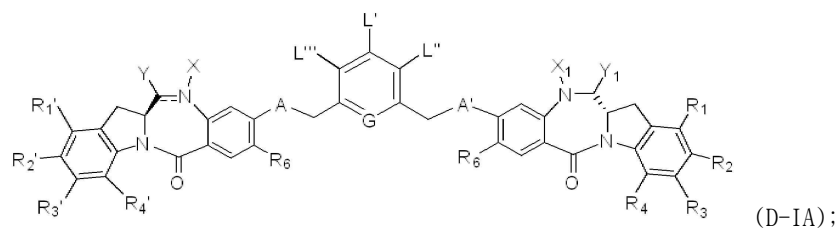
[0632] 본원에서 사용된 바와 같이, “옥사졸리디노벤조디아제핀” (OBD) 화합물은 옥사졸리디노벤조디아제핀 코어 구조를 갖는 화합물이다. 상기옥사졸리디노벤조디아제핀은 치환되거나 또는 치환안된 것일 수 있다. 여기에는 링커에 의해 연계된 2개의 옥사졸리디노벤조디아제핀 코어를 갖는 화합물 또한 내포된다. 옥사졸리디노벤조디아제핀 코어의 일부분으로써 이민 기능성 ($-C=N-$)은 환원될 수 있다.



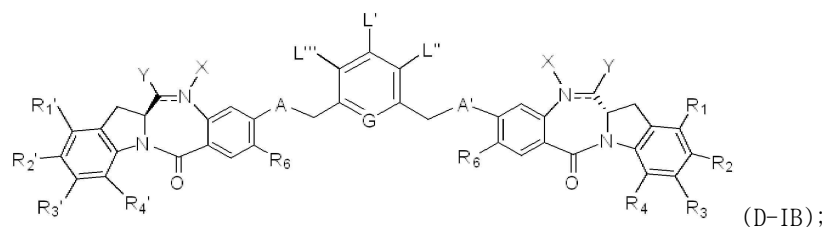
[0633] 일부 구체예들에서, 상기 옥사졸리디노벤조디아제핀 화합물은 의 코어 구조를 포함하고, 이는 임의선택적으로 치환될 수 있다.

[0634] 특정 구체예들에서, D는 메이탄시노이드 화합물이다.

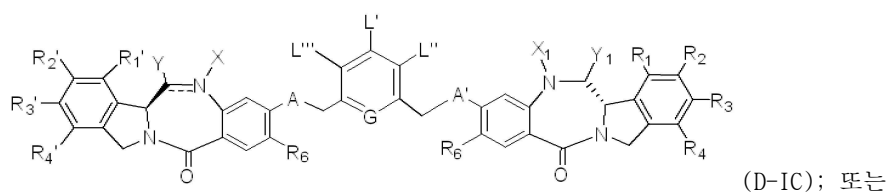
[0635] 1st 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물의 경우, D는 다음 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있다:



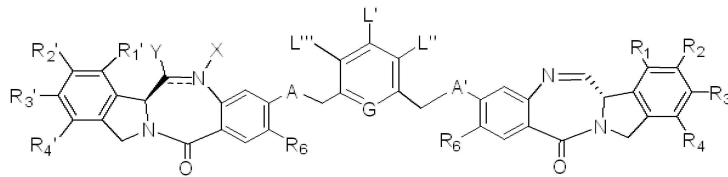
[0636] (D-IA);



[0637] (D-IB);



[0638] (D-IC); 또는



(D-ID);

이때:

N와 C 사이에 이중선 $=$ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H 또는 (C_1-C_4) 알킬이며; 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H 또는 아민 보호 모이어티이며, Y는 -OH 또는 $-SO_3H$ 이며, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고;

L' , L'' , 및 L''' 중 하나는 다음의 식으로 나타내며:

$-Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-(A')$, 또는

$-N(R^c)-R_{x1}-C(=O)-(D')$;

그리고 나머지 두 개는 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로젠, 구아니디늄 $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-NR'COR''$, -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, 시아노, 아지도, -COR', -OCOR', 및 $-OCONR'R''$ 에서 각각 독립적으로 선택되며;

Z_1 및 Z_2 중 하나는 $-C(=O)-$ 이며, 다른 하나는 $-NR_5-$ 이며;

P_1 은 아미노산 잔기 또는 2 ~ 20개 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드이며;

R_{x1} 은 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐이며;

R^c 는 -H, 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ 이며, 이때 R^k 는 -H, 임의선택적으로 2차 아미노 (가령, $-NHR^{101}$) 또는 3차 아미노 ($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 ~ 6개의 탄소 원자를 갖는 선형, 분기형 사이클릭 알킬, 또는 5-구성원 또는 6-구성원의 질소 함유하는 헤테로사이클이며, 이때 R^{101} 및 R^{102} 는 각각 독립적으로 선형, 분기형, 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐이며;

각 경우에서, R은 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 ~ 18개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 아릴, 임의선택적으로 치환된 5-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유), 또는 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 함유하는)으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며;

R' 및 R'' 는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 그리고 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 갖는)로부터 선택되며;

R^c 는 -H 또는 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 선형 또는 분기형 알킬이며;

n은 1 ~ 24의 정수이고;

X_1 은 -H, 아민-보호기, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 ~ 18개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 아릴, 임의선택적으로 치

환된 5-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유), 그리고 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 함유하는)으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며;

[0655] Y_1 은 -H, 옥소기, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 임의선택적으로 치환된 6-구성원 ~ 18-구성원의 아릴, 임의선택적으로 치환된 5-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유하는), 1 ~ 6개 헤테로원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환에서 선택되며;

[0656] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' 및 R_4' 는 각각 독립적으로 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 할로젠, 구아니디늄 $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', -SO₂R', -SO₃H, -OSO₃H, -SO₂NR'R'', 시아노, 아지도, -COR', -OCOR', 및 -OCONR'R''로 구성된 군에서 선택되며;

[0657] R_6 은 -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, 또는 할로젠이며;

[0658] G는 -CH- 또는 -N-이며;

[0659] A 및 A'는 동일하거나 또는 상이하며, -O-, 옥소 (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ 및 -CRR'N(R₅)-로부터 독립적으로 선택되며; 그리고

[0660] 각 경우에서, R_5 는 독립적으로 -H 또는 임의선택적으로 치환된 선형 또는 분기형 알킬이다.

[0661] 특정 구체예들에서, D는 화학식 (D-IA) 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낸다.

[0662] 특정 구체예들에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, X_1 은 -H, -OH, (C₁-C₃)알킬, 할로(C₁-C₃)알킬, 또는 페닐이며; Y_1 '은 -H, 옥소기, (C₁-C₃)알킬 또는 할로(C₁-C₃)알킬이며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다. 더 구체적으로, X_1 은 -H, -OH 또는 -Me이며; 그리고 Y_1 은 -H 또는 옥소이다. 더욱 더 구체적으로, X_1 은 -H이며; 그리고 Y_1 은 -H이다.

[0663] 특정 구체예들에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, A 및 A'는 동일하거나 또는 상이하며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다. 더 구체적으로, A 및 A'는 -O-이다.

[0664] 특정 구체예들에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, R_6 은 -OMe이며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다.

[0665] 특정 구체예들에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' 및 R_4' 는 독립적으로 -H, 할로젠, -NO₂, -OH, (C₁-C₃)알킬, 할로(C₁-C₃)알킬 또는 (C₁-C₃)알콕시이며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다. 더 구체적으로, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' 및 R_4' 는 모두 -H이다.

[0666] 특정 구체예들에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, R, R', R'' 및 R_5 는 각각 독립적으로 -H 또는 (C₁-C₃)알킬이며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다.

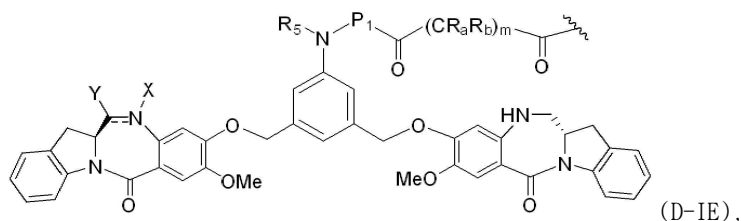
[0667] 특정 구체예들에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, G는 -CH-이다.

[0668] 특정 구체예들에서, D는 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)으로 나타내며, 이때:

[0669] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' 및 R_4' 는 모두 -H이며;

[0670] R_6 은 -OMe이며;

- [0671] X_1 및 Y_1 은 모두 -H이며;
- [0672] A 및 A'는 -O-이며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다. 특정 구체예들에서, G는 -CH-이며; 그리고 나머지 변수들은 상기에서 기술된 바와 같다.
- [0673] 제 2 특이적 구체예에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, L', L'' 및 L''' 중 하나는 화학식 (A') 또는 (D')으로 나타내며, 다른 것들은 -H, 1 ~ 6개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬, 할로젠, -OH, (C₁-C₆)알콕시, 또는 -NO₂이며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다. 특정 구체예들에서, L'은 화학식 (A')으로 나타내며; 그리고 L'' 및 L''' 는 모두 -H이다. 다른 구체예들에서, L'은 화학식 (D')로 나타내며; 그리고 L'' 및 L''' 는 모두 -H이다.
- [0674] 특정 구체예들에서, 화학식 (A') 또는 (D')에서 R₄₁은 할로젠, -OH, (C₁-C₃)알킬, (C₁-C₃)알콕시, 할로(C₁-C₃)알킬, 또는 하전된 치환체 또는 이온화가능한 기 Q로 임의선택적으로 치환된, 1 ~ 6개 탄소 원자를 갖는 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬이며; 그리고 나머지 변수들은 제 1 또는 제 2 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.
- [0675] 제 3 특이적 구체예들에서, 제 1 또는 제 2 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같이 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC) 또는 (D-ID)의 경우, L'는 다음의 식으로 나타내며:
- [0676] $-NR_5-P_1-C(=O)-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(B1')$;
- [0677] $-NR_5-P_1-C(=O)-CY-(CR_aR_b)_{s1'}-C(=O)-(B2')$;
- [0678] $-C(=O)-P_1-NR_5-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(C1')$, 또는
- [0679] $-C(=O)-P_1-NR_5-CY-(CR_aR_b)_{s1'}-C(=O)-(C2')$
- [0680] 이때:
- [0681] 각 경우에서, R_a 및 R_b는 각각 독립적으로 -H, (C₁-C₃)알킬 또는 하전된 치환체 또는 이온화가능한 기 Q이며;
- [0682] s는 1 ~ 6의 정수이고;
- [0683] s1'은 0 또는 1 ~ 6의 정수이고;
- [0684] Cy는 할로젠, -OH, (C₁-C₃)알킬, (C₁-C₃)알콕시, 또는 할로(C₁-C₃)알킬로 임의선택적으로 치환된, 5 또는 6개 탄소 원자를 갖는 사이클릭 알킬이며; 그리고
- [0685] 나머지 변수들은 제 1 또는 제 2 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다.
- [0686] 특정 구체예들에서, 화학식 (B2') 및 (C2')에서 Cy는 사이클로헥산이며; 그리고 s1'은 0 또는 1이다.
- [0687] 제 4 특이적 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물의 경우, D는 다음 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있고:

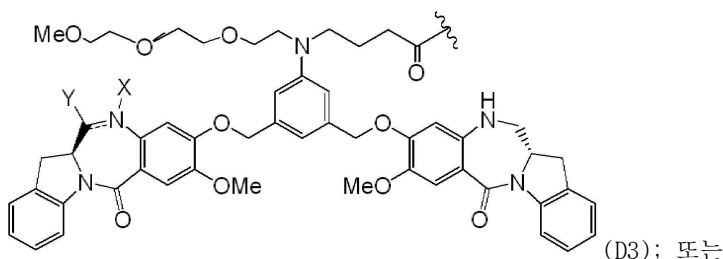
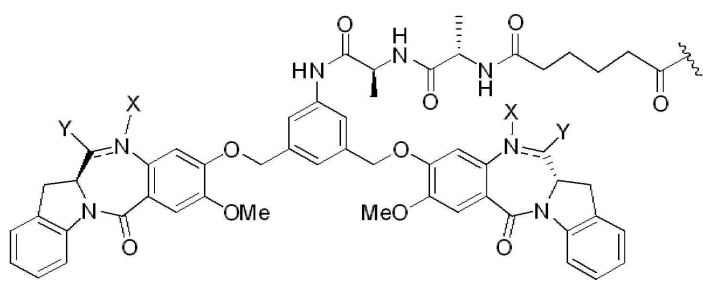
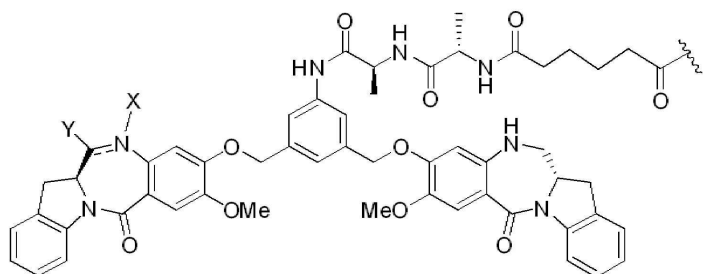


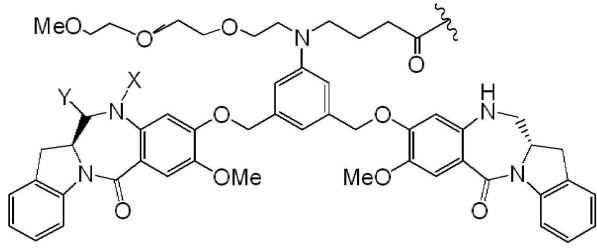
- [0688] , 나머지 변수들은 제 3 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서에서 기술된 바와 같다.
- [0690] 제 5 특이적 구체예에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC), (D-ID) 또는 (D-IE)의 경우, R_a 및 R_b는 모두 H이며; 그리고 R₅는 H 또는 Me이며, 그리고 나머지 변수들은 제 3 또는 제 4 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예에서 기술된 것과 같다.

[0691] 특정 구체예들에서, 제 1, 제 2, 제 3 또는 제 4 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 화합물의 경우, 상기 하전된 치환체 또는 이온화가능한 기 Q는 i) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$, 또는 $-Z'-NR_{11}R_{12}$, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이거나; 또는, ii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 또는 $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 이며; Z'는 임의선택적으로 치환된 알킬렌, 임의선택적으로 치환된 사이클로알킬렌 또는 임의선택적으로 치환된 페닐렌이며; $R_{14} \sim R_{16}$ 은 각각 독립적으로 임의선택적으로 치환된 알킬이며; 그리고 X^- 는 약제학적으로 수용가능한 음이온이다. 더 구체적으로, Q는 $-SO_3H$ 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이다.

[0692] 제 6 특이적 구체예에서, 화학식 (D-IA), (D-IB), (D-IC), (D-ID) 또는 (D-IE)의 경우, P_1 은 2 ~ 10개 아미노산 잔기들을 함유하는 펩티드이며, 나머지 변수들은 제 1, 제 2, 제 3, 제 4 또는 제 5 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예에서 기술된 것과 같다. 특정 구체예들에서, P_1 은 2 ~ 5개의 아미노산 잔기들을 함유하는 펩티드이다. 특정 구체예들에서, P_1 은 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드다. 더 구체적으로, P_1 은 중앙 조직에서 발현된 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드다. 특정 구체예들에서, P_1 은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-토실-Arg, Phe-N⁹-니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 56), β -Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 57), Gly-Phe-Leu-Gly (서열 식별 번호: 58), Val-Arg, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe 및 Gln-Ala이다. 더 구체적으로, P_1 은 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, 또는 D-Ala-D-Ala이다.

[0693] 제 7 특이적 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물의 경우, D는 다음 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있고:

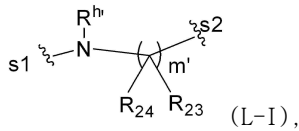




[0697] (D4),

[0698] 이때 N와 C 사이에 이중선 $\equiv$ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H이며; 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H이고, 그리고 Y는 $-SO_3H$ 이며 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이며, 그리고 나머지 변수들은 제 1 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0699] 제 8 특이적 구체예, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물의 경우, -L-는 다음의 구조 화학식으로 나타낼 수 있다:



[0700] (L-I),

[0701] 이때:

[0702] s1은 D에 공유적으로 연결된 부위이며; s2는 말레이미드기에 공유 결합된 부위이고;

[0703] 각 경우에서 R_{23} 및 R_{24} 는 독립적으로 H 또는 임의선택적으로 치환된 알킬이며;

[0704] m' 은 0 ~ 10 사이의 정수이고;

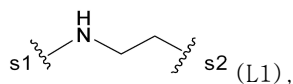
[0705] $R^{h'}$ 는 H 또는 임의선택적으로 치환된 알킬이며;

[0706] 그리고 나머지 변수들은 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6 또는 제 7 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 것과 같다.

[0707] 특정 구체예들에서, R_{23} 및 R_{24} 는 모두 H이며; 그리고 m' 은 1 ~ 6 사이의 정수이고, 그리고 나머지 변수들은 제 8 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0708] 특정 구체예들에서, $R^{h'}$ 는 H이며, 그리고 나머지 변수들은 제 8 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

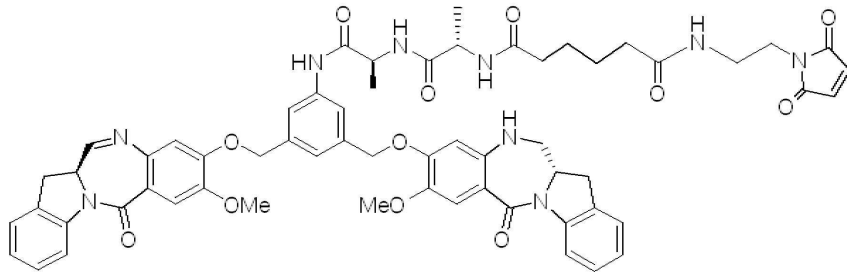
[0709] 제 9 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물의 경우, -L-는 다음의 구조 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있다:



[0710] (L1),

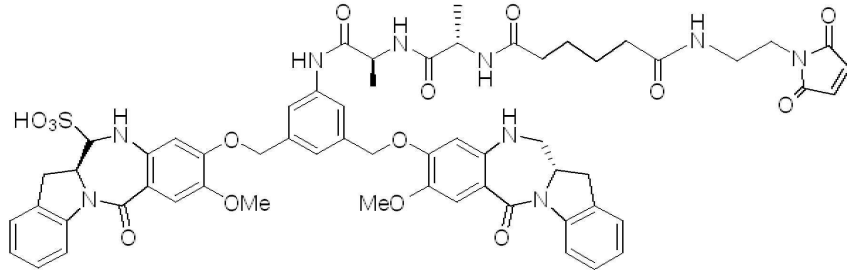
[0711] 그리고 나머지 변수들은 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6 또는 제 7 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 것과 같다.

[0712] 제 10 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:



[0713]

(I1), 또는



[0714]

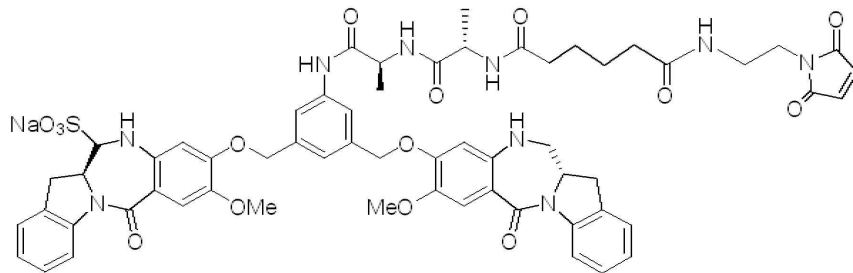
(I2)

[0715]

또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이다.

[0716]

특정 구체예들에서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타낸다:

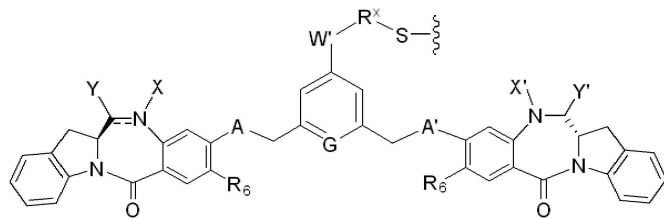


[0717]

(I3).

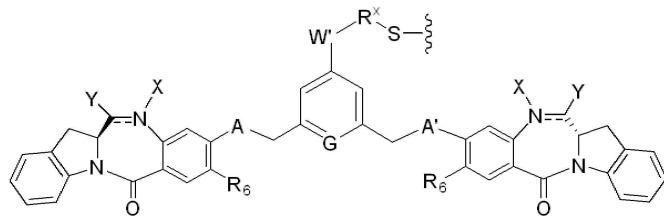
[0718]

제 11 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물의 경우, D는 다음 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있다:



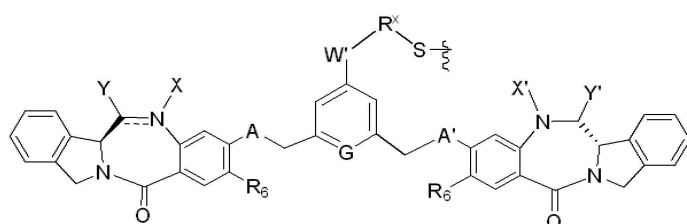
[0719]

(D-IIA);



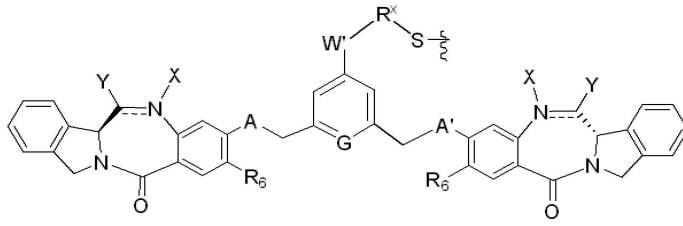
[0720]

(D-IIB);



[0721]

(D-IIC); 또는



(D-IID),

이때:

N와 C 사이에 이중선 $=$ 은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고, 이것이 이중 결합일 때, X는 존재하지 않고, Y는 -H 또는 (C_1-C_4) 알킬이며; 그리고 이것이 단일 결합일 때, X는 -H 또는 아민 보호 모이어티이며, Y는 -OH 또는 $-SO_3H$ 이며, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고;

X'는 -H, -OH, 치환된 또는 치환안된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 페닐, 및 아민-보호기로 구성된 군에서 선택되며;

Y'는 -H, 옥소기, 치환된 또는 치환안된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐로 구성된 군에서 선택되며;

A 및 A'는 -O- 및 -S-에서 선택되며;

W'는 존재하지 않거나, 또는 -O-, $-N(R^c)-$, $-N(R^c)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^c)-$, -S- 또는 $-CH_2-S-$, $-CH_2NR^c-$ 에서 선택되며;

R^x는 존재하지 않거나, 또는 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬에서 선택되며;

R^c는 -H, 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ 이며, 이때 R^k는 -H, 임의 선택적으로 2차 아미노 (가령, $-NHR^{101}$) 또는 3차 아미노 ($-NR^{101}R^{102}$) 기를 보유하는, 1 ~ 6개의 탄소 원자를 갖는 선형, 분기형 사이클릭 알킬, 또는 5-구성원 또는 6-구성원의 질소 함유하는 헤테로사이클이며, 이때 R¹⁰¹ 및 R¹⁰²는 각각 독립적으로 선형, 분기형, 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐이며;

n은 1 ~ 24의 정수이고;

G는 -CH- 또는 -N-에서 선택되고;

R₆은 -H, -R, -OR, -SR, $-NR'R''$, $-NO_2$, 또는 할로젠이며; 그리고

각 경우에서, R은 -H, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 6 ~ 18개 탄소 원자를 갖는 임의선택적으로 치환된 아릴, 임의선택적으로 치환된 5-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로아릴 환 (이때 질소, 산소, 및 황에서 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 헤테로원자를 함유), 또는 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 함유하는)으로 구성된 군에서 독립적으로 선택되며;

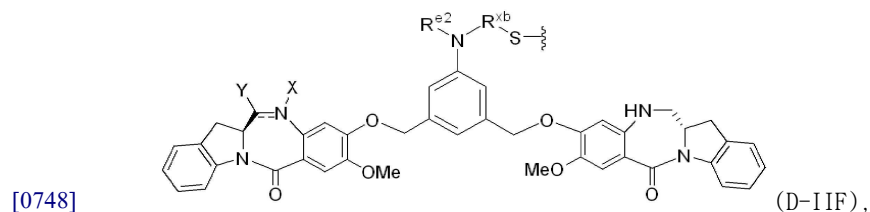
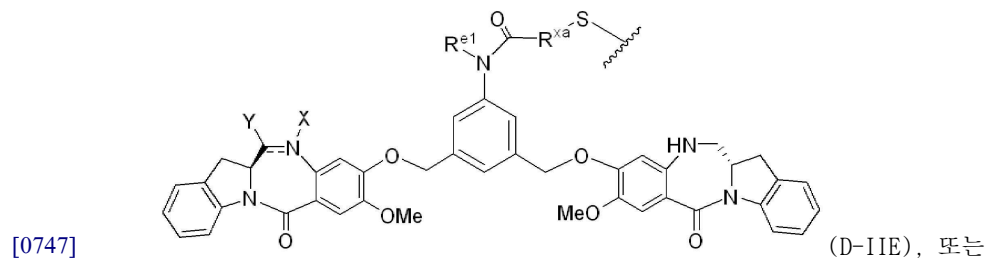
R' 및 R''는 각각 독립적으로 -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, 임의선택적으로 치환된 선형, 분기형 또는 사이클릭 알킬, 알케닐 또는 알키닐, 폴리에틸렌 글리콜 단위 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 그리고 임의선택적으로 치환된 3-구성원 ~ 18-구성원의 헤테로사이클릭 환 (이때 O, S, N 및 P에서 독립적으로 선택된 1 ~ 6개 헤테로원자를 갖는)로부터 선택되며;

R^c는 -H 또는 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는, 임의선택적으로 치환된 선형 또는 분기형 알킬; 그리고 L은 링커다.

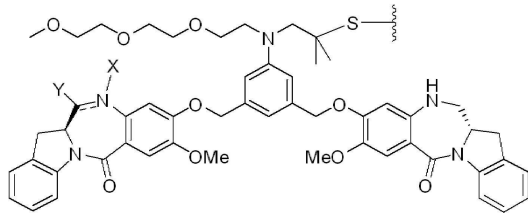
특정 구체예들에서, D는 화학식 (D-IIA) 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낸다.

특정 구체예들에서, D는 화학식 (D-IIA), (D-IIB), (D-IIC) 또는 (D-IID)으로 나타내며, 이때:

- [0739] X' 및 Y' 는 모두 -H이고;
- [0740] A 및 A'는 모두 -O-이고;
- [0741] R_6 은 -OMe이고;
- [0742] W' 는 $-N(R^e)-$ 또는 $-N(R^e)-C(=O)-$ 이며;
- [0743] R^e 는 -H, 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ 이며, 이때 R^k 는 -H, 1 ~ 4개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬이며;
- [0744] n은 2 ~ 6의 정수이고;
- [0745] R^x 는 1 ~ 6개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분기형 알킬이며; 그리고 나머지 변수들은 제 11 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.
- [0746] 제 12 특이적 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물의 경우, D는 다음 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있고:



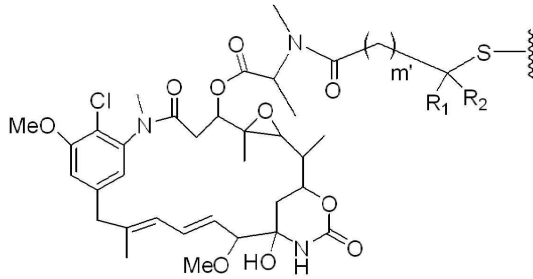
- [0749] 이때:
- [0750] R^{e1} 은 H 또는 (C_1-C_6) 알킬이며;
- [0751] R^{xa} 는 (C_1-C_6) 알킬이며;
- [0752] R^{e2} 는 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ 이며;
- [0753] n은 2 ~ 6의 정수이고;
- [0754] R^k 는 -H 또는 -Me이며;
- [0755] R^{xb} 는 (C_1-C_6) 알킬이며; 그리고 나머지 변수들은 제 11 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.
- [0756] 제 13 특이적 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물의 경우, D는 다음 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있고:



[0757] (D5);

[0758] 나머지 변수들은 제 11 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

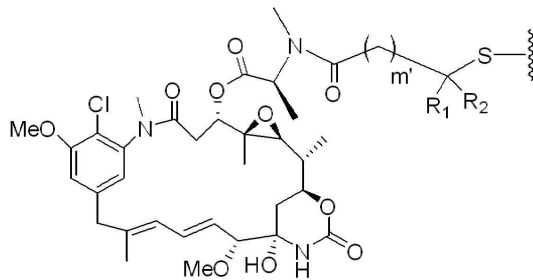
[0759] 제 14 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물의 경우, D는 다음 화학식으로 나타낼 수 있고:



[0760] (D-III),

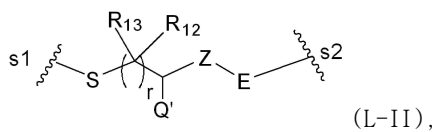
[0761] 이때 m'는 1 또는 2 이며; R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 -H 또는 (C₁-C₃)알킬이며; 그리고 L은 링커다.

[0762] 특정 구체예들에서, D는 다음의 식으로 나타낸다:



[0763] (D-IIIA).

[0764] 제 15 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물의 경우, L은 다음의 구조 화학식 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타낼 수 있고:



[0765] (L-II),

[0766] 이때:

[0767] s1은 D에 공유적으로 연결된 부위이며, 그리고 s2는 말레이미드기에 공유 결합된 부위이고;

[0768] E는 -(CR₁₀R₁₁)_q-, 사이클로알킬, 또는 사이클로알킬알킬이며;

[0769] Z는 존재하지 않음, -SO₂NR₉-, -NR₉SO₂-, -C(=O)-NR₉-, -NR₉-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-NR₉-(CH₂CH₂O)_p-, -NR₉-C(=O)-(CH₂CH₂O)_p-, -(OCH₂CH₂)_p-C(=O)NR₉-, 또는 -(OCH₂CH₂)_p-NR₉-C(=O)-이며;

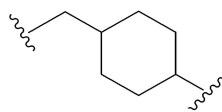
[0770] p는 1 ~ 24의 정수이고;

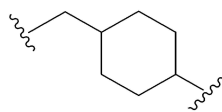
[0771] Q는 H, 하전된 치환체, 또는 이온화가능한 기이며;

[0772] R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, 및 R₁₃은 각 경우에서, 독립적으로 H 또는 임의선택적으로 치환된 알킬이며;

[0773] q 및 r 은 각 경우에서, 독립적으로 0 ~ 10 사이의 정수이고; 그리고, 나머지 변수들은 제 11, 제 12, 제 13 또는 제 14 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

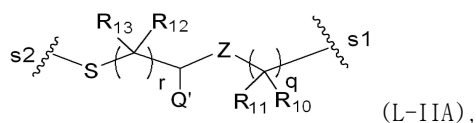
[0774] 특정 구체예들에서, E는 $-(CR_{10}R_{11})_q-$ 이며, 나머지 변수들은 제 15 특이적 구체예에서 기술된 바와 같다.



[0775] 특정 구체예들에서, E는 이며, 나머지 변수들은 제 15 특이적 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0776] 특정 구체예에서, Z는 $-C(=O)-NR_9-$ 또는 $-NR_9-C(=O)-$ 이며, 그리고 나머지 변수들은 제 15 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0777] 제 16 특이적 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물의 경우, L은 다음의 구조 화학식으로 나타내며:



[0778] 이때 R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , 및 R_{13} 은 각 경우에서, 독립적으로 $-H$ 또는 (C_1-C_3) 알킬이며; 그리고 나머지 변수들은 제 15 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0780] 특정 구체예들에서, R_9 는 $-H$ 이며, 그리고 나머지 변수들은 제 16 특이적 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0781] 특정 구체예들에서, Q' 는

[0782] i) H 이고;

[0783] ii) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$, 또는 $-Z'-NR_{14}R_{15}$, 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고; 또는,

[0784] iii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 또는 $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 이고;

[0785] 이때 Z' 는 임의선택적으로 치환된 알킬렌, 임의선택적으로 치환된 사이클로알킬렌, 또는 임의선택적으로 치환된 페닐렌이며;

[0786] R_{14} , R_{15} 및 R_{16} 은 각각 독립적으로 임의선택적으로 치환된 알킬이며; 그리고,

[0787] X^- 는 약제학적으로 수용가능한 음이온이며, 그리고 나머지 변수들은 제 16 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0788] 특정 구체예들에서, Q' 는 H 또는 $-SO_3H$ 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이며, 그리고 나머지 변수들은 제 16 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0789] 특정 구체예들에서, R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , 및 R_{13} 은 모두 H 이며; 그리고 q 및 r 은 각각 독립적으로 1 ~ 6 사이의 정수이고, 그리고 나머지 변수들은 제 16 특이적 구체에 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0790] 특정 구체예들에서, L은 화학식 (L-IIA)로 나타내며, 이때:

[0791] R_{12} 및 R_{13} 은 각 경우에서, 각각 독립적으로 H 또는 (C_1-C_3) 알킬이며;

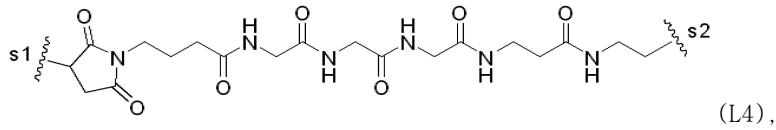
[0792] Q 는 H 또는 $-SO_3H$ 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이고,

[0793] Z 는 $-C(=O)-NR_9-$ 또는 $-NR_9-C(=O)-$ 이며;

[0794] R_9 는 H 또는 (C_1-C_3) 알킬이며;

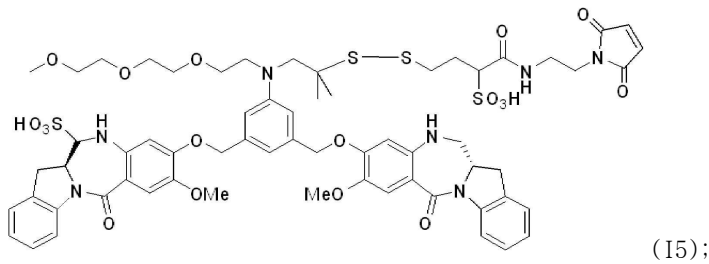
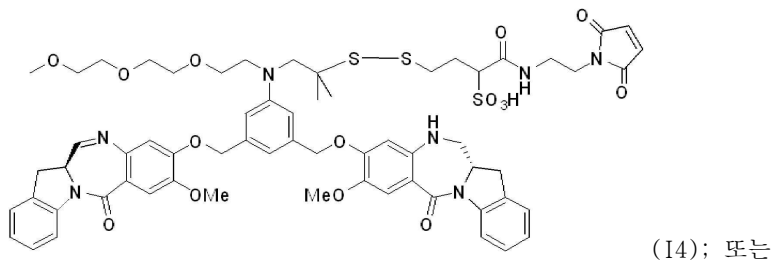
Gly (서열 식별 번호: 58). 더욱 더 구체적으로, P_L 은 Gly-Gly-Gly, Ala-Ala-Ala, D-Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Val-Ala, 또는 β -Ala-Gly-Gly-Gly이다.

제 19 특이적 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물의 경우, L은 다음의 구조 화학식으로 나타내며:



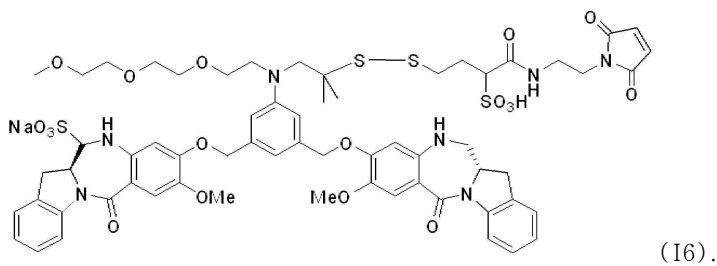
또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이며, 그리고 나머지 변수들은 제 11, 제 12, 제 13 또는 제 14 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

제 20 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:

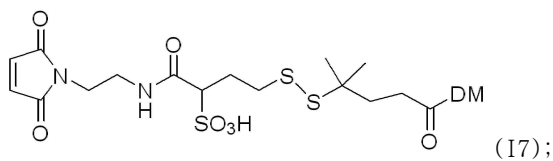


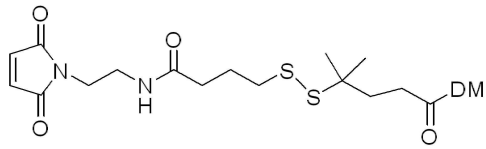
또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이다.

특정 구체예들에서, 제 20 특이적 구체예의 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:

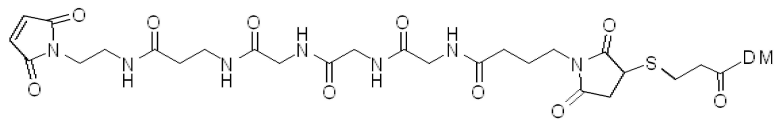


제 21 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:



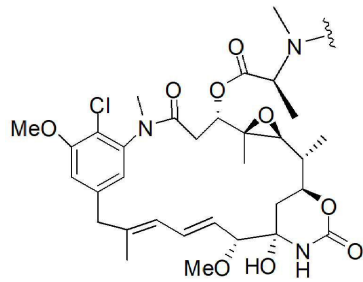


[0824] (I8); 또는



[0825] (I9);

[0826] 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염으로 나타내며, 이때 DM은 다음 화학식으로 나타낸 약물 모이어티이다:



[0827]

[0828] 제 22 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:

[0829] $L_2'-A-NH-CR^{1A}R^{2A}-S-L_1-D$ (I-a),

[0830] 이때:

[0831] L_2' 는 말레이미드 모이어티를 품고 있는 스페이서이며;

[0832] A는 아미노산 또는 2 내지 20개 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드이며;

[0833] R^{1A} 및 R^{2A} 는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-3} 알킬이며;

[0834] L_1 은 스페이서이며; 그리고

[0835] $D-L_1-SH$ 는 세포독성 체제다.

[0836] 특정 구체예들에서, R^{1A} 및 R^{2A} 중 적어도 하나는 H이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22 특이적 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0837] 특정 구체예들에서, R^{1A} 및 R^{2A} 는 각각 독립적으로 H 또는 Me이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22 특이적 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0838] 특정 구체예들에서, R^{1A} 및 R^{2A} 는 H이며; 그리고 다른 하나는 Me이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22 특이적 구체예에서 기술된 바와 같다.

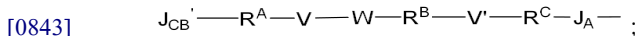
[0839] 특정 구체예들에서, R^{1A} 및 R^{2A} 는 모두 H이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0840] 특정 구체예들에서, L_1 은 $-L_1'-C(=O)-$ 이며; 그리고 L_1' 는 알킬렌 또는 사이클로알킬렌이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다. 더 구체적으로, L_1' 은 C_{1-10} 알킬렌이다. 더욱 더 구체적으로, L_1 은 $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$ 이며; R^{3A} 및 R^{4A} 는 각각 독립적으로 H 또는 Me이다. 또다른 더 특이적 구체예에서, L_1 은 $-CR^{3A}R^{4A}-(CH_2)_{3-5}-C(=O)-$ 이다. 더더욱 특이적 구체예에서, R^{3A} 및 R^{4A} 는

모두 Me이다.

[0841] 특정 구체예들에서, L_1 은 $-(CH_2)_{4-6}-C(=O)-$ 이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0842] 제 23 특이적 구체예에서, 화학식 (I-a)의 경우, L_2' 는 다음의 구조 화학식으로 나타내며:



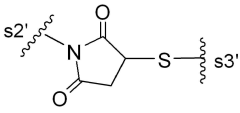
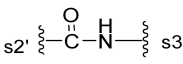
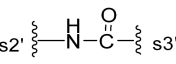
[0844] 이때:

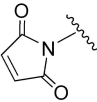
[0845] R^A 는 알킬렌, 사이클로알킬알킬렌 또는 아릴렌이며;

[0846] R^B 및 R^C 는 각각 독립적으로 존재하지 않음, 알킬렌, 시클알킬렌, 또는 아릴렌이며;

[0847] V 및 V' 는 각각 독립적으로 $-(O-CH_2-CH_2)_{p1}-$, 또는 $-(CH_2-CH_2-O)_{p1}-$ 이며;

[0848] $p1$ 는 0 또는 1 ~ 10의 정수이고;

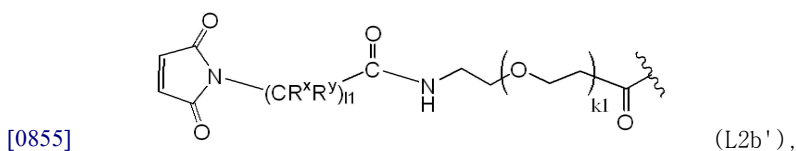
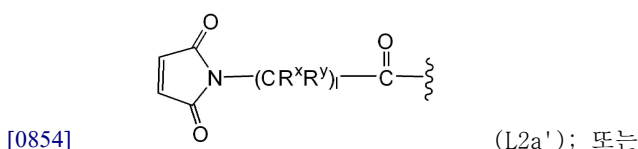
[0849] W 는 존재하지 않음,  ,  또는  이며, 이때 $s2'$ 는 V , R^A 또는 J_{CB}' 에 연결된 부위를 나타내고, $s3'$ 는 R^B , V' , R^C 또는 J_A 에 연결된 부위를 나타내고;

[0850]  J_{CB}' 는 이며; 그리고

[0851] J_A 는 $-C(=O)-$ 이며; 그리고 나머지 변수들은 제 22 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0852] 특정 구체예들에서, $p1$ 은 0 이며, R^C 는 존재하지 않고, 그리고 나머지 변수들은 제 23 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0853] 제 24 특이적 구체예에서, 화학식 (I-a)의 경우, L_2' 는 다음의 구조 화학식으로 나타내며:



[0856] 이때:

[0857] R^x 및 R^y 은 각 경우에서, 독립적으로 H, -OH, 할로젠, $-O-(C_{1-4}$ 알킬), $-SO_3H$, $-NR_{40}R_{41}R_{42}^+$, 또는 -OH, 할로젠, $-SO_3H$ 또는 $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$ 로 임의선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬이며, 이때 R_{40} , R_{41} 및 R_{42} 는 각각 독립적으로 H 또는 C_{1-4} 알킬이며;

[0858] l 및 $l1$ 은 각각 독립적으로 1 ~ 10의 정수이며;

[0859] $k1$ 은 1 ~ 12의 정수이며; 그리고 나머지 변수들은 제 22 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에

서 기술된 바와 같다.

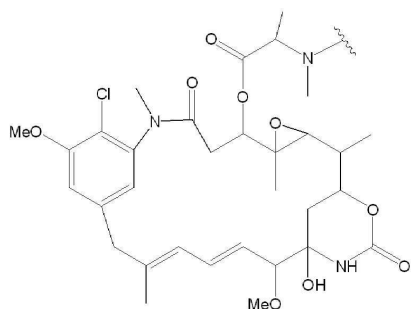
[0860] 특정 구체예들에서, R^x 및 R^y 는 모두 H이며, 그리고 나머지 변수들은 제 24 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0861] 특정 구체예들에서, 1 및 11은 각각 2 ~ 6 사이의 정수이고, 그리고 나머지 변수들은 제 24 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0862] 제 25 특이적 구체예에서, 화학식 (I-a)의 경우, A는 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22, 제 23 또는 제 24 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다. 더 구체적으로, A는 중앙 조직에서 발현된 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티드다. 또다른 더 특이적 구체예에서, A는 $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 와 공유적으로 연계되는, Ala, Arg, Asn, Asp, Cit, Cys, 셀리노-Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 및 Val(각각 독립적으로 L-또는 D-이성질체임)로 구성된 군에서 선택된 아미노산을 갖는 펩티드이다. 더 구체적으로, $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 에 연결된 아미노산은 L 아미노산이다.

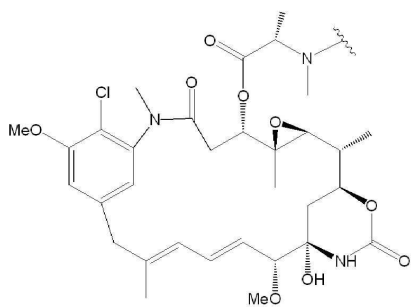
[0863] 특정 구체예들에서, A는 2 ~ 5개의 아미노산 잔기들을 함유하는 펩티드이며, 그리고 나머지 변수들은 제 25 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다. 더 구체적으로, A는 Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, D-Val-Ala, Val-Cit, D-Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Phe-Ala, Phe- N^9 -토실-Arg, Phe- N^9 -니트로-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Ala-Ala, D-Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala-D-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 55), β -Ala-Leu-Ala-Leu (서열 식별 번호: 56), Gly-Phe-Leu-Gly (서열 식별 번호: 57), Val-Arg, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe, Gln-Ala, D-Ala-Pro, 및 D-Ala-tBu-Gly로 구성된 군에서 선택되며, 이때 각 펩티드에서 첫 번째 아미노산은 L_2 기에 연결되며, 각 펩티드의 마지막 아미노산은 $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 에 연결된다. 더욱 더 구체적으로, A는 Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, 또는 D-Ala-tBu-Gly이다.

[0864] 제 26 특이적 구체예에서, 화학식 (I-a)의 경우, D는 메이탄시노이드이며, 그리고 나머지 변수들은 제 22, 제 23, 제 24 또는 제 25 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다. 더 구체적으로, D는 다음 화학식으로 나타낼 수 있다:



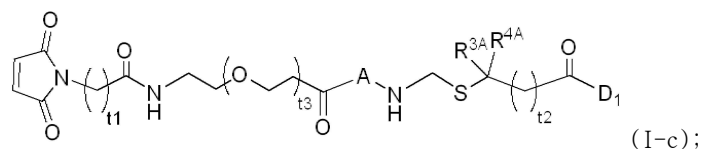
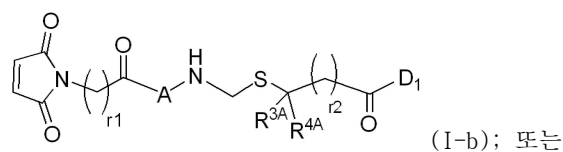
[0865] .

[0866] 더욱 더 구체적으로, D는 다음 화학식으로 나타낼 수 있다:



[0867] .

제 27 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:



또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이며, 이때:

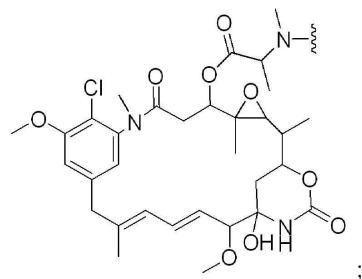
R^{3A} 및 R^{4A} 는 각각 독립적으로 H 또는 Me이고;

r_1 및 t_1 은 각각 독립적으로 1 ~ 6의 정수이며;

r_2 및 t_2 는 각각 독립적으로 1 ~ 7의 정수이며;

t_3 은 1 ~ 12의 정수이며;

D_1 은 다음의 식으로 나타내며:

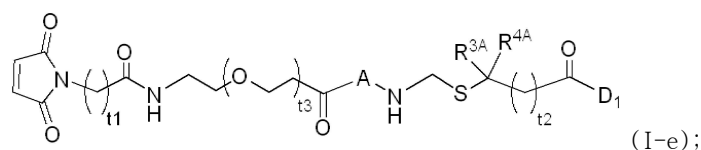
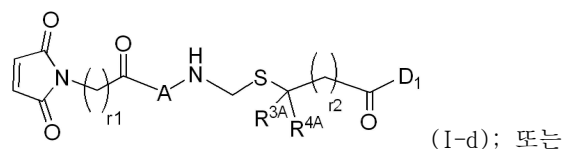


그리고 나머지 변수들은 제 25 또는 제 26 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

특정 구체예에서, A는 Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, 또는 D-Ala-tBu-Gly이며, 그리고 나머지 변수들은 제 28 구체예에서 기술된 바와 같다.

특정 구체예에서, r_1 은 2 ~ 4의 정수이며; 그리고 r_2 는 3 ~ 5의 정수이며, 그리고 나머지 변수들은 제 27 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

제 28 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:



이때:

[0885] r1 및 t1은 각각 2 ~ 6의 정수이며;

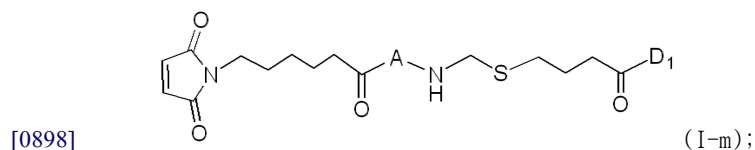
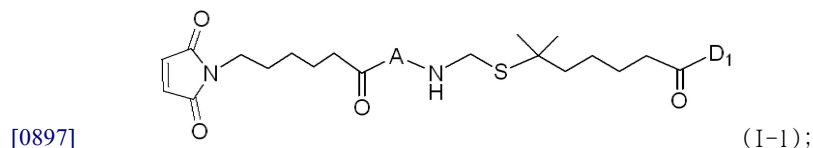
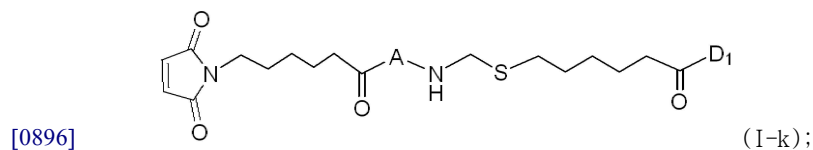
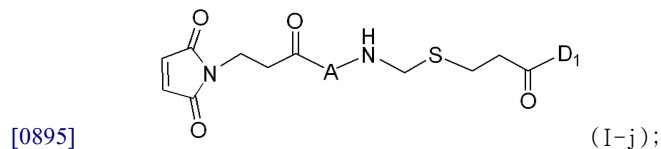
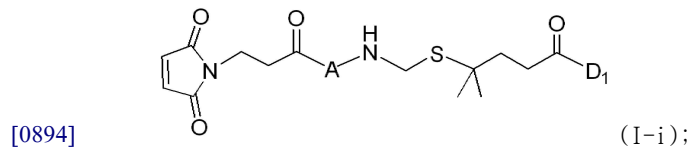
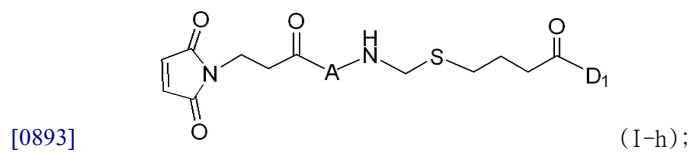
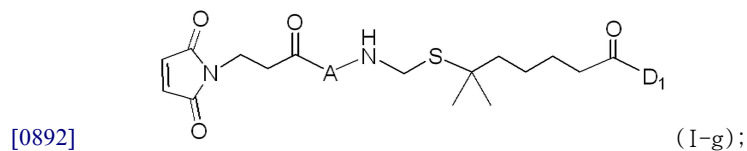
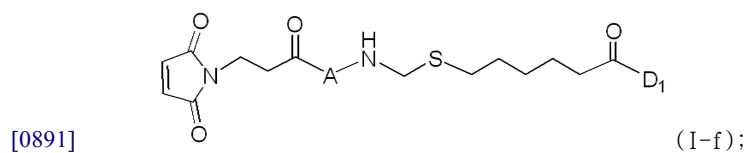
[0886] r2 및 t2는 각각 2 ~ 5의 정수이며; 그리고

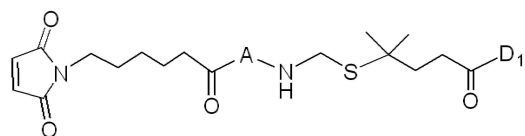
[0887] t3은 각각 2 ~ 12의 정수이며; 그리고 나머지 변수들은 제 27 특이적 구체예 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들에서 기술된 바와 같다.

[0888] 특정 구체예들에서, R^{3A} 및 R^{4A} 는 모두 Me이며, 그리고 나머지 변수들은 제 28 구체예에서 기술된 바와 같다.

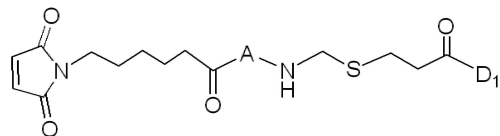
[0889] 특정 구체예들에서, R^{3A} 및 R^{4A} 는 모두 H이며, 그리고 나머지 변수들은 제 28 구체예에서 기술된 바와 같다.

[0890] 제 29 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:

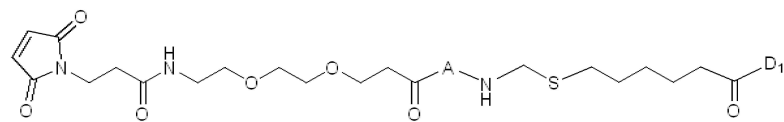




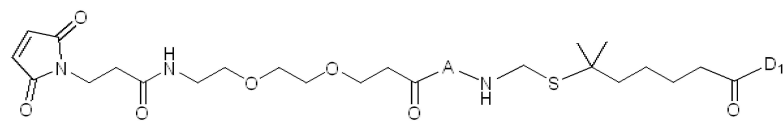
[0899] (I-n);



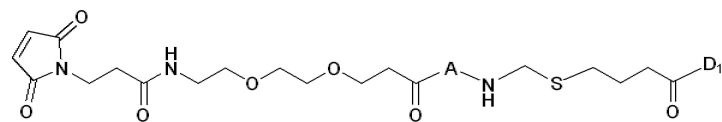
[0900] (I-o);



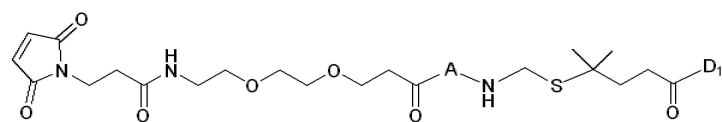
[0901] (I-p);



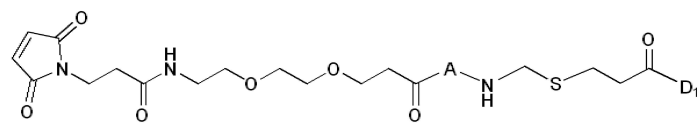
[0902] (I-q);



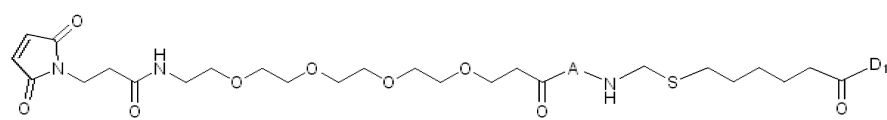
[0903] (I-r);



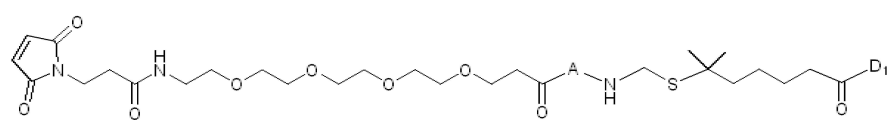
[0904] (I-s);



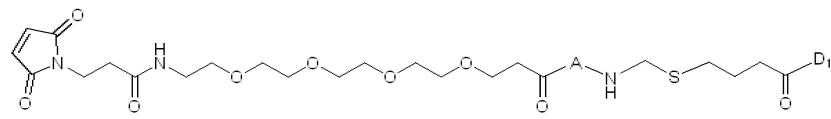
[0905] (I-t);



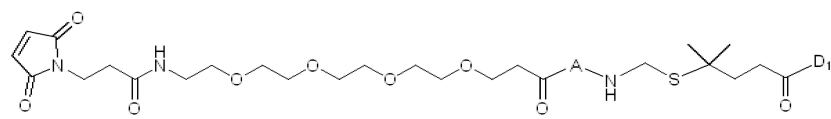
[0906] (I-u);



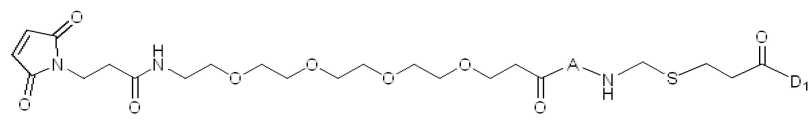
[0907] (I-v);



[0908] (I-w);



[0909] (I-x); 또는



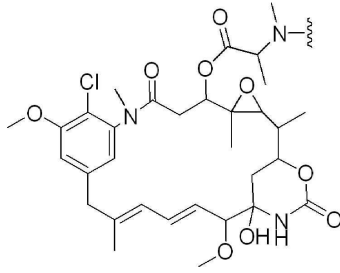
[0910] (I-y);

[0911] 또는 이의 약제학적으로 수용가능한 염이며, 이때:

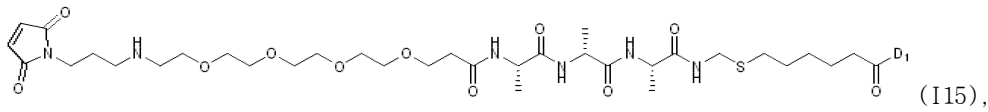
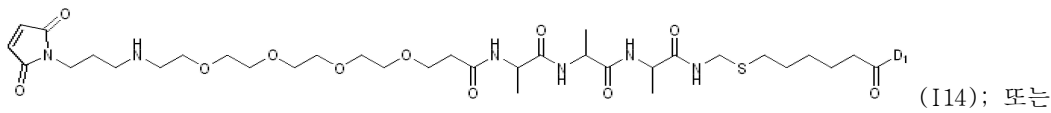
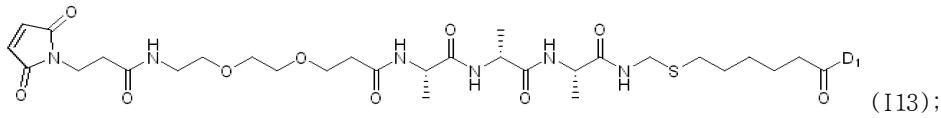
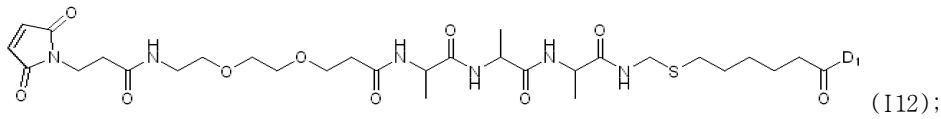
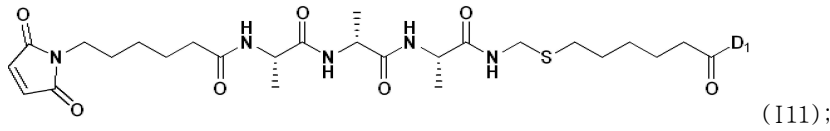
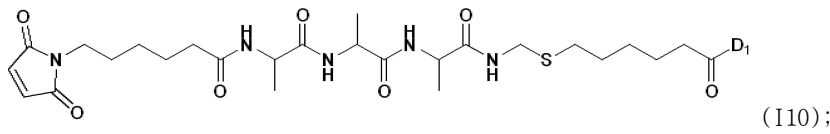
[0912] A는 Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, 또는 D-Ala-tBu-

Gly이며; 그리고

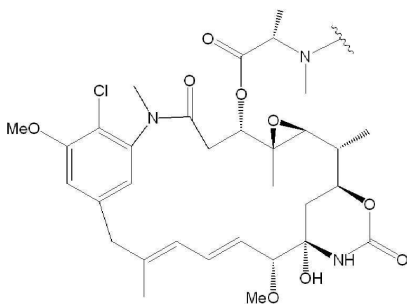
D₁은 다음의 식으로 나타낸다:



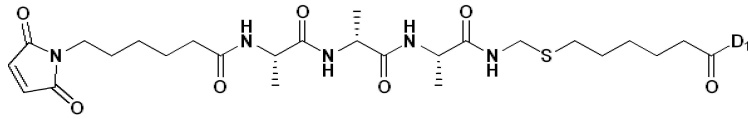
제 30 특이적 구체예에서, 본원에서 기재된 방법들 (가령, 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5, 제 6, 제 7, 제 8, 제 9 또는 제 10 구체예, 또는 본원에 기술된 임의의 구체예들의 방법)에서 화학식 (I)의 화합물은 다음의 식으로 나타내며:



이때 D₁은 다음의 식으로 나타낸다:



특정 구체예에서, 화학식 (I)의 화합물은 화학식 (I11)로 나타낸다:



[0925] (I11).

[0926] 상기 화학식 (I11)의 화합물은 또한 DM21-C 또는 Mal-LDL-DM 또는 MalC5-LDL-DM로도 지칭된다.

[0927] 특정 구체예들에서, 상기에서 기술된 화학식 (I)의 화합물의 경우, 상기 약제학적으로 수용가능한 염은 나트륨 염 또는 칼륨 염이다. 특정 구체예들에서, 상기에서 기술된 화학식 (I)의 화합물의 경우, 상기 약제학적으로 수용가능한 염은 나트륨 염이다.

[0928] 5. 면역곤주게이트, 약제학적 조성물 및 이용 방법

[0929] 본 발명은 본 발명의 방법들에 의해 준비된 본원에서 기술하고 있는 곤주게이트를 또한 제공한다. 본원에서 기술된 곤주게이트를 포함하는 약제학적 조성물이 또한 제공된다.

[0930] 본원에 기재된 약학 조성물은 국소 또는 전신 치료를 위한 임의의 수의 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 국소 (이를 테면, 질 및 직장 운반을 비롯한 점막으로의), 이를 테면, 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적제, 좌제, 스프레이, 액체 및 분말; 폐 (가령, 분무기를 비롯한 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기(insufflation), 기관내(intratracheal), 비강내, 표피 및 경피); 경구; 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입을 포함하는 비경구; 또는 두개내 (가령, 척수강 내 또는 심실내) 투여될 수 있다. 일부특정 구체예들에서, 상기 투여는 정맥내 투여다. 본원에서 기술된 약제학적 조성물은 또한 시험관내 또는 생체외일 수도 있다.

[0931] 본 발명은 포유류 (가령, 인간)에서 비정상적 세포 성장을 억제하거나, 또는 증식성 장애를 치료하는 방법을 포함하는데, 이 방법은 전술한 포유류에게 치료요법적 유효량의 본 발명의 면역곤주게이트 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0932] 특정 구체예들에서, 포유류에서 비정상적 세포 성장 또는 증식성 장애는 혈액 암, 백혈병, 또는 림프종을 비롯한 암이다. 특정 구체예들에서, 상기 증식성 장애는 림프 기관, 또는 혈액 악성 암이다.

[0933] 예를 들면, 상기 암은 다음으로 구성된 군에서 선택될 수 있다: 급성 골수성 백혈병 (CD33-낮은 AML, P-당단백질 양성 AML, 재발된 AML, 또는 난치성 AML을 포함하는 AML), 급속 위기의 CML 및 CML 연합된 아벨손(Abelson) 종양유전자 (Bcr-ABL 전위) 포함하는 만성 골수성 백혈병 (CML), 골수이형성 증후군 (MDS), 급성 B 림프아구 백혈병 또는 B-세포 급성 림프아구 백혈병 (B-ALL)을 포함하나 이에 국한되지 않은 급성 림프아구 백혈병 (ALL), 릿터(Richter) 증후군 또는 릿터의 CLL 형질전환을 포함하는 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 털 세포 백혈병 (HCL), 급성 전골수성(promyelocytic) 백혈병 (APL), B-세포 만성 림프증식성 질환 (B-CLPD), 비정형 만성 림프구성 백혈병 (바람직하게는 뚜렷한 CD11c 발현을 갖는), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 모세포성 형질 세포양 수지상세포 신생물 (BPDCN), 맨틀 세포 백혈병 (MCL)을 포함하는 비-호지킨 림프종 (NHL) 및 작은 림프구성 림프종 (SLL), 호지킨 림프종, 전신 비만세포종, 및 버킷 림프종.

[0934] 특정 구체예들에서, 상기 암은 최소한 하나의 음성 예후 인자(prognostic factor), 가령, P-당단백질의 과다발현, EVI1의 과다발현, p53 변형, DNMT3A 돌연변이, FLT3 내부 턴덤 중복(internal tandem duplication)을 갖는다.

[0935] 특정 구체예들에서, 상기 암은 폐암 (이를 테면, 비-소-세포 폐암), 결장직장암, 방광암, 위암, 췌장암, 신장 세포 암종, 전립선암, 식도암, 유방암, 두경부암, 자궁암, 난소암, 간암, 자궁경부암, 갑상선암, 고환암, 골수암, 흑색종 및 림프 암으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특정 구체예들에서, 상기 암은 비-소세포 폐암, 결장직장암, 위암, 유방암(예를 들어, 삼중 음성 유방암(TNBC)) 또는 췌장암이다. 추가 구체예들에서, 본 발명의 면역곤주게이트는 비-소-세포 폐암 (편평 세포, 비-편평 세포, 선암종, 또는 거대-세포 미분화된 암종), 결장직장암 (선암종, 위장관 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양, 원발성 결장직장 림프종, 평활근육종, 또는 편평 세포 암종) 또는 유방암 (이를 테면, 삼중 음성 유방암 (TNBC)) 암의 치료에 유용할 수 있다.

[0936] 실시예 1. 환원 제제 스크리닝 및 항체 사전-공정

[0937] 환원 제제 스크리닝

[0938] 항-CD123 항체 함유하는 부위-특이적 곤주게이션 부위에서 공작된 시스테인을 환원시키는 능력에 대해 다양한 환원 제제들이 스크리닝되었다. 모든 반응에 대해, 20mM 히스티딘(pH 6.0) 중 항체의 50mg/mL 스톱 용액을 인산 칼륨 (pH 6.0) 완충액으로 희석하여, 50mM의 최종 인산칼륨 농도를 달성하였다. DMA 및 DMA 안에 가용화된 적합

한 포스핀 스톱의 필요한 용적을 상기 반응 용액에 추가하여 2.0 mg/mL 항체 농도, 10% (v/v) DMA, 및 상기 항체에 대해 포스핀 당량으로 표시된 수 (mol:mol)를 얻었다. 상기 반응 혼합물은 후속적으로 25°C에서 4 h 동안 반응되도록 하였다. 상기 환원 반응이 완료될 때, 해당 항체에 대한 Alexa Fluor 488-말레이미드의 40 (mol:mol) 당량을 DMA중 Alexa Fluor 488 말레이미드의 10mM 스톱을 이용하여 상기 반응에 도입시켰다. 25°C에서 하룻밤 동안 항온처리 후, SEC 크로마토그래피에서 상기 항체 (280 nm에서) 및 AF488-mal (280 및 493 nm에서)의 공지의 흡광 계수를 이용하여 라벨링 정도를 결정하였다. 이들 결과는 표 A에 제공된다.

표 A

포스핀 당량	비스(p- 술포네이트페닐) 페닐포스핀 이수화물	2- (디페닐포스피노) 벤젠술포산	2- (디페닐포스피노) 벤조산	TCEP	2- (디페닐 포스피노 에틸아민	2- (디페닐포스피노) -N,N,N- 트리메틸벤질암모늄 트리플레이트	2- (디시클로헥실 포스피노)벤젠 술포산
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
2	0.835	0.78	2.08	2.41	1.97	0.514	0.69
3	0.845	0.74	2.605	3.36	2.14	0.48	0.86
5	0.88	N/A	4.5	3.94	2.62	0.51	0.63
10	1.02	0.65	7.1	7.24	5.16	0.633	0.05

이들 데이터의 결과에서 포스핀 2-(디페닐포스피노)벤조산, TCEP, 및 2-(디페닐포스피노)에틸아민은 해당 항체의 이황화물을 환원시킬 수 있고, 이로써 AF488 말레이미드와의 후속 라벨링에 이용가능하도록 만든다.

별도 실험에서, 두 개 특이적 포스핀을 항-CD123 항체 함유하는 부위-특이적 콘주게이션 부위에서 공작된 시스템인을 환원시키는 능력에 대해 스크리닝하였다. 상기 항체를 우선 50 mM의 인산칼륨염 완충액, pH 6.0에 희석시켰다. 이 용액에 표시된 환원 제제의 항체 및 DMA에 대해 적절한 수의 당량(mol:mol)을 첨가하여, 5 mg/mL의 항체 및 5%(v/v)의 DMA 최종 농도를 달성하였다. 이 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 단계가 완료되면, 환원된 항체의 분취량을 제거하고, pH 6.0 인산칼륨 완충액으로 희석하고, 그리고 2.5 mg/mL 항체 및 10%(v/v) DMA에서 AF488-mal 대비 항체 20 mol:mol 당량과 반응하도록 두었다. 라벨링 수준은 혼합물을 25°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 280 및 493 nm에서 SEC에 의해 모니터링하였다. 환원 용액의 나머지를 또한 50mM 완충제 농도를 유지하면서, pH 6.0 인산칼륨 완충제로 희석하였다. DMA 및 DHAA (DMA 스톱 용액으로써)를 1.5:1 몰비의 DHAA 대 환원 제제로 해당 반응물 첨가하였다. 재-산화 반응 혼합물의 최종 조성물은 표시된 수의 DHAA 당량 및 5%(v/v) DMA를 갖는 2.5 mg/mL 항체다. 이 용액을 25°C에서 18시간 동안 항온처리한 후, 콘주게이션 반응을 설정했다. 반응 혼합물을 50mM 완충제 농도를 유지하면서 pH 6.0 인산칼륨으로 희석하였다. 이 용액에 DMA 및 항체에 대하여 10몰 당량의 AF488-mal을 첨가하였다. 해당 콘주게이션 반응 혼합물의 최종 조성물은 2.0 mg/mL 항체, 10 몰 당량의 AF488-mal, 및 10% (v/v) DMA이었다. 이 반응 혼합물을 25°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 상기 반응이 완료될 때, SEC 크로마토그래피에서 상기 항체 (280 nm에서) 및 AF488-mal (280 및 493 nm에서)의 공지의 흡광 계수를 이용하여 AF488-mal의 라벨링 정도를 결정하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 B에 제시되어 있다.

표 B

	2-(디페닐포스피노)에틸아민		3-(디페닐포스피노)프로필아민	
당량 수	환원 DAR (20 당량 Alexa)	콘주게이션-후 DAR(1.5X DHAA, 5당량 Alexa)	환원 DAR (20 당량 Alexa)	콘주게이션-후 DAR(1.5X DHAA, 5당량 Alexa)
5	3.25	0.93	6.82	1.62
10	5.96	1.49	9.38	2.26
16/15	7.17	1.88	9.49	2.39

이들 연구에서 2-(디페닐포스피노)에틸아민 및 3-(디페닐포스피노)프로필아민은 모두 해당 항체의 고유의 쇄간 이황화물 및 공작된 시스템인 이황화물을 환원시킬 수 있는 효과적인 환원 제제임을 나타낸다. 추가로, 과량의

DHAA를 사용한 원-포트 반응에서 재-산화시 예상되는 DAR 2 콘쥬게이트를 얻을 수 있다.

[0946]

별도의 실험에서, 상기 공정은 포스핀 및 비-포스핀 환원 제제를 사용하여 pH 7.5에서 환원으로 테스트되었다. 항-CD123 항체를 우선 50 mM의 인산칼륨염 완충액, pH 7.5에 희석시켰다. 이 용액에 표시된 환원 제제의 항체 및 DMA에 대해 적절한 수의 당량(mol:mol)을 첨가하여, 5 mg/mL의 항체 및 5%(v/v)의 DMA 최종 농도를 달성하였다. 이 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 단계가 완료되면, 반응 용액을 50mM 완충액 농도를 유지하면서 pH 7.5 인산칼륨 완충액으로 추가 희석하였다. DMA 및 DHAA (DMA 스톱 용액으로써)를 1.5:1 몰비의 DHAA 대 환원 제제로 해당 반응물 첨가하였다. 재-산화 반응 혼합물의 최종 조성물은 표시된 수의 DHAA 당량 및 5%(v/v) DMA를 갖는 2.5 mg/mL 항체다. 이 용액을 25°C에서 18시간 동안 항온처리한 후, 콘쥬게이션 반응을 설정했다. 반응 혼합물을 50mM 완충제 농도를 유지하면서 pH 6.0 인산칼륨으로 희석시켜, 이 혼합물 pH를 감소시켰다. 이 용액에 DMA 및 항체에 대하여 10몰 당량의 AF488-mal을 첨가하였다. 해당 콘쥬게이션 반응 혼합물의 최종 조성물은 2.0 mg/mL 항체, 10 몰 당량의 AF488-mal, 및 10% (v/v) DMA이었다. 이 반응 혼합물을 25°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 상기 반응이 완료될 때, SEC 크로마토그래피에서 상기 항체 (280 nm에서) 및 AF488-mal (280 및 493 nm에서)의 공지의 흡광 계수를 이용하여 AF488-mal의 라벨링 정도를 결정하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 C에 제시되어 있다.

[0947]

표 C

반응	환원 제제	DTT (당량 vs Ab)	DHAA (당량 vs DTT)	AF488- mal (당량 vs Ab)	Ab 당(per) AF488 라벨
1	DTT	5	1.5	10	1.3
2	DTT	10	1.5	10	1.6
3	DTT	20	1.5	10	1.4
4	TCEP	10	1.5	10	1.7
5	TCEP	15	1.5	10	1.8
6	TCEP	20	1.5	10	2.0
7	2-(디페닐포스피노)에틸아민	5	1.5	10	1.3
8	2-(디페닐포스피노)에틸아민	10	1.5	10	1.7
9	2-(디페닐포스피노)에틸아민	15	1.5	10	1.8
10	3-(디페닐포스피노)프로필아민	5	1.5	10	2.0
11	3-(디페닐포스피노)프로필아민	10	1.5	10	1.6
12	3-(디페닐포스피노)프로필아민	15	1.5	10	2.1

[0948]

산화 및 환원 제제 농도 및 DAR에 대한 영향

[0949]

DAR에 대한 영향에 있어서 DHAA 대 2-디페닐포스피노에틸아민의 비율을 조사하였다. 항-CD123 항체를 우선 50 mM의 인산칼륨염 완충액, pH 6.0에 희석시켰다. 이 용액에 항체 및 DMA에 대해 2-(디페닐포스피노)에틸아민의 적합한 수의 당량(mol:mol)을 첨가하여, 5 mg/mL의 항체 및 5%(v/v)의 DMA 최종 농도를 달성하였다. 이 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 단계가 완료되면, 환원된 항체의 분취량을 제거하고, pH 6.0 인산칼륨 완충액으로 희석하고, 그리고 2.5 mg/mL 항체 및 10%(v/v) DMA에서 AF488-mal 대비 항체 20 mol:mol 당량과 반응하도록 두었다. 라벨링 수준은 혼합물을 25°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 280 및 493 nm에서 SEC에 의해 모니터링하였다. 환원 용액의 나머지를 또한 50mM 완충제 농도를 유지하면서, pH 6.0 인산칼륨 완충제로 희석하였

[0950]

다. DMA 및 DHAA (DMA 스톱 용액으로써)를 표시된 몰비의 DHAA 대 환원 제제로 해당 반응물 첨가하였다. 재-산화 반응 혼합물의 최종 조성물은 표시된 수의 DHAA 당량 및 5%(v/v) DMA를 갖는 2.5 mg/mL 항체다. 이 용액을 25℃에서 18시간 동안 항온처리한 후, 콘주게이션 반응을 설정했다. 반응 혼합물을 50mM 완충제 농도를 유지하면서 pH 6.0 인산칼륨으로 희석하였다. 이 용액에 DMA 및 항체에 대하여 10몰 당량의 AF488-mal을 첨가하였다. 해당 콘주게이션 반응 혼합물의 최종 조성물은 2.0 mg/mL 항체, 10 몰 당량의 AF488-mal, 및 10% (v/v) DMA이었다. 이 반응 혼합물을 25℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 상기 반응이 완료될 때, SEC 크로마토그래피에서 상기 항체 (280 nm에서) 및 AF488-mal (280 및 493 nm에서)의 공지의 흡광 계수를 이용하여 AF488-mal의 라벨링 정도를 결정하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 D 및 도 1에 제시되어 있다.

[0951] 표 D

2-페닐포스포노 에틸아민의 당량	DAR(환원-후; 20 당량, AD488-Mal)
0	0.53
5	3.25
6	4.19
8	5.51
10	5.96
12	6.44
16	7.17

[0952]

[0953] 이들 데이터에서 2-(디페닐포스포노)에틸아민과 함께 효과적인 콘주게이션이 일어남을 나타낸다. 특히, 포스핀 당량이 증가함에 따라 AF-488 라벨링 정도가 더 높게 관찰되었다. 추가적으로, 1.0 내지 2.0 mol:mol 과량의 DHAA 대 포스핀에서 AF-488 라벨링에 유의한 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 항체의 천연 사슬간 이황화 결합의 완전한 재-산화를 나타낸다.

[0954] 항체 농도 연구

[0955] DAR에 대한 높은 항체 농도의 영향은 원-포트 콘주게이션 방법을 사용하여 평가되었다. 항-ADAM9 항체를 우선 50 mM의 인산칼륨염 완충액, pH 6.0에 희석시켰다. 이 용액에 항체 및 DMA에 대해 표시된 포스핀의 25 당량 (mol:mol)을 첨가하여, 10 mg/mL의 항체 및 5%(v/v)의 DMA 최종 농도를 달성하였다. 이 혼합물을 25℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 단계가 완료되면, 환원된 항체의 분취량을 제거하고, pH 6.0 인산칼륨 완충액으로 희석하고, 그리고 저농도 및 고농도 반응을 위해 4.0 또는 7.5 mg/mL 항체에서, 차례로, AF488-mal 대비 항체 25 mol:mol 당량과 10%(v/v) DMA이 반응하도록 두었다. 라벨링 수준은 혼합물을 25℃에서 4시간 동안 반응시킨 후 280 및 493 nm에서 SEC에 의해 모니터링하였다. 환원 용액의 나머지를 또한 50mM 완충제 농도를 유지하면서, pH 6.0 인산칼륨 완충제로 희석하였다. DMA 및 DHAA (DMA 스톱 용액으로써)를 1:1 몰비의 DHAA 대 환원 제제로 해당 반응물 첨가하였다. 재-산화 반응 혼합물의 최종 조성물은 4 또는 7.5 mg/mL 항체와 항체에 대해 25 mol:mol 당량의 DHAA 및 7.5% (v/v) DMA이었다. 이 용액을 25℃에서 18시간 동안 항온처리한 후, 콘주게이션 반응을 설정했다. 반응 혼합물을 50mM 완충제 농도를 유지하면서 pH 6.0 인산칼륨으로 희석하였다. 이 용액에 DMA 및 항체에 대하여 5몰 당량의 AF488-mal을 첨가하였다. 해당 콘주게이션 반응 혼합물의 최종 조성물은 저-농도 및 고-농도 반응에서 차례로 3.5 또는 7 mg/mL의 항체와 5 몰 당량의 AF488-mal, 그리고 10% (v/v) DMA이었다. 이 반응 혼합물을 25℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 상기 반응이 완료될 때, SEC 크로마토그래피에서 상기 항체 (280 nm에서) 및 AF488-mal (280 및 493 nm에서)의 공지의 흡광 계수를 이용하여 AF488-mal의 라벨링 정도를 결정하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 E에 제시되어 있다.

[0956] 표 E

반응	포스핀	환원 농도 (mg/mL)	재-산화 농도 (mg/mL)	콘주게이션 농도 (mg/mL)	환원 반응 후 AF488-mal 라벨링	최종 콘주게이션 의 AF488- mal 라벨링
1	TCEP	10	4	3.5	8.45	1.53
2	폴리스(하드캡시프로 필) 포스핀	10	4	3.5	9.72	1.88
3	폴리스(하드캡시프로 필) 포스핀	10	7.5	7	9.63	1.97
4	2-{디테닐포스포노} 에틸아민	10	4	3.5	8.76	1.93
5	2-{디테닐포스포노} 에틸아민	10	7.5	7	8.67	1.85
6	3-{디테닐포스포노} 프로필아민	10	4	3.5	9.37	1.94
7	3-{디테닐포스포노} 프로필아민	10	7.5	7	8.98	2.15
8	비스(3- 아미노프로필) 테닐포스핀	10	4	3.5	9.51	1.91
9	비스(3- 아미노프로필) 테닐포스핀	10	7.5	7	8.28	2.05

[0957]

[0958] 상이한 포스핀들을 사용하여, 저-농도 또는 고-농도에서의 환원, 재-산화 및 콘주게이션 후, 모든 반응은 항체 당 2.0개의 라벨의 목표에 접근하는 AF488-mal 라벨링을 나타내었다.

[0959]

TCEP 환원에서 시간 및 온도의 효과

[0960]

TCEP 환원에 있어서 시간 및 온도의 영향은 원-포트 콘주게이션 방법을 사용하여 조사되었다. 환원 반응은 pH 6.0에서 10mg/mL의 항-ADAM9 항체 농도, 5% DMA를 포함하는 25mM 숙신산염에서 수행되었다. 반응은 25 mol:mol 당량의 TCEP로 설정되었으며, 2, 4, 6, 8 또는 20 시간 동안 25°C, 30°C 또는 35°C에서 수행되었다. 재-산화 반응은 pH 6.0에서 7mg/mL의 항체 농도, 8% DMA를 포함하는 25mM 숙신산염에서 수행되었다. TCEP에 대해 1.5-배 과량의 DHAA로 반응을 설정하고, 25°C에서 16-20시간 동안 수행했다. 재-산화된 항체는 AF488-mal 페이로드와의 콘주게이션 반응 설정에 직접 사용되었다. 이들 콘주게이션 반응은 pH 6.0에서 5 mg/mL의 항체 농도, 10% DMA를 포함하는 25mM 숙신산염에서 수행되었다. AF488-mal의 5.0 mol:mol 당량으로 반응을 설정하고, 25°C에서 16-20 h 동안 수행했다. 각 AF488-mal 반응 종료 시, SEC를 통해 단량체 및 AF488-mal 라벨링 정도에 대해 샘플을 분석했다. 상기 항체 (280 nm에서) 및 AF488-mal (280 nm 및 493 nm에서)의 공지의 흡광 계수를 이용하여 AF488-mal 라벨링 정도를 결정하였다. 이들 반응의 상세는 표 F 및 도 2 및 도 3에 나타난다.

표 F

샘플	환원 시간 (h)	환원 온도 (C)	단량체 %	SEC DAR
1	2	25	96.30	1.53
2	4	25	97.44	1.86
3	6	25	97.74	1.92
4	8	25	98.20	2.05
5	20	25	97.13	2.28
6	2	30	97.32	1.75
7	4	30	98.17	2.01
8	6	30	98.41	2.13
9	8	30	98.46	2.19
10	20	30	93.36	2.34
11	2	35	97.79	1.97
12	4	35	98.45	2.18
13	6	35	94.81	2.24
14	8	35	93.51	2.29
15	20	35	85.99	2.42

이 연구는 TCEP 환원 반응 시간과 온도가 라벨링의 최종 콘쥬게이트 정도에 영향을 미친다는 것을 보여주는데, 가장 짧은 환원 시간은 AF488-mal의 라벨링 수준이 더 낮은 것으로 해석된다. 콘쥬게이트 안정성에 대한 추가적인 영향이 상승된 온도에서 관찰되었으며, 이때 콘쥬게이트의 단량체 %가 시간 함수로써 감소됨이 발견되었다.

TCEP 당량 스크리닝

원-포트 콘쥬게이션 방법 및 상기 항-ADAM9 항체를 이용하여, 시스테인 환원에 있어서 TCEP 농도 효과를 검사하였다. 환원 반응은 pH 6.0에서 10mg/mL의 항체 농도, 5% DMA를 포함하는 25mM 숙신산염에서 수행되었다. 이들 환원 반응 항체에 대해 8, 10, 15, 20 또는 25 당량의 TCEP로 설정되었으며, 25℃에서 8 시간 동안 실행되었다. 재-산화 반응은 TCEP에 대해 1.5-배 과량의 DHAA 존재 하에서 pH 6.0, 25mM 숙신산염에서 7mg/mL의 항체 농도, 8% DMA에서 25℃, 16-20 시간 동안 수행되었다. 재-산화된 항체 반응 혼합물을 직접 사용하여 AF-488Mal 라벨링으로 콘쥬게이션 반응을 설정하였다. 이들 콘쥬게이션 반응은 pH 6.0에서 5 mg/mL의 항체 농도, 10% DMA를 포함하는 25mM 숙신산염에서 수행되었다. 반응은 항체에 대해 5 몰 당량의 AF-488Mal로 설정되었으며, 25℃에서 16-20h 동안 수행되었다. 상기 반응 완료 시, 상기 항체 (280 nm에서) 및 AF488-mal (280 nm 및 493 nm에서)의 공지의 흡광 계수를 이용하여 SEC 크로마토그래피에 의해 AF488-mal 라벨링 정도를 결정하였다. 본 연구의 결과는 하기 표 G 및 도 4에 제시되어 있다.

표 G

샘플	TCEP 당량	환원 시간 (h)	SEC DAR
1	8	8	1.62
2	10	8	1.73
3	15	8	1.91
4	20	8	1.95
5	25	8	2.03

이러한 데이터는 최종 콘쥬게이트 페이로드 로딩이 포스핀의 몰 과량에 의존함을 나타낸다. pH 6.0에서 TCEP의 경우, 1.9 이상의 라벨링을 달성하려면 15 당량 또는 그 이상의 환원 제제가 필요하다.

실시예 2: TCEP 및 3-(디페닐포스피노) 프로필아민 (DPPA)을 이용한 원-포트 콘쥬게이션 공정 비교

이러한 실험은 항-ADAM9 항체를 사용하여 25 mg Ab 규모에서 TCEP를 사용한 pH 7.5에서의 환원 및 DPPA를 사용한 pH 6.0에서의 환원 효능을 확인하고, 비교하도록 설계되었다.

[0971] TCEP 원-포트 공정의 경우, 환원 반응은 5% DMA를 포함하는 pH 7.5, 50mM KPi에서 12mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. 상기 반응은 항체에 대해 27몰 당량의 TCEP로 설정하고, 25℃에서 4시간 동안 실행되었다. 이러한 환원된 항체를 재-산화 반응 설정에 이용하였는데, 이 반응은 7.5% DMA를 포함하는 pH 7.5, 50mM KPi에서 10mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. 재-산화 반응은 DHAA 대 TCEP의 1:1 몰비로 설정되었고, 25℃에서 4시간 동안 수행되었다. 상기 재-산화된 항체는 콘쥬게이션 전, 1 M 아세트산으로 6.0으로 pH 조정되었다. 상기 콘쥬게이션 반응은 15% DMA를 포함하는 pH 6.0, 50 mM KPi에서 8 mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. 상기 콘쥬게이션 반응은 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C로 설정되었으며, 25℃에서 8-12 시간 동안 실행되었다.

[0972] DPPA 원-포트 공정의 경우, 상기 환원 반응은 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 존재 하에서 5% DMA를 포함하는 pH 6.0, 25 mM 숙신산염에서 12 mg/mL의 항체 농도로 수행되며, 25℃에서 4 시간 동안 수행되었다. 이러한 환원된 항체를 재-산화 반응 설정에 이용하였는데, 이 반응은 7.5% DMA를 포함하는 pH 6.0, 25mM 숙신산염에서 10mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. 재-산화 반응은 DHAA 대 DPPA의 1:1 몰비로 설정되었고, 25℃에서 13시간 동안 수행되었다. 상기 콘쥬게이션 반응은 15% DMA를 포함하는 pH 6.0, 25 mM 숙신산염에서 8 mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. 상기 콘쥬게이션 반응은 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C로 설정되었으며, 25℃에서 8-12 시간 동안 실행되었다. 단량체 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 콘쥬게이트를 분석하였다. TCEP 및 DPPA를 이용한 원-포트 콘쥬게이션 공정의 결과는 표 H에서 상세하게 기술된다.

[0973] 표 H

샘플	환원 제제	환원 pH	재-산화 pH	콘쥬게이션 pH	포스핀 당량	단량체 %	SEC DAR
1	TCEP	7.5	7.5	6	27.17	98.0	1.82
2	DPPA	6	6	6	16.30	97.7	1.98

[0974]

[0975] 이 데이터는 기존 반응 설정의 결과를 뒷받침하는데, pH 6.0 DPPA 환원에 의한 콘쥬게이션은 pH 7.5 TCEP 환원에서의 콘쥬게이션 보다 더 높은 DAR 값을 초래함을 확인시켰다. 단량체 수준은 이 두 환원 조건에 대해 유사했으며, pH 7.5 TCEP 환원은 0.3% 더 높은 단량체 수준을 초래하였다.

[0976] 실시예 3: TCEP를 환원 제제로 사용한 원-포트 공정의 환원 반응 pH 스크리닝

[0977] 이 실험은 TCEP를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DM21-C 페이로드를 이용한 원-포트 공정에서 환원 반응 pH를 스크리닝하도록 기획되었다.

[0978] 새로 유입된 항-ADAM9 항체 용액 (10 mM 아세트산 나트륨 중 25 mg/mL 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)을 적합한 pH 200 mM 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염과 함께, pH 7.0, 8.0, 및 8.5의 상이한 pH 항체 스톡 용액을 준비하였다. 이들 항체 용액을 후속적으로 대응하는 pH 환원 반응의 설정에 이용하였다. 50 mM 인산 칼륨염 pH 7.0, 8.0, 또는 8.5 중 10 mg/mL 농도의 항체, 및 5% DMA에서 환원 반응을 수행하였다. 항체에 대해 27 몰 당량의 TCEP로 반응을 설정하였으며, 25℃에서 4 시간 동안 수행되었다. 1M 아세트산을 이용하여 상기 환원된 항체 용액의 pH를 6.0으로 조정하였으며, 그 다음 정제하지 않고 재-산화 반응을 설정하는데 이용하였으며, 이 반응은 8% DMA를 포함하는, pH 6.0, 50 mM 인산 칼륨염중 9 mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. TCEP에 대해 1.5-배 과량의 DHAA로 반응을 설정하고, 25℃에서 12-16 시간 동안 수행했다. 그 다음 상기 재-산화된 항체를 콘쥬게이션 반응의 설정에 직접 이용하였고, 이 반응은 15% DMA를 함유하는, pH 6.0, 50 mM 인산 칼륨염중 8 mg/mL 농도의 항체에서 수행되었다. 5.4 당량의 DM21-C로 반응을 설정하고, 25℃에서 8 시간 동안 수행하였다. 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 콘쥬게이트를 분석하였다.

[0979] 이 실험 결과는 표 I에 나와 있다. 특히, 이들 결과에서 pH를 7.0에서 8.5로 증가시킨 환원 반응은 최종 콘쥬게이트에 유의미적인 영향을 주지 않음을 나타낸다.

표 I

반응	환원 pH	재-산화 pH	콘쥬게이션 pH	단량체 %	SEC DAR
1	7.0	6.0	6.0	97.39	1.81
2	8.0	6.0	6.0	96.42	1.76
3	8.5	6.0	6.0	96.00	1.78

실시예 4: 항-ADAM9 약물 콘쥬게이트의 콘쥬게이션을 위한 원-포트 콘쥬게이션 공정 개발

pH 조정없이, pH 5.0에서 원-포트 공정

이 실험은 9% 수크로스를 함유하는 pH 5.0, 10 mM 아세트이트 완충액중 25 mg/mL 농도의 항-ADAM9 항체가 원-포트 프로세스에서 pH 조정없이, pH 5.0에서의 직접적인 콘쥬게이션에 적합한지를 결정하기 위해 기획되었다.

환원 반응은 pH 5, 10 mM 아세트이트 + 5% DMA와 함께 9% 수크로스 중 12 mg/mL 농도의 항체에서 수행되었다. 상기 항체에 대해 표시된 몰 과량의 DPPA로 반응을 설정하였으며, 25℃에서 10 시간 동안 수행되었다. 상기 환원된 항체를 정제하지 않고, 재-산화 반응에 이용하였으며, 이 반응은 pH 5.0, 10 mM 아세트이트 + 7.5% DMA 함유하는 9% 수크로스 중 10 mg/mL 항체에서 수행되었다. 반응은 DHAA 대 DPPA 포스핀의 1:1 몰 비율로 설정되었고, 25℃에서 12 시간 동안 수행되었다. 상기 재-산화된 항체를 정제하지 않고, DM21-C를 이용한 콘쥬게이션 반응의 설정에 이용하였다. 이들 콘쥬게이션 반응은 pH 5, 10 mM 아세트이트 + 15% DMA를 함유하는 9% 수크로스중 8 mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. 5.4 당량의 DM21-C로 반응을 설정하고, 25℃에서 12h 동안 수행하였다. 해당 콘쥬게이션 반응 종료시, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 샘플을 분석하였다.

이 실험 결과는 표 J에 나와 있다. 특히, 이들 결과는 DAR 2 콘쥬게이트를 준비하기 위해, 원-포트 공정 pH 5.0에서 환원 제제로 DPPA를 이용할 수 있음을 나타낸다.

표 J

반응	환원 제제	DPPA 당량	단량체 %	SEC DAR
1	DPPA	11	98.12	2.11
2	DPPA	16	97.54	2.07
3	DPPA	22	97.05	2.17
4	DPPA	27	95.72	2.26

DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 반응 온도 스크리닝

이 실험은 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DM21-C 페이로드를 이용한, 원-포트 공정을 위한 반응 온도를 스크리닝하도록 기획되었다.

모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세트이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.1 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 이 환원 반응은 표시된 온도에서 4 h 동안 진행되도록 하였다. 이 반응 온도는 원-포트 공정 동안 표시된 값에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 3.7 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘쥬게이션 반응 개시 전, 8h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 50 mM pH 6.5 인산 칼륨염으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 2.8 mg/mL 농도의 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 15%의 DMA 농도에서 8h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 표 K에 나와 있다. 이들 데이터를 기반으로, 원-포트 공정에서 18° ~ 27℃의 온도는 DAR 및 단량체 %에 영향을 주지 않는 것으로 밝혀졌다.

표 K

반응	온도 (C)	DAR (SEC)	단량체 %
1	27	1.97	98.46
2	25	1.96	98.47
3	23	1.98	98.46
4	21	2.00	98.45
5	22	2.04	98.52
6	20	2.01	98.44
7	18	2.02	98.56

DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 pH 스크리닝

이 실험은 25℃에서 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DM21-C 페이로드를 이용한, 원-포트 공정을 위한 반응 pH를 스크리닝하도록 기획되었다.

모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 표시된 pH의 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.1 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 이 환원 반응은 4 h 동안 진행되도록 하였다. 이 반응 pH는 pH 조정없이, 원-포트 공정 동안 표시된 값에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 3.7 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. 적합한 pH의 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘주게이션 반응 개시 전, 8h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 적합한 pH의 50 mM 인산 칼륨염으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 2.8 mg/mL 농도의 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 15%의 DMA 농도에서 8h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 표 L에 나와 있다.

표 L

반응	pH	DAR (SEC)	단량체 %
1	6.6	1.98	98.43
2	6.5	1.96	98.47
3	6.4	1.99	98.47
4	6.3	1.99	98.53

DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 포스핀 농도 스크리닝

이 실험은 25℃에서 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DM21-C 페이로드를 이용한, 원-포트 공정을 위한 포스핀의 양을 스크리닝하도록 기획되었다.

모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.1 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 표시된 수의 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 4 h 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 3.7 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘주게이션 반응 개시 전, 8h 동안 진행되도록 하였다. 추가

적으로 50 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 2.8 mg/mL 농도의 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 15%의 DMA 농도에서 8h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 표 M에 나와 있다.

표 M

반응	DPPA 당량	DAR (SEC)	단량체 %
1	19	2.03	98.44
2	16	1.96	98.47
3	14	1.95	98.43

DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 DHAA 산화 제제 농도 스크리닝

이 실험은 25℃에서 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DM21-C 페이로드를 이용한, 원-포트 공정을 위한 DHAA 산화 제제의 양을 스크리닝하도록 기획되었다.

모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.1 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 4 h 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 표수된 배수 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 3.7 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘주게이션 반응 개시 전, 8h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 50 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 2.8 mg/mL 농도의 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 15%의 DMA 농도에서 8h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 표 N에 나와 있다.

표 N

반응	DHAA 당량 (DPPA 대비)	DAR (SEC)	단량체 %
1	1.7	1.96	98.43
2	1.5	1.96	98.47
3	1.4	1.98	98.43

DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 페이로드 농도 스크리닝

이 실험은 25℃에서 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체를 이용한, 원-포트 공정을 위한 DM21-C 페이로드의 필요한 양을 스크리닝하도록 기획되었다.

모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.1 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 4 h 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 3.7 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘주게이션 반응 개시 전, 8h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 50 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 2.8 mg/mL 농도의 항체에 대해

표시된 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 15%의 DMA 농도에서 8h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 표 0에 나와 있다.

표 0

반응	DM21-C 당량 (Ab 대비)	DAR (SEC)	단량체 %
1	5.4	1.96	98.47
2	5.2	1.94	98.48
3	5.0	1.93	98.50
4	4.8	1.96	98.45
5	4.6	1.93	98.46
6	4.3	1.93	98.44
7	4.1	1.92	98.40
8	3.9	2.00	98.52
9	3.7	2.01	98.47
10	3.5	2.01	98.44

DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 콘쥬게이션 반응 시간 스크리닝

이 실험은 25℃에서 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체를 이용한, 원-포트 공정을 위한 콘쥬게이션 반응 시간을 스크리닝하도록 기획되었다.

이 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세트이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.1 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 4 h 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 이 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 3.7 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘쥬게이션 반응 개시 전, 8h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 50 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 2.8 mg/mL 농도의 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 콘쥬게이션 반응을 위한 최종 DMA 농도는 15%이다. 반응 공정은 1.5 ~ 10.5 h 동안 기구 샘플 챔버 안에서 25℃에서 유지된 반응물의 반복 SEC 크로마토그래피 반응에 의해 모니터링되었다. SEC 단량체 % 및 콘쥬게이트 DAR 데이터를 수집하고, 하기 표 P에 요약하였다.

[1017] 표 P

반응	콘쥬게이션 시간 (h)	DAR (SEC)	단량체 %
1	1.5	1.86	98.58
2	2.5	1.90	98.56
3	3.5	1.93	98.50
4	4.5	1.91	98.52
5	5.5	1.93	98.51
6	6.5	1.95	98.54
7	7.5	1.97	98.53
8	8.5	1.96	98.50
9	9.5	1.95	98.47
10	10.5	1.94	98.46

[1018]

[1019] DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 유기 공-용매 조건 스크리닝

[1020] 이 실험은 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DHAA 산화 제제를 이용하여 25℃의 항온에서 원-포트 공정의 최종 콘쥬게이션 단계 동안 유기 공-용매 함량 %를 스크리닝하도록 기획되었다.

[1021] 모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 50 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.1 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 4 h 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 3.7 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘쥬게이션 반응 개시 전, 8h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 50 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 2.8 mg/mL 농도의 항체에 대해 5.4 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 표시된 최종 DMA 농도에서 8h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 하기 표 Q에 나와 있다.

[1022] 표 Q

반응	콘쥬게이션 반응 DMA 함량 (%)	DAR (SEC)	단량체 %
1	16	1.97	98.44
2	15	1.96	98.47
3	13	1.98	98.48
4	12	1.97	98.47
5	11	1.97	98.47
6	10	1.96	98.46
7	9	1.96	98.46

[1023]

[1024] DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 환원 반응 시간 스크리닝

[1025] 이 실험은 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DHAA 산화 제제를 이용하여 23℃의 항온에서 원-포

트 공정에서 환원 반응 단계에 필요한 시간을 스크리닝하도록 기획되었다.

[1026] 모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 30 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.5 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 1 ~ 5 h 이내 표시된 시간 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 4.0 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘주게이션 반응 개시 전, 6h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 30 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 3.5 mg/mL 농도의 항체에 대해 4.6 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 10%의 DMA 농도에서 13h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 하기 표 R에 나와 있다.

[1027] 표 R

반응	환원 시간 (h)	DAR (SEC)	단량체 %
1	1	1.96	98.74
2	2	1.97	98.73
3	3	2.00	98.66
4	4	2.05	98.70
5	5	2.03	98.65

[1028] DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 재-산화 반응 시간 스크리닝

[1029]

[1030] 이 실험은 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DHAA 산화 제제를 이용하여 23℃의 항온에서 원-포트 공정에서 재-산화 반응 단계에 필요한 시간을 스크리닝하도록 기획되었다.

[1031] 모든 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 30 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.5 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이들 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 4 h 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5-배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 4.0 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘주게이션 반응 개시 전, 1 ~ 7 h 사이의 표시된 시간 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 30 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 3.5 mg/mL 농도의 항체에 대해 4.6 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 10%의 DMA 농도에서 13h 동안 반응시킨 후, 단량체 % 및 DAR에 대해 SEC를 통하여 미가공 반응 혼합물을 분석하였다. 이들 실험 결과는 하기 표 S에 나와 있다.

표 S

반응	재-산화 시간 (h)	DAR (SEC)	단량체 %
1	1	2.02	98.69
2	2	2.05	97.88
3	3	2.03	98.65
4	4	2.01	98.08
5	5	1.97	98.09
6	6	1.98	98.61
7	7	1.96	98.65

DPPA를 이용한 원-포트 공정에 대한 스케일-업(scale up) 조건

이 실험은 DPPA를 환원 제제로 이용하고, 항-ADAM9 항체, 및 DHAA 산화 제제를 이용하여 23℃의 항온에서 1.2g 항체 규모에서 원-포트 반응 공정의 수행능을 테스트하도록 기획되었다.

이 반응의 경우, 새로 유입된 항-ADAM9 항체 (10 mM 아세테이트 나트륨 중 ~25 mg/mL 농도의 항체, pH 5.0, 9% 수크로스)를 pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시켜, 최종 농도 30 mM의 인산 칼륨염 완충액을 제공하였다. 후속적으로 최종 농도 4.5 mg/mL의 항체에서 환원 반응을 설정하는데 이 항체 용액을 이용하였다. 해당 항체에 대해 16 몰 당량의 DPPA 포스핀을 최종 5%의 DMA 공-용매 농도를 갖는 항체 용액에 추가하였다. 상기 환원 반응은 5 h 동안 진행되도록 하였으며, pH 조정없는 원-포트 공정 동안 이 반응 pH는 6.5에서 유지시켰다. 그 다음 상기 환원된 항체 용액을 정제하지 않고 재-산화 반응의 설정에 이용하였다. 재-산화 반응은 DPPA에 대해 1.5배 몰 과량의 DHAA 산화 제제 및 7%의 최종 DMA 공-용매 농도에서, 4.0 mg/mL의 최종 항체 농도에서 수행되었다. pH 6.5 인산 칼륨염 스톱 완충액을 해당 반응의 희석에 이용하여 목표로 하는 항체 농도를 얻었다. 상기 재-산화 반응은 해당 콘쥬게이션 반응 개시 전, 6h 동안 진행되도록 하였다. 추가적으로 30 mM pH 6.5 인산 칼륨염 완충액으로 희석시킨 후, 상기 재-산화된 항체 용액에 3.5 mg/mL 농도의 항체에 대해 4.6 몰 당량의 DM21-C를 추가하였다. 최종 10%의 DMA 농도에서 12h 동안 반응시킨 후, 미가공 반응 혼합물을 정제하고, 제형화시켰다. 상기 반응 종료시, 0.5/0.2 um의 듀얼 층 폴리에테르술폰 필터를 이용하여 균질한 반응 혼합물을 우선 여과시켰다. 여과 후, 상기 반응 혼합물은 9 w/v% 수크로스를 함유하는 10 mM 숙신산 나트륨염, pH 4.7 완충액에 대해 14 디아볼륨(diavolumes)으로 TFF를 통하여 정제시켰다. 회수 후, 상기 완충제 교환된 콘쥬게이트를 0.5/0.2 um 듀얼 층 폴리에테르술폰 필터를 통하여 여과시키고, 그리고 10 mM 숙신산 나트륨염, pH 4.7과 9 w/v% 수크로스 및 0.01% 폴리소르베이트-20중 최종 농도 7 mg/mL의 콘쥬게이트로 제형화시켰다. 1.2g 등급(scale)에서 공정의 전체 수율은 93%였다. 최종 콘쥬게이트의 SEC 크로마토그래피를 이용하여, 단량체 %는 98.71%, DAR은 1.99로 측정되었다.

실시예 5: DPPA를 이용한 원-포트 콘쥬게이션 공정과, TCEP를 이용한 다-단계 공정의 비교

500mg 항체 규모에서 다-단계 공정의 경우, 환원은 37℃에서 1시간 동안 10 mg/mL 항-ADAM9 항체 및 50mM pH 7.6 인산 칼륨염 환원 완충액 중 항체에 대해 27(mol:mol) 당량의 TCEP에서 수행되었다. 환원 후, TFF는 잔류 포스핀, 산화 포스핀 및 캡핑 분자를 함유하는 소분자 티올을 제거하기 위해, 10 디아볼륨에 대해 50mM pH 7.6 인산 칼륨염 완충액에 대해 투석여과를 수행했다. 이러한 정제된, 환원된 항체는 추가 처리 없이, 선택적 재-산화 반응물을 준비하는데 이용하였다. 7 mg/mL의 최종 항체 농도에서, 항체에 대해 15 (mol:mol) 당량의 DHAA, 그리고 1 % (v/v) DMA를 이용하여 4 h 동안 25℃에서 재-산화를 수행하였다. 4℃에서 하룻밤 동안 재-산화된 반응 용액을 유지한 후, DM21-C를 이용한 콘쥬게이션 반응은 상기 재-산화된 항체 용액의 임의의 추가적인 가중없이 준비되었다. 50 mM pH 7.6 인산 칼륨염 중 6 mg/mL의 최종 항체 농도에서, 해당 항체에 대해 4.4 (mol:mol) 당량의 DM21-C 페이로드 및 10 % (v/v) DMA를 이용하여 25 C에서 18 h 동안 콘쥬게이션을 실행하였다. 콘쥬게이션 후, 상기 미가공 반응 혼합물을 12 디아볼륨에 대해 9% (w/v) 수크로스를 함유하는 10 mM 숙신산 나트륨염, pH 5.0 완충액으로 정용여과를 통하여 TFF에 의해 정제시켰다.

500 mg 항체 규모의 원-포트 공정에서, 12 mg/mL의 항-ADAM9 항체와 해당 항체에 대해 25 mM pH 6.0 숙신산 나트륨염 완충액중 16 (mol:mol) 당량의 3-(디페닐포스피노)프로필아민 (DPPA), 그리고 5 % (v/v) DMA를 이용하여 25℃에서 4 h 동안 환원을 수행하였다. 그 다음, 미가공 환원된 항체 용액을 정제하지 않고, 선택적 재-산화 반

응으로 가져왔다. 10 mg/mL 항체와 해당 항체에 대해 16 (mol:mol) 당량의 DHAA, 그리고 7.5% (v/v) DMA를 이용하여 25°C에서 23 h 동안 재-산화를 수행하였다. 그 다음, 미가공 재-산화된 항체 용액을 정제하지 않고, 콘주게이션 반응으로 가져왔다. 25 mM pH 6.0 속신산 나트륨염 완충액 중 최종 항체 농도 8 mg/mL 및 해당 항체에 대해 5.4 (mol:mol) 당량의 DM21-C를 이용하여 25°C에서 20 h 동안 콘주게이션을 실행하였다. 콘주게이션 후, 상기 미가공 반응 혼합물을 12 디아볼륨에 대해 9% (w/v) 수크로스를 함유하는 10 mM 속신산 나트륨염, pH 5.0 완충액으로 정용여과를 통하여 TFF에 의해 정제시켰다.

두 반응의 단량체 및 DAR 값은 최종 콘주게이트의 SEC 크로마토그래피에 의해 결정되었다. DAR 값은 280 nm에서 항체의 흡광 계수, 항체의 252 ~ 280 nm 흡광도 비율, 그리고 252 nm에서 페이로드 흡광 계수를 사용하여 계산되었다. 본 연구의 결과는 표 T에 제시되어 있다.

표 T

반응	단량체 %	SEC DAR
다-단계 TCEP 공정	86.2	1.7
원-포트 DPPA 공정	98.2	1.9

실시예 6: 연속 원-포트 콘주게이션 공정

원-포트 공정에 대해 엔드-투-엔드(end-to-end) 통합된 연속 제조 실행이 시연되었다. 본 연구에는 G4723A 항체가 이용되었다. 시연된 것은 원-포트 연속 공정을 스케일-업하기 위한 개념 증명으로써, 연속-교반 탱크 반응기(CSTRs)와 플러그 유동 반응기(PFRs)를 통합하도록 설계되었다.

CSTR과 PFR을 시리즈로 사용하는 이점은 전체 필요 부피를 줄이고, 반응물 스트림 간의 혼합을 개선시켜, 더 방대한 체류 시간 분포를 비롯한, 위험 완화 기능을 증가시킨다는 점이다. 각 반응 단계 (환원, 재-산화, 및 콘주게이션)에서 CSTR 및 PFR의 경우 반응 부피를 결정하였다. 각 반응에 대한 동역학 데이터가 생성되고, 각 반응에 대한 원하는 표적 전환이 명시된다. 이러한 결과를 기반으로, 각 반응에 대한 CSTR 및 PFR 부피는 사용된 튜브의 내부 직경과 각 반응 단계에서 원하는 체류 시간 달성에 필요한 부피 유량을 기준으로 지정된다. 연속적 원-포트 콘주게이션 공정에 대한 반응 도식은 도 5에 나타난다.

우선, 50 mg/mL에서 제형화된 G4723A 항체를 30 mM 인산 칼륨염 pH 6.5을 이용하여 목표로 하는 환원 반응 농도 4 mg/mL로 희석시켰다. 이 공급물 스트림은 연동 펌프를 통해 환원 CSTR로 공급된다. 동시에, DMA에서 8.77mM으로 제조된 DPPA 스톱 용액은 주사기 펌프에 의해 환원 CSTR로 공급된다. 이들 두 공급물 스트림의 체적 유량은 환원 반응이 16배 몰 과량의 DPPA:Ab와 함께 4.0 mg/mL 농도를 달성하도록 설정된다. 추가적으로, 환원 반응에서 DMA의 부피 농도는 5%(v/v)이다.

연동 펌프를 사용하여 환원 반응 CSTR(Ab 및 DPPA 공급 스트림으로 구성됨)로의 결합된 유속과 동일한 체적 유속으로 환원 반응 CSTR로부터 물질을 회수했다. 평형-상태(steady-state) 작업을 위한 환원 반응 CSTR의 액체 수준과 체류 시간을 일정하게 유지하기 위해, CSTR로의 유입 및 유출 유속을 일치시켰다. 환원 반응 CSTR로부터 추출된 물질은 환원 PFR을 통해 공급되었다. PFR에 대한 튜브의 길이는 목표로 하는 반응 전환율을 기반으로 결정되었다. 목표 전환은 체류 시간 설정에 사용되었으며, PFR을 통한 총 체적 유량은 PFR 반응기의 고정 길이를 설정하기 위해 결정되었다. 환원 PFR을 온도-조절된 수조에 넣어, 반응 온도가 전체적으로 일정하도록 하였다.

환원 PFR은 연동 펌프에 의해 환원 CSTR 반응기 밖으로 배출되는 물질과 동일한 체적 유량으로 재-산화 CSTR에 직접 공급되었다. 이 공급 스트림은 주사기 펌프에 의해 재산화 CSTR에도 공급된 DMA에서 제조된 DHAA 스톱 용액과 혼합되었다. DHAA 스톱 용액을 DMA에서 55mM으로 제조하고, 재-산화 반응에 대한 최종 반응 매개변수가 다음과 같이 되도록 반응기에 공급하였다: 3.9 mg/mL의 항체 농도, 24-배 몰 과량의 DHAA:Ab, 그리고 6.5 % DMA (v/v).

재-산화 CSTR로의 두 공급물 스트림의 결합된 유속을 결정하고, 동일한 유속에서 재-산화 CSTR로부터 물질 제거에 사용되는 추가 연동 펌프의 체적 유속 설정에 사용했다. 환원 CSTR과 유사하게, 액체 수준과 체류 시간이 평형-상태 작업 동안 일정하도록 CSTR로의 유입 및 유출 유속이 선택되었다. 재-산화 CSTR로부터 펌프에 의해 제거되는 물질은 재-산화 PFR로 직접 공급되었다. 재산화 반응 PFR 설계 접근 방식은 이전에 논의된 환원 PFR과 동일했다. 동역학 데이터를 기반으로 하는 원하는 반응 전환율은 반응 체류 시간을 설정한다. 재-산화 반응을

통한 체적 유량과 결합된 이 체류 시간을 사용하여 PFR 설계 기준을 계산했다. 재-산화 PFR도 온도-조절되는 수조에 (환원 PFR과 유사) 넣었다.

[1050] 재-산화 반응 PFR의 배출물은 콘쥬게이션 CSTR로 직접 공급되었다. DM21-C 스톱 용액을 DMA에서 3.20mM로 제조하고, 주사기 펌프에 의해 접합 CSTR로 첨가하였다. 2개의 유입 스트림을 CSTR에서 혼합하여, 최종 반응 조건을 3.8 mg/mL의 항체 농도, 4.6 몰 과량의 DM21:Ab 및 10% DMA(v/v)로 만들었다. 연동 펌프는 재-산화 반응과 DM21-C 스톱 용액의 결합된 체적 유량에서 접합 반응 혼합물을 제거했다. 이 연동 펌프는 유속을 일치시켜, 용기에서 액체 수준을 유지시키고, 콘쥬게이션 반응 PFR로 직접 공급되었다. 콘쥬게이션 반응 PFR은 동역학 반응 데이터를 기반으로 하는 반응 전환을 목표로 했다. 이 목표 변환은 체류 시간 정의에 사용되었다. 콘쥬게이션의 체류 시간 및 체적 유량은 접합 PFR 조건 정의에 사용되었다. 환원 및 재-산화 PFR과 유사하게, 콘쥬게이션 반응 PFR은 온도-조절된 수조에 담겼다.

[1051] 상기 콘쥬게이션 반응 PFR은 정제안된 콘쥬게이션 반응 혼합물을 용리시켰다. 이 스트림은 역류(counter-current) TFF 정제 단위로 공급되었다. 유입되는 미가공 반응물은 대략적으로 3.8 mg/mL 및 10% DMA (v/v)의 농도이었다. 정용여과 완충액 (10 mM 숙신산 나트륨염, 9 % (w/v) 수크로스, pH 4.7)의 스트림은 유입된 정제안된 콘쥬게이트 반응 혼합물과 복합되어, 유입되는 공급물 스트림을 희석시킨다. 이 공급물 스트림을 도 6에 도시된 바와 같이, 모듈 2로부터의 투과액 스트림과 복합되어, 모듈 1에 대한 콘쥬게이트의 공급물 농도를 추가로 희석시켰다. 모듈 1 및 모듈 2의 경우, Pall Cadence 인-라인 농축기 (ILC) 막이 이용되었다.

[1052] 모듈 1의 잔류액은 모듈 2로 직접 공급되었다. DF 완충액의 추가 공급물은 모듈 2로의 유입구 앞에서 모듈 1의 잔류물과 복합되었다. 모듈 1의 투과액은 폐기를 위해 폐기물로 보내졌다. 모듈 2의 잔류액으로부터 정제된 콘쥬게이트를 회수하였다. 모듈 2의 투과액은 재순환되고, 위에서 설명한대로 모듈 1에 대한 공급물과 복합되었다 (도 6 참고). 이 역류 설정은 미가공 반응 혼합물에서 불순물을 효과적으로 제거하고, 콘쥬게이트를 DF 완충액으로 완충액-교환된다. 역류 TFF 정제 동안, 페이로드 불순물의 제거를 보장하기 위해, 사전-TFF 및 정제된 샘플을 유리(free) 약물 방법으로 특성화했다. 결과는 두 장치에 걸쳐 유입되는 정제안된 공급물 스트림에서 불순물을 매우 효과적으로 제거함을 보여줍니다(>99%). 연속 실행 및 배취 대조군에 대한 최종 정제된 콘쥬게이트에 대한 결과는 표 S에 나와 있다.

[1053] 표 S: 통합된 DS 제조 운용을 위한 산물 품질 요약

산물 품질 속성	연속 콘쥬게이션 (역류 TFF)	배취 대조군 (정제된 NAP)
HMW (% SEC 로 측정)	0.3	0.3
단량체 (% SEC 로 측정)	99.7	99.7
유리 약물 제거 (%)	99.89	N/A
정제된 유리 약물 (ug/mL)	<LOQ	N/A
DAR (UV 로 측정)	1.95	N/A
DAR (SEC-MS 로 측정)	1.9	N/A
미가공 반응 DAR (SEC 로 측정)	2.0	2.1
HL (% Gel Chip 으로 측정)	3	4
H2L2 (% Gel Chip 으로 측정)	81	82

[1054]

실시예 7.비활성 대기 하에서 원-포트 콘쥬게이션 공정

[1055]

[1056] GMP 제조 중 예상 조건을 더 잘 모방하기 위해, N₂ 퍼지된-시스템에서 전체 원-포트 콘쥬게이션 공정을 수행하는 것의 영향을 테스트한다. 환원 및 재-산화 반응의 성능은 N₂ 및 정상적인 대기 하에서 동일한 반응을 비교하여 테스트된다. 환원은 5% DMA를 포함하는 pH 6.5, 30 mL 인산 칼륨염 중 4.5 mg/mL의 항체 농도에서 수행되었다. 상기 반응은 16몰 당량의 DPPA로 설정하고, 23 °C에서 5시간 동안 실행되었다. 재-산화는 7% DMA를 포함하는 pH 6.5, 30 mM 인산 칼륨염중 4.0 mg/mL의 항체 농도에서 실행되었다. 상기 반응은 24몰 당량의 DHAA로 설정하고, 23 °C에서 6시간 동안 실행되었다. 콘쥬게이션은 10% DMA를 포함하는 pH 6.5, 30 mM 인산 칼륨염중 3.5

mg/mL의 항체 농도에서 실행되었다. 상기 반응은 4.6몰 당량의 DM21-C로 설정하고, 23 °C에서 12시간 동안 실행되었다. 175mg 규모의 두 반응은 EasyMax 시스템에서 내부 온도를 23.0°C로 제어하고, 오버헤드 혼합을 70rpm으로 설정되었다. 한 반응의 헤드스페이스로 실험 기간 동안 N₂가 지속적으로 퍼지되었다. 추가적으로, 이 반응을 위해, 물 및 30mM 인산칼륨 완충 용액을 반응에 첨가하기 전, 15-30분 동안 N₂로 버블링하였다.

[1057] 표 T에서 볼 수 있듯이, 질소 퍼지된 시스템에서 반응을 실행하는 것과 권주게이션 반응 용기를 대기에 개방된 상태로 두는 것 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 질소 하에 실행된 반응에 대한 모든 분석 데이터(SEC 단량체, SEC DAR, HIC DAR, GelChip)는 동일한 원료를 사용한 대조군 및 기존의 스케일-업 실행과 일치한다.

[1058] 표 T. 산물 품질에 대한 요약

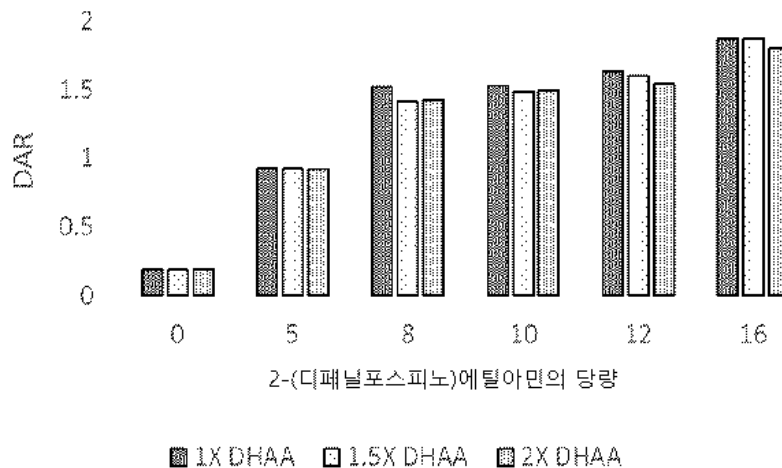
	N ₂ Rxn (미가공)	대기 Rxn (미가공)	기존의 스케일-업 실행*
SEC DAR	2.04	2.01	2.04
HIC DAR	1.98	1.97	1.98
단량체 %	98.35	98.35	98.71
HMW %	1.47	1.54	1.22
LMW %	0.18	0.11	0.07
D0 %	발견되지 않음	발견되지 않음	0.02
D1 %	2.56	2.96	2.82
D2 %	97.32	97.04	96.90
D4 %	0.12	발견되지 않음	0.26
H1 %	6.18	5.14	5.84
H2L2 %	78.36	80.92	78.54
전체적인 수율 %	NA	NA	93.60

* 기존의 스케일-업 실행은 여기에 설명된 반응과 동일한 Ab 로트, DPPA 및 페이로드 로트를 사용한다.

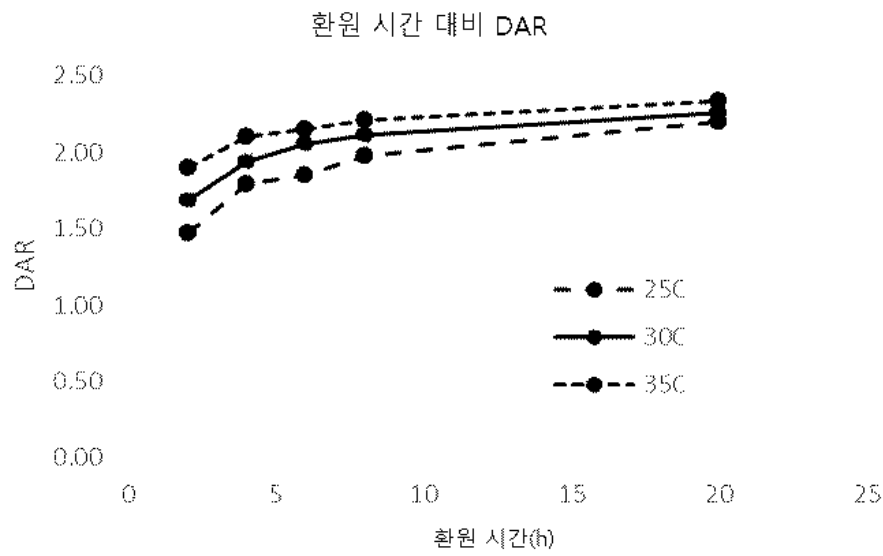
[1059]

도면

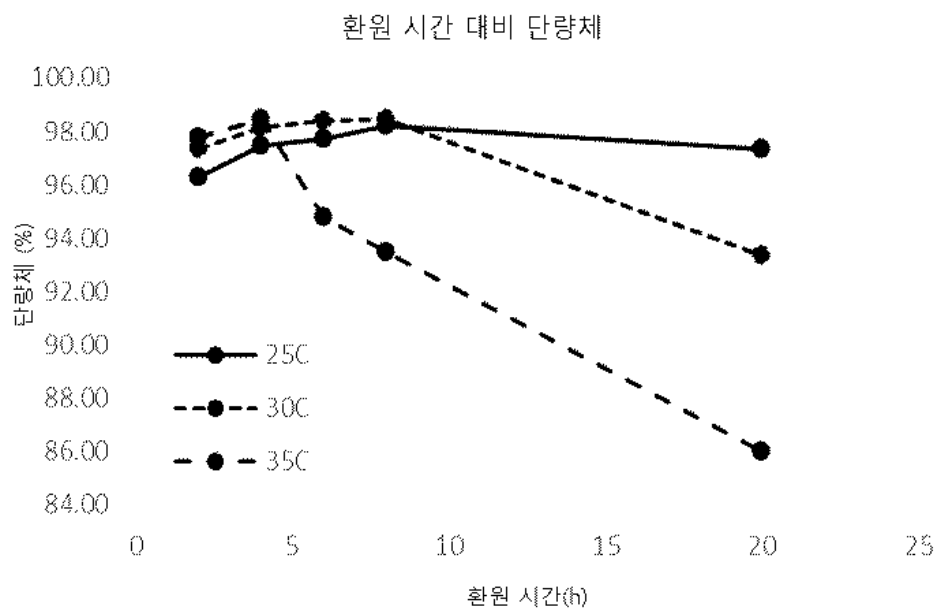
도면1



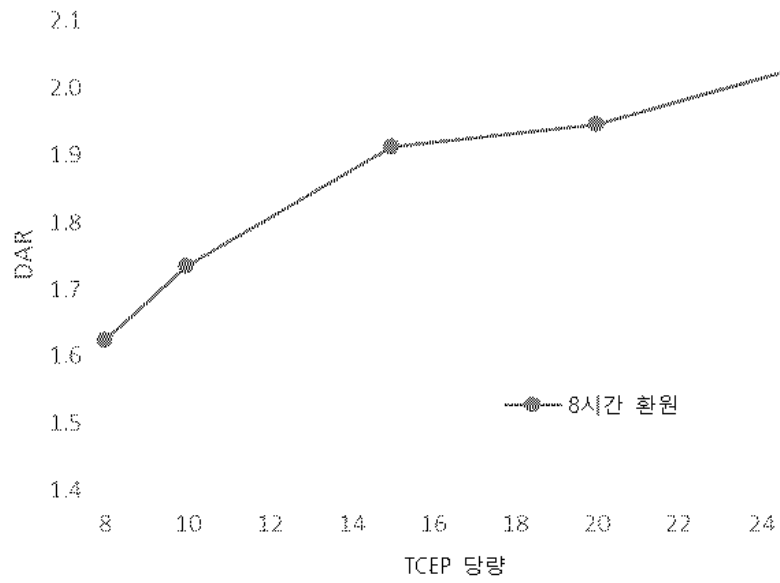
도면2



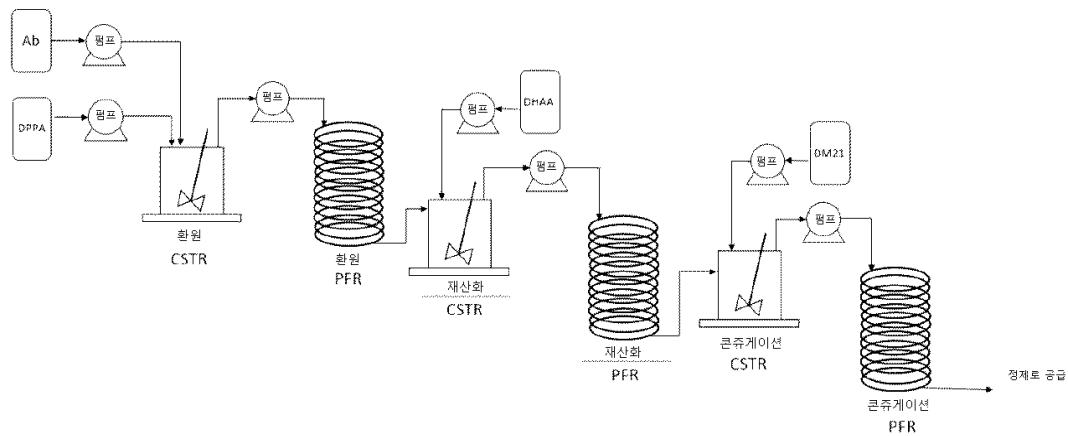
도면3



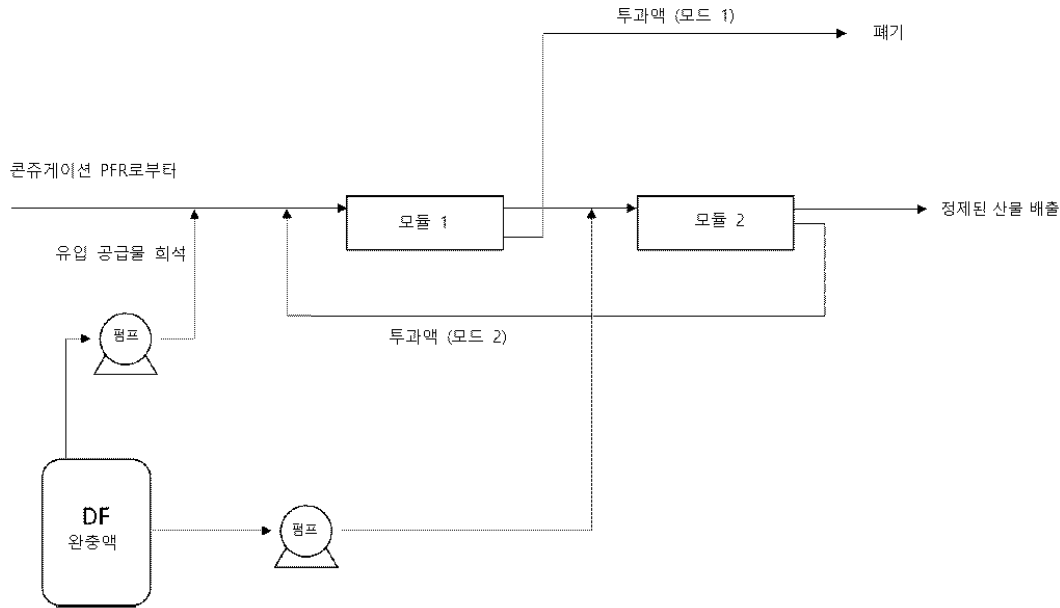
도면4



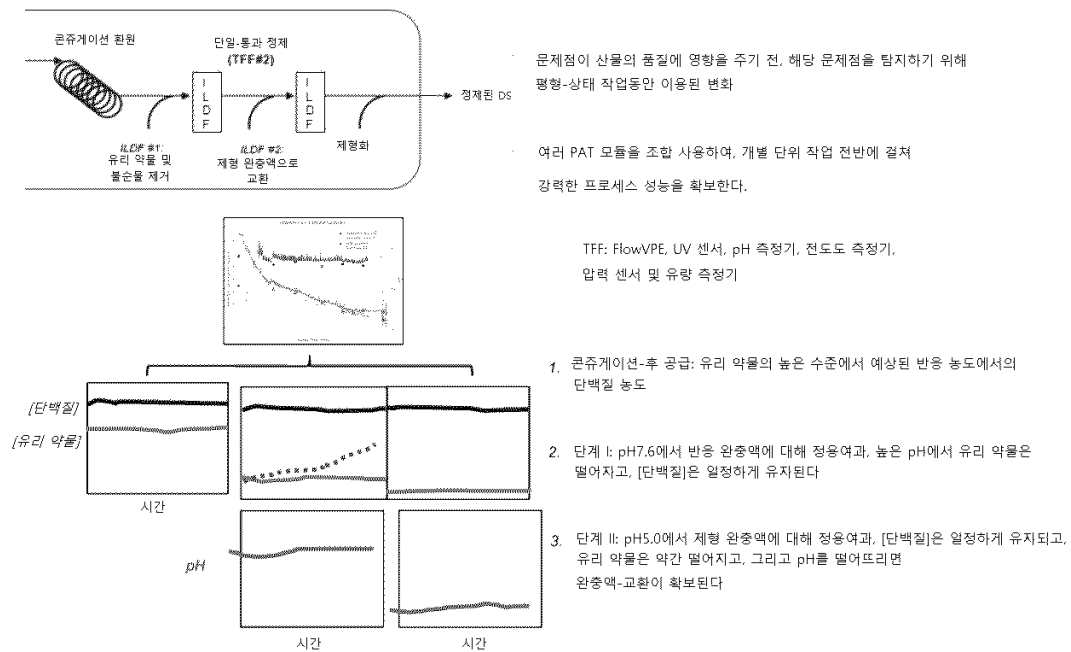
도면5



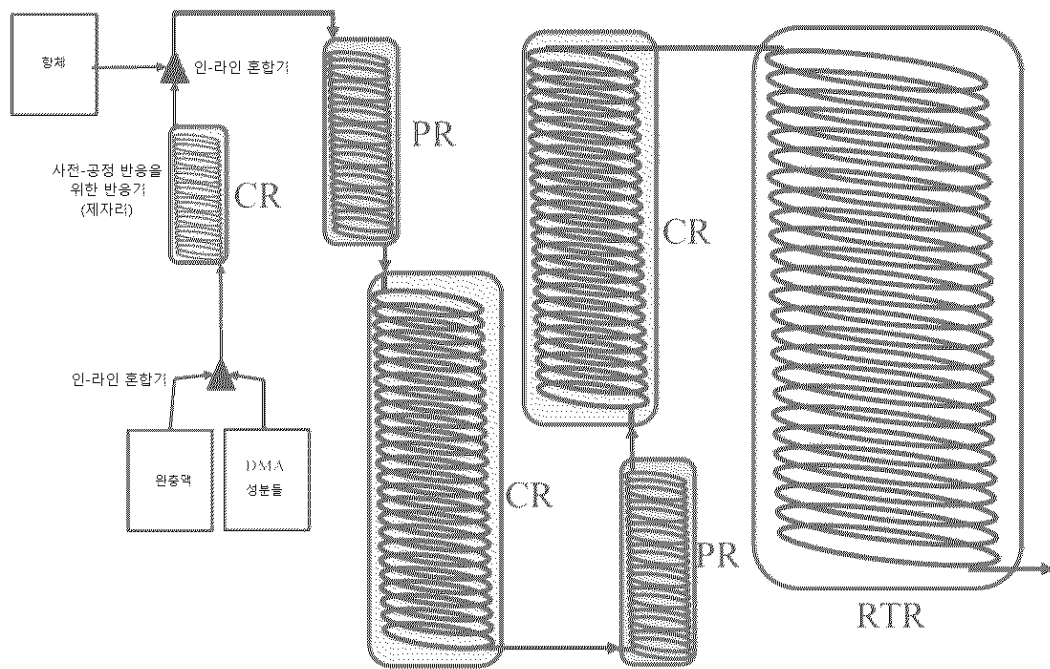
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNOGEN, INC.

<120> METHODS OF PREPARING CELL-BINDING AGENT-DRUG CONJUGATES

<130> 128037-00820

<140> PCT/US2020/023897

<141> 2020-03-20

<150> 62/856,942

<151> 2019-06-04

<150> 62/821,707

<151> 2019-03-21

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 2

Arg Val Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 3

Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 4

Ser Ser Ile Met His

1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 5
 Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 6
 Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95	
Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly			
100	105	110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
115	120	125	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
130	135	140	
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
165	170	175	
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
180	185	190	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
195	200	205	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
210	215	220	
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
225	230	235	240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
245	250	255	
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
260	265	270	
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
275	280	285	
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
290	295	300	
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
305	310	315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
325	330	335	

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser

435 440 445

Pro Gly

450

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

100 105

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 10

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

35 40 45
Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 12

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 13

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 13
 His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 14
 Ser Tyr Tyr Ile His
 1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 15
 Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15
 Gly

<210> 16
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

```

<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

        polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (443)..(443)
<223> /replace="Cys"
<220><221> SITE
<222> (1)..(447)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
        preference with respect to those in the annotations
        for variant positions"
<400> 18
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
        20           25           30

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

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val 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
 435 440 445

<210> 19

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 19

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

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

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 20

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

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

1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser

20 25 30
Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

35 40 45
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95
Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

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

195

200

205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1

5

10

15

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser

1

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Phe Thr

1 5
 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
 <400> 24
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5
 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
 <400> 25
 Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser

<210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
 <400> 26
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 27

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 28

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

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

65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85 90 95
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 29

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 29

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

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

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

 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys

435 440 445

Leu Ser Pro Gly

450

<210> 30

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 30

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser

20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400
 > 31

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32

Gln Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 33

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Asn Thr

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 34

Asn Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 35

Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 36

Asp Gly Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 37

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

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

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 38

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

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

100 105 110

<210> 39

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (441)..(441)

<223> /replace="Cys"

<220><221> SITE

<222> (1)..(445)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Tyr Ile Gln Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115	120	125	
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
130	135	140	
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
210	215	220	
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
245	250	255	
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
260	265	270	
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
275	280	285	
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
290	295	300	
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
305	310	315	320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
325	330	335	
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro			
340	345	350	
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val			
355	360	365	

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 40

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 40

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

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

1 5 10 15

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 45

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

1 5 10 15

Gly

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 46
 Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr

1 5
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 47
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn

1 5 10
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 48
 Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe

1 5 10

<210> 49
 <211> 118
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 49

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

115

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 50

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> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 51

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

<210> 52
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide"
<220><221> VARIANT
<222> (443)..(443)
<223> /replace="Ser"
<220><221> VARIANT
<222> (448)..(448)
<223> /replace=" "
<220><221> SITE
<222> (1)..(448)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
      preference with respect to those in the annotations

      for variant positions"
<400> 52
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 Cys Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 53

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 53

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 54

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 54

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
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 55
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 55
 Ala Leu Ala Leu
 1
 <210> 56

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Beta-Ala
 <400> 56
 Xaa Leu Ala Leu

1
 <210> 57
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 57
 Gly Phe Leu Gly
 1
 <210> 58
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Beta-Ala
 <400> 58

Xaa Gly Gly Gly

1

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 59

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 60

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 61

<211> 4

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 61

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 62

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 63

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 64

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

peptide"

<400> 65

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 66

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5