



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0139054
(43) 공개일자 2024년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 - A61K 47/68 (2017.01) A61K 49/00 (2006.01)
 - A61K 51/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 - C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
 - C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
 - C12N 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 - A61K 47/6889 (2017.08)
 - A61K 47/6803 (2023.08)
- (21) 출원번호 10-2024-7024616
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월22일
 - 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년07월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/082277
- (87) 국제공개번호 WO 2023/122753
 - 국제공개일자 2023년06월29일
- (30) 우선권주장
 - 63/293,025 2021년12월22일 미국(US)
 - (뒷면에 계속)
- (71) 출원인
 - 엔라자 테라퓨틱스, 인크.
 - 미국 92037 캘리포니아 라 호야 노스 토리 파인스 로드 11099 스위트 290
- (72) 발명자
 - 듀론, 세르지오
 - 미국 92037 캘리포니아 라 호야 노스 토리 파인스 로드 11099 스위트 290
 - 롤랜드, 제이슨
 - 미국 92037 캘리포니아 라 호야 노스 토리 파인스 로드 11099 스위트 290
 - (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 - 양영준, 이상남

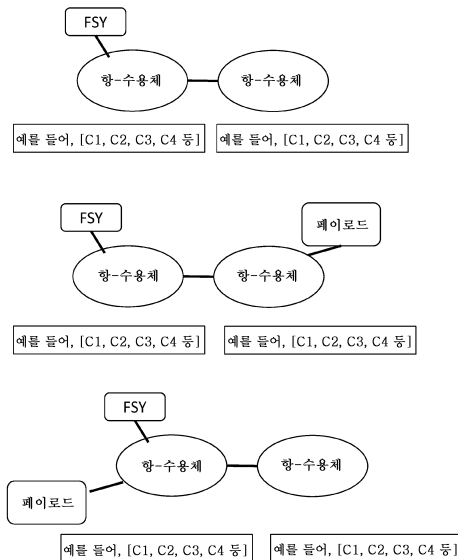
전체 청구항 수 : 총 216 항

(54) 발명의 명칭 **가교 항체**

(57) 요약

접합체를 사용하여 단일 도메인 항체를 표적에 가교시키기 위한 조성물 및 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 표적화 도메인을 포함하는 접합체로서, 여기서 표적화 도메인은 비천연 아미노산을 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 가교 단일 도메인 및 다중특이적 항체를 사용하여 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

대표도 - 도28a



(52) CPC특허분류

A61K 47/68031 (2023.08)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6871 (2017.08)
A61K 47/6879 (2017.08)
A61K 49/0032 (2013.01)
A61K 49/0058 (2013.01)
A61K 51/103 (2020.05)
A61K 51/1072 (2020.05)
A61K 51/1093 (2020.05)

(72) 발명자

프타신, 제로드

미국 92037 캘리포니아 라 호야 노스 토리 파인스
로드 11099 스위트 290

하이트, 아나리아

미국 92037 캘리포니아 라 호야 노스 토리 파인스
로드 11099 스위트 290

류, 준

미국 92037 캘리포니아 라 호야 노스 토리 파인스
로드 11099 스위트 290

(30) 우선권주장

63/346,799 2022년05월27일 미국(US)
63/388,072 2022년07월11일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

표적화 도메인 및 페이로드를 포함하는 집합체로서, 여기서 표적화 도메인은 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 포함하고, 여기서 표적화 도메인은 표적에 결합하도록 구성되고, 여기서 UAA 잔기는 표적화 도메인이 결합되는 경우에 표적과 공유 결합을 형성하기에 충분히 근접하여 있는 것인 집합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 페이로드가 UAA 잔기로부터 위치 $n+x$ 에서의 아미노산에 부착되며, 여기서 n 은 아미노산의 위치이고, x 는 적어도 1인 집합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 페이로드가 UAA 잔기로부터 위치 $n-x$ 에서의 아미노산에 부착되며, 여기서 n 은 아미노산의 위치이고, x 는 적어도 1인 집합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 도메인이 표적에 결합되는 경우에, UAA 잔기가 표적으로부터 5-20 옹스트롬 이내에 있는 것인 집합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 표적화 도메인이 세포 표면 분자에 결합하는 것인 집합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 세포 표면 분자가 종양 연관 항원인 집합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, UAA 잔기가 표적의 히스티딘, 리신 또는 티로신 잔기와 공유 결합을 형성하도록 구성된 것인 집합체.

청구항 8

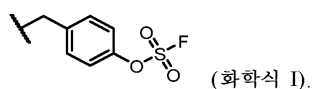
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, UAA 잔기가 플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 집합체.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, UAA 잔기가 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 집합체.

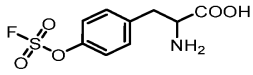
청구항 10

제9항에 있어서, UAA 잔기가 하기 화학식 I을 포함하는 것인 집합체:



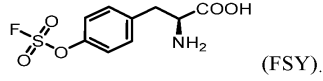
청구항 11

제9항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 집합체:



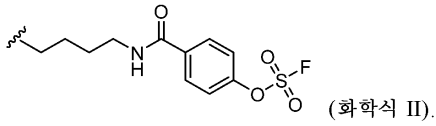
청구항 12

제9항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



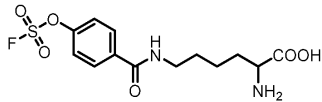
청구항 13

제9항에 있어서, UAA 잔기가 하기 화학식 II를 포함하는 것인 접합체:



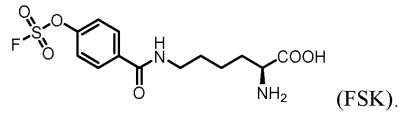
청구항 14

제9항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



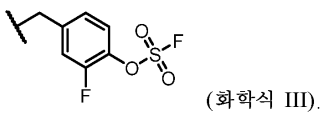
청구항 15

제9항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



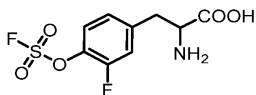
청구항 16

제9항에 있어서, UAA 잔기가 하기 화학식 III을 포함하는 것인 접합체:



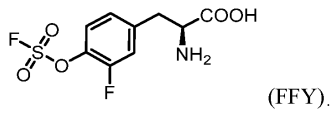
청구항 17

제9항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



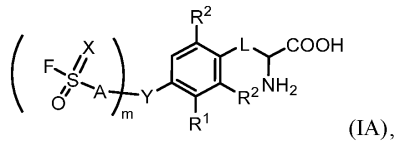
청구항 18

제9항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



청구항 19

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

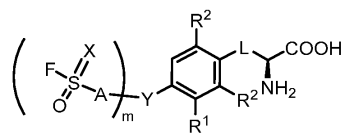
R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

여기서 Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

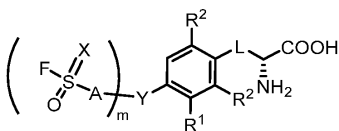
청구항 20

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는 것인 접합체:



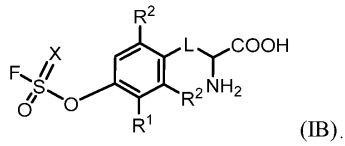
청구항 21

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는 것인 접합체:



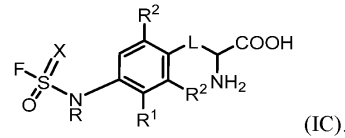
청구항 22

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



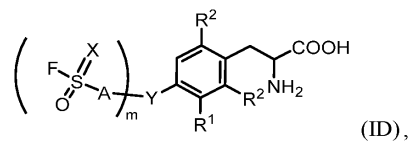
청구항 23

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IC)의 구조를 갖는 것인 접합체:



청구항 24

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

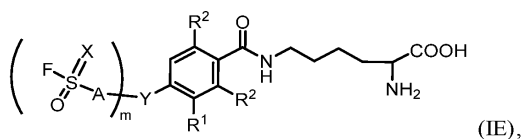
각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 25

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

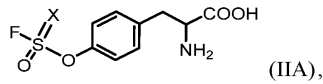
각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 26

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



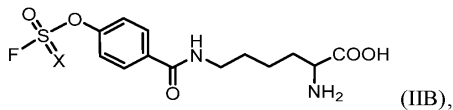
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 27

제19항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



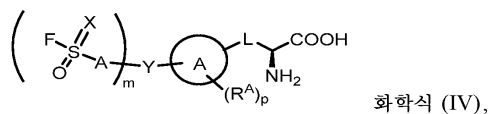
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 28

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고;

각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; 각각의 R^X는 임의로 치

환된 알킬이고;

L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 추가의 표적화 도메인을 추가로 포함하는 접합체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함하는 것인 접합체.

청구항 31

제30항에 있어서, 세포독성 모이어티가 소분자 약물 또는 화학요법 약물을 포함하는 것인 접합체.

청구항 32

제30항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 ^{35}S , 3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{32}P , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{149}Tb , ^{211}At , ^{212}Pb / ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{64}Cu , ^{67}Cu 및 ^{227}Th 로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 킬레이트화제를 추가로 포함하는 것인 접합체.

청구항 34

제30항 또는 제33항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 ^{99m}Tc , ^{131}I , ^{201}Tl , ^{111}In 및 ^{67}Ga 로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 링커에 의해 접합체에 부착된 것인 접합체.

청구항 36

제35항에 있어서, 링커가 중합체를 포함하는 것인 접합체.

청구항 37

제35항에 있어서, 링커가 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커인 접합체.

청구항 38

제35항에 있어서, 링커가 0.01kDa 내지 50kDa인 접합체.

청구항 39

제35항에 있어서, 링커가 0.01kDa 내지 10kDa인 접합체.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 선형, 분지형, 다량체 또는 덴드리머인 접합체.

청구항 41

제40항에 있어서, 링커가 이관능성 또는 다관능성 링커 또는 이관능성 또는 다관능성 중합체인 접합체.

청구항 42

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 수용성 중합체를 포함하는 것인 접합체.

청구항 43

제42항에 있어서, 수용성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)인 접합체.

청구항 44

제43항에 있어서, PEG가 0.1kDa 내지 2.5kDa의 분자량을 갖는 것인 접합체.

청구항 45

제43항에 있어서, PEG가 1-8개의 단량체를 포함하는 것인 접합체.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 도메인이 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 접합체.

청구항 47

제46항에 있어서, 표적화 도메인이 항원 결합 도메인을 포함하고, 접합체가 CDR 영역을 포함하고, 적어도 1개의 UAA가 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 것인 접합체.

청구항 48

제47항에 있어서, UAA가 CDR 영역 내에 포함되는 것인 접합체.

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 도메인이 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하는 것인 접합체.

청구항 50

제5항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 세포-표면 분자가 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fc1Ra, EphA2, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체.

청구항 51

(i) 페이로드 및 (ii) 조작된 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하는 접합체로서, CDR 영역 및 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 갖는 sdAb를 포함하며, 여기서 sdAb는 서열 식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함하는 것인 접합체.

청구항 52

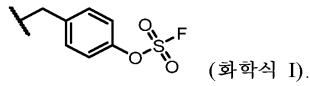
제51항에 있어서, UAA 잔기가 플루오로술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체.

청구항 53

제52항에 있어서, UAA 잔기가 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체.

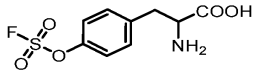
청구항 54

제53항에 있어서, UAA 잔기가 하기 화학식 I을 포함하는 것인 접합체:



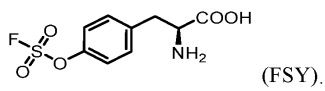
청구항 55

제53항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



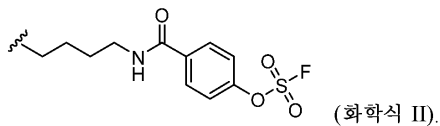
청구항 56

제53항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



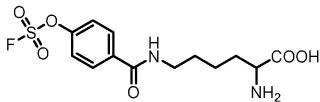
청구항 57

제53항에 있어서, UAA 잔기가 하기 화학식 II를 포함하는 것인 접합체:



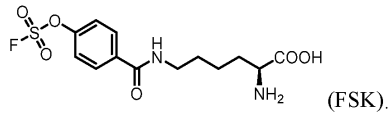
청구항 58

제53항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



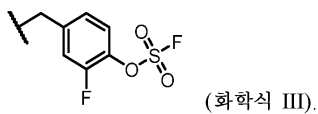
청구항 59

제53항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



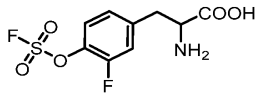
청구항 60

제53항에 있어서, UAA 잔기가 하기 화학식 III을 포함하는 것인 접합체:



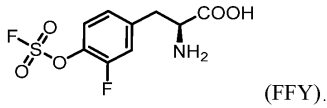
청구항 61

제53항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



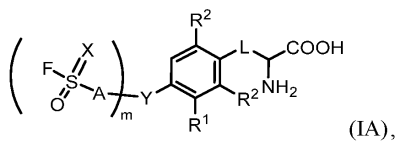
청구항 62

제53항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



청구항 63

제53항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

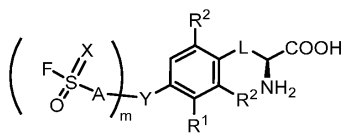
R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

여기서 Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

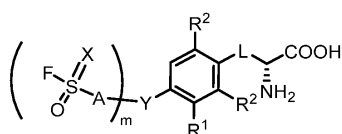
청구항 64

제63항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는 것인 접합체:



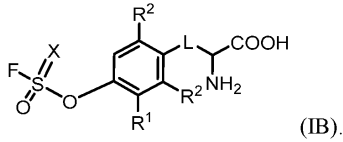
청구항 65

제63항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는 것인 접합체:



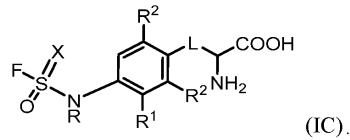
청구항 66

제63항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



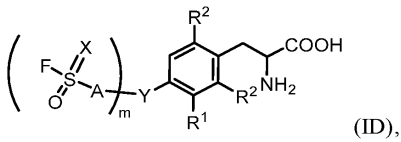
청구항 67

제63항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IC)의 구조를 갖는 것인 접합체:



청구항 68

제63항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

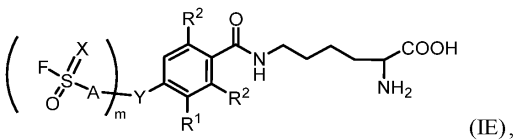
각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 69

제62항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된

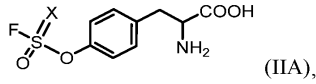
헤테로시클로알킬이고;

R^1 은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R^2 는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 70

제63항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



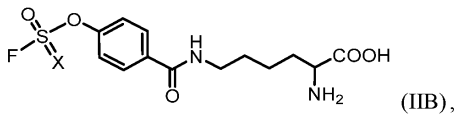
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 71

제63항에 있어서, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



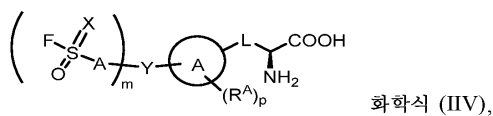
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 72

제51항에 있어서, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IIV)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고;

각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 73

제51항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 1을 포함하고, UAA가 서열식별번호: 5, 6 및 7 중 어느 하나에 포함되는 것인 집합체.

청구항 74

제73항에 있어서, UAA가 서열식별번호: 1에 대해 26, 28, 29, 30, 99, 102, 103, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 75

제51항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 2를 포함하고, UAA가 서열식별번호: 8, 9 및 10 중 어느 하나에 포함되는 것인 집합체.

청구항 76

제75항에 있어서, UAA가 서열식별번호: 2에 대해 50, 52, 53, 54, 56, 58 및 100으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 77

제51항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 3을 포함하고, UAA가 서열식별번호: 11, 12 및 13 중 어느 하나에 포함되는 것인 집합체.

청구항 78

제77항에 있어서, UAA가 서열식별번호: 3에 대해 58, 62, 101, 103 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 79

제51항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 16을 포함하고, UAA가 서열식별번호: 16에 대해 109의 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 80

제51항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 25를 포함하고, UAA가 서열식별번호: 23에 대해 52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 62 및 64로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 81

제51항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 26을 포함하고, UAA가 서열식별번호: 24에 대해 53, 55, 56, 57, 58, 60, 64 및 67로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 82

제51항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 UAA 측쇄를 통해 연결되지 않은 것인 집합체.

청구항 83

제51항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함하는 것인 집합체.

청구항 84

제83항에 있어서, 세포독성 모이어티가 소분자 약물 또는 화학요법 약물을 포함하는 것인 집합체.

청구항 85

제83항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{32}P , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{149}Tb , ^{211}At , ^{212}Pb / ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{64}Cu , ^{67}Cu 및 ^{227}Th 로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 집합체.

청구항 86

제83항 또는 제85항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 킬레이트화제를 추가로 포함하는 것인 집합체.

청구항 87

제83항에 있어서, 영상화제가 형광단 또는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^{201}Tl , ^{111}In 및 ^{67}Ga 로 이루어진 군으로부터 선택된 방사성리간드 작용제를 포함하는 것인 집합체.

청구항 88

제1항 내지 제87항 중 어느 한 항의 집합체를 투여하는 것을 포함하는 방법으로서, 여기서 집합체는 세포의 표면 상의 표적에 공유 결합하는 것인 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 세포가 종양 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 집합체가 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하는 것인 방법.

청구항 91

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 표적이 종양 연관 항원인 방법.

청구항 92

제88항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 표적이 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, BIR, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, EphA2, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 93

질환 또는 상태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제92항 중 어느 한 항의 집합체를 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 상태를 치료하는 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 질환이 PRAD (전립선 선암종), mCRPC (전이성 거세 저항성 전립선암), 고형 종양 (신생혈관계), LUAD (폐 선암종), LUSC (폐 편평 세포 암종), HNSC (두경부 편평 세포 암종), THCA (갑상선 암종), ESCA (식도 암종), STAD (위 선암종), GIST (위장 기질 종양), COAD (결장 선암종), READ (직장 선암종), SARC (육종), SCLC (소세포 폐암), MESO (중피종), PAAD (췌장 선암종), B-세포 악성종양, T-세포 악성종양, ALL (급성 림프모구성 백혈병), NHL (비-호지킨 림프종), HL (호지킨 림프종), CLL (만성 림프구성 백혈병), AML (급성 골수성 백혈병), MDS (골수이형성 증후군), MSI-고 종양, SKCM (피부의 피부 흑색종), UVM (포도막 흑색종), DLBC (미만성 대 B-세포 림프종), 자궁내막암, CESC (자궁경부 암종), 골암, BLCA (방광 요로상피암), BRCA (유방 침습성 암종), TNBC (삼중 음성 유방암), LIHC (간의 간세포성 암종), OV (난소 장액성 난선암종), UCEC (자궁체부 자궁내막 암종), NE-PCa (신경내분비 전립선암), GBM (다형성 교모세포종) 및 KIRC (신장 투명

신세포 암종) 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 95

제1항 내지 제87항 중 어느 한 항의 집합체를 제조하는 방법으로서,

- (a) 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함하는 표적화 도메인을 생성하는 단계; 및
- (b) 표적화 도메인을 페이로드에, 임의로 링커를 통해 접합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함하는 표적화 도메인이 생체내 합성되는 것인 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 생성이 직교 tRNA 신테타제/서프레서 tRNA 쌍의 사용을 포함하는 것인 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 생성이 피롤리신 tRNA 신테타제/tRNA^{Pyl}로부터 유래된 직교 tRNA 신테타제/서프레서 tRNA 쌍을 포함하는 것인 방법.

청구항 99

제97항에 있어서, 직교 tRNA 신테타제가 서열식별번호: 84, 87, 92 또는 그의 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 100

제30항 내지 제33항, 제35항 내지 제50항 및 제83항 내지 제86항 중 어느 한 항의 집합체를 투여하는 것을 포함하는, 세포에 세포독성 페이로드를 전달하는 방법으로서, 여기서 집합체는 세포의 표면 상의 표적에 공유 결합함으로써 세포독성 페이로드를 전달하는 것인 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 세포가 종양 세포인 방법.

청구항 102

제100항에 있어서, 세포가 종양 미세환경 내에 포함된 것인 방법.

청구항 103

제100항에 있어서, 세포가 포유동물 대상체 내에 포함된 것인 방법.

청구항 104

제100항에 있어서, 세포가 인간 대상체 내에 포함된 것인 방법.

청구항 105

제100항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 집합체가 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하는 것인 방법.

청구항 106

제100항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 표적이 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1,

TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 107

제100항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대상체가 PCa (전립선암), CRPCa (거세 저항성 전립선암), 고형 종양 (신생혈관계), NSCLC (비소세포 폐암), HNSCC (두경부 편평 세포 암종), ESCC (식도암), GC (위암), CRC (결장직장암), SCLC (소세포 폐암), MPM (중피종), PDAC (췌장관 선암종), ALL (급성 림프모구성 백혈병), AML (급성 골수성 백혈병), MDS (골수이형성 증후군), MSI-고 종양, 흑색종, DLBCL (미만성 대 B 세포 림프종), 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암, BrCa (유방암), TNBC (삼중 음성 유방암), NE-PCa (신경내분비 전립선암), GBM (교모세포종) 및 RCC (신세포 암종)로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 상태를 앓고 있거나 또는 이를 갖는 것으로 진단된 것인 방법.

청구항 108

(i) 제1 표적화 도메인, (ii) 제2 표적화 도메인 및 임의로 (iii) 페이로드를 포함하는 접합체로서, 여기서 제1 표적화 도메인은 적어도 1개의 제1 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 이에 의해 제1 표적화 도메인은 UAA의 부위에서 제1 표적에 공유 결합할 수 있고, 제2 표적화 도메인은 제2 표적에 결합하도록 구성된 것인 접합체.

청구항 109

제108항에 있어서, 제1 표적 및 제2 표적이 동일한 세포 상에 있는 것인 접합체.

청구항 110

제108항 또는 제109항에 있어서, 제1 표적화 도메인이 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 접합체.

청구항 111

제110항에 있어서, 제1 표적화 도메인이 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하는 것인 접합체.

청구항 112

제108항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 UAA가 제1 표적과 인터페이스하는 제1 표적화 도메인의 영역 내에 또는 그의 근접부 내에 포함되는 것인 접합체.

청구항 113

제108항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적화 도메인이 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 접합체.

청구항 114

제113항에 있어서, 제2 표적화 도메인이 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하는 것인 접합체.

청구항 115

제108항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 연결되어 융합 단백질 형성을 하는 것인 접합체.

청구항 116

제108항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 화학적 접합에 의해 연결된 것인 접합체.

청구항 117

제115항 또는 제116항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 도메인이 링커에 의해 연결된 것인 접합체.

청구항 118

제108항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 동일한 표적에 결합하는 것인 접합체.

청구항 119

제118항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 동일한 표적의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 접합체.

청구항 120

제118항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 동일한 표적의 동일한 에피토프에 결합하는 것인 접합체.

청구항 121

제118항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 동일한 표적이 단량체인 접합체.

청구항 122

제118항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 동일한 표적이 다량체 분자인 접합체.

청구항 123

제108항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 상이한 표적에 결합하는 것인 접합체.

청구항 124

제108항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적이 제1 세포 표면 분자인 접합체.

청구항 125

제108항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적이 제2 세포 표면 분자인 접합체.

청구항 126

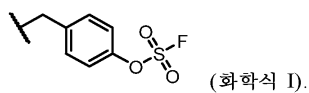
제108항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체.

청구항 127

제108항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 UAA가 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체.

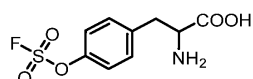
청구항 128

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 I을 포함하는 것인 접합체:



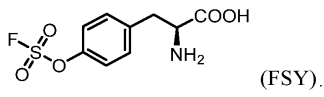
청구항 129

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



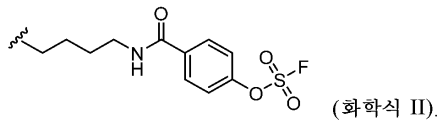
청구항 130

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



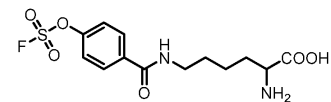
청구항 131

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 II를 포함하는 것인 접합체:



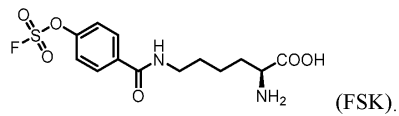
청구항 132

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



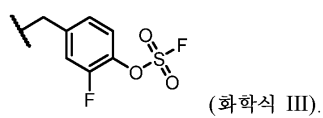
청구항 133

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



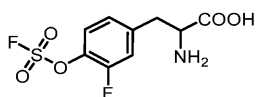
청구항 134

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 III을 포함하는 것인 접합체:



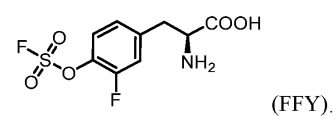
청구항 135

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



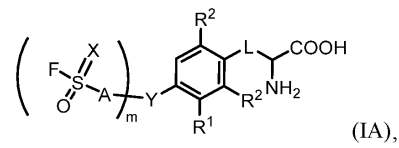
청구항 136

제127항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



청구항 137

제108항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

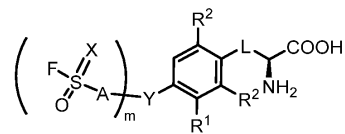
R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

여기서 Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

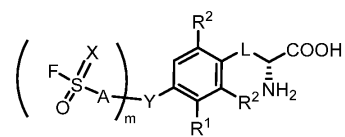
청구항 138

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IAa)의 구조를 갖는 것인 접합체:



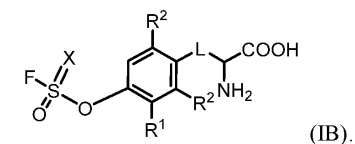
청구항 139

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IAb)의 구조를 갖는 것인 접합체:



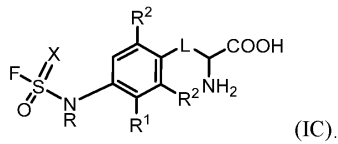
청구항 140

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



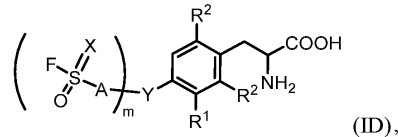
청구항 141

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IC)의 구조를 갖는 것인 집합체:



청구항 142

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는 것인 집합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

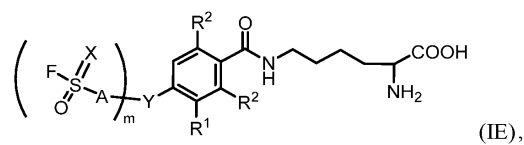
각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 143

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는 것인 집합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

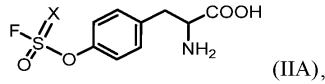
각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 144

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



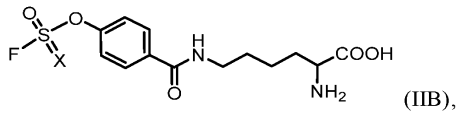
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 145

제137항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



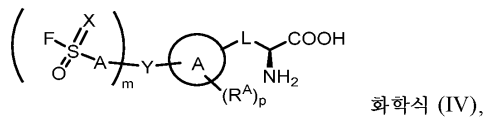
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 146

제108항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 제1 UAA가 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고;

각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; p는 0, 1, 2, 3 또는 4 이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고;

L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 147

제124항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포 표면 분자가 PSMA, EGFR, HER2, HER3, PD-L1, EphA4,

피브로넥틴 ED-B, EpCAM, CCR4, CD25, VEGF, VEGFR2, endo180, LIV-1, PTK7, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, DLK1, Muc16, cMET, CEA, LRP5 및 LRP6으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체.

청구항 148

제125항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 세포 표면 분자가 PSMA, EGFR, HER2, HER3, PD-L1, EphA4, 피브로넥틴 ED-B, EpCAM, CCR4, CD25, VEGF, VEGFR2, endo180, LIV-1, PTK7, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, DLK1, Muc16, cMET, CEA, LRP5 및 LRP6으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체.

청구항 149

제108항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적화 도메인이 제2 UAA를 포함하며, 이에 의해 제2 표적화 도메인이 제2 UAA의 부위에서 제2 표적에 공유 결합할 수 있는 것인 접합체.

청구항 150

제149항에 있어서, 제2 UAA가 제1 표적화 도메인에 포함된 적어도 1개의 UAA와 상이한 것인 접합체.

청구항 151

제149항에 있어서, 제2 UAA가 제1 표적화 도메인에 포함된 적어도 1개의 UAA와 동일한 것인 접합체.

청구항 152

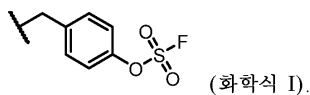
제149항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 UAA가 플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체.

청구항 153

제149항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 UAA가 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체.

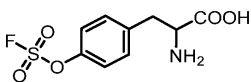
청구항 154

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 I을 포함하는 것인 접합체:



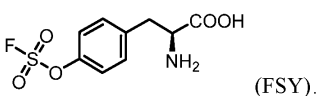
청구항 155

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



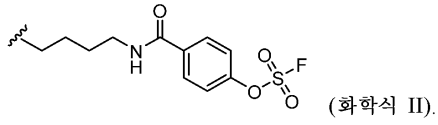
청구항 156

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



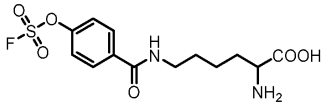
청구항 157

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 II를 포함하는 것인 접합체:



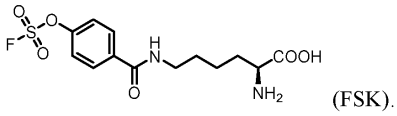
청구항 158

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



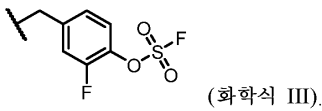
청구항 159

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



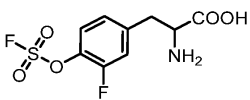
청구항 160

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 III을 포함하는 것인 접합체:



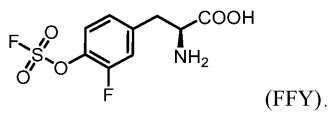
청구항 161

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



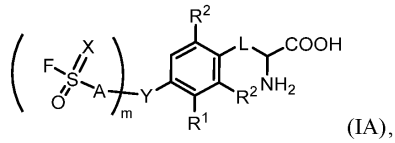
청구항 162

제153항에 있어서, 제2 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체:



청구항 163

제149항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

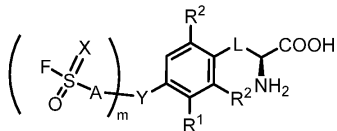
R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²은 수소 또는 메틸이고;

L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

여기서 Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

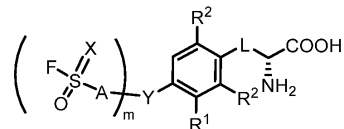
청구항 164

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는 것인 접합체:



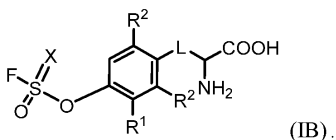
청구항 165

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는 것인 접합체:



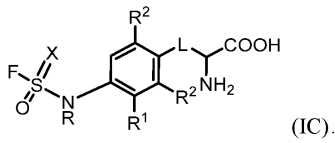
청구항 166

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



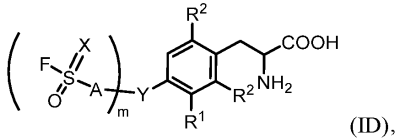
청구항 167

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IC)의 구조를 갖는 것인 접합체:



청구항 168

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

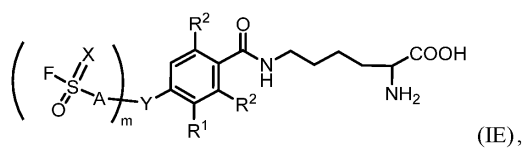
각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 169

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

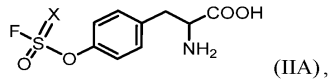
각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 170

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는 것인 접합체:



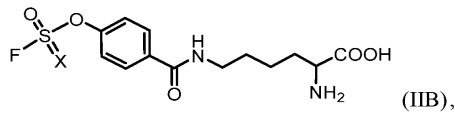
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 171

제163항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는 것인 접합체:



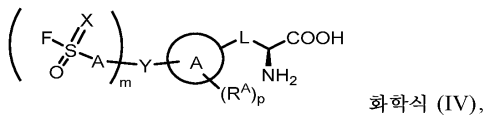
여기서

X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

청구항 172

제149항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 UAA가 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는 것인 접합체:



여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고;

각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; p는 0, 1, 2, 3 또는 4 이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고;

L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

청구항 173

제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인이 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함하는 것인 접합체.

청구항 174

제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인이 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 집합체.

청구항 175

제108항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적화 도메인이 서열식별번호: 1-4, 16-64 중 어느 하나를 포함하는 것인 집합체.

청구항 176

제108항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적화 도메인이 서열식별번호: 1-4, 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인 집합체.

청구항 177

제1항 내지 제87항 및 제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 65-72를 포함하는 집합체.

청구항 178

제1항 내지 제87항 및 제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 65-72에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 집합체.

청구항 179

제1항 내지 제87항 및 제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 1-4, 16-64 중 어느 하나를 포함하는 집합체.

청구항 180

제1항 내지 제87항 및 제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 1-4, 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 집합체.

청구항 181

제1항 내지 제87항 및 제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 65-72에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 집합체.

청구항 182

제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나가 서열식별번호: 1을 포함하는 것인 집합체.

청구항 183

제182항에 있어서, UAA가 서열식별번호: 1에 대해 26, 28, 29, 30, 99, 102, 103, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 184

제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나가 서열식별번호: 2를 포함하는 것인 집합체.

청구항 185

제184항에 있어서, UAA가 서열식별번호: 2에 대해 50, 52, 53, 54, 56, 58 및 100으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 186

제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나가 서열식별번호: 3을 포함하는 것인 집합체.

청구항 187

제186항에 있어서, UAA가 서열식별번호: 3에 대해 58, 62, 101, 103 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 집합체.

청구항 188

제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나가 서열식별번호: 16을 포함하는 것인 집합체.

청구항 189

제188항에 있어서, 서열식별번호: 16을 포함하는 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나가 서열식별번호: 16에 대해 위치 109에 비천연 아미노산을 추가로 포함하는 것인 집합체.

청구항 190

제108항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나가 서열식별번호: 18을 포함하는 것인 집합체.

청구항 191

제108항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함하는 것인 집합체.

청구항 192

제191항에 있어서, 세포독성 모이어티가 소분자 약물 또는 화학요법 약물을 포함하는 것인 집합체.

청구항 193

제191항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{32}P , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{149}Tb , ^{211}At , $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$, ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{64}Cu , ^{67}Cu 및 ^{227}Th 로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 집합체.

청구항 194

제192항 또는 제193항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 킬레이트화제를 추가로 포함하는 것인 집합체.

청구항 195

제192항에 있어서, 방사성리간드 작용제가 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^{201}Tl , ^{111}In 및 ^{67}Ga 로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 집합체.

청구항 196

제108항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 링커에 의해 집합체에 부착된 것인 집합체.

청구항 197

제108항 내지 제196항 중 어느 한 항의 집합체를 투여하는 것을 포함하는 방법으로서, 여기서 집합체는 제1 세포의 표면 상의 제1 표적에 공유 결합하는 것인 방법.

청구항 198

제197항에 있어서, 집합체가 제1 세포의 표면 상의 제2 표적에 결합하는 것인 방법.

청구항 199

제197항 또는 제198항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 동일한 표적에 결합하는 것인 방법.

청구항 200

제199항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 동일한 표적의 동일한 에피토프에 결합하는 것인 방법.

청구항 201

제199항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 동일한 표적의 상이한 에피토프에 결합하는 것인 방법.

청구항 202

제197항 또는 제198항에 있어서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인이 제1 세포의 표면 상의 상이한 표적에 결합하는 것인 방법.

청구항 203

제197항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 도메인이 제2 UAA를 포함하고, 제2 UAA가 제2 표적에 공유 결합하는 것인 방법.

청구항 204

제197항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세포가 종양 세포인 방법.

청구항 205

제204항에 있어서, 접합체가 제1 표적에 결합되는 경우에 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하는 것인 방법.

청구항 206

제204항에 있어서, 접합체가 제2 표적에 결합되는 경우에 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하는 것인 방법.

청구항 207

제204항에 있어서, 접합체가 제1 표적 및 제2 표적에 결합되는 경우에 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하는 것인 방법.

청구항 208

제197항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적이 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, FolRa, EphA2, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 209

제197항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적이 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R,

CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fc1Ra, EphA2, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 210

제197항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 방사성표지 작용제 또는 세포독성제인 방법.

청구항 211

제198항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 영상화제인 방법.

청구항 212

제211항에 있어서, 접합체가 제1 세포 상의 제1 표적 및 제2 표적에 결합되는 경우에 제1 세포를 영상화하거나 확인하는 방법.

청구항 213

제108항 내지 제196항 중 어느 한 항의 접합체를 제조하는 방법으로서,

- (a) 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함하는 제1 표적화 도메인을 생체내 합성하는 단계; 및
- (b) 페이로드를 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인에, 임의로 링커를 통해 접합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 214

제213항에 있어서, 제2 표적화 도메인을 제1 표적화 도메인에 대한 융합 단백질로서 생체내 합성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 215

제213항 또는 제214항에 있어서, 합성이 직교 tRNA 신테타제/서프레스 tRNA 쌍의 사용을 포함하는 것인 방법.

청구항 216

제215항에 있어서, 합성이 피롤리신 tRNA 신테타제/tRNA^{Py1}로부터 유래된 직교 tRNA 신테타제/서프레스 tRNA 쌍을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호-참조

[0002] 본 출원은 2021년 12월 22일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/293,025; 2022년 5월 27일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/346,799; 및 2022년 7월 11일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/388,072를 우선권 주장하며, 이들 각각은 그 전문이 참조로 포함된다.

배경 기술

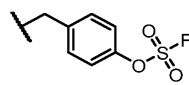
[0003] 단백질은 주로 단백질 내에서 또는 단백질 사이에서 비-공유 상호작용을 사용하는데, 이는 단백질의 아미노산 측쇄가 통상적으로 가역적인 비교적 약한 디설피드 결합을 생성하는 시스테인을 제외하고는 서로 공유 결합을 형성할 수 없기 때문이다. 따라서, 표적 단백질 상의 다중 천연 아미노산 잔기와 특이적으로 반응할 수 있는 잠재성 생물반응성 비천연 아미노산 (UAA)은 생체내 공유 결합에 적용가능한 단백질의 다양성에 따라 확장될 것이며, 이는 신규 공유 연결의 활용을 통해 기존 단백질 특성을 증진시키거나 새로운 기능을 진화시키는 것을 가능하게 할 수 있다. 추가로, 단백질 사이의 공유 연결은 생체내 단백질-단백질 상호작용의 비가역적 포획을 가

능하게 할 것이며, 이는 단백질 확인, 약물 발견, 비가역적 길항제 및 페이로드 전달에 유용할 수 있다.

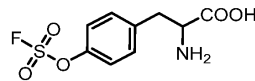
발명의 내용

[0004]

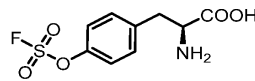
표적화 도메인 및 페이로드를 포함하는 접합체로서, 여기서 표적화 도메인은 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 포함하고, 여기서 표적화 도메인은 표적에 결합하도록 구성되고, 여기서 UAA 잔기는 표적화 도메인이 결합되는 경우에 표적과 공유 결합을 형성하기에 충분히 근접하여 있는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 페이로드가 UAA 잔기로부터 위치 $n+x$ 에서의 아미노산에 부착되며, 여기서 n 은 아미노산의 위치이고, x 는 적어도 1인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 페이로드가 UAA 잔기로부터 위치 $n-x$ 에서의 아미노산에 부착되며, 여기서 n 은 아미노산의 위치이고, x 는 적어도 1인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 표적화 도메인이 표적에 결합되는 경우에, UAA 잔기가 표적으로부터 5-20 앙스트롬 이내에 있는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 표적화 도메인이 세포 표면 분자에 결합하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 표적의 히스티딘, 리신 또는 티로신 잔기와 공유 결합을 형성하도록 구성된 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 하기



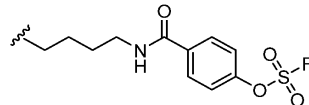
화학식 I을 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (화학식 I). 추가로, UAA 잔기의 UAA가



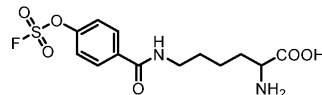
하기 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (FSX). 추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기



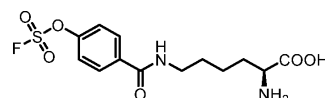
구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (FSY). 추가로, UAA 잔기가 하기 화학식



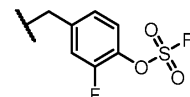
II를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (화학식 II). 추가로, UAA 잔기의



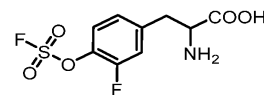
UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (FSZ). 추가로, UAA 잔기의



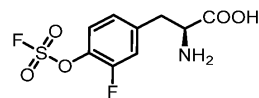
UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (FSK). 추가로, UAA



잔기가 하기 화학식 III을 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (화학식 III). 추가로,

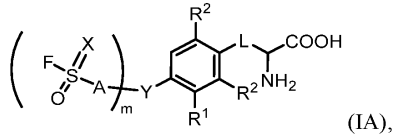


UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (FSU). 추가로, UAA



잔기의 UAA가 하기 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다: (FSV).

[0005] 추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IA)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



[0006]

여기서

[0007]

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0008]

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

[0009]

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0010]

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0011]

R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

[0012]

L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

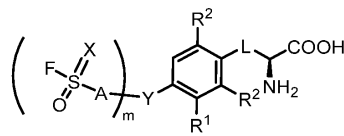
[0013]

여기서 Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

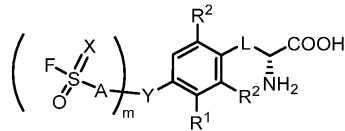
[0014]

추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

[0015]

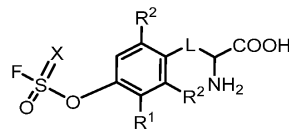


추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는 것인 접합



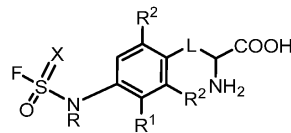
체가 본원에 제공된다:

추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IB)의 구



구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

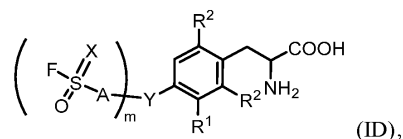
(IB). 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하



기 화학식 (IC)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

(IC).

[0016] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



[0017]

여기서

[0018]

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0019]

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

[0020]

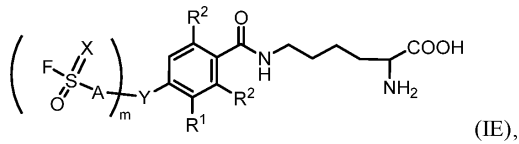
[0021] A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0022] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0023] R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

[0024] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0025] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



[0026] 여기서

[0027]

[0028] 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0029] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

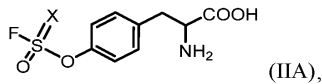
[0030] A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0031] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0032] R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

[0033] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0034] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



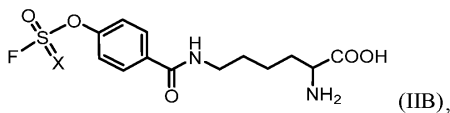
[0035] 여기서

[0036]

[0037] X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0038] R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

[0039] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



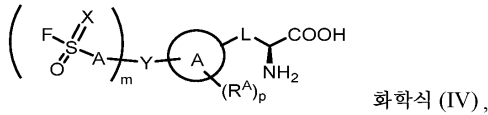
[0040] 여기서

[0041]

[0042] X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0043] R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

[0044] 추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



[0045]

[0046] 여기서

[0047] 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0048] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

[0049] A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0050] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0051] 고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고;

[0052] 각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고;

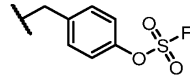
[0053] L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

[0054] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0055] 추가로, 페이로드가 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 세포독성 모이어티가 소분자 약물 또는 화학요법 약물을 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 방사성리간드 작용제가 ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ¹⁴⁹Tb, ²¹¹At, ²¹²Pb/²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac 및 ²²⁷Th로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 방사성리간드 작용제가 킬레이트 화제를 추가로 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 방사성리간드 작용제가 ^{99m}Tc, ¹³¹I, ²⁰¹Tl, ¹¹¹In 및 ⁶⁷Ga로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 페이로드가 링커에 의해 접합체에 부착된 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 링커가 중합체를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 링커가 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 링커가 0.01kDa 내지 2.5kDa인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 링커가 0.01kDa 내지 2.5kDa인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 링커가 선형, 분지형, 다량체 또는 덴드리머인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 링커가 이관능성 또는 다관능성 링커 또는 이관능성 또는 다관능성 중합체인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 링커가 수용성 중합체를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 수용성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, PEG가 0.1kDa 내지 2.5kDa의 분자량을 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, PEG가 1-8개의 단량체를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 표적화 도메인이 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 표적화 도메인이 항원 결합 도메인을 포함하고, 접합체가 CDR 영역을 포함하고, 적어도 1개의 UAA 잔기가 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 CDR 영역 내에 포함되는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 표적화 도메인이 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 세포-표면 분자가 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로블렉틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체가 본원에 제공된다.

[0056]

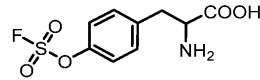
또한, (i) 페이로드 및 (ii) 조작된 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하는 접합체로서, CDR 영역 및 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 갖는 sdAb를 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 플루오로술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 하기 화학식 I을



포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

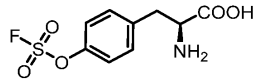
(화학식 I).

추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조



를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

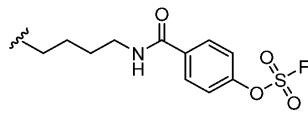
추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기 구조를 갖



는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

(FSY).

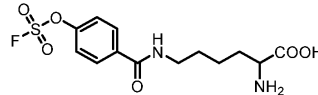
추가로, UAA 잔기가 하기 화학식 II를 포함



하는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

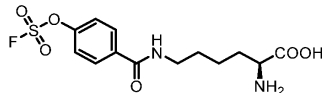
(화학식 II).

추가로, UAA 잔기의 UAA가 하



기 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

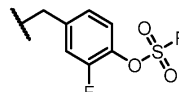
추가로, UAA가 하기 구조를



갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

(FSK).

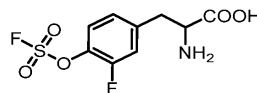
추가로, UAA 잔기가 하기 화학식



III을 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

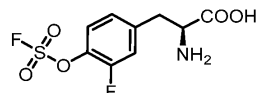
(화학식 III).

추가로, UAA 잔기의 UAA가 하



기 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기 구

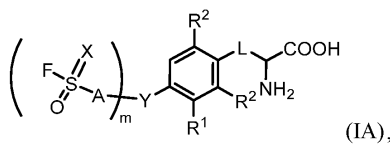


조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

(FFY).

[0057]

추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IA)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



[0058]

여기서

[0059]

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0060]

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

[0061]

A는 결합 또는 -(CH2)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0062]

[0063]

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알

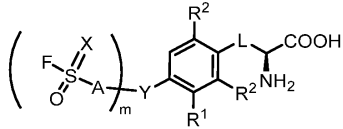
킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0064] R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

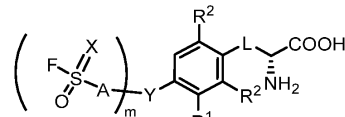
[0065] L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

[0066] 여기서 Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0067] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

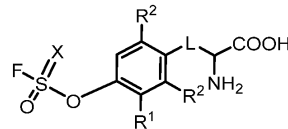


. 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는 것인 접합



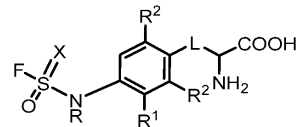
체가 본원에 제공된다:

. 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IB)의 구



조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

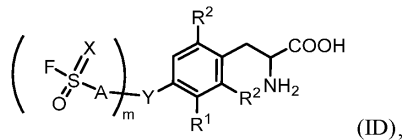
(IB). 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기



(IC).

화학식 (IC)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:

[0068] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



(ID),

[0069]

여기서

[0070]

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0071]

Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

[0072]

A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0073]

각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0074]

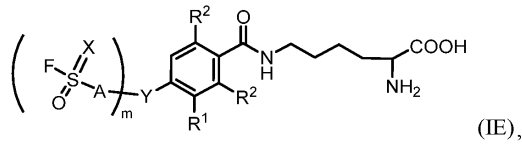
R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

[0075]

여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0076]

[0077] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



[0078]

[0079] 여기서

[0080] 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0081] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

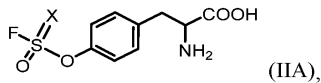
[0082] A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0083] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0084] R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

[0085] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0086] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는 것인 조작된 sdAb가 본원에 제공된다:



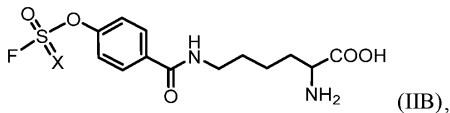
[0087]

[0088] 여기서

[0089] X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0090] R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

[0091] 추가로, 화학식 (IA)의 UAA가 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는 것인 조작된 sdAb가 본원에 제공된다:



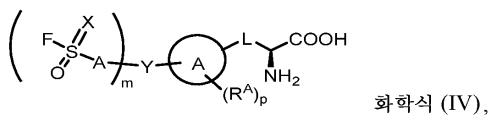
[0092]

[0093] 여기서

[0094] X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0095] R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

[0096] 추가로, UAA 잔기의 UAA가 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는 것인 접합체가 본원에 제공된다:



[0097]

[0098] 여기서

[0099] 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0100] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

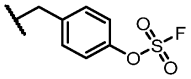
- [0101] A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;
- [0102] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헥테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헥테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헥테로시클로알킬이고;
- [0103] 고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헥테로아릴이고;
- [0104] 각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고;
- [0105] L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고;
- [0106] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.
- [0107] 추가로, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 1을 포함하고, UAA 잔기가 서열식별번호: 5, 6 및 7 중 어느 하나에 포함되는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 서열식별번호: 1에 대해 26, 28, 29, 30, 99, 102, 103, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 2를 포함하고, UAA 잔기가 서열식별번호: 8, 9 및 10 중 어느 하나에 포함되는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 서열식별번호: 2에 대해 50, 52, 53, 54, 56, 58 및 100으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 3을 포함하고, UAA 잔기가 서열식별번호: 11, 12 및 13 중 어느 하나에 포함되는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, UAA 잔기가 서열식별번호: 3에 대해 58, 62, 101, 103 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 16을 포함하고, UAA가 서열식별번호: 16에 대해 109의 아미노산 위치에 존재하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 23을 포함하고, UAA가 서열식별번호: 23에 대해 52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 62 및 64로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 조작된 sdAb가 서열식별번호: 24를 포함하고, UAA가 서열식별번호: 24에 대해 53, 55, 56, 57, 58, 60, 64 및 67로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재하는 것인 접합체가 본원에 제공된다.
- [0108] 추가로, 페이로드가 UAA 잔기 측쇄를 통해 연결되지 않은 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 페이로드가 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 세포독성 모이어티가 소분자 약물 또는 화학요법 약물을 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 방사성리간드 작용제가 ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ¹⁴⁹Tb, ²¹¹At, ²¹²Pb/²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac 및 ²²⁷Th로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 방사성리간드 작용제가 킬레이트화제를 추가로 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다. 추가로, 영상화제가 형광단 또는 ^{99m}Tc, ¹³¹I, ²⁰¹Tl, ¹¹¹In 및 ⁶⁷Ga로 이루어진 군으로부터 선택된 방사성리간드 작용제를 포함하는 것인 접합체가 본원에 제공된다.
- [0109] 본원에 기재된 접합체를 투여하는 것을 포함하는 방법으로서, 여기서 접합체는 세포의 표면 상의 표적에 공유 결합하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 세포가 종양 세포를 포함하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 접합체가 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 표적이 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 접합체를 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 상태를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 질환이 PCa (전립선암), CRPCa (거세 저항성 전립선암), 고형 종양 (신생혈관계), NSCLC (비소세포 폐암), HNSCC (두경부 편평 세포 암종), ESCC (식도암), GC (위암), CRC (결장직장암), SCLC (소세포 폐암), MPM (중피종), PDAC (췌장관 선암종), ALL (급성 림프모구성

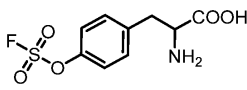
백혈병), AML (급성 골수성 백혈병), MDS (골수이형성 증후군), MSI-고 종양, 흑색종, DLBCL (미만성 대 B 세포 림프종), 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암, BrCa (유방암), TNBC (삼중 음성 유방암), NE-PCa (신경내분비 전립선암), GBM (교모세포종) 및 RCC (신세포 암종) 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법이 본원에 제공된다.

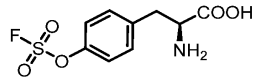
[0110] 본원에 기재된 접합체를 제조하는 방법으로서, 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함하는 표적화 도메인을 생성하는 단계; 및 표적화 도메인을 페이로드에, 임의로 링커를 통해 접합시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함하는 표적화 도메인이 생체내 합성되는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 생성이 직교 tRNA 신테타제/서프레서 tRNA 쌍의 사용을 포함하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 생성이 피롤리신 tRNA 신테타제/tRNA^{Pyl}로부터 유래된 직교 tRNA 신테타제/서프레서 tRNA 쌍을 포함하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 직교 tRNA 신테타제가 서열식별번호: 84, 87, 92 또는 그의 변이체를 포함하는 것인 방법이 본원에 제공된다.

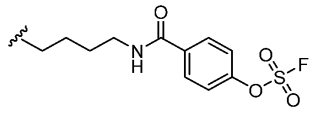
[0111] 본원에 기재된 접합체를 투여하는 것을 포함하는, 세포에 세포독성 페이로드를 전달하는 방법으로서, 여기서 접합체는 세포의 표면 상의 표적에 공유 결합함으로써 세포독성 페이로드를 전달하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 세포가 종양 세포인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 세포가 종양 미세환경 내에 포함된 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 세포가 포유동물 대상체 내에 포함된 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 세포가 인간 대상체 내에 포함된 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 접합체가 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 표적이 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법이 본원에 제공된다. 추가로, 인간 대상체가 PCa (전립선암), CRPCa (거세 저항성 전립선암), 고형 종양 (신생혈관계), NSCLC (비소세포 폐암), HNSCC (두경부 편평 세포 암종), ESCC (식도암), GC (위암), CRC (결장직장암), SCLC (소세포 폐암), MPM (중피종), PDAC (췌장관 선암종), ALL (급성 림프모구성 백혈병), AML (급성 골수성 백혈병), MDS (골수이형성 증후군), MSI-고 종양, 흑색종, DLBCL (미만성 대 B 세포 림프종), 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암, BrCa (유방암), TNBC (삼중 음성 유방암), NE-PCa (신경내분비 전립선암), GBM (교모세포종) 및 RCC (신세포 암종)로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 상태를 앓고 있거나 또는 이를 갖는 것으로 진단된 것인 방법이 본원에 제공된다.

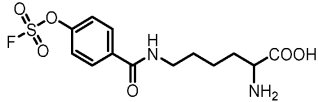
[0112] (i) 제1 표적화 도메인, (ii) 제2 표적화 도메인 및 (iii) 페이로드를 포함하는 접합체로서, 여기서 제1 표적화 도메인은 적어도 1개의 제1 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 이에 의해 제1 표적화 도메인은 UAA의 부위에서 제1 표적에 공유 결합할 수 있고, 제2 표적화 도메인은 제2 표적에 결합하도록 구성된 것인 접합체가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 및 제2 표적은 동일한 세포 상에 있다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인은 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인은 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 UAA는 제1 표적과 인터페이스하는 제1 표적화 도메인의 영역 내에 또는 그의 근접부 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 제2 표적화 도메인은 항체, 항체 단편 또는 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적화 도메인은 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 연결되어 융합 단백질을 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 화학적 접합에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 도메인은 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적의 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 동일한 표적은 단량체이다. 일부 실시양태에서, 동일한 표적은 다량체 분자이다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 상이한 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적은 제1 세포 표면 분자이다. 일부 실시양태에서, 제2 표적은 제2 세포 표면 분자이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 플루오로 술페이트 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 UAA는 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적

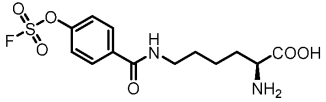
어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 I을 포함한다:  (화학식 I). 일부 실시양태에서, 적어도 1

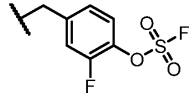
개의 제1 UAA는 하기 구조를 갖는다:  . 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하

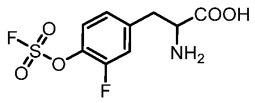
기 구조를 갖는다:  (FSY). 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 II

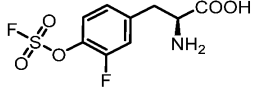
를 포함한다:  (화학식 II). 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 구조

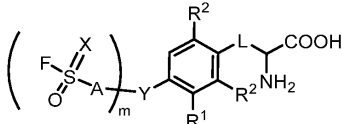
를 갖는다:  . 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 구조를 갖는다:

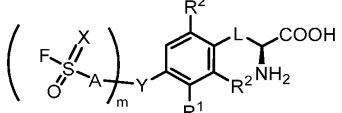
 (FSK). 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 III을

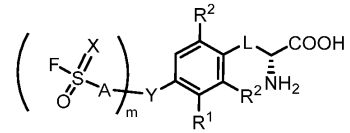
포함한다:  (화학식 III). 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 구조를 갖는다:

 . 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 구조를 갖는다:

 (FFY). 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IA)의 구조를

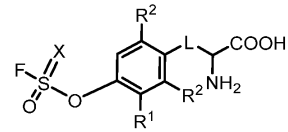
갖는다:  (IA), 여기서 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 -(CH2)n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고; L은 -(CH2)p- 또는 -C(O)NH-(CH2)p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고; Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 적

어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는다:  . 일부 실시양태



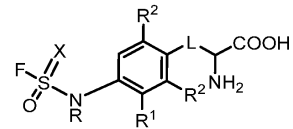
에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는다:

일부



실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IB)의 구조를 갖는다:

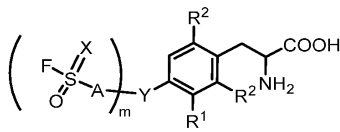
(IB). 일



부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IC)의 구조를 갖는다:

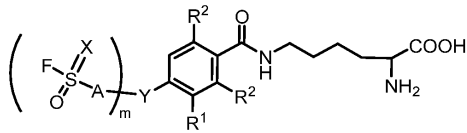
(IC).

일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는다:



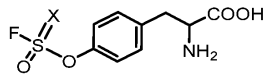
(ID),

여기서 각각의 X는 독립적으로 0 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고; Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는다:



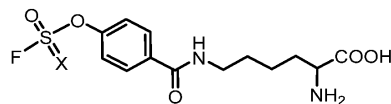
(IE),

여기서 각각의 X는 독립적으로 0 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고; Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는다:



(IIA),

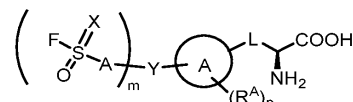
여기서 X는 독립적으로 0 또는 NR'이고; R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다. 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식



(IIB)의 구조를 갖는다:

(IIB),

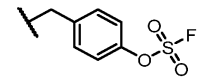
여기서 X는 독립적으로 0 또는 NR'이고; R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다. 일부 실시양태에서, 적



어도 1개의 제1 UAA는 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는다:

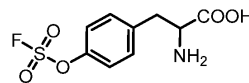
화학식 (IV), 여기서

각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR' 이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; 고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고; 각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; p는 0, 1, 2, 3 또는 4이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고; L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고; Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 제1 세포 표면 분자는 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 세포 표면 분자는 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 도메인은 제2 UAA를 포함하며, 이에 의해 제2 도메인은 제2 UAA의 부위에서 제2 표적에 공유 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 제1 표적화 도메인에 포함된 적어도 1개의 UAA와 상이하다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 제1 표적화 도메인에 포함된 적어도 1개의 UAA와 동일하다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 플루오로 술페이트 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 아릴-플루오로 술페이트 모



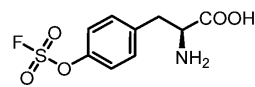
(화학식 I).

이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 I을 포함한다:



일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 구조를 갖는다:

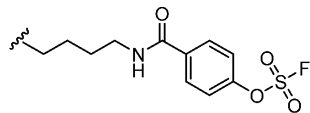
일부 실시양태에서, 제2 UAA는



하기 구조를 갖는다:

(FSY).

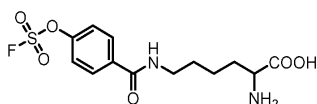
일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 II를



(화학식 II).

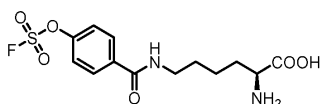
포함한다:

일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 구조를 갖는다:



일부 실시양태에서,

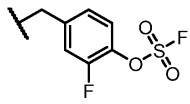
제2 UAA는 하기 구조를 갖는다:



(FSK).

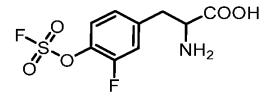
일부 실시양태에서,

제2 UAA는 하기 화학식 III을 포함한다:

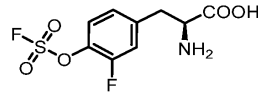


(화학식 III).

일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 구조를 갖는다:

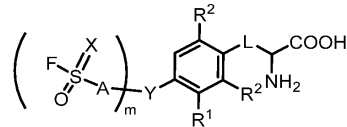


일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 구조를 갖는다:



(FFY).

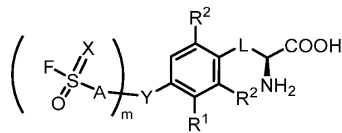
일부 실시양태에서, 제2



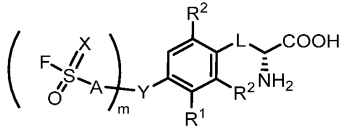
(IA),

여기서 각각의 X는 독립적으로

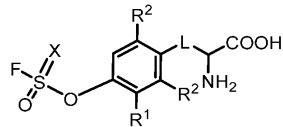
0 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고; L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고; Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는다:



일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는다:

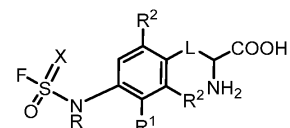


일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IB)의 구조를 갖는다:



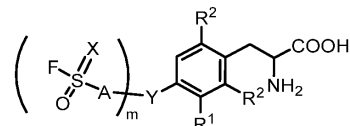
(IB).

일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IC)의 구조를 갖는다:



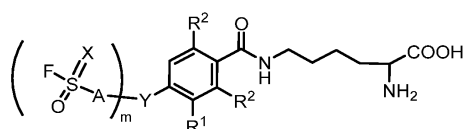
(IC).

일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는다:



(ID),

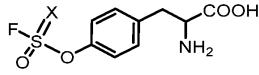
여기서 각각의 X는 독립적으로 0 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고; Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는다:



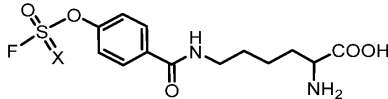
(IE),

여기서 각각의 X는 독립적으로 0 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-,

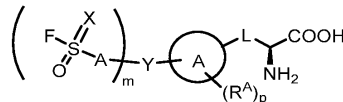
-NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고; Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는다:



(IIA), 여기서 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고; R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는다:



(IIB), 여기서 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고; R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다. 일부 실시양태에서, 제2 UAA는 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는다:



화학식 (IV), 여기서 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; 고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고; 각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; p는 0, 1, 2, 3 또는 4이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고; L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고; Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 66-72를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 66-72에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 66-72에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 1을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 서열식별번호: 1에 대해 26, 28, 29, 30, 99, 102, 103, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 서열식별번호: 2에 대해 50, 52, 53, 54, 56, 58 및 100으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 서열식별번호: 3에 대해 58, 62, 101, 103 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 16을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 16을 포함하는 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 16에 대해 위치 109에 비친연 아미노산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 18을 포함한다. 일부 실시양태에서, 페이로드 는 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 모이어티는 소분자 약물 또는 화학요법 약물을 포함한다. 일부 실

학식 (IV)의 구조를 갖는다:

화학식 (IV), 여기서 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고; Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고; A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고; 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고; 고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고; 각각의 R^A는 독립적으로 -OH, -OR^X, 할로젠, NHR^X, N(R^X)₂ 또는 임의로 치환된 알킬이고; p는 0, 1, 2, 3 또는 4이고; 각각의 R^X는 임의로 치환된 알킬이고; L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고; Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 66-72를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 66-72에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 서열식별번호: 66-72에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 1을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 서열식별번호: 1에 대해 26, 28, 29, 30, 99, 102, 103, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 서열식별번호: 2에 대해 50, 52, 53, 54, 56, 58 및 100으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 서열식별번호: 3에 대해 58, 62, 101, 103 및 107로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 16을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 16을 포함하는 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 16에 대해 위치 109에 비친연 아미노산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 서열식별번호: 18을 포함한다. 일부 실시양태에서, 페이로드 는 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 모이어티는 소분자 약물 또는 화학요법 약물을 포함한다. 일부 실

시양태에서, 방사성리간드 작용제는 ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{211}At , $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$, ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac 및 ^{227}Th 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 방사성리간드 작용제는 킬레이트화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방사성리간드 작용제는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^{201}Tl , ^{111}In 및 ^{67}Ga 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 링커에 의해 접합체에 부착된다. 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 접합체를 투여하는 것을 포함하는 방법으로서, 여기서 접합체는 제1 세포의 표면 상의 제1 표적에 공유 결합하는 것인 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 접합체는 제1 세포의 표면 상의 제2 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적의 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 제1 세포의 표면 상의 상이한 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 도메인은 제2 UAA를 포함하고, 여기서 제2 UAA는 제2 표적에 공유 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 세포는 종양 세포이다. 일부 실시양태에서, 접합체는 제1 표적에 결합되는 경우에 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 제2 표적에 결합되는 경우에 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제한다. 일부 실시양태에서, 접합체는 제1 표적 및 제2 표적에 결합되는 경우에 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적은 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 표적은 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 방사성표지 작용제 또는 세포독성제이다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 영상화제이다. 일부 실시양태에서, 방법은 접합체가 제1 세포 상의 제1 표적 및 제2 표적에 결합되는 경우에 제1 세포를 영상화하거나 확인한다. 또 다른 측면에서, (a) 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함하는 제1 표적화 도메인을 생체내 합성하는 단계; 및 (b) 페이로드를 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인에, 임의로 링커를 통해 접합시키는 단계를 포함하는, 본원에 제공된 접합체를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 제2 표적화 도메인을 제1 표적화 도메인에 대한 융합 단백질로서 생체내 합성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성은 직교 tRNA 신테타제/서프레스 tRNA 쌍의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성은 피롤리신 tRNA 신테타제/tRNA^{Pyl}로부터 유래된 직교 tRNA 신테타제/서프레스 tRNA 쌍을 포함한다.

[0113] 참조로 포함됨

[0114] 본 명세서에서 언급된 모든 공개 문헌, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공개 문헌, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 나타내어진 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0115] 본 발명의 신규 특색은 첨부된 청구범위에 구체적으로 제시된다. 본 발명의 특색 및 이점의 보다 나은 이해는 본 발명의 원리가 이용된 예시적 실시양태를 제시하는 하기 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조하여 얻어질 것이다:

도 1a-1e는 37°C에서 상이한 위치에 FSY를 갖는 FSY-변형된 sdAb와 PSMA (PSMA 최종 농도는 0.125 mg/mL, 1.25 uM이었음) (대략 7:1 sdAb 대 PSMA의 몰비) 사이의 가교의 다양한 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 도 1a는 표적

PSMA의 존재 또는 부재 하에 FSY를 포함하는 C1 구축물을 보여주는 겔을 도시한다. PSMA-C1-FSY 가교, PSMA 및 C1-FSY가 라벨링되어 있다. 도 1b는 표적 PSMA의 존재 또는 부재 하에 FSY를 포함하는 C1 구축물을 보여주는 겔을 도시한다. PSMA-C1-FSY 가교, PSMA 및 C1-FSY가 라벨링되어 있다. 도 1c는 표적 PSMA의 존재 또는 부재 하에 FSY를 포함하는 C1 구축물을 보여주는 겔을 도시한다. PSMA-C1-FSY 가교, PSMA 및 C1-FSY가 라벨링되어 있다. 도 1d는 표적 PSMA의 존재 또는 부재 하에 FSY를 포함하는 C1 구축물을 보여주는 겔을 도시한다. PSMA-C1-FSY 가교, PSMA 및 C1-FSY가 라벨링되어 있다. 도 1e는 표적 PSMA의 존재 또는 부재 하에 FSY를 포함하는 C1 구축물을 보여주는 겔을 도시한다. PSMA-C1-FSY 가교, PSMA 및 C1-FSY가 라벨링되어 있다.

도 2a-2c는 37°C에서 C2 (PSMA-특이적 sdAb)와 PSMA (8:1 sdAb:PSMA의 몰비)사이의 가교의 다양한 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 도 2a는 표적 PSMA의 존재 하에 위치 50-61에 FSY를 포함하는 C2 구축물, 뿐만 아니라 PSMA 및 야생형 C2--CDR2 풀 대조군을 보여주는 겔을 도시한다. 두꺼운 화살표는 가교된 생성물의 존재를 나타낸다. PSMA 및 C2는 얇은 화살표로 라벨링되어 있다. 도 2b는 표적 PSMA의 존재 하에 FSY를 포함하는 C2 구축물을 보여주는 겔을 도시한다. 도 2c는 표적 PSMA의 존재 하에 FSY를 포함하는 C2 구축물, 뿐만 아니라 야생형 C2--CDR3 풀 대조군을 보여주는 겔을 도시한다. 두꺼운 화살표는 가교된 생성물의 존재를 나타낸다. PSMA 및 C2-FSY는 얇은 화살표로 라벨링되어 있다.

도 3a는 37°C에서 180분에 걸쳐 FSY-변형된 sdAb (C1의 위치 28 또는 102에 FSY)와 PSMA (5:1 sdAb 대 PSMA의 몰비) (PSMA 최종 농도는 0.125 mg/mL, 1.25 μM이었음) 사이의 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 보여준다.

도 3b는 FSY-변형된 sdAb와 PSMA 사이의 가교 실험에 대한 PSMA 가교 백분율 대 시간의 동역학적 플롯을 보여준다. y-축은 가교된 PSMA의 % (10 단위 간격으로 0에서 60)로 라벨링되어 있고, x-축은 시간 (분, 30분 간격으로 0에서 180)으로 라벨링되어 있다. 시험된 구축물은 C1-28FSY (원형); C1-102FSY (정상각형); C1-112FSY (삼각형); C1-113FSY (역삼각형)였다.

도 4는 단량체 C1-관련 sdAb 구축물의 다이어그램을 보여준다. C1 (2개의 시스테인 디설피드 연결을 포함하는 야생형 서열); C39 (C1-C101A/C104A, 1개의 시스테인 디설피드 연결이 2개의 알라닌으로 대체되고, 디설피드 연결은 제거됨); C1-102FSY (히스티딘 102가 비천연 아미노산 FSY로 대체된 구축물 C1); 및 C39-102FSY (C1-C101A/C104A/H102(FSY), C101 및 C104 시스테인 둘 다가 알라닌으로 대체되고, 히스티딘 102가 FSY로 대체됨).

도 5a는 37°C에서 180분에 걸쳐 이중파라토프 구축물 C40-102FSY (C39-102FSY 서열을 FSY 부재 C39의 카피와 연결함으로써 생성됨) 또는 단일파라토프 구축물 C39-102FSY와 PSMA 사이의 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. C39-102FSY, C40-102FSY, 수용체 및 가교 중에 상응하는 밴드가 라벨링되어 있다. 커플링 속도는 단일파라토프 구축물과 비교하여 이중파라토프 구축물에 대해 증가된다.

도 5b는 이중파라토프 구축물 C40-102FSY 또는 단일파라토프 구축물 C39-102FSY와 PSMA 사이의 가교에 대한 PSMA 가교 대 시간의 동역학적 플롯을 보여준다.

도 6a 및 6b는 다양한 FSY-변형된 C3 구축물 사이의 가교의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 도 6a는 위치 26-35 및 50-60에 FSY를 갖는 C3 구축물의 결과를 보여주며; 구축물 C3-58FSY에 대한 가교된 생성물은 별도로 표시되어 있다. 도 6b는 위치 61-66 및 99-113에 FSY를 갖는 C3 구축물의 결과를 보여주며; 가교된 생성물은 적어도 구축물 C3-62FSY, C3-101FSY, C3-103FSY, C3-107FSY에 대해 관찰되었다.

도 7a는 다양한 폴링된 FSK-변형된 C8 구축물과 FAP 수용체 사이의 가교의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 도 7b는 다양한 개별 FSK-변형된 C8 구축물과 FAP 수용체 사이의 가교의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 도 7c는 다양한 FSK 변형된 C8 구축물과 FAP 수용체 사이의 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 보여준다.

도 8a-8d는 다양한 FSY-변형된 C9 구축물과 Her3 수용체 사이의 가교의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 도 8a는 다양한 위치에 FSY를 갖는 C9 구축물의 풀 및 Her3 수용체의 결과를 보여준다. 도 8b는 위치 52-68에 FSY를 갖는 C9 구축물 및 Her3 수용체의 결과를 보여준다. 도 8c는 위치 53, 55, 56, 57, 58, 60, 64 또는 67에 FSY를 갖는 C9 구축물 및 Her3 수용체의 결과를 보여준다. 도 8d는 FSY 변형된 C9 구축물 (C9-55FSY)과 Her3 수용체 사이의 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 보여준다.

도 9는 유동 세포측정법을 사용한 인간 전립선 종양 세포주 LNCaP (PSMA+) 및 PC3 (PSMA-)에 대한 C2-54FSY 및 C2-54TYR sdAb의 결합 검정의 결과를 보여준다.

도 10a 및 10b는 세포에 대한 FSY 변형된 sdAb 가교의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 도 10a는 상이한 농도 및 시점에서 인큐베이션된 LNCaP 세포 및 C2-54 FSY를 사용한 웨스턴 블롯을 보여준다. 블롯은 항-PSMA 항체 (상부

패널), 항-sdAb 항체 (중간 패널) 및 로딩 대조군으로서의 항-GAPDH (하부 패널)를 사용하여 분석하였다. 도 10b는 LNCaP 세포 및 C2-54TYR을 사용한 웨스턴 블롯을 보여주며, 이는 PSMA와의 가교를 나타내지 않았다. 최 우측 레인은 9시간 동안 LNCaP 세포와 함께 1 μ M에서 인큐베이션된 C2-54FSY의 샘플을 보여주는 대조군이다. 도 10c는 상이한 시점에서 C2-54FSY의 다양한 농도에서의 가교 동역학의 그래프를 보여준다.

도 11a는 상이한 시간 동안 LNCaP 세포에서 PSMA를 사용한 1 μ M 및 24nM의 C2-54FSY 및 C3-101FSY의 가교 동역학의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 상부 패널은 항-PSMA 항체를 사용한 블롯을 보여주며, 하부 패널은 항-GAPDH 대조군을 보여준다. 도 11b는 LNCaP 세포 상의 PSMA에 대한 C2-54FSY 및 C3-101FSY의 가교 동역학의 그래프를 보여준다.

도 12a 및 12b는 생체내 가교 검정의 연구 설계 및 결과를 보여준다. 도 12a는 C2-54 TYR 및 C2-54 FSY를 투여한 마우스로부터의 LNCaP 및 PC3 종양 조직 샘플의 연구 설계 및 웨스턴 블롯을 보여준다. 상부 패널은 항-VHH 항체로 블롯팅된 켈의 PSMA 영역을 보여주고, 중간 패널은 항-VHH 항체로 블롯팅된 켈의 유리 VHH 영역을 보여주고, 하부 패널은 항-GAPDH 블롯을 보여준다. 좌측 패널은 LNCaP 종양 보유 동물로부터의 샘플을 보여주며, 우측 패널은 PC3 샘플을 보여준다. 가교는 단지 LNCaP (PSMA+) 종양에서 및 C2-54FSY의 존재 하에서만 관찰된다. 도 12b는 투여 후 C2-54 TYR 및 C2-54 FSY의 혈장 농도의 그래프를 보여준다.

도 13은 C8-54FSY, C8-55FSY 및 C8-56FSY에 대한 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 보여준다 (좌측에서 우측으로). 가교 및 C8-FSY를 나타내는 밴드 위치가 라벨링되어 있다. 각각의 구축물에 대해, 레인은 (좌측에서 우측으로) 0, 15, 30, 60, 120, 180분 및 래더를 나타낸다.

도 14는 다양한 C15-FSY 함유 구축물에 대한 가교의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 좌측 켈: 레인 (좌측에서 우측으로)은 위치 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 33, 34, 35에서 FSY 치환을 갖는 구축물, 래더 및 Her2를 나타낸다. 우측 켈: 레인 (좌측에서 우측으로)은 위치: 36, 37, 66, 67, 68, 69에서 FSY 치환을 갖는 구축물, wt 래더 및 Her2를 나타낸다. 가교 및 FSY 포함 구축물을 나타내는 밴드 위치가 라벨링되어 있다.

도 15는 이중과라토프 구축물 C38-FSY와 Her2-Fc에 대한 가교의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 레인 (좌측에서 우측으로)은 0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5의 시간 (hr), Her2 및 래더이다. 가교, Her2-Fc 및 C38-FSY를 나타내는 밴드 위치가 라벨링되어 있다.

도 16은 A431 및 Colo320DM 세포에서 구축물에 대한 유동 세포측정법을 통한 결합 연구로부터 유래된 형광 대 농도의 플롯을 도시한다: A431-C23-TYR, 채워진 정사각형; A431-C23-FSY, 채워진 삼각형; Colo320DM-C23-TYR, "x"-기호; 및 Colo320DM-C23-FSY, 빈 원형. y-축은 40,000 단위 간격으로 0에서 200,000까지의 AF680-기하평균으로 라벨링되어 있다. x-축은 로그 베이스 10 스케일로 10⁻¹¹에서 10⁻⁵까지의 농도 (M)로 라벨링되어 있다.

도 17은 A431 (EGFR+) 및 COLO320DM (EGFR-) 종양에서 종양내 유리- 및 EGFR-가교된 AF680-표지된 화합물 C23-TYR 및 C23-FSY를 시간-의존성 방식으로 보여준다. 유리 AF-680 표지된 C23-TYR 및 C23-FSY는 ~15kD 영역에서 검출되었고 (하부 패널), EGFR 가교된 sdAb 밴드는 ~175kD 영역에서 검출되었다 (상부 패널). EGFR+ A431 종양에서 C23-FSY로는 EGFR의 시간-의존성 가교가 관찰되었지만 C23-TYR로는 관찰되지 않았다. EGFR- COLO320DM 종양에서는 유리-sdAb 체류도 가교도 관찰되지 않았다.

도 18a는 C23-TYR 또는 C23-FSY 시험 물품을 투여한 동물로부터 유래된 A431 종양으로부터의 삼중 생물학적 복제물에 걸친 광자/s/g 조직의 플롯을 도시한다. 개별 동물로부터의 값이 제시되고, 중심 막대는 평균 강도를 나타내고, 오차 막대는 SEM을 나타낸다 (대응표본 t 검정에 의해 *는 p= 0.024를 나타내고, **는 p= 0.002를 나타냄). C23-FSY는 8 및 24시간 시점 둘 다에서 비-FSY 함유 C23-TYR 단백질과 비교하여 A431 종양에서 유의하게 더 높은 수준으로 존재하였다. y-축은 0.5x10¹⁰개 간격으로 0에서 1.5x10¹⁰개까지의 광자/s/g 조직으로 라벨링되어 있다. x-축은 8 및 24 hr 시간에서의 투여 후 시간 (hr)으로 라벨링되어 있다. 별표는 대응표본 t 검정 (양측)을 통해 통계적 유의성을 나타냈다 (*= p ≤ 0.05, **= p ≤ 0.005).

도 18b는 투여 8 및 24시간 후에 C23-FSY를 투여한 동물로부터의 A431 및 COLO320DM 종양의 정량적 생체의 형광 강도의 플롯을 도시한다. 플롯은 삼중 생물학적 복제물에 걸친 광자/s/g 조직을 보여준다. 개별 동물로부터의 값이 제시되고, 중심 막대는 평균 강도를 나타내고, 오차 막대는 SEM을 나타낸다. C23-FSY는 8 및 24시간 시점 둘 다에서 EGFR- COLO320DM 종양에 존재하는 양과 비교하여 A431 종양에 유의하게 더 높은 수준으로 존재하였으며, 이는 C23-FSY 단백질의 종양 고정의 특이성을 입증한다. y-축은 0.5x10¹⁰개 간격으로 0에서 1x10¹⁰개까지의 광자/s/g 조직으로 라벨링되어 있다. x-축은 각각의 막대 세트에 대해 8 및 24 hr 시간에서의 투여 후 시간

(hr)으로 라벨링되어 있다. 좌측 세트는 A431 모델 종양이고, 우측 세트는 Colo320DM 모델 종양이다.

도 19는 종양 연관 유리 sdAb 및 PSMA-가교된 sdAb를 시간-의존성 방식으로 보여주는 SDS PAGE 겔의 형광 영상을 보여준다. LNCaP 종양을 보유하는 마우스에게 C30-TYR 또는 C30-FSY를 삼중으로 투여하였다. 처리 후 지정된 시점에서, 종양을 수거하고, 겔 전기영동을 위해 처리하여 형광단-접합된 sdAb 시험 물품을 검출하였다. 유리 (비-가교된) sdAb-AF680은 ~20kD 영역에서 검출되었고 (하부 패널), C30-FSY에 대한 PSMA-가교된 sdAb-AF680 종은 100kD 영역에서 이동하였다 (상부 패널). *로 표시된 레인은 비히클 샘플을 나타낸다.

도 20은 종양 연관 유리 및 PSMA-가교된 시험 물품 C30-TYR 및 C30-FSY의 정량적 분석을 보여준다. 상기 겔로부터의 유리 및 PSMA-가교된 종 밴드의 형광 밴드 강도를 밀도측정법 및 표준 곡선과의 비교를 통해 정량화하였다. 총 종양내 시험 물품 농도 (유리 및 PSMA-가교됨, pg/mg 종양 조직)가 시간 (h)에 대해 플롯팅되어 있다. *로 나타낸 데이터 포인트는 검출 및 정량화 한계 미만인 샘플을 나타낸다. C30-FSY의 종양 노출은 비-공유 C30-TYR에 비해 대략 3x 증가하였다.

도 21a는 MMAE에 접합된 sdAb에 대한 농도 대 세포 생존율 곡선을 보여주는, PC3PIP (PSMA 양성) 및 PC3flu (PSMA 음성) 세포주에서의 C26-54TYR 및 C26-54FSY 시험 물품의 세포독성의 비교 플롯을 도시한다. y-축은 20 단위 간격으로 0에서 120까지의 % 생존율로 라벨링되어 있다. x-축은 로그 베이스 10 간격으로 10^{-11} 에서 10^{-6} 까지의 시험 물품 농도 (M)로 라벨링되어 있다.

도 21b는 MMAE에 접합된 sdAb에 대한 농도 대 세포 생존율 곡선을 보여주는, PC3PIP (PSMA 양성) 및 PC3flu (PSMA 음성) 세포주에서의 C28-101TYR 및 C28-101FSY 시험 물품의 세포독성의 비교 플롯을 도시한다. y-축은 20 단위 간격으로 0에서 120까지의 % 생존율로 라벨링되어 있다. x-축은 로그 베이스 10 간격으로 10^{-11} 에서 10^{-6} 까지의 시험 물품 농도 (M)로 라벨링되어 있다.

도 22는 FSY 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 도시하며, 여기서 C17의 52FSY 및 54FSY 변이체를 Her2 수용체와 함께 인큐베이션하고, 가교 효율에 대해 검사하였다. 레인 1-5는 0, 30, 60, 120 및 180분에서의 C17-52FSY를 나타내고; 레인 6-10은 0, 30, 60, 120 및 180분에서의 C17-54FSY를 나타내고; 레인 11 및 12는 각각 FcHer2 및 래티이다. C17-FSY, 수용체 및 가교 생성물에 반응하는 밴드 위치가 라벨링되어 있다.

도 23a는 BT474 세포에서 MMAE에 접합된 sdAb에 대한 농도 대 세포 생존율 곡선을 보여주는, C33-52TYR, C33-52FSY, C33-54TYR 및 C33-54FSY 시험 물품의 5시간 휴약을 사용한 세포독성의 비교 플롯을 도시한다. y-축은 20 단위 간격으로 -20에서 120까지의 % 생존율로 라벨링되어 있다. x-축은 로그 베이스 10 간격으로 10^{-3} 에서 10^3 까지의 시험 물품 농도 (nM)로 라벨링되어 있다.

도 23b는 BT474 세포에서 MMAE에 접합된 sdAb에 대한 농도 대 세포 생존율 곡선을 보여주는, C33 시험 물품의 연속 6일 노출을 사용한 세포독성의 비교 플롯을 도시한다. y-축은 20 단위 간격으로 -20에서 120까지의 % 생존율로 라벨링되어 있다. x-축은 로그 베이스 10 간격으로 10^{-2} 에서 10^2 까지의 시험 물품 농도 (nM)로 라벨링되어 있다.

도 24a는 단일파라토프 및 이중파라토프 구축물 (C3-101FSY, 정사각형; C34-FSY, 삼각형; C36-FSY, 원형)에 대한 PSMA 가교의 플롯을 도시한다. y-축은 20 단위 간격으로 0에서 100까지의 가교된 PSMA (총 %)로 라벨링되어 있다. x-축은 베이스 10 간격으로 0.01에서 1000까지의 시험 물품 농도 (nM)로 라벨링되어 있다. 플롯은 1시간에서의 가교에 상응한다.

도 24b는 단일파라토프 및 이중파라토프 구축물 (C3-101FSY, 정사각형; C34-FSY, 삼각형; C36-FSY, 원형)에 대한 PSMA 가교의 플롯을 도시한다. y-축은 20 단위 간격으로 0에서 100까지의 가교된 PSMA (총 %)로 라벨링되어 있다. x-축은 베이스 10 간격으로 0.01에서 1000까지의 시험 물품 농도 (nM)로 라벨링되어 있다. 플롯은 6시간에서의 가교에 상응한다.

도 25a는 1시간 및 6시간 시점에서 다양한 농도의 C3-101FSY 및 C34-FSY 구축물에서의 FSY 가교 동역학의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. 레인 1-6은 1시간에서의 C3-101FSY를 나타내고; 레인 7-12는 1시간에서의 C34-FSY를 나타내고; 레인 13-18은 6시간에서의 C3-101FSY를 나타내고, 레인 19-24는 6시간에서의 C34-FSY를 나타낸다. 6개의 레인의 각각의 균은 증가하는 구축물 농도를 도시한다 (좌측에서 우측으로): UTC, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM. 블롯의 상부 세트는 a-PSMA를 도시하고, 블롯의 하부 세트는 a-GAPDH를 도시한다. GAPDH, PSMA, 가교-단

량체 및 가교 이량체에 대한 밴드 위치가 라벨링되어 있다.

도 25b는 1시간 및 6시간 시점에서 다양한 농도의 C3-101FSY 및 C36-FSY 구축물에서의 FSY 가교 동역학의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. 레인 1-6은 1시간에서의 C3-101FSY를 나타내고; 레인 7-12는 1시간에서의 C36-FSY를 나타내고; 레인 13-18은 6시간에서의 C3-101FSY를 나타내고, 레인 19-24는 6시간에서의 C36-FSY를 나타낸다. 6개의 레인의 각각의 균은 증가하는 구축물 농도를 도시한다 (좌측에서 우측으로): UTC, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM. 블롯의 상부 세트는 a-PSMA를 도시하고, 블롯의 하부 세트는 a-GAPDH를 도시한다. GAPDH, PSMA, 가교-단량체 및 가교 이량체에 대한 밴드 위치가 라벨링되어 있다.

도 26a는 EGFR과 단일파라토프 구축물 C4-109FSY 사이의 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 도시한다. t 반수-최대는 대략 120분이었다. 가교된 생성물, EGFR 및 sdAb 단량체에 반응하는 밴드가 라벨링되어 있다. 단량체 FSY-함유 sdAb와 결속된 수용체의 카툰이 우측에 제시된다.

도 26b는 EGFR과 이중파라토프 구축물 C37-FSY 사이의 가교 동역학의 SDS-PAGE 분석을 도시한다. 가교된 생성물, EGFR 및 sdAb 이량체에 반응하는 밴드가 라벨링되어 있다. 이중파라토프 FSY-함유 sdAb 구축물과 결속된 수용체를 도시하는 카툰이 우측에 제시된다.

도 27은 단일파라토프 구축물 C4-109FSY (정사각형) 또는 이중파라토프 구축물 C37-FSY (원형)에 대한 EGFR 가교 동역학의 플롯을 도시한다. y-축은 0에서 100%까지의 EGFR 가교 %로 라벨링되어 있다. x-축은 100분 간격으로 0에서 400까지의 시간 (분)으로 라벨링되어 있다.

도 28a-c는 제1 표적화 도메인 (예를 들어, 구축물 C1-C4) 및 제2 표적화 도메인 (예를 들어, 구축물 C1-C4)을 포함하는 본원에 기재된 예시적인 접합체를 도시하며, 여기서 접합체는 비천연 아미노산 (예를 들어, FSY)을 포함한다. 하나의 예시적인 접합체는 또한 페이로드를 포함한다. 예시적인 접합체는 제1 표적화 도메인, 제2 표적화 도메인 또는 둘 다의 표적화 도메인 상에 비천연 아미노산을 포함할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0116] 항체, 항체 단편 및 항체-관련 구축물, 예컨대 항체-약물 접합체 (ADC)는 연구 및 임상 적용을 위한 유용한 도구일 수 있다. 그러나, 일부 경우에, 이들 분자의 사용은 표적에 대한 온/오프 속도뿐만 아니라 안정성에 의해 제한된다. 표적에 대한 접합체의 특이적 및 공유 결합을 위한 조성물 및 방법이 본원에 제공된다. 일부 경우에, 접합체는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 갖는 적어도 1개의 표적화 도메인을 포함하며, 상기 잔기는 표적과 표적화 도메인 사이의 인터페이스에 근접하여 있어, 표적화 도메인과 표적이 결합되는 경우에, 표적과 UAA 잔기 사이에 공유 결합이 형성된다. 일부 경우에, 접합체는 적어도 1개의 표적화 도메인 및 적어도 1개의 페이로드를 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 표적과 표적화 도메인 사이의 인터페이스에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 포함하여, 표적화 도메인과 표적이 결합되는 경우에, 표적과 UAA 잔기 사이에 공유 결합이 형성된다. 일부 경우에, 접합체가 그의 표적화 세포/종양에 도달하면, 페이로드는 이제 표적화 도메인을 통해 표적에 공유 결합된다. 일부 경우에, 공유 상호작용은 표적에 결합하는 접합체의 오프 속도를 제거하거나 감소시켜, 부착된 페이로드와의 접촉을 증가시킨다.

[0117] 일부 경우에, 접합체는 (i) 제1 표적화 도메인 및 (ii) 제2 표적화 도메인을 포함하며, 여기서 제1 또는 제2 표적화 도메인은 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함한다. 일부 경우에, 제1 또는 제2 표적화 도메인은 표적과 제1 또는 제2 표적화 도메인 사이의 인터페이스에 근접하여 존재하는 적어도 1개의 UAA를 포함하고, 제1 또는 제2 표적화 도메인과 표적이 결합되는 경우에, 표적과 적어도 1개의 UAA 사이에 공유 결합이 형성된다. 일부 경우에, 접합체는 페이로드를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 접합체가 그의 표적화 세포, 예컨대 종양 또는 종양 미세환경 내의 세포에 도달하는 경우에, 페이로드는 이제 표적화 도메인 중 하나 (예를 들어, 제1 또는 제2 표적 도메인)를 통해 표적에 공유 결합된다.

[0118] 일부 경우에, 공유 상호작용은 표적에 결합하는 접합체의 오프 속도를 제거하거나 감소시키거나, 또는 달리 표적에 대한 접촉을 안정화시킨다. 추가 경우에, 본원에 제공된 접합체 내의 제1 및 제2 표적화 도메인은 동일하거나 상이한 표적을 표적화한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인이 아닌 제2 표적화 도메인만이 UAA를 포함한다. 일부 경우에, 제2 표적화 도메인이 아닌 제1 표적화 도메인만이 UAA를 포함한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 둘 다는 UAA를 포함한다. 일부 경우에, 페이로드는 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인에 부착될 수 있다. 일부 경우에, 페이로드는 제1 표적화 도메인에 부착된다. 일부 경우에, 페이로드는 제2 표적화 도메인에 부착된다.

- [0119] 접합체
- [0120] 접합체는 표적화 도메인 및 페이로드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 링커에 의해 접합체에 부착된다. 일부 경우에, 접합체는 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 표적에 결합하도록 구성되고, 표적화 도메인 내의 비천연 아미노산 중 1개는 표적과 공유 결합을 형성한다.
- [0121] 본원에 제공된 접합체는 (i) 제1 표적화 도메인 및 (ii) 제2 표적화 도메인을 포함할 수 있다. 본원에 제공된 접합체는 (i) 제1 표적화 도메인, (ii) 제2 표적화 도메인 및 (iii) 페이로드를 포함할 수 있다. 본원의 접합체는 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 세포에 결합하도록 구성된다. 일부 경우에, 접합체는 제1 표적화 도메인, 제2 표적화 도메인에 포함된 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하거나 또는 각각의 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 적어도 1개의 UAA를 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 표적에 결합하도록 구성되고, 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 및/또는 제2 표적화 도메인) 내의 UAA 중 1개는 표적과 공유 결합을 형성한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인은 UAA를 포함하고, 제1 표적과 공유 결합을 형성하도록 구성되어, 적어도 1개의 UAA가 제1 표적화 도메인에 제1 표적과 제1 표적화 도메인 사이의 인터페이스에 근접하여 존재한다. 일부 경우에, 제1 표적 및 제1 표적화 도메인이 결합되고, 제1 표적과 접합체의 제1 표적화 도메인 내의 UAA 사이에 공유 결합이 형성된다. 일부 경우에, 제2 표적화 도메인은 UAA를 포함하고, 제2 표적과 공유 결합을 형성하도록 구성되어, 적어도 1개의 UAA가 제2 표적화 도메인에 제2 표적과 제2 표적화 도메인 사이의 인터페이스에 근접하여 존재한다. 일부 경우에, 제2 표적 및 제2 표적화 도메인이 결합되고, 제2 표적과 접합체의 제2 표적화 도메인 내의 UAA 사이에 공유 결합이 형성된다. 일부 경우에, 제1 표적은 제2 표적과 동일하다. 일부 경우에, 제1 표적 및 제2 표적은 동일한 세포의 표면 상에 있다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은, 예컨대 세포의 표면 상의 동일한 표적에 결합하고, 표적화 도메인 중 하나의 결속은 다른 표적화 도메인을 그의 상응하는 표적에 근접하게 가져온다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인은 제1 표적에 결합되고, 제2 표적화 도메인은 제2 표적에 결합되고, 제1 및 제2 표적화 도메인 중 적어도 하나는 UAA를 포함하고, UAA는 상응하는 표적과 공유 결합을 형성한다. 일부 경우에, 한 표적화 도메인은 그의 상응하는 표적과 공유 결합을 형성하고, 다른 표적화 도메인은 그의 상응하는 표적에 비공유 결합된다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 둘 다는 각각 그의 상응하는 표적에 공유 결합된다.
- [0123] 본원에 제공된 접합체는 1개 초과 표적에 결합하도록 구성될 수 있다. 일부 경우에, 제2 표적화 도메인은 제1 표적화 도메인과 상이한 표적에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 접합체는 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 초과 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인)은 링커 (예를 들어, 화학적 링커, 융합 단백질 또는 본원에 제공된 다른 링커)를 통해 서로 부착된다. 본원에 제공된 접합체 내의 다중 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인)은 일부 경우에 단일과라토프 또는 이중과라토프 구축물을 제공할 수 있다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적에 결합한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 상이한 표적에 결합한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 연결되어 융합 단백질을 형성한다.
- [0124] 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인)은 접합체에 부착된 페이로드를 표적에 안내할 수 있다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 단일특이적 Fab2, 이중특이적 Fab2, 삼중특이적 Fab3, 1가 IgG, scFv, 이중특이적 디아바디, 삼중특이적 트리아바디, scFv-Fc, 나노바디 (즉, 단일 도메인 항체, sdAb), 미니바디, IgNAR, V-NAR, hcIgG, VhH 또는 펩티바디, DARPIn, 모노바디/FN3, VNAR, 레페바디, DARPIn을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 나노바디를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 1개 이상의 CDR 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 세포 표면 분자에 결합한다. 일부 경우에, 접합체는 이중과라토프이다. 일부 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 각각 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하고, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편의 구조는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인은 단일 쇠 (예를 들어, Fv) 항체 단편일 수 있고, 제2 표적화 도메인은 sdAb일 수 있거나, 또는 다른 경우에, 제1 표적화 도메인은 sdAb일 수 있고, 제2 표적화 도메인은 sdAb일 수 있다.
- [0125] 일부 경우에, 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 및/또는 제2 표적화 도메인)은 항체 모방체, 예컨

대 아피바디, DARPin 또는 미니 결합제이다.

[0126] 일부 경우에, 표적은 세포 표면 단백질을 포함한다. 일부 경우에, 표적은 PSMA를 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 및/또는 제2 표적화 도메인)은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나와 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나와 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 동일성을 갖는 서열 및 적어도 1개의 비천연 아미노산을 포함한다.

[0127] 비천연 아미노산은 접합체 내의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 일부 경우에, 제1 또는 제2 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인) 중 하나 또는 둘 다는 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 1개 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편이다. 일부 경우에, 1개 이상의 비천연 아미노산은 표적화 도메인 중 단지 하나 또는 둘 다에서 CDR 내에 또는 그의 근접부 내에 포함된다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 C1, C2 또는 C3을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 C1을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 26, 28, 29, 30, 99, 102, 103, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114 및 115 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 C1을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 28, 102, 112 및 113 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 C1을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 C2를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 50, 52, 53, 54, 56, 58 또는 100 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 C2를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 C4를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 109에 비천연 아미노산을 갖는 C4를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 C3을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 58, 62, 101, 103 또는 107 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 C3을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 62, 64 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 C8을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 53, 55, 56, 57, 58, 60, 64, 67 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 C9를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR 영역 및 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 갖는 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR 영역 및 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 갖는 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나와 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR 영역은 1개 이상의 서열식별번호: 5-13을 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR 영역은 1개 이상의 서열식별번호: 5-13과 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0128] 일부 경우에, 접합체는, 예컨대 정제를 위한 태그 (예를 들어, His6 태그)를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 태그를 포함하지 않거나, 또는 태그는 투여 전에 제거된다. 일부 경우에, 접합체는, 예컨대 발현 또는 분비를 위한 리더 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 리더 서열을 포함하지 않거나, 또는 리더 서열은 접합체의 형성 전에, 페이로드의 부착 전에 또는 접합체의 투여 전에 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인으로부터 제거된다.

[0129] 일부 경우에, 접합체는 신호 서열을 포함한다. 신호 서열은 박테리아 세포에서 접합체의 발현, 폴딩 또는 산화를 가능하게 할 수 있다. 일부 경우에, 신호 서열은 박테리아 세포에서 발현된 접합체가 접합체의 폴딩 또는 기능을 촉진하기 위해 또 다른 위치 또는 환경으로 수송되도록 할 수 있다. 일부 경우에, 신호 서열은 PelB 서열일 수 있다. 일부 경우에, 신호 서열은 박테리아 세포의 주변세포질로의 접합체의 수송을 가능하게 할 수 있다. 일부 경우에, 환경은 디설피드의 형성 또는 디설피드의 환원을 가능하게 하도록 산화 또는 환원될 수 있다.

[0130] 표적

[0131] 본원에 제공된 접합체는 1개 이상의 표적에 결합하도록 구성될 수 있다. 일부 경우에, 접합체는 UAA를 포함하는 단일 표적화 도메인으로 구성되고, 접합체는 표적에 결합한다. 일부 경우에, 접합체는 2개 (또는 적어도 2개)의 표적화 도메인으로 구성되고, 제1 및 제2 표적화 도메인은 1개 이상의 표적에 결합한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인은 제1 표적에 결합하고, 제2 표적화 도메인은 제2 표적에 결합한다. 일부 경우에, 표적화 도메인 (예를 들어, 단일 표적화 도메인 또는 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인)에 포함된 UAA는 표적

화 도메인 (예를 들어, 단일 표적화 도메인 또는 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인)과 표적 (표적화 도메인(들)에 대한 상응하는 표적, 예를 들어 제1 또는 제2 표적) 사이에 공유 결합을 형성한다. 일부 경우에, 접합체는 제1 UAA를 포함하는 제1 표적화 도메인 및 제2 UAA를 포함하는 제2 표적화 도메인을 포함한다. 이러한 UAA는 일부 경우에 동일하거나 또는 다른 경우에 상이하다. 일부 경우에, 표적은 세포 표면 분자이다 (즉, 세포의 외부 표면 상에 전체적으로 또는 부분적으로 존재함). 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 동일한 표적, 예컨대 동일한 세포 표면 분자에 결합한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인은 각각 상이한 표적에 결합하고, 예컨대 상이한 세포 표면 분자에 결합한다. 상이한 세포 표면 분자는 동일한 세포 상에 존재할 수 있다.

[0132] 일부 경우에, 표적은 종양 세포 상에 존재하는 세포 표면 분자이다. 표적은 일부 경우에 단량체이다. 일부 경우에, 표적은 동중 또는 이중 단위의 다량체 구조에 포함된다. 일부 경우에, 표적은 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0133] 일부 경우에, 접합체는 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인을 포함하고, 둘 다의 표적화 도메인은 동일한 표적에 결합하며, 여기서 표적은 종양 세포 상의 세포 표면 분자이다. 예를 들어, 표적화 도메인 둘 다는 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 표적에 결합한다. 일부 경우에, 접합체는 제1 표적화 도메인을 포함하고, 제2 표적화 도메인은 상이한 표적에 결합하며, 여기서 상이한 표적 중 1개 이상은 종양 세포 상의 세포 표면 분자이다. 예를 들어, 제1 및 제2 표적화 도메인은 각각 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 표적에 결합한다. 일부 경우에, 접합체는 제1 또는 제2 표적 (또는 둘 다)이 결합되는 경우에 세포 표면에 페이로드를 운반한다. 일부 경우에, 접합체는 페이로드를 갖지 않고, 접합체는 제1 표적, 제2 표적 또는 제1 및 제2 표적 둘 다에 공유 결합되는 경우에 차단제 또는 길항제로서 작용한다.

[0134] 일부 경우에, 접합체는 단일 표적화 도메인을 포함하고, 표적화 도메인은 표적에 결합하며, 여기서 표적은 종양 세포 상의 세포 표면 분자이다. 예를 들어, 표적화 도메인은 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택된 표적에 결합한다. 일부 경우에, 단일 표적화 도메인은 표적에 페이로드를 운반한다. 일부 경우에, 단일 표적화 도메인은 페이로드를

가지 않고, 접합체는 표적에 공유 결합되는 경우에 차단제 또는 길항제로서 작용한다.

[0135] 표적화 도메인에 의해 결속되는 표적은 다양한 구조를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 표적은 표적화 도메인에 의해 결속될 수 있는 1개 이상의 에피토프를 포함한다. 일부 경우에, 표적은 다중 에피토프를 포함하고, 다중 표적화 도메인에 의해, 예를 들어, 예컨대 제1 에피토프에 결합하는 제1 표적화 도메인 및 제2 에피토프에 결합하는 제2 표적화 도메인에 의해 결속될 수 있다. 일부 경우에, 표적은 다량체를 포함한다. 일부 경우에, 표적은 단일쇄 펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 표적은 다량체 분자를 포함한다. 일부 경우에, 다량체 분자는 2개 이상의 서브유닛을 포함한다. 일부 경우에, 서브유닛은 동일한 구조를 갖는다. 일부 경우에, 서브유닛은 상이한 구조이거나 또는 동일한 구조와 상이한 구조의 조합이다. 일부 경우에, 다량체 분자는 복합체 내에 2개 이상의 분자를 포함한다. 일부 경우에, 다량체 분자는 서로 복합체를 형성하거나 상호작용하는 2개의 단백질을 포함한다.

[0136] 예시적인 표적화 도메인 및 예시적인 접합체

[0137] 본원에 제공된 접합체는 표적과 결속하는 분자로부터 조립될 수 있는 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 표적화 도메인 (단일 표적화 도메인 또는 제1 표적화 도메인 및/또는 제2 표적화 도메인)은 항원-결합 영역을 포함하며, 여기서 항원 결합 영역은 특이적 표적과 결속한다. 이러한 항원 결합 영역은 CDR, 예컨대 항체의 중쇄 또는 경쇄에서 일반적으로 발견되는 3개의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 표적화 도메인은 CDR을 포함하는 항원 결합 단편, 예컨대 VHH (나노바디 또는 단일 도메인 항체로도 불림)를 포함한다. 일부 경우에, 단일 도메인 항체는 1개 이상의 UAA를 포함한다. 일부 경우에, 단일 표적화 도메인 또는 다중 표적화 도메인을 갖는 접합체의 경우, 표적화 도메인 중 하나 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인)는 표 1의 단일 도메인 항체, 예컨대 C1, C2, C3, C4 또는 C5로부터 선택된다. 일부 경우에, 1개 초과 표적화 도메인을 갖는 접합체의 경우, 각각의 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인)은 표 1의 단일 도메인 항체, 예컨대 C1, C2, C3, C4 또는 C5 중 임의의 것으로부터 독립적으로 선택되고, 1개 이상의 UAA는 단일 도메인 항체의 CDR 내에 또는 CDR에 근접하여 존재한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인은 표 1의 단일 도메인 항체, 예컨대 C1, C2, C3, C4 또는 C5 중 임의의 것으로부터 선택된다. 일부 경우에, 제2 표적화 도메인은 표 1의 단일 도메인 항체, 예컨대 C1, C2, C3, C4 또는 C5 중 임의의 것으로부터 선택된다.

[0138] 일부 경우에, 구축물 C1을 포함하는 접합체는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인, 제2 표적화 도메인 또는 둘 다의 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C1을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 1, 4, 19 또는 73 내의 위치 26, 28, 29, 30, 99, 102, 103, 105, 108, 110, 111, 112, 113, 114 및 115 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C1을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 1, 4, 19 또는 73 내의 위치 28, 102, 112 및 113 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C1을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함한다. 일부 경우에, 이러한 sdAb는 서열식별번호: 1을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 1에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 1에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 동일성을 갖는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인 또는 둘 다를 포함한다.

[0139] 일부 경우에, 구축물 C2를 포함하는 접합체는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인, 제2 표적화 도메인 또는 두 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C2를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 2 또는 22의 위치 50, 52, 53, 54, 56, 58 또는 100 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C2를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하고, sdAb 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 2를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인 또는 둘 다를 포함한다.

- [0140] 일부 경우에, 구축물 C3을 포함하는 접합체는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인, 제2 표적화 도메인 또는 둘 다의 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C3을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 3의 위치 58, 62, 101, 103 또는 107 중 어느 하나에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C3을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 C3의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 위치 109에 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 3을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 3에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 3에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인 또는 둘 다를 포함한다.
- [0141] 일부 경우에, 구축물 C4를 포함하는 접합체는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인, 제2 표적화 도메인 또는 둘 다의 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C4를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 16을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 16에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 16에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인 또는 둘 다를 포함한다.
- [0142] 일부 경우에, 구축물 C5를 포함하는 접합체는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인, 제2 표적화 도메인 또는 둘 다의 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 비천연 아미노산을 갖는 구축물 C5를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 18을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 도메인 항체 (sdAb) 및 sdAb 내의 CDR 영역 내에 또는 그에 근접하여 있는 적어도 1개의 비천연 아미노산 (UAA)을 포함하며, 여기서 sdAb는 서열식별번호: 18에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 18에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는 단일 표적화 도메인, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인 또는 둘 다를 포함한다.
- [0143] 본원에 기재된 접합체는 2개 이상의 표적화 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 2개 이상의 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인)은 링커를 통해 서로 부착된다. 일부 경우에, 접합체는 융합 단백질이다. 일부 경우에, 링커는 링커 L1 (서열식별번호: 14)을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 65-72 중 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 65-72 중 어느 하나에 대해 적어도 99%, 98%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 70% 또는 적어도 65% 서열 동일성을 갖는다.
- [0144] 일부 경우에, 제1 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 제1 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 제2 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 제2 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 단일 표적화 도메인으로 구성되고, 단일 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 단일 표적화 도메인은 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0145] 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 65-72를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 65-72 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 1-4 또는 16-64 중 어느 하나에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 서열식별번호: 65-72에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0146] 일부 경우에, 본원에 기재된 접합체와 연관된 아미노산 서열은 표 1A에 있다.

[0147] 표 1A: 아미노산 서열

구축물 명칭	SEQ ID NO	서열
C1	1	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLR</u> <u>L</u> <u>SCTAPGYTDSN</u> <u>YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRG</u> <u>STSY</u> <u>ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSL</u> <u>KPEDT</u> <u>AIYYCAVAACHFCDSL</u> <u>PKTQDEYIL</u> <u>WGQGTQ</u> <u>VTVSSAAAYPYDVPDYGS</u>
C2	2	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLT</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>CAASRFMISEY</u> <u>SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTD</u> <u>YAES</u> <u>VKGRFTISRDN</u> <u>AKNTLYLQMN</u> <u>SLKPEDTAVY</u> <u>YCDGYGYRGQGTQ</u> <u>TVSS</u>
C3	3	<u>QVQLQESGGGSVEAGGSLR</u> <u>L</u> <u>SC</u> <u>ARSGWPYST</u> <u>YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIF</u> <u>AES</u> <u>KAGQFTISQDNAKNTVYLQMN</u> <u>NL</u> <u>KPEDTAIY</u> <u>YCAARRDYS</u> <u>LS</u> <u>SSSDDFDY</u> <u>WGQGTQ</u> <u>VTVSSA</u> <u>AAYPYDVPDYGS</u>
C1- C101A/C1 04A/H102 (FSY)	4	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLR</u> <u>L</u> <u>SCTAPGYTDSN</u> <u>YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRG</u> <u>STSY</u> <u>ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSL</u> <u>KPEDT</u> <u>AIYYCAVAAXFADSL</u> <u>PKTQDEYIL</u> <u>WGQGTQ</u> <u>VTVSSAAAYPYDVPDYGSC</u>
C1- CDR1_26 -35	5	GYTDSNYYS
C1- CDR2_50 -66	6	VNTGRGSTSYADSVKG
C1- CDR3_99 -116	7	AACHFCDSLPKTQDEYIL
C2- CDR1_26 -35	8	RFMISEYSMH
C2- CDR2_50 -65	9	TINPAGTTDYAESVKG
C2- CDR3_96 -100	10	DGYGY
C3_CDR1 26-35	11	GWPYSTYSMN
C3_CDR2 50-65	12	GISSTMSGIIFAESKAG
C3_CDR3 99-113	13	RRDYSLS
L1	14	GGGSGGGGS
Pe1B	15	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMG

[0148]

C4	16	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTRSRS YGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVT VSS
C4-109FSY	17	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTRSRS YGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVT VSS
C5	18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSS YAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSSGGYTYT DSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTA VYYCAATYLSDDYSRYALPQRPLDYDYWGQ GTQVTVSSLE
C1-C101A/C104A	19	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGSTSY ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT AIYYCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQ VTVSSAAAYPYDVPDYGSC
C2-A54(FSY)	20	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPXGTTDYAES VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSS
C6	21	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNK YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLV TVSS
C7	22	EVQLVESGGGLVQPGESLTLSCVAVAGSIFFA MSWYRQAPGKERELVARIGSDDRVTYADSV KGRFTISRDNKRTAGLQMNSLKPEDTAVYY CNAQTDLRDWTVREYWGQGTQVTVSSSPST PPTSPSTPP
C8	23	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASGSIFVG NAMGWYRQALGNQRELVAGITSDGITYYPD SVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLKPEDTAV YYCNLWPPRIGFASWGQGTQVTVSSAAAYP YDVPDYGS
C9	24	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAFSGRTFSM YTMGWFRQAPGKEREFVAANRGRGLSPDIA DSVNGRFTISRDNANTLYLQMDSLKPEDTA VYYCAADLQYGSSWPQRSSAEYDYWGQGT VTVSS
C10	25	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAPSGSIFGIR TMDWYRQAPGKERELVARITMDGRVVFHADS VKGRFSGSRDGASNAVYLMNSLKPDDTAV YYCRYSGLTSREYWGPGTQVTVSS
C11	26	QVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAASGIDLSL YRMRWYRQAPGKERDLVALITDDGTSYYED

[0149]

		SVKGRFTITRDNPSNKVFLQMNSLKPEDTAV YYCNAETPLSPVNYWGQGTQVTVS
C12	27	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASETFGVV FTLGWYRQAPGKGREFVARVTGDTVDYAE SVKGRFTISSDFARNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCNTGAYWGQGLVTVKPSPTPTPSPSTP P
C14	28	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDYGS YWMGWFRQAPGKEREVAAINRGGGYTVY ADSVKGRFTISRDTAKNTVYLQMNSLRPDDT ADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTQVT VSS
C15	29	MDLGKKLLEAARAGQDDEVIRILMANGADV NAHDFYGITPLHLAANFGHLEIVEVLLKHGA DVNAFDYDNTPLHLAADAGHLEIVEVLLKYG ADVNASDRDGHPLHLAAREGHLEIVEVLLK NGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEIL QKLAAALE
C16	30	RSDLGKKLLEAARAGQDDEVIRILMANGADV NAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIVEVLLKNGA DVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHG ADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKL NGS
C17	31	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRISGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSSPSTPTPS PSTPP
C17- 52FSY	32	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIXGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSSPSTPTPS PSTPP
C17_54(F SY)	33	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRISGXGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSSPSTPTPS PSTPP
C18	34	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSSK YAMGWFRQAPGKGTEFVATISWSDGSTYYA DSVEGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCAAAVDVLAGTFEYDYWGQGLVTV VSSSPSTPTPSPSTPP
C19	35	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTREYDYWGQGTQVT VSS
C19_109(FSY)	36	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTGYA

[0150]

		DSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAGSAWYGTRXEYDYWGQGTQVT VSS
C20	37	QVTLRESGGGLVQAGGSLRLSCKGSGRAINT YAMGWFRQAPGKEREVAAISWNGGHTRYA DSVQGRFAISRDNADNTMYLQMNSLKPEDT AVYHCAAYSYHRIATMEADADSWGQGTQ VTV
C21	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFTFRN YEMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGSTYYA HSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAI YYCARLRDGFNNGFDYWGQGTQVTVSSLPE TGGSPSTPPTPSPSTPP
C22-TYR	39	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAGSAWYGTRYEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C22-FSY	40	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAGSAWYGTRXEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C23-TYR	41	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAGSAWYGTRYEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGG-(AF680)
C23-FSY	42	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAGSAWYGTRXEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGG-(AF680)
C24	43	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLMNMLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGS
C24-FSY	44	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLMNMLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGS
C25- 54TYR	45	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSSSPSTPPTPSPSTPP C
C25- 54FSY	46	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPXGTTDYAES VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVY

[0151]

		YCDGYGYRGGGTQVTVSSSPSTPPTPSPSTPP C
C26	47	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVY YCDGYGYRGGGTQVTVSSSPSTPPTPSPSTPP CHHHHHH-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C26-54 FSY	48	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPXGTTDYAES VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAVY YCDGYGYRGGGTQVTVSSSPSTPPTPSPSTPP CHHHHHH-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C27- 101TYR	49	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSSDDFDYWGGGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSSPSTPPTPSPSTPPC
C27- 101FSY	50	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSDDFDYWGGGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSSPSTPPTPSPSTPPC
C28	51	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSSDDFDYWGGGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSSPSTPPTPSPSTPPCHHHHH H-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C28-101 FSY/TYR	52	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSDDFDYWGGGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSSPSTPPTPSPSTPPCHHHHH H-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C29-TYR	53	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSSDDFDYWGGGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C29-FSY	54	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSDDFDYWGGGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C30-TYR	55	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSSDDFDYWGGGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGG-(AF680)
C30-FSY	56	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES

[0152]

		KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRXFLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGG-(AF680)
C32-52TYR	57	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C32-52FSY	58	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C32-54TYR	59	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C32-54FSY	60	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C33-52TYR	61	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C33-52FSY	62	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C33-54TYR	63	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C33-54FSY	64	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGGGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C34	65	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGGGTQVTVSSGGGGGGGGGGGG GGSQVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWP YSTYSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIF AESKAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDT AIYYCAARRYFLSSSSDDFDYWGQGTQVTV

[0153]

		SSAAAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPST PP
C34-FSY	66	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGGGTQVTVSSGGGGSGGGSGG GGSQVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWP YSTYSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIF AESKAGQFTISQDNAKNTVYLQMNLLKPEDT AIYYCAARRXFLSSSSDDFDYWGQGTQVTV SSAAAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPST PP
C35	67	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAIY YCAARRYFLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQVQLQESGGGSVEAGG SLRLSCARSGWPYSTYSMNWFRQAPGKERE AVAGISSTMSGIIFAESKAGQFTISQDNAKNT VYLQMNLLKPEDTAIYYCAARRYFLSSSSD DFDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSLP ETGGSPSTPPTPSPSTPP
C36-FSY	68	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAIY YCAARRXFLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQVQLQESGGGSVEAGG SLRLSCARSGWPYSTYSMNWFRQAPGKERE AVAGISSTMSGIIFAESKAGQFTISQDNAKNT VYLQMNLLKPEDTAIYYCAARRXFLSSSSD DFDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSLP ETGGSPSTPPTPSPSTPP
C37 TYR 또는 FSY	69	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTLEXYDYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFV AAIRWSGGYTYTDSVKGRFTISRDNKTTV YLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSSDYSRYA LPQRPLDYDYWGQGTQVTVSSLE
C38 C15- C16_66 wt 또는 FSY)	70	MDLGKLLLEAARAGQDDEVIRLMANGADV NAHDFYGITPLHLAANFGHLEIVEVLLKHGA DVNAFXDNTPLHLAADAGHLEIVEVLLKYG ADVNASDRDGHTPLHLAAREGHLEIVEVLLK NGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEIL QKLGGGGSRSDLGKLLLEAARAGQDDEVIRL MANGADVNAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIV EVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEI AEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNE DLAEILQKLNGS

[0154]

C39	71	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGTSY ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT AIYYCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQ VTVSSAAAYPYDVPDYGS
C40	72	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGTSY ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT AIYYCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQ VTVSSAAAYPYDVPDYGSGGGGGSGGGGSQV QLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSNYY MSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGTSYADS VKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDTAIY YCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQVT VSSAAAYPYDVPDYGS

[0155]

[0156]

X는 FSY 혼입 부위의 위치를 나타낸다. His6 경제 태그 및/또는 PeIB 리더 서열을 갖는 표의 서열이 또한 본원에서 구현된다.

[0157] 일부 경우에, 본원에 기재된 접합체와 연관된 DNA 서열은 표 2에 있다.

[0158] 표 2: DNA 서열

명칭	SEQ ID NO	서열
C1	73	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTAT TTGTTGCCTACAGCGGCTGCCGGTACTTC TGCTTGCCGCACAGCCAGCGATGGCCCAAG TCCAAC TGCAAGAGTCGGGTGGCGGCTCTG TTCAAGCGGGAGGCTCCTTGCGCTTGAGCT GTACCGCTCCTGGGTACACAGACAGTAATT ATTATATGAGCTGGTTCCGCCAAGCGCCCG GTAAAGAACGTGAATGGGTAGCTGGTGTGA ACACAGGACGCGGTTCGACATCCTACGCGG ACAGTGTTAAAGGTCGCTTACAATCTCGC AAGATAACGCTAAGAACAATGTTCTTGC AAATGAACTCGCTTAAGCCAGAAGATACTG CTATTTACTACTGCGCTGTAGCCGCTGCCA CTTCTGTGATAGTCTTCCAAAGACTCAAGAC GAGTACATTTTATGGGGCCAGGGCACTCAA GTCACAGTTTCGAGCGCCGCCGATACCCA TACGACGTCCCAGACTATGGCTCTCATCATC ACCATCACCAT ^{taa} AAGCTTGGCTGTTTTGGC GGATGAGAGAAG
C2	74	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTAT TTATTACCTACAGCGGCAGCAGGGTTATTGT TATTGGCCGCGCAGCCCGCAATGGCTGAAG TTCAACTTGTTGAGAGCGGGGGCGGATTGG TACAGCCGGGGGGTCACTTACCTTATCAT GTGCAGCATCGCGCTTCATGATCTCAGAAT ACAGTATGCATTGGGTTCGTCAAGCGCCGG GGAAAGGTCTTGAGTGGGTAGTACCATCA ACCCAGCCGGAACCACTGATTACGCGGAAA GCGTGAAGGGCCGTTTTACCATCTCCCGCG ACAATGCTAAAAATACTTTATACTTACAGA TGAACAGTTTGAACCCGAAGATACGGCGG TGTACTACTGTGACGGGTACGGCTATCGTG GCCAAGGAACACAAGTTACTGTATCCTCTC ATCATCATCACCATCAC ^{taa} AAGCTTGGCTGT TTTGGCGGATGAGAG
C3	75	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTAC CTTCTGCCGACTGCCGCTGCAGGTTTGTGT TATTGGCCGCTCAACCAGCGATGGCCAGG TACAGCTGCAAGAAAGTGGTGGTGGTAGCG TAGAGGCGGGTGGGTCTTTACGTCTGTCTG GCGCTCGTTCGGGTGGCCCTACTCAACGTA TAGTATGAATTGGTTCCGTCAGGCCCCCGGT AAAGAACGTGAGGCAGTCGCGGGGATTCG TCAACGATGTCTGGGATTATCTTTGCCGAGT CCAAAGCTGGACAGTTCACTATTAGCCAAG ATAACGCCAAGAACACAGTGTATCTTCAGA TGAATAACCTGAAACCGGAAGACACCGCAA

[0159]

		TTTACTACTGCGCAGCGCGCCGTGACTACTC CTTGTCTTCGAGCTCGGACGATTTCGATTAT TGGGGTCAGGGGACCCAAGTCACTGTGAGT TCCGCCGACGATATCCGTATGATGTACCC GATTACGGCTCGCACCACCATCATCACCAT aaAAGCTTGGCTGTTTTGGCGG
C4	76	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC CTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGC TCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGG GCCAAGTAAAACTAGAGGAATCAGGTGGA GGGTCCGTGCAAACCGGTGGCAGTCTCCGT TTGACCTGTGCTGCGAGCGGCCGTACCAGC CGCAGCTACGGCATGGGTTGGTTTCGTCAG GCACCGGGTAAGGAGCGCGAGTTCGTGTCC GGCATCAGCTGGCGTGGTACAGCACGGGC TATGCGGATAGCGTTAAAGGTCGCTTACC ATTTCTCGTGATAATGCAAAGAACACCGTT GATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCGGAA GACACCGCTATCTACTACTGCGCCGCGGCG GCGGGTTCTGCCTGGTATGGCACTCTGTATG AATACGACTACTGGGGTCAGGGTACGCAGG TTACCGTCTCGTCCCATCATCACCACCACCA CTAAAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGA G
C4_109	77	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC CTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGC TCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGG GCCAAGTAAAACTAGAGGAATCAGGTGGA GGGTCCGTGCAAACCGGTGGCAGTCTCCGT TTGACCTGTGCTGCGAGCGGCCGTACCAGC CGCAGCTACGGCATGGGTTGGTTTCGTCAG GCACCGGGTAAGGAGCGCGAGTTCGTGTCC GGCATCAGCTGGCGTGGTACAGCACGGGC TATGCGGATAGCGTTAAAGGTCGCTTACC ATTTCTCGTGATAATGCAAAGAACACCGTT GATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCGGAA GACACCGCTATCTACTACTGCGCCGCGGCG GCGGGTTCTGCCTGGTATGGCACTCTGTAG GAATACGACTACTGGGGTCAGGGTACGCAG GTTACCGTCTCGTCCCATCATCACCACCACC ACTAAAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAG AG
C8	78	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC TTACTTCCAACAGCAGCCGCAGGATTATTA CTGTTGGCCGCTCAGCCTGCAATGGCTCAA GTGCAGTTACAAGAAAGCGGGGGCGGACTT GTGCAAACAGGAGGGAGTCTGCGTCTTTCC TGTGCGGCGAGTGGGTCGATCTTCGTTGGA AATGCGATGGGCTGGTATCGCCAAGCCTTG GGTAATCAACGTGAATTAGTCGCAGGGATC ACGTCCGATGGGATCACATACTACCCGGAT

[0160]

		TCAGTTAAGGGCCGCTTTACAATCTCTCGTG ATAACGATAAAAAACAGATTTACTTACAAA TGAATAGTTTTAAAACCAGAGGATACCGCTG TTTACTACTGCAACCTGTGGCCCCCTCGTAT CGGGTTCGCCTCCTGGGGACAAGGAACTCA AGTGACGGTCTCGAGTGCTGCCGCTTACCCT TACGACGTACCGGATTACGGGTTCGCATCAT CATCATCACCCTAAAAGCTTGGCTGTTTTG GCGGATGAGAG
C9	79	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC TTATTACCTACCGCTGCAGCGGGGCTGTTGT TGTTGGCCGCCAGCCAGCAATGGCTATGG CGCAAGTCCAATTAGTTCAATCAGGCGGGG GGTTGGTCCAGGCGGGGGATCCTTACGTC TGTCATGTGCTTTCAGTGGCCGCACGTTCTC AATGTACACGATGGGGTGGTTTCGTC AAGC TCCGGGGAAAAGAACGCGAGTTTGTGGCCGC AAATCGCGGACGTGGGTAAAGTCCCGACAT TGCTGACAGTGTTAATGGACGCTTACCATT TCACGCGACAATGCTAAGAATACTCTTTAC CTTCAGATGGACTCTCTGAAACCAGAGGAC ACCGCCGTATATTATTGCGCCGCAGACTTAC AGTACGGGTTCATCATGGCCTCAACGTTCTG CTGCTGAATATGATTACTGGGGGCAAGGAA CGACAGTCACTGTATCCTCGCATCACCACC ATCACCAT _{taa} AAGCTTGGCTGTTTTGGCGGA TGAGAG
pBAD_f wd	80	CTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATT TTCAGCCTGATACAG
pBAD_re v	81	GTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATT ATTTCTAGCCCCAAAAAACGGGTATGGAG
pBAD- C8	82	AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGAC ATTGCCGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTT CTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACAAA GCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTC TATAATCACGGCAGAAAAAGTCCACATTGAT TATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCA TAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCC TACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACT GTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGAA ATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT ACATATGAAATACTTACTTCCAACAGCAGC CGCAGGATTATTACTGTTGGCCGCTCAGCCT GCAATGGCTCAAGTGCAGTTACAAGAAAGC GGGGCGGACTTGTGCAAAACAGGAGGGAG TCTGCGTCTTCTGTGCGGCGAGTGGGTCG ATCTTCGTTGAAATGCGATGGGCTGGTAT CGCCAAGCCTTGGGTAATCAACGTGAATTA GTCGCAGGGATCACGTCCGATGGGATCACA TACTACCCGATTACAGTTAAGGGCCGCTTA

[0161]

	<p>CAATCTCTCGTGATAACGATAAAAAACACGA TTTACTTACAAATGAATAGTTTAAAACAG AGGATACCGCTGTTTACTACTGCAACCTGTG GCCCCCTCGTATCGGGTTCGCCTCTGGGGA CAAGGAACTCAAGTGACGGTCTCGAGTGCT GCCGCTTACCCTTACGACGTACCGGATTAC GGGTCGCATCATCATCATCACCCTAAAAG CTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATT TTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGC AGAAGCGTCTGATAAAACAGAATTTGCCT GGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGAC CCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGT AGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCAT GCGAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAAT AAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGG CCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGGTGAA CGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGG AGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCC CGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATA AACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGC CATCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTA CAAACTCTTTTTGTTATTTTTCTAAATACAT TCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAA AGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT GTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTG CCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTG GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTG GGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGAT CTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC ACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT TATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAAC TCGGTCGCCGATACACTATTCTCAGAATG ACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAA AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTT TTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTC GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA CGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC GCAAACCTATAACTGGCGAACTACTTACTCT AGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATT GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGG TCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCT ACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG</p>
--	--

[0162]

	<p> AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTG CCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAG ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGA TTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATC TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGC GTAATCTGCTGCTTGC AAAACAAAAAACCA CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATC AAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAA CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCA CCACTTCAAGA ACTCTGTAGCACCGCCTAC ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTG GCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG GATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGG GGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCG AACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGG TATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACC TCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACG CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCG TATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT CGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTG CGGTATTTACACCGCATATCGTGCACTCTC AGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTA AGCCAGTATACTCCGCTATCGCTACGTG ACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGC CAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTT GTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAG CTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC AGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCG CGAGGCAGCAGATCAATTCGCGCGCGAAGG CGAAGCGGCATGCATAATGTGCCTGTCAA TGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCTAT GCTACTCCGTCAAGCCGTCAATTGTCTGATT CGTTACCAATTATGACA ACTTGACGGCTAC ATCATTCACTTTTCTTCAACCGGCACGG AACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTT TAAATACCCGCGAGAAAATAGAGTTGATCGT CAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGA </p>
--	--

[0163]

		<p>TAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAGCAGCT TCGCCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCA GCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCG GAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACA AGCAAAATGCTGTGCGACGCTGGCGATAT CAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGA TGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATC CATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGC TTCCATGCGCCGCAGTAACAATTGCTCAAG CAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCG CCCTTCCCCTTGCCCCGGCGTTAATGATTTGC CCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGC GCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTG GCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCA TGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACC CACTGGTGATAACCATTCGCGAGCCTCCGGA TGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGC GGGAACAGCAAAAATACACCCGGTCGGCAA ACAAATTCTCGTCCCTGATTTTTCACCACCC CCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATAT AACCTTTCATTCCCAGCGGTGCGTGCATAA AAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCG GCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAA ACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATT GCGCTTCAGCCATACTTTCATACTCCCGCC ATTCAGAG</p>
pBAD-C9	83	<p>AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGAC ATTGCCGTCACTGCGTCTTTACTGGCTCTT CTCGCTAACCAAAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAA GCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAAGTGTC TATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGAT TATTTGCACGGCGTCACACTTGCTATGCCA TAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCC TACCTGACGCTTTTTATCGCACTCTCTACT GTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGAA ATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT ACATATGAAATACTTATTACCTACCGCTGCA GCGGGGCTGTTGTTGTTGGCCGCCAGCCA GCAATGGCTATGGCGCAAGTCCAATTAGTT CAATCAGGCGGGGGTTGGTCCAGGCGGGG GGATCCTTACGTCTGTCATGTGCTTTCAGTG GCCGCACGTTCTCAATGTACACGATGGGGT GGTTTCGTCAAGCTCCGGGAAAGAACGCG AGTTTGTGGCCGAAATCGCGGACGTGGGT TAAGTCCCAGATTGCTGACAGTGTTAATG GACGCTTACCATTTCACGCGACAATGCTA AGAATACTCTTACCTCAGATGGACTCTCT GAAACCAGAGGACACCGCCGTATATTATTG CGCCGCAGACTTACAGTACGGGTCATCATG GCCTCAACGTTTCGTCTGCTGAATATGATTAC</p>

[0164]

	<p>TGGGGGCAAGGAACGACAGTCACTGTATCC TCGCATCACCACCATCACCATTAAGCTT GGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTC AGCCTGATACAGATTAATCAGAACGCAGA AGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGC GGCAGTAGCGGGTGGTCCCACCTGACCCC ATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGC GCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCG AGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAA ACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT TCGTTTTATCTGTTGTTGTGCGGTGAACGCT CTCCTGAGTAGGACAAAATCCGCCGGGAGCG GATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGA GGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAACT GCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATC CTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAA CTCTTTTGTATTTTTCTAAATACATTCAAAA TATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC CTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCC TGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAA AGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC ACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAA CAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCC CGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT AAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCC GTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTC GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT TGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCT TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC TGCGGCCAACTTACTTCTGACAAACGATCGG AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGA TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC TGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC ATTAACGGCGAACTACTTACTTAGCTTCC CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCG GCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTA AGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAA ATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAC TGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAG TTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA ACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTG AAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA</p>
--	---

[0165]

	<p>TCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGC GTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATC TTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCT GCTGCTTGCAAACAAAAAACCCACCGCTAC CAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGC TACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTT CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTT TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC AAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGT TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG CGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGT GCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCT ACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC TATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGA GAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA GCTTCCAGGGGGAAAACGCTGGTATCTTTA TAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGG GGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAA CGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTT ATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTG AGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCG GTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATT TCACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACA ATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGT ATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTC ATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCC GCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCC CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCG TCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTT ACCGTCATCACCGAAAACGCGGAGGCAGCA GATCAATTCGCGCGCGAAGGCGAAGCGGCA TGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGC AGGGATTCTGCAAACCTATGCTACTCCGTC AAGCCGTCAATTGTCTGATTCTGTTACCAATT ATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTTT TTCTTACAACCGGCACGGAACCTCGTCCG GCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGC GAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAAACCAACA TTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGG GTGGTGCTCAAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTG ATACGTTGGTCTTCGCGCCAGCTTAAGACG CTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGT GACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATG CTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATTGCT</p>
--	--

[0166]

		GTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACA AGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGG ATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCG CCGCAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTAT CGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCC TTGCCCGGCGTTAATGATTTGCCAAACAG GTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCTTCATC CGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATAT TGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTA GGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTG ATACCATTGCGGAGCCTCCGGATGACGACC GTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAG CAAAATATCACCCGGTCGGCAAACAAATTC TCGTCCCTGATTTTTACCACCCCTGACCG CGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTC ATTCCCAGCGGTGCGTTCGATAAAAAATCG AGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAA CCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAGTAT CCCGGCAGCAGGGGATCATTTTTCGCTTCA GCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTCAGAG
--	--	--

[0167]

[0168]

페이로드

[0169]

접합체는 페이로드를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 접합체에 포함된 표적화 도메인 (예를 들어, 단일 표적화 도메인 또는 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인)은 페이로드를 표적으로 안내할 수 있다. 일부 경우에, 표적화 도메인 (예를 들어, 단일 표적화 도메인 또는 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인)은 페이로드를 세포, 예컨대 종양 세포로 안내하는 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 영상화제, 방사성리간드 작용제 또는 세포독성제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 모이어티는 소분자 약물, 펩티드, 단백질 또는 화학요법 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 방사성리간드 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방사성리간드 작용제는 ³⁵S, ³H, ¹¹¹In, ¹¹²In, ¹⁴C, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ³²P, ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹³¹I, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹⁴⁹Tb, ²¹¹At, ²¹²Pb/²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu 및 ²²⁷Th로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 방사성리간드 작용제는 킬레이트화제를 추가로 포함한다. 킬레이트화제의 예는 DOTA, DOTAGA, NOTA, MACROPA, THP 및 TRAP를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방사성리간드 작용제는 ^{99m}Tc, ¹³¹I, ²⁰¹Tl, ¹¹¹In 및 ⁶⁷Ga로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 영상화제는 염료를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 2개 이상의 페이로드를 포함한다. 예를 들어, 접합체는 조직 침투를 가시화하기 위한 페이로드 염료 및 종양을 사멸시키기 위한 페이로드 화학요법제를 포함한다.

[0170]

페이로드는 접합체에 부착될 수 있다. 페이로드는 접합체에 공유 부착될 수 있다. 일부 경우에, 페이로드는 비천연 아미노산 (UAA) 잔기를 통해 접합체에 부착되지 않는다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 UAA 잔기로부터 아미노산 n+x (C-말단 쪽으로)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 비천연 아미노산 위치 n으로부터 x개 아미노산 떨어진 위치로서 정의된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 UAA 잔기로부터 아미노산 n-x (N-말단 쪽으로)에 부착된다. 일부 실시양태에서, UAA 잔기는 표적과 인터페이스하는 표적화 도메인 (예를 들어, 단일 표적화 도메인 또는 제1 또는 제2 표적화 도메인)의 영역 내에 또는 그의 근접부 내에 포함된다. 일부 경우에, 페이로드는 접합체 내의 비천연 아미노산으로부터 적어도 2, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 또는 적어도 125개 아미노산 떨어져 부착된다.

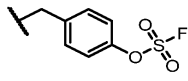
[0171]

비천연 아미노산 (UAA)

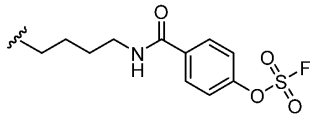
[0172]

비천연 아미노산 (UAA)은 본원에 기재된 접합체 내로 혼입될 수 있다. 일부 경우에, UAA 잔기는 접합체의 표적화 도메인에 존재한다. 일부 경우에, UAA는 표적에 공유 결합하도록 구성된다. 일부 경우에, UAA는 표적에 존재하는 아미노산에 공유 결합하도록 구성된다. 일부 경우에, 접합체는 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과 UAA를 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 제1 UAA를 포함하는 제1 표적화 도메인 및 제2 UAA를 포함하는 제2 표적화 도메인을 포함한다. 일부 경우에, UAA는 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 또는 제2 표적화 도메인) 내에서 표적화 도메인이 표적에 결합하는 경우에 표적에 존재하는 아미노산에 공유 결합하도록 구성된다. 일부 경우에, 이러한 아미노산은 친핵성 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, UAA 잔기는 리신, 히스티딘 또는 티로신과 공유 결합을 형성한다. 일부 경우에, UAA 잔기는 표적-결합 도메인에 위치한다. 일부 경우에, UAA는 접합체 내로 혼입될 때 표적화 도메인, 예컨대 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 표적화 도메인, 예를 들어 단일 도메인 항체의 CDR에 위치한다. 일부 실시양태에서, UAA 잔기는 아릴-플루오로 술페이트 모이어티를 포함

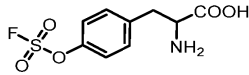
한다. 일부 경우에, UAA 잔기는 본원에 기재된 접합체 내로 유전자 코딩된다. 일부 경우에, UAA 잔기는 티로신 또는 리신의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 잔기는 하기 화학식 I의 구조를 포함



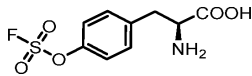
한다: (화학식 I). 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 잔기는 하기 화학식 II의 구조를 포



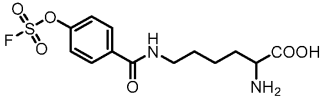
함한다: (화학식 II). 일부 실시양태에서, UAA 잔기는 본원에 기재된 UAA의 혼입으로 부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 2-아미노-3-(4-((플루오로술포닐)옥시)페닐)프로판산



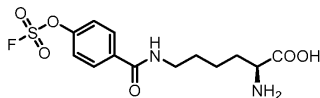
이다: . 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 플루오로술포닐티로신 (FSY)이다:



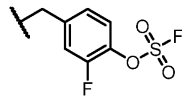
. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 N6-(4-((플루오로술포닐)옥시)벤조일)리신이



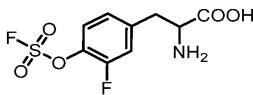
다: . 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 플루오로술포닐옥시벤조일-L-리신



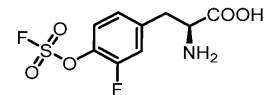
(FSK)이다: . 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 잔기는 하기 화학식 III의 구



조를 포함한다: . 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 하기이다:



. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 하기이다:



(FFY).

[0173] 일부 실시양태에서, UAA 잔기의 비천연 아미노산 (UAA)은 화학식 (IA)의 구조를 갖는다:

[0174] (IA),

[0175] 여기서

[0176] 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0177] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

[0178] A는 결합 또는 -(CH₂)_n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

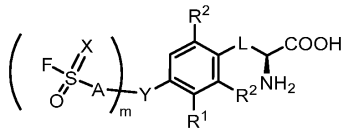
[0179] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

[0180] R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

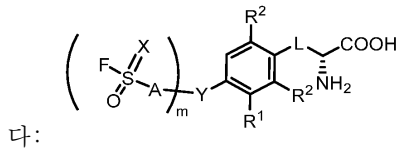
[0181] L은 -(CH₂)_p- 또는 -C(O)NH-(CH₂)_p-이고; p는 1 내지 6의 정수이고;

[0182] 여기서 Y가 -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

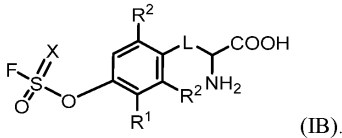
[0183] 일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (IA-a)의 구조를 갖는다:



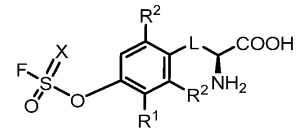
일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (IA-b)의 구조를 갖는



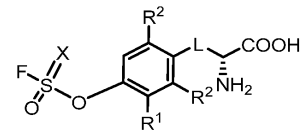
[0184] 일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (IB)의 구조를 갖는다:



[0185]

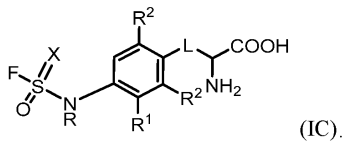


[0186] 일부 실시양태에서, 화학식 (IB)의 UAA는 하기 화학식 (IB-a)의 구조를 갖는다:

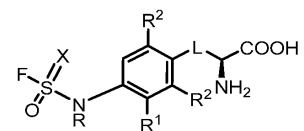


일부 실시양태에서, 화학식 (IB)의 UAA는 하기 화학식 (IB-b)의 구조를 갖는다:

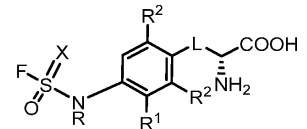
[0187] 일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (IC)의 구조를 갖는다:



[0188]



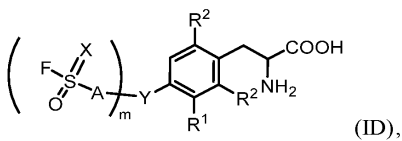
[0189] 일부 실시양태에서, 화학식 (IC)의 UAA는 하기 화학식 (IC-a)의 구조를 갖는다:



일부 실시양태에서, 화학식 (IB)의 UAA는 하기 화학식 (IB-b)의 구조를 갖는다:

일부 바람직한 실시양태에서, R은 수소이다.

[0190] 일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (ID)의 구조를 갖는다:



[0191]

[0192] 여기서 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0193] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

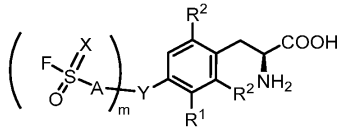
[0194] A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0195] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

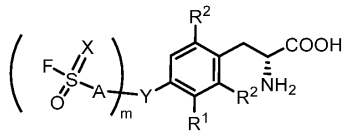
[0196] R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

[0197] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0198] 일부 실시양태에서, 화학식 (ID)의 UAA는 하기 화학식 (ID-a)의 구조를 갖는다:

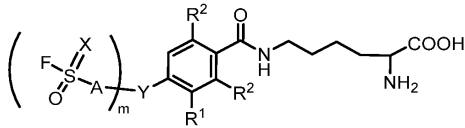


. 일부 실시양태에서, 화학식 (ID)의 UAA는 하기 화학식 (ID-b)의 구조를 갖는



다:

[0199] 일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (IE)의 구조를 갖는다:



(IE),

[0200]

[0201] 여기서 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0202] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

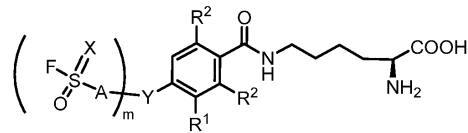
[0203] A는 결합 또는 $-(CH_2)_n-$ 이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0204] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

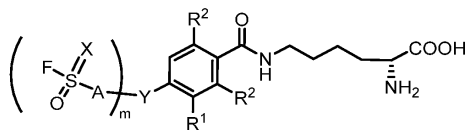
[0205] R¹은 수소, 플루오로 또는 아이오도이고; R²는 수소 또는 메틸이고;

[0206] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.

[0207] 일부 실시양태에서, 화학식 (IE)의 UAA는 하기 화학식 (IE-a)의 구조를 갖는다:



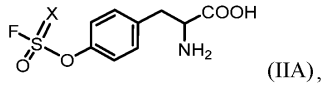
. 일부 실시양태에서, 화학식 (IE)의 UAA는 하기 화학식 (IE-b)의



구조를 갖는다:

[0208] 특정 실시양태에서, Y는 결합, -O- 또는 -NR-이고, m은 1이다. 다른 실시양태에서, Y는 -N=이고, m은 2이다. 특정의 바람직한 실시양태에서, Y는 -O-이고, m은 1이다. 다른 실시양태에서, Y는 -NR-이고, m은 1이다. 다른 실시양태에서, Y는 결합이고, m은 1이다. 다른 실시양태에서, Y는 O- 또는 -NR-이고, m은 1이다.

[0209] 일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (IIA)의 구조를 갖는다:



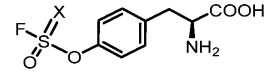
[0210]

[0211] 여기서

[0212] X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

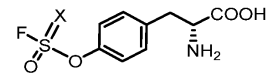
[0213] R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

[0214] 일부 실시양태에서, 화학식 (IIA)의 UAA는 하기 화학식 (IIA-a)의 구조를 갖는다:

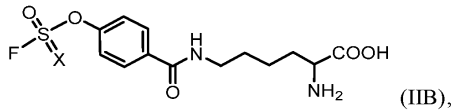


[0214]

일부 실시양태에서, 화학식 (IIA)의 UAA는 하기 화학식 (IIA-b)의 구조를 갖는다:



[0215] 일부 실시양태에서, 화학식 (IA)의 UAA는 하기 화학식 (IIB)의 구조를 갖는다:



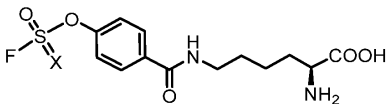
[0216]

[0217] 여기서

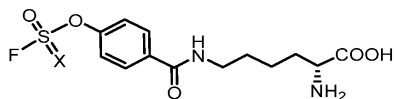
[0218] X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0219] R'는, 존재하는 경우에, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다.

[0220] 일부 실시양태에서, 화학식 (IIB)의 UAA는 하기 화학식 (IIB-a)의 구조를 갖는다:

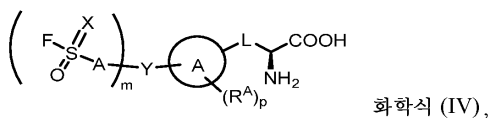


일부 실시양태에서, 화학식 (IIB)의 UAA는 하기 화학식 (IIB-b)의 구조



를 갖는다:

[0221] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 (UAA)은 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는다:



[0222]

[0223] 여기서

[0224] 각각의 X는 독립적으로 O 또는 NR'이고;

[0225] Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이고;

[0226] A는 결합 또는 -(CH2)n-이고; m은 1 또는 2이고; n은 1 내지 4의 정수이고;

[0227] 각각의 R 및 R'는, 존재하는 경우에, 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이고;

- [0228] 고리 A는 5- 내지 6-원 아릴 또는 헤테로아릴이고;
- [0229] 각각의 R^A 는 독립적으로 -OH, $-OR^X$, 할로젠, NHR^X , $N(R^X)_2$ 또는 임의로 치환된 알킬이고; 각각의 R^X 는 임의로 치환된 알킬이고;
- [0230] L은 $-(CH_2)_p-$ 또는 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이고; p는 1 내지 6의 정수이고;
- [0231] 여기서 Y가 결합, -O- 또는 -NR-인 경우에, m은 1이고; Y가 -N=인 경우에, m은 2이다.
- [0232] 일부 실시양태에서, A는 결합이다. 다른 실시양태에서, A는 $-(CH_2)_n-$ 이다. 일부 실시양태에서, n은 1, 2, 3 또는 4이다. 한 실시양태에서, n은 1이다. 또 다른 실시양태에서, n은 2이다. 또 다른 실시양태에서, n은 3이다. 또 다른 실시양태에서, n은 4이다.
- [0233] 일부 실시양태에서, 고리 A는 5-원 고리이다. 일부 실시양태에서, 고리 A는 6-원 고리이다. 일부 실시양태에서, 고리 A는 아릴이다. 일부 실시양태에서, 고리 A는 헤테로아릴이다. 일부 실시양태에서, 고리 A는 6-원 아릴이다. 일부 실시양태에서, 고리 A는 6-원 헤테로아릴이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 고리 A는 페닐이다.
- [0234] 일부 실시양태에서, p는 0이다. 일부 실시양태에서, p는 1 내지 4의 정수이다. 일부 실시양태에서, p는 1 내지 3의 정수이다. 한 실시양태에서, p는 1이다. 또 다른 실시양태에서, p는 2이다. 또 다른 실시양태에서, p는 3이다. 또 다른 실시양태에서, p는 4이다.
- [0235] 일부 실시양태에서, 각각의 R^A 는 독립적으로 -OH, $-OR^X$, 할로젠, NHR^X , $N(R^X)_2$ 또는 임의로 치환된 알킬이고; 각각의 R^X 는 임의로 치환된 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^A 는 독립적으로 -OH, 할로 또는 임의로 치환된 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^A 는 독립적으로 할로 또는 임의로 치환된 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^A 는 독립적으로 -OH 또는 임의로 치환된 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^A 는 독립적으로 임의로 치환된 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^A 는 독립적으로 치환된 알킬이다. 일부 실시양태에서, 각각의 R^A 는 독립적으로 비치환된 알킬이다. 한 실시양태에서, 각각의 R^A 는 아이오도이다. 또 다른 실시양태에서, 각각의 R^A 는 메틸이다. 하나의 구체적 실시양태에서, p가 1인 경우에, R^A 는 아이오도이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, p가 2인 경우에, 각각의 R^A 는 메틸이다.
- [0236] 일부 실시양태에서, Y는 결합, -O-, -NR- 또는 -N=이다. 일부 실시양태에서, Y는 -O-, -NR- 또는 -N=이다. 일부 실시양태에서, Y는 결합, -O- 또는 -NR-이다. 일부 실시양태에서, Y는 결합, -O- 또는 -N=이다. 일부 실시양태에서, Y는 결합, -NR- 또는 -N=이다. 일부 실시양태에서, Y는 -O- 또는 -NR-이다. 일부 실시양태에서, Y는 -O- 또는 -N=이다. 일부 실시양태에서, Y는 -NR- 또는 -N=이다. 한 실시양태에서, Y는 결합이다. 또 다른 실시양태에서, Y는 -O-이다. 또 다른 실시양태에서, Y는 -NR-이다. 또 다른 실시양태에서, Y는 -N=이다.
- [0237] 일부 실시양태에서, L은 $-(CH_2)_p-$ 이다. 다른 실시양태에서, L은 $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ 이다. 일부 실시양태에서, p는 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3 또는 1 내지 2의 정수이다. 한 실시양태에서, p는 1 내지 4이다. 또 다른 실시양태에서, p는 1 또는 2이다. 또 다른 실시양태에서, p는 1 또는 4이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, L은 $-CH_2-$ 이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, L은 $-C(O)NH-(CH_2)_4-$ 이다.
- [0238] 일부 실시양태에서, R은 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다. 일부 실시양태에서, R은 수소 또는 치환 또는 비치환된 알킬이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, R은 수소이다. 또 다른 실시양태에서, R은 치환 또는 비치환된 C_{1-6} 알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R은 비치환된 C_{1-6} 알킬이다. 한 실시양태에서, R은 메틸이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, R은 수소 또는 메틸이다.
- [0239] 일부 실시양태에서, R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다. 일부 실시양태에서, R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환 또는 비치환된 아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로아릴이다. 일부 실시양태에서, R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 치환 또는 비치환된

아릴, 치환 또는 비치환된 헤테로아릴, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬이다. 일부 실시양태에서, R'는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 아릴이다. 실시양태에서, R'는 수소이다. 또 다른 실시양태에서, R'는 치환 또는 비치환된다. 또 다른 실시양태에서, R'는 치환 또는 비치환된 아릴이다.

[0240] 일부 실시양태에서, R¹은 수소이다. 일부 실시양태에서, R¹은 플루오로이다. 일부 실시양태에서, R¹은 아이오도이다. 일부 실시양태에서, R²는 수소이다. 다른 실시양태에서, R²는 메틸이다. 일부 실시양태에서, R¹은 수소이고, R²는 수소이다. 일부 실시양태에서, R¹은 플루오로이고, R²는 수소이다. 일부 실시양태에서, R¹은 수소이고, R²는 메틸이다. 일부 실시양태에서, R¹은 아이오도이고, R²는 수소이다.

[0241] 링커

[0242] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체는 1개 초과인 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 및 제2 표적 도메인)은 제1 링커를 통해 연결된다. 제1 링커 및 제2 링커는 본원에 기재된 임의의 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 제2 링커를 통해 표적 도메인 (제1 또는 제2 표적 도메인) 중 하나에 연결된다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 제1 링커는 펩티드 링커이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제2 링커는 화학적 접합을 통해 형성된다. 일부 실시양태에서, 제2 링커는 화학적 접합을 위한 이관능성 링커이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제2 링커는 비-펩티드 링커이다.

[0243] 일부 실시양태에서, 표적화 도메인을 본원에 기재된 페이로드에 접합 또는 결합시키기 위한 유용한 기능적 반응성 기는, 예를 들어 0차 또는 보다 고차의 링커를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 본원에 기재된 링커 (임의로 페이로드, 표적화 도메인 또는 접합체의 다른 부분에 사전-부착됨)와 반응하는 기능적 반응성 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 본원에 기재된 페이로드 또는 표적화 도메인 내의 천연 아미노산과 반응하는 반응성 기를 포함한다. 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적 도메인 및 제2 표적화 도메인) 또는 표적화 도메인 중 하나 (예를 들어, 제1 표적 도메인 또는 제2 표적화 도메인) 및 페이로드는 제1 표적화 도메인 상의 친핵성 반응성 모이어티를 제2 표적화 도메인 상의 친전자성 반응성 모이어티와 반응시킴으로써 또는 표적화 도메인 상의 친핵성 반응성 모이어티를 페이로드 상의 친전자성 반응성 모이어티와 반응시킴으로써 함께 접합될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인 또는 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적 도메인 또는 제2 표적화 도메인) 및 페이로드는 제1 표적화 도메인 상의 친전자성 반응성 모이어티를 제2 표적화 도메인 상의 친핵성 모이어티와 반응시킴으로써 또는 표적화 도메인 상의 친전자성 반응성 모이어티를 페이로드 상의 친핵성 모이어티와 반응시킴으로써 함께 접합된다. 일부 실시양태에서, 아미드 결합은 표적화 도메인 상의 아민 (예를 들어, 리신 잔기의 ε-아민)과 또 다른 표적화 도메인 상의 카르복실 기의 반응 시 또는 표적화 도메인 상의 아민과 페이로드 상의 카르복실 기의 반응 시 형성될 수 있다. 대안적 실시양태에서, 표적화 도메인 및/또는 페이로드는 접합 전에 유도체화제로 유도체화된다.

[0244] 일부 경우에, 고차 링커는 이관능성 링커, 예컨대 동종이관능성 링커 또는 이종이관능성 링커를 포함한다. 예시적인 동종이관능성 링커는 로만트 시약 디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트) DSP, 3'3'-디티오비스(술포숙신이미딜 프로프리오네이트) (DTSSP), 디숙신이미딜 수베레이트 (DSS), 비스(술포숙신이미딜)수베레이트 (BS), 디숙신이미딜 타르트레이트 (DST), 디술포숙신이미딜 타르트레이트 (술포 DST), 에틸렌 글리코비스(숙신이미딜 숙시네이트) (EGS), 디숙신이미딜 글루타레이트 (DSG), N,N'-디숙신이미딜 카르보네이트 (DSC), 디메틸 아디프 이미데이트 (DMA), 디메틸 피멜리미데이트 (DMP), 디메틸 수베라이미데이트 (DMS), 디메틸-3,3'-디티오비스프로 피온이미데이트 (DTBP), 1,4-디-3'-(2'-피리딜디티오)프로피오나미도)부탄 (DPDPB), 비스말레이미도핵산 (BMH), 아릴 할라이드-함유 화합물 (DFDNB), 예컨대, 예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠 또는 1,3-디플루오로-4,6-디니트로벤젠, 4,4'-디플루오로-3,3'-디니트로페닐술포 (DFDNPS), 비스-[β-(4-아지도살리실아미도)에틸] 디술포드 (BASED), 포름알데히드, 글루타르알데히드, 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르, 아디프산 디히드라지드, 카르보히드라지드, α-톨루이딘, 3,3'-디메틸벤지딘, 벤지딘, α, α'-p-디아미노디페닐, 디아이오도-p-크실렌 술포산, N,N'-에틸렌-비스(아이오도아세트아미드) 또는 N,N'-헥사메틸렌-비스(아이오도아세트아미드)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0245] 일부 실시양태에서, 이관능성 링커는 이종이관능성 링커를 포함한다. 예시적인 이종이관능성 링커는 아민-반응성 및 술포히드릴 가교제, 예컨대 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (sPDP), 장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (LC-sPDP), 수용성-장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (술포-LC-sPDP), 숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루엔 (sMPT), 술포숙신이미딜-6-[α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루아미드]헥사노에이트 (술포-LC-sMPT), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로핵산-

드 링커는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 폴리펩티드 링커는 (GGGGSGGGG)_x (서열식별번호: 14) (여기서, x는 1-10임)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12개의 아미노산 길이 및 더 긴 길이의 폴리펩티드 링커이다. 링커는 SPSTPPTPSPSTPP를 포함할 수 있다. 폴리펩티드 링커는 (GGGGG)_x, (GGGS)_x의 반복일 수 있다. 링커는 글리신, 세린, 트레오닌 또는 프롤린을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 한 표적화 도메인의 N-말단은 링커 폴리펩티드의 C-말단에 융합되고, 링커 폴리펩티드의 N-말단은 또 다른 표적화 도메인의 N-말단에 융합된다.

[0249] 다양한 실시양태에서, 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적화 도메인 및 제2 표적화 도메인)은 링커에 의해 연결 또는 분리된다. 링커는 폴리펩티드 링커일 수 있다. 링커는 제조합 기술을 통해 발현될 수 있고, 표적화 도메인의 발현과 함께 핵산 서열을 사용하여 코딩될 수 있다. 링커는 표적화 도메인을 연결하여 융합 단백질을 형성할 수 있다. 접합체 내의 링커의 존재는 표적화 도메인이 다른 표적화 도메인으로부터의 입체 간섭 없이 적절하게 기능하도록 할 수 있다. 링커는 가요성 링커일 수 있다. 링커의 가요성은 표적화 도메인이 다른 표적화 도메인으로부터의 최소 간섭으로 독립적인 입체형태를 채택하도록 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과 아미노산을 포함하는 펩티드 링커이다. 일부 경우에, 펩티드 링커는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이하의 아미노산을 포함한다. 추가의 경우에, 펩티드 링커는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 폴리펩티드 링커는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12개의 아미노산 길이 및 더 긴 길이의 폴리펩티드 링커이다. 링커는 SPSTPPTPSPSTPP를 포함할 수 있다. 폴리펩티드 링커는 (GGGGG)_x, (GGGS)_x의 반복일 수 있다. 링커는 글리신, 세린, 트레오닌 또는 프롤린을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 한 표적화 도메인의 N-말단은 링커 폴리펩티드의 C-말단에 융합되고, 링커 폴리펩티드의 N-말단은 또 다른 표적화 도메인의 N-말단에 융합된다.

[0250] 일부 실시양태에서, 링커는 자기-희생적 링커 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자기-희생적 링커 모이어티는 p-아미노벤질 알콜 (PAB), p-아미노벤질옥시카르보닐 (PABC) 또는 그의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 디펩티드 링커 모이어티 및 자기-희생적 링커 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자기-희생적 링커 모이어티는 미국 특허 번호 9089614 및 WIPO 출원 번호 W02015038426에 기재된 바와 같다.

[0251] 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 글루쿠로니드이다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 산-절단가능한 링커이다. 일부 실시양태에서, 산-절단가능한 링커는 히드라진이다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 환원가능한 링커이다.

[0252] 일부 실시양태에서, 링커는 말레이미드 기를 포함한다. 일부 경우에, 말레이미드 기는 말레이미드 스페이서로도 지칭된다. 일부 경우에, 말레이미드 기는 말레이미도카프로일 (mc)을 형성하는 카프로산을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 링커는 말레이미도카프로일 (mc)을 포함한다. 일부 경우에, 링커는 말레이미도카프로일 (mc)이다. 다른 경우에, 말레이미드 기는 말레이미도메틸 기, 예컨대 상기 기재된 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (sMCC) 또는 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (술포-sMCC)를 포함한다.

[0253] 일부 실시양태에서, 말레이미드 기는 자기-안정화 말레이미드이다. 일부 경우에, 자기-안정화 말레이미드는 디아미노프로피온산 (DPR)을 사용하여 말레이미드에 인접한 염기성 아미노 기를 혼입시킴으로써 티오숙신이미드 고리 가수분해의 분자내 촉매작용을 제공하고, 이에 의해 역-마이클 반응을 통해 제거 반응을 겪는 것으로부터 말레이미드를 제거한다. 일부 경우에, 자기-안정화 말레이미드는 문헌 [Lyon, et al., "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," Nat. Biotechnol. 32(10):1059-1062 (2014)]에 기재된 말레이미드 기이다. 일부 경우에, 링커는 자기-안정화 말레이미드를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 자기-안정화 말레이미드이다.

[0254] 일부 경우에, 링커는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 10개 또는 그 초과 카르보닐 또는 디카르보닐 기, 옥심 기, 히드록실아민 기 또는 그의 보호된 형태를 포함한다. TLR-효능제 링커 유도체 또는 표적화 도메인은 동일하거나 상이할 수

있으며, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 초과
의 상이한 반응성 기를 포함하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개
또는 그 초과 상이한 부위가 유도체에 존재할 수 있다.

[0255] 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 화학식 "표적화 도메인-L-페이로드"를 갖는 또 다른 분자에 커플링된
표적화 도메인을 제공하며, 여기서 L은 연결기 또는 화학 결합이다. 일부 실시양태에서, L은 생체내에서 안정
하다. 일부 실시양태에서, L은 생체내에서 가수분해성이다. 일부 실시양태에서, L은 생체내에서 준안정하다.

[0256] 표적화 도메인 및 페이로드는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 연결 작용제 및 절차를 사용하여
L을 통해 함께 연결될 수 있다. 일부 측면에서, 표적화 도메인 및 페이로드는 직접 융합되고, L은 결합이다.
다른 측면에서, 표적화 도메인 및 페이로드는 연결기 L을 통해 융합된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 표적
화 도메인 및 페이로드는 펩티드 결합을 통해, 임의로 펩티드 또는 아미노산 스페이서를 통해 함께 연결된다.
일부 실시양태에서, 표적화 도메인 및 페이로드는 화학적 접합을 통해, 임의로 연결기 (L)를 통해 함께 연결된
다. 일부 실시양태에서, L은 각각의 표적화 도메인 및 페이로드에 직접 접합된다.

[0257] 화학적 접합은 한 화합물의 친핵성 반응성 기를 또 다른 화합물의 친전자성 반응성 기에 반응시킴으로써 일어날
수 있다. L이 결합인 경우의 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 표적화 도메인 상의 친핵성 반응성 모이어티
를 링커 상의 친전자성 반응성 모이어티와 반응시킴으로써 또는 표적화 도메인 상의 친전자성 반응성 모이어티
를 페이로드 상의 친핵성 반응성 모이어티와 반응시킴으로써 페이로드에 접합된다. L이 표적화 도메인 및 페이
로드를 함께 연결하는 기인 경우의 실시양태에서, 표적화 도메인 및/또는 페이로드는 표적화 도메인 및/또는 페
이로드 상의 친핵성 반응성 모이어티를 L 상의 친전자성 반응성 모이어티와 반응시킴으로써 또는 표적화 도메인
및/또는 페이로드 상의 친전자성 반응성 모이어티를 L 상의 친핵성 반응성 모이어티와 반응시킴으로써 L에 접합
될 수 있다. 친핵성 반응성 기의 비제한적 예는 아미노, 티올 및 히드록실을 포함한다. 친전자성 반응성 기의
비제한적 예는 카르복실, 아실 클로라이드, 무수물, 에스테르, 숙신이미드 에스테르, 알킬 할라이드, 술포네이
트 에스테르, 말레이미도, 할로아세틸 및 이소시아나이드를 포함한다. 표적화 도메인 및 페이로드가 카르복실
산을 아민과 반응시킴으로써 함께 접합되는 실시양태에서, 활성화제는 카르복실산의 활성화된 에스테르를 형성
하는 데 사용될 수 있다.

[0258] 카르복실산의 활성화된 에스테르는, 예를 들어 N-히드록시숙신이미드 (NHS), 토실레이트 (Tos), 메실레이트, 트
리플레이트, 카르보디이미드 또는 헥사플루오로포스페이트일 수 있다. 일부 실시양태에서, 카르보디이미드는
1,3-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), 1,1'-카르보닐디이미다졸 (CDI), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르
보디이미드 히드록클로라이드 (EDC) 또는 1,3-디이소프로필카르보디이미드 (DICD)이다. 일부 실시양태에서, 헥
사플루오로포스페이트는 헥사플루오로포스페이트 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플
루오로포스페이트 (BOP), 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP), 2-
(1H-7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸 우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HATU) 및 o-벤조트리아졸-
N,N,N',N'-테트라메틸-우로늄-헥사플루오로-포스페이트 (HBTU)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0259] 일부 실시양태에서, 표적화 도메인 (예를 들어, 제1 표적 도메인 및 제2 표적화 도메인)은 페이로드 또는 L 상
의 친전자성 반응성 기에 접합할 수 있는 친핵성 반응성 기 (예를 들어, 리신, 시스테인 또는 세린의 측쇄의 아
미노 기, 티올 기 또는 히드록실 기)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 페이로드 또는 L 상의
친핵성 반응성 기에 접합할 수 있는 친전자성 반응성 기 (예를 들어, Asp 또는 Glu의 측쇄의 카르복실레이트
기)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 페이로드 또는 L에 직접 접합할 수 있는 반응성 기를 포
함하도록 화학적으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 친핵성 측쇄를 갖는 천연 아미노산을 포
함하도록 N-말단 또는 C-말단에서 변형된다. 예시적인 실시양태에서, 표적화 도메인의 N-말단 또는 C-말단 아
미노산은 리신, 오르니틴, 세린, 시스테인 및 호모시스테인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 표
적화 도메인의 N-말단 또는 C-말단 아미노산은 리신 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서,
표적화 도메인은 친전자성 측쇄를 갖는 천연 아미노산, 예컨대, 예를 들어 Asp 및 Glu를 포함하도록 N-말단 또
는 C-말단 아미노산에서 변형된다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인의 내부 아미노산은 본원에 이전에 기재
된 바와 같이 친핵성 측쇄를 갖는 천연 아미노산으로 치환된다. 예시적인 실시양태에서, 치환되는 표적화 도메
인의 내부 아미노산은 리신, 오르니틴, 세린, 시스테인 및 호모시스테인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
예를 들어, 표적화 도메인의 내부 아미노산은 리신 잔기로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인
의 내부 아미노산은 친전자성 측쇄를 갖는 천연 아미노산, 예컨대, 예를 들어 Asp 및 Glu로 치환된다.

[0260] 일부 실시양태에서, 페이로드는 표적화 도메인 또는 L에 직접 접합할 수 있는 반응성 기를 포함한다. 일부 실

시양태에서, 페이로드는 표적화 도메인 또는 L 상의 친전자성 반응성 기에 접합할 수 있는 친핵성 반응성 기 (예를 들어, 아민, 티올, 히드록실)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 표적화 도메인 또는 L 상의 친핵성 반응성 기에 접합할 수 있는 친전자성 반응성 기 (예를 들어, 카르복실 기, 카르복실 기의 활성화된 형태, 이탈기를 갖는 화합물)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 표적화 도메인 또는 L 상의 친전자성 반응성 기에 접합할 수 있는 친핵성 반응성 기를 포함하도록 화학적으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 표적화 도메인 또는 L 상의 친핵성 반응성 기에 접합할 수 있는 친전자성 반응성 기를 포함하도록 화학적으로 변형된다.

[0261] 일부 실시양태에서, 접합은 유기실란, 예를 들어 글루타르알데히드로 처리된 아미노실란; 실란올 기의 카르보닐 디이미다졸 (CDI) 활성화; 또는 덴드리머의 이용을 통해 수행될 수 있다. 다양한 덴드리머가 관련 기술분야에 공지되어 있고, 암모니아 또는 에틸렌디아민 개시제 코어 시약으로부터 시작하는 분기형 방법에 의해 합성되는 폴리(아미도아민) (PAMAM) 덴드리머; 트리스-아미노에틸렌-이민 코어를 기재로 하는 PAMAM 덴드리머의 하위부류; 친수성, 친핵성 폴리(아미도아민 (PAMAM) 내부 및 소수성 유기규소 (OS) 외부로 이루어진 반전된 단분자 미셀인 방사상 층상 폴리(아미도아민-유기규소) 덴드리머 (PAMAMOS); 일반적으로 말단 기로서 1급 아민을 갖는 폴리-알킬 아민이면서 덴드리머 내부는 수많은 3급 트리스-프로필렌 아민으로 이루어진 폴리(프로필렌 이민) (PPI) 덴드리머; 폴리(프로필렌 아민) (POPAM) 덴드리머; 디아미노부탄 (DAB) 덴드리머; 친양쪽성 덴드리머; 수용성 초분지형 폴리페닐렌의 단분자 미셀인 미셀 덴드리머; 폴리리신 덴드리머; 및 폴리-벤질 에테르 초분지형 골격을 기재로 하는 덴드리머를 포함한다.

[0262] 일부 실시양태에서, 접합은 올레핀 복분해를 통해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 페이로드 및 표적화 도메인, 페이로드 및 L, 또는 표적화 도메인 및 L 둘 다는 복분해를 겪을 수 있는 알켄 또는 알킨 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적합한 촉매 (예를 들어, 구리, 루테튬)가 복분해 반응을 가속화시키는 데 사용된다. 올레핀 복분해 반응을 수행하는 적합한 방법은 관련 기술분야에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000), Walensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004), 및 Blackwell et al., Angew. Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998)]을 참조한다.

[0263] 일부 실시양태에서, 접합은 클릭 화학을 사용하여 수행될 수 있다. "클릭 반응"은 범주가 넓고, 수행하기가 용이하며, 단지 용이하게 입수가 가능한 시약을 사용하고, 산소 및 물에 대해 비감수성이다. 일부 실시양태에서, 클릭 반응은 트리아졸릴 기를 형성하는 알킬닐 기와 아지도 기 사이의 고리화첨가 반응이다. 일부 실시양태에서, 클릭 반응은 구리 또는 루테튬 촉매를 사용한다. 클릭 반응을 수행하는 적합한 방법은 관련 기술분야에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Kolb et al., Drug Discovery Today 8: 1128 (2003); Kolb et al., Angew. Chem. Int. Ed. 40:2004 (2001); Rostovtsev et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41 :2596 (2002); Tornoe et al., J. Org. Chem. 67:3057 (2002); Manetsch et al., J. Am. Chem. Soc. 126: 12809 (2004); Lewis et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41: 1053 (2002); Speers, J. Am. Chem. Soc. 125:4686 (2003); Chan et al. Org. Lett. 6:2853 (2004); Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 127: 15998 (2005); 및 Waser et al., J. Am. Chem. Soc. 127:8294 (2005)]을 참조한다.

[0264] 고친화도 특이적 결합 파트너, 예를 들어 스트렙타비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴 또는 렉틴/탄수화물을 통한 간접 접합이 또한 고려된다.

[0265] 접합을 위한 반응성 잔기

[0266] 일부 실시양태에서, 표적화 도메인 및/또는 페이로드는 유기 유도체화제를 사용하여 친핵성 반응성 기 또는 친전자성 반응성 기를 포함하도록 관능화된다. 이러한 유도체화제는 표적화 도메인 상의 표적화 아미노산의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기 및 페이로드 상의 관능기와 반응할 수 있다. 표적화 도메인 및/또는 페이로드 상의 반응성 기는, 예를 들어 알데히드, 아미노, 에스테르, 티올, α-할로아세틸, 말레이미도 또는 히드라지노 기를 포함한다. 유도체화제는, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 작용제를 포함한다. 대안적으로, 표적화 도메인 및/또는 페이로드는 중간체 담체, 예컨대 폴리사카라이드 또는 폴리펩티드 담체를 통해 서로 간접적으로 연결될 수 있다. 폴리사카라이드 담체의 예는 아미노 텍스트란을 포함한다. 적합한 폴리펩티드 담체의 예는 생성된 로딩된 담체에 바람직한 용해도 특성을 부여하기 위해 폴리리신, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 그의 공중합체 및 이들 아미노산과 다른 것, 예를 들어 세린의 혼합 중합체를 포함한다.

[0267] 시스테인 잔기는 가장 통상적으로 α-할로아세테이트 (및 상응하는 아민), 예컨대 클로로아세트산 또는 클로로

아세트아미드와 반응하여 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테인 잔기는 또한 브로모트리플루오로아세톤, 알파-브로모-β-(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설피드, 메틸 2-피리딜 디설피드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 유도체화된다.

[0268] 히스티딜 잔기는 pH 5.5-7.0에서 디에틸피로카르보네이트와의 반응에 의해 유도체화되는데, 이는 이 작용제가 히스티딜 측쇄에 대해 비교적 특이적이기 때문이다. 파라-브로모페나실 브로마이드가 또한 유용하며; 반응은 바람직하게는 pH 6.0에서 0.1 M 카코딜산나트륨 중에서 수행된다.

[0269] 리시닐 및 아미노-말단 잔기는 숙신산 또는 다른 카르복실산 무수물과 반응한다. 이들 작용제를 사용한 유도체화는 리시닐 잔기의 전하를 역전시키는 효과를 갖는다. 알파-아미노-함유 잔기를 유도체화하기 위한 다른 적합한 시약은 이미도에스테르, 예컨대 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로히드라이드, 트리니트로벤젠술포산, 0-메틸이소우레아, 2,4-펜탄디온 및 글리옥살레이트와의 트랜스아미나제-촉매된 반응을 포함한다.

[0270] 아르기닐 잔기는 하나 또는 여러 통상적인 시약, 특히 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온 및 닐히드린과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아니딘 관능기의 높은 pKa 때문에 반응이 알칼리성 조건에서 수행될 것을 요구한다. 추가로, 이들 시약은 리신 기뿐만 아니라 아르기닌 엡실론-아미노기와 반응할 수 있다.

[0271] 티로실 잔기의 특이적 변형이 이루어질 수 있으며, 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼 표지를 티로실 잔기 내로 도입하는 것이 특히 흥미롭다. 가장 통상적으로, N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄이 각각 0-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 형성하는 데 사용된다.

[0272] 카르복실 측기 (아스파르트산 또는 글루탐산)는 카르보디이미드 (R-N=C=N-R') (여기서 R 및 R'는 상이한 알킬기임), 예컨대 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸) 카르보디이미드와의 반응에 의해 선택적으로 변형된다. 추가로, 아스파르트산 및 글루탐산 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.

[0273] 다른 변형은 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 히드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), 아스파라긴 또는 글루탐산의 탈아미드화, N-말단 아민의 아세틸화 및/또는 C-말단 카르복실산기의 아미드화 또는 에스테르화를 포함한다.

[0274] 또 다른 유형의 공유 변형은 글리코시드를 펩티드에 화학적으로 또는 효소적으로 커플링시키는 것을 포함한다. 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카르복실기, (c) 유리 술포히드릴기, 예컨대 시스테인의 것, (d) 유리 히드록실기, 예컨대 세린, 트레오닌 또는 히드록시프롤린의 것, (e) 방향족 잔기, 예컨대 티로신의 것 또는 (f) 글루탐산의 아미드기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 W01987/05330 및 문헌 [Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)]에 기재되어 있다.

[0275] 일부 실시양태에서, L은 결합이다. 이들 실시양태에서, 표적화 도메인 및 페이로드는 표적화 도메인 상의 친핵성 반응성 모이어티를 페이로드 상의 친전자성 반응성 모이어티와 반응시킴으로써 함께 접합된다. 대안적 실시양태에서, 표적화 도메인 및 페이로드는 표적화 도메인 상의 친전자성 반응성 모이어티를 페이로드 상의 친핵성 모이어티와 반응시킴으로써 함께 접합된다. 예시적인 실시양태에서, L은 표적화 도메인 상의 아민 (예를 들어, 리신 잔기의 ε-아민)과 M 상의 카르복실기의 반응 시 형성되는 아미드 결합이다. 대안적 실시양태에서, 표적화 도메인 및/또는 페이로드는 접합 전에 유도체화제로 유도체화된다.

[0276] 일부 실시양태에서, L은 연결기이다. 일부 실시양태에서, L은 이관능성 링커이고, 표적화 도메인 및 페이로드에의 접합 전에 단지 2개의 반응성기를 포함한다. 표적화 도메인 및 페이로드 둘 다 친전자성 반응성기를 갖는 실시양태에서, L은 표적화 도메인 및 페이로드에의 접합 전에 2개의 동일한 또는 2개의 상이한 친핵성기 (예를 들어, 아민, 히드록실, 티올)를 포함한다. 표적화 도메인 및 페이로드 둘 다 친핵성 반응성기를 갖는 실시양태에서, L은 표적화 도메인 및 페이로드에의 접합 전에 2개의 동일한 또는 2개의 상이한 친전자성기 (예를 들어, 카르복실기, 카르복실기의 활성화된 형태, 이탈기를 갖는 화합물)를 포함한다. 표적화 도메인 또는 페이로드 중 하나가 친핵성 반응성기를 갖고, 표적화 도메인 또는 페이로드 중 다른 하나가 친전자성 반응성기를 갖는 실시양태에서, L은 표적화 도메인 및 페이로드에의 접합 전에 1개의 친핵성 반응성기 및 1개의 친전자성기를 포함한다.

- [0277] L은 (표적화 도메인 및 페이로드에의 접합 전에) 각각의 표적화 도메인 및 페이로드와 반응할 수 있는 적어도 2개의 반응성 기를 갖는 임의의 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, L은 단지 2개의 반응성 기를 가지며, 이관능성이다. L (펩티드에의 접합 전)은 화학식 VI: A-L-B에 의해 나타내어질 수 있으며, 여기서 A 및 B는 독립적으로 친핵성 또는 친전자성 반응성 기이다. 일부 실시양태에서, A 및 B는 둘 다 친핵성 기이거나 또는 둘 다 친전자성 기이다. 일부 실시양태에서, A 또는 B 중 하나는 친핵성 기이고, A 또는 B 중 다른 하나는 친전자성 기이다.
- [0278] 일부 실시양태에서, A 및 B는 올레핀 복분해 반응에 적합한 알켄 및/또는 알킨 관능기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, A 및 B는 클릭 화학에 적합한 모이어티 (예를 들어, 알켄, 알킨, 니트릴, 아지드)를 포함한다. 반응성 기 (A 및 B)의 다른 비제한적 예는 피리딜디티올, 아릴 아지드, 디아지린, 카르보다이미드 및 히드라지드를 포함한다.
- [0279] 일부 실시양태에서, L은 소수성이다. 소수성 링커는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)]을 참조하며, 이는 그 전문이 참조로 포함된다. 관련 기술분야에 공지된 적합한 소수성 연결기는, 예를 들어 8-히드록시 옥탄산 및 8-메르캡토옥탄산을 포함한다. 조성물의 펩티드에의 접합 전에, 소수성 연결기는 본원에 기재된 바와 같이 및 하기 제시된 바와 같이 적어도 2개의 반응성 기 (A 및 B)를 포함한다: A-(소수성 연결기)-B.
- [0280] 일부 실시양태에서, 소수성 연결기는 반응성 기로서 말레이미도 또는 아이오도아세틸 기 및 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산 (예를 들어, NHS 에스테르)을 포함한다. 이들 실시양태에서, 말레이미도 또는 아이오도아세틸 기는 표적화 도메인 또는 페이로드 상의 티올 모이어티에 커플링될 수 있고, 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산은 커플링 시약의 사용 하에 또는 사용 없이 표적화 도메인 또는 페이로드 상의 아민에 커플링될 수 있다. 카르복실산을 유리 아민과 커플링시키기 위해 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 커플링제, 예컨대, 예를 들어 DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU 및 본원에 기재된 다른 활성화제가 사용될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 친수성 연결기는 2 내지 100개의 메틸렌 기의 지방족쇄를 포함하며, 여기서 A 및 B는 카르복실 기 또는 그의 유도체 (예를 들어, 숙신산)이다. 다른 구체적 실시양태에서, L은 아이오도아세트산이다.
- [0281] 일부 경우에, 조성물의 펩티드에의 접합 전에, 친수성 연결기는 본원에 기재된 바와 같이 및 하기 제시된 바와 같이 적어도 2개의 반응성 기 (A 및 B)를 포함한다: A-(친수성 연결기)-B. 구체적 실시양태에서, 연결기는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. PEG는 특정 실시양태에서 약 100 달톤 내지 약 10,000 달톤, 예를 들어 약 500 달톤 내지 약 5000 달톤의 분자량을 갖는다. PEG는 일부 실시양태에서 약 10,000 달톤 내지 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는다.
- [0282] 일부 실시양태에서, 친수성 연결기는 반응성 기로서 말레이미도 또는 아이오도아세틸 기 및 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산 (예를 들어, NHS 에스테르)을 포함한다. 이들 실시양태에서, 말레이미도 또는 아이오도아세틸 기는 표적화 도메인 또는 페이로드 상의 티올 모이어티에 커플링될 수 있고, 카르복실산 또는 활성화된 카르복실산은 커플링 시약의 사용 하에 또는 사용 없이 표적화 도메인 또는 페이로드 상의 아민에 커플링될 수 있다. 카르복실산을 아민과 커플링시키기 위해 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 적절한 커플링제, 예컨대, 예를 들어 DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU 및 본원에 기재된 다른 활성화제가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 연결기는 말레이미도-중합체(0.1-2.5 kDa)-COOH, 아이오도아세틸-중합체(0.1-2.5 kDa)-COOH, 말레이미도-중합체(0.1-2.5 kDa)-NHS 또는 아이오도아세틸-중합체(0.1-2.5 kDa)-NHS이다.
- [0283] 일부 실시양태에서, 연결기는 아미노산, 디펩티드, 트리펩티드 또는 폴리펩티드로 구성되며, 여기서 아미노산, 디펩티드, 트리펩티드 또는 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 적어도 2개의 활성화 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 연결기 (L)는 아미노, 에테르, 티오에테르, 말레이미도, 디술폰, 아미드, 에스테르, 티오에스테르, 알켄, 시클로알켄, 알킨, 트리아졸, 카르바메이트, 카르보네이트, 카텝신 B-절단가능 및 히드라존으로 이루어진 군으로부터 선택된 모이어티를 포함한다.
- [0284] 일부 실시양태에서, L은 1 내지 약 60개 또는 1 내지 30개 또는 그 초과 원자, 2 내지 5개의 원자, 2 내지 10개의 원자, 5 내지 10개의 원자 또는 10 내지 20개의 원자의 길이의 원자의쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서,쇄 원자는 모두 탄소 원자이다. 일부 실시양태에서, 링커의 백본 내의쇄 원자는 C, O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된다.쇄 원자 및 링커는 일부 경우에 보다 가용성인 접합체를 제공하도록 그의 예상된 용해도 (친수성)에 따라 선택된다. 일부 실시양태에서, L은 표적 조직 또는 기관 또는 세포에서 발견되는 효소 또는 다른 촉매 또는 가수분해 조건에 의한 절단에 적용되는 관능기를 제공한다. 일부 실시양태에서,

L의 길이는 입체 장애의 가능성을 감소시키기에 충분히 길다.

- [0285] 일부 실시양태에서, L은 생물학적 유체, 예컨대 혈액 또는 혈액 분획에서 안정하다. 일부 실시양태에서, L은 혈청에서 적어도 5분 동안 안정하고, 예를 들어 혈청에서 5분의 기간 동안 인큐베이션되는 경우에 접합체의 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만이 절단된다. 다른 실시양태에서, L은 혈청에서 적어도 10 또는 20 또는 25 또는 30 또는 60 또는 90 또는 120분, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 또는 24시간 동안 안정하다. 이들 실시양태에서, L은 생체내에서 가수분해를 겪을 수 있는 관능기를 포함하지 않는다. 일부 예시적인 실시양태에서, L은 혈청에서 적어도 약 72시간 동안 안정하다. 생체내에서 유의한 가수분해를 겪을 수 없는 관능기의 비제한적 예는 아미드, 에테르 및 티오에테르를 포함한다.
- [0286] 일부 실시양태에서, L은 생체내에서 가수분해성이다. 이들 실시양태에서, L은 생체내에서 가수분해를 겪을 수 있는 관능기를 포함한다. 생체내에서 가수분해를 겪을 수 있는 관능기의 비제한적 예는 에스테르, 무수물 및 티오에스테르를 포함한다.
- [0287] 일부 예시적인 실시양태에서, L은 37°C의 혈장에서 불안정하고, 3시간 이내에 실질적인 가수분해를 겪으며, 6시간 내에 완전한 가수분해를 겪는다. 일부 예시적인 실시양태에서, L은 불안정하지 않다.
- [0288] 일부 실시양태에서, L은 생체내에서 준안정하다. 이들 실시양태에서, L은 임의로 일정 기간에 걸쳐 생체내에서 화학적으로 또는 효소적으로 절단될 수 있는 관능기 (예를 들어, 산-불안정성, 환원-불안정성 또는 효소-불안정성 관능기)를 포함한다. 이들 실시양태에서, L은, 예를 들어 히드라존 모이어티, 디술피드 모이어티 또는 카텡신-절단가능한 모이어티를 포함할 수 있다. L이 준안정한 경우에, 임의의 특정한 이론에 얽매는 것을 의도하지는 않지만, 표적화 도메인-L-M 접합체는 세포의 환경에서는 안정하나, 예를 들어 상기 기재된 기간 동안 혈청에서는 안정하나, 세포내 환경 또는 세포내 환경을 모방하는 조건에서는 불안정하여, 세포 내로의 진입 시 절단된다. 일부 실시양태에서, L이 준안정한 경우에, L은 적어도 약 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 42 또는 48시간, 예를 들어 적어도 약 48, 54, 60, 66 또는 72시간, 또는 약 24-48, 48-72, 24-60, 36-48, 36-72 또는 48-72시간 동안 혈청에서 안정하다.
- [0289] 일부 경우에, 적합한 중합체 백본은 화학식 X-중합체-LY를 가지며, 여기서 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 아지드 기와 반응하지 않는 관능기이고, Y는 적합한 이탈기이다. 적합한 관능기의 예는 히드록실, 보호된 히드록실, 아세탈, 알케닐, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 보호된 히드라지드, 보호된 티올, 카르복실산, 보호된 카르복실산, 말레이미드, 디티오피리딘 및 비닐피리딘 및 케톤을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 적합한 이탈기의 예는 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0290] 링커는 넓은 범위의 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. 표적화 도메인과 연결된 엔티티 사이에 또는 연결된 엔티티와 그의 결합 파트너 (존재하는 경우) 사이에 목적하는 공간적 관계 또는 입체형태를 제공하기 위해 보다 큰 또는 보다 작은 분자량 링커가 사용될 수 있다. 또한, 표적화 도메인과 연결된 엔티티 사이에 또는 연결된 엔티티와 그의 결합 파트너 사이에 목적하는 공간 또는 가요성을 제공하기 위해 보다 긴 또는 보다 짧은 분자 길이를 갖는 링커가 사용될 수 있다.
- [0291] 일부 실시양태에서, 링커는 a) 중합체 백본의 적어도 제1 말단 상의 아지드, 알킨, 히드라진, 히드라지드, 히드록실아민 또는 카르보닐-함유 모이어티; 및 b) 중합체 백본의 제2 말단 상의 적어도 제2 관능기를 포함하는 덤벨 구조를 갖는 수용성 이관능성 링커를 포함한다. 제2 관능기는 제1 관능기와 동일하거나 상이할 수 있다. 제2 관능기는 일부 실시양태에서 제1 관능기와 반응성이 아니다. 일부 실시양태에서, 수용성 화합물은 분지형 분자 구조의 적어도 1개의 아암을 포함한다. 예를 들어, 분지형 분자 구조는 수지상일 수 있다.
- [0292] 예시적인 실시양태에서, 중합체는 링커를 통해 표적화 도메인 또는 변형된 표적화 도메인에 연결된다. 예를 들어, 링커는 한 말단에서 중합체 - 예컨대 알부민 결합 모이어티 - 에 결합하고 다른 말단에서 폴리펩티드 백본 상의 임의의 이용가능한 위치에 결합하는 1 또는 2개의 아미노산을 포함할 수 있다. 추가의 예시적인 링커는 친수성 링커, 예컨대 적어도 5개의 비-수소 원자를 포함하는 화학적 모이어티를 포함하며, 여기서 이들의 30-50%는 N 또는 O이다.
- [0293] 임의로, 다중 표적화 도메인 또는 변형된 표적화 도메인 분자는 링커 폴리펩티드에 의해 연결될 수 있으며, 여기서 상기 링커 폴리펩티드는 임의로 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-11, 1-12개의 아미노산 길이이고, 더 긴 길이이며, 여기서 임의로 한 표적화 도메인의 N-말단은 링커 폴리펩티드의 C-말단에 융합되고, 링커 폴리펩티드의 N-말단은 또 다른 표적화 도메인의 N-말단에 융합된다.

- [0294] 본원에 사용된 용어 "친전자성 기", "친전자체" 등은 전자 쌍을 수용하여 공유 결합을 형성할 수 있는 원자 또는 원자단을 지칭한다. 본원에 사용된 "친전자성 기"는 할라이드, 카르보닐 및 에폭시드 함유 화합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 통상의 친전자체는 할라이드, 예컨대 티오포스겐, 글리세린 디클로로히드린, 프탈로일 클로라이드, 숙시닐 클로라이드, 클로로아세틸 클로라이드, 클로로숙시닐 클로라이드 등; 케톤, 예컨대 클로로아세톤, 브로모아세톤 등; 알데히드, 예컨대 글리옥살 등; 이소시아네이트, 예컨대 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 톨릴렌 디이소시아네이트, 메타-크실릴렌 디이소시아네이트, 시클로헥실메탄-4,4-디이소시아네이트 및 이들 화합물의 유도체를 포함한다.
- [0295] 본원에 사용된 용어 "친핵성 기", "친핵체" 등은 공유 결합을 형성할 수 있는 전자 쌍을 갖는 원자 또는 원자단을 지칭한다. 이러한 유형의 기는 음이온성 기로서 반응하는 이온화가능한 기일 수 있다. 본원에 사용된 "친핵성 기"는 히드록실, 1급 아민, 2급 아민, 3급 아민 및 티올을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0296] 일반적으로, 탄소 친전자체는 탄소 친핵체를 포함한 상보적 친핵체에 의해 공격받기 쉬우며, 여기서 공격 친핵체는 전자 쌍을 탄소 친전자체에 가져와 친핵체와 탄소 친전자체 사이에 새로운 결합을 형성한다.
- [0297] 탄소 친핵체의 비제한적 예는 알킬, 알케닐, 아릴 및 알키닐 그리나르, 유기리튬, 유기아연, 알킬-, 알케닐-, 아릴- 및 알키닐-주석 시약 (유기스탄난), 알킬-, 알케닐-, 아릴- 및 알키닐-보란 시약 (유기보란 및 유기보로네이트)을 포함하나 이에 제한되지는 않으며; 이들 탄소 친핵체는 물 또는 극성 유기 용매 중에서 동역학적으로 안정하다는 이점을 갖는다. 탄소 친핵체의 다른 비제한적 예는 인 일리드, 엔올 및 엔올레이트 시약을 포함하며; 이들 탄소 친핵체는 합성 유기 화학 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 전구체로부터 생성하기가 비교적 용이하다는 이점을 갖는다. 탄소 친핵체는, 탄소 친전자체와 함께 사용되는 경우에, 탄소 친핵체와 탄소 친전자체 사이에 새로운 탄소-탄소 결합을 생성한다.
- [0298] 탄소 친전자체에 커플링시키기에 적합한 비-탄소 친핵체의 비제한적 예는 1급 및 2급 아민, 티올, 티올레이트 및 티오에테르, 알콜, 알콕시드, 아지드, 세미카르바지드 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이들 비-탄소 친핵체는, 탄소 친전자체와 함께 사용되는 경우에, 전형적으로 헤테로원자 연결 (C-X-C)을 생성하며, 여기서 X는 산소, 황 또는 질소를 포함하나 이에 제한되지는 않는 헤테로원자이다.
- [0299] 일부 경우에, 본원에 사용된 중합체는 한 말단에서 히드록시 또는 메톡시로 종결되며, 즉 X는 H 또는 CH₃ ("메톡시 PEG")이다. 대안적으로, 중합체는 반응성 기로 종결되어 이관능성 중합체를 형성할 수 있다. 전형적인 반응성 기는 20종의 통상의 아미노산에서 발견되는 관능기 (말레이미드 기, 활성화된 카르보네이트 (p-니트로페닐 에스테르를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 활성화된 에스테르 (N-히드록시숙시이미드, p-니트로페닐 에스테르를 포함하나 이에 제한되지는 않음) 및 알데히드를 포함하나 이에 제한되지는 않음)와 반응하는 데 통상적으로 사용되는 반응성 기, 뿐만 아니라 20종의 통상의 아미노산에 대해 불활성이지만 상보적 관능기 (아지드 기, 알킨 기를 포함하나 이에 제한되지는 않음)와 특이적으로 반응하는 관능기를 포함할 수 있다. 상기 화학식에서 Y로 나타난 중합체의 다른 말단은 아미노산을 통해 표적화 도메인에 직접적으로 또는 간접적으로 부착될 것임을 주목한다. 예를 들어, Y는 폴리펩티드의 아민 기 (리신의 엡실론 아민 또는 N-말단을 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 대한 아미드, 카르바메이트 또는 우레아 연결이다. 대안적으로, Y는 티올 기 (시스테인의 티올 기를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 대한 말레이미드 연결이다. 대안적으로, 중합체 상의 알킨 기는 표적화 도메인에 존재하는 아지드 기와 반응하여 유사한 생성물을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 강한 친핵체 (히드라진, 히드라지드, 히드록실아민, 세미카르바지드를 포함하나 이에 제한되지는 않음)는 표적화 도메인에 존재하는 알데히드 또는 케톤 기와 반응하여, 히드라존, 옥심 또는 세미카르바존 (적용가능한 경우)을 형성할 수 있으며, 이는 일부 경우에 적절한 환원제로의 처리에 의해 추가로 환원될 수 있다. 대안적으로, 강한 친핵체는 아미노산을 통해 표적화 도메인 내로 혼입되고, 수용성 중합체에 존재하는 케톤 또는 알데히드 기와 우선적으로 반응하는 데 사용될 수 있다.
- [0300] 실제적으로 요망되는 경우에, 약 0.1 달톤 (Da) 내지 2,500 Da 또는 그 초과를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 중합체를 위한 임의의 분자 질량이 사용될 수 있다. 중합체의 분자량은 약 100 Da 내지 약 5,000 Da 또는 그 초과를 포함하나 이에 제한되지는 않는 넓은 범위일 수 있다. 일부 경우에, 중합체는 50-5000 Da, 50-3000 Da, 50-2500 Da, 100-2500 Da, 250-2500 Da, 250-5000 Da 또는 500-5000 Da이다. 분지쇄 중합체는 각각의 쇠가 0.1-5 kDa, 0.1-4 kDa, 0.1-3 kDa, 0.1-2.5 kDa, 0.1-1.5 kDa 범위의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0301] 중합체는 약 800 Da 내지 약 100,000 Da의 평균 분자량을 갖는 수용성 중합체 백본을 포함하는 아지드- 및 아세

틸렌-함유 중합체 유도체를 포함할 수 있다. 수용성 중합체의 중합체 백본은 폴리(에틸렌 글리콜)일 수 있다. 그러나, 폴리(에틸렌)글리콜 및 다른 관련 중합체, 예컨대 폴리(텍스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 매우 다양한 수용성 중합체가 또한 존재하며, 용어 PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)의 사용은 모든 이러한 분자를 포괄하고 포함하는 것으로 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 용어 PEG는 이관능성 PEG, 멀티아함형 PEG, 유도체화 PEG, 포크형 PEG, 분지형 PEG, 펜던트 PEG (즉, 중합체 백본에 펜던트된 1개 이상의 관능기를 갖는 PEG 또는 관련 중합체) 또는 그 안에 분해가능한 연결을 갖는 PEG를 포함한 임의의 그의 형태의 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0302] 중합체의 이들 형태 이외에도, 중합체는 또한 백본에 약한 또는 분해가능한 연결을 갖도록 제조될 수 있다. 예를 들어, 중합체는 가수분해에 적용되는 중합체 백본에 에스테르 연결을 갖도록 제조될 수 있다. 하기 제시된 바와 같이, 이러한 가수분해는 중합체의 보다 저분자량의 단편으로의 절단을 유발한다: -중합체-CO₂-중합체+H₂O → 중합체-CO₂H+HO-중합체-

[0303] 링커는 중합체, 예컨대 수용성 백본을 포함하는 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 수용성인 중합체 백본은 2 내지 약 300개의 말단을 포함한다. 적합한 중합체의 예는 다른 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리(프로필렌 글리콜) ("PPG"), 그의 공중합체 (에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 그의 삼원공중합체, 그의 혼합물 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 달라질 수 있지만, 이는 전형적으로 약 800 Da 내지 약 100,000 Da, 종종 약 6,000 Da 내지 약 80,000 Da의 범위이다. 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 약 100 Da 내지 약 100,000 Da, 예컨대 비제한적으로 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 약 100 Da 내지 약 50,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 약 100 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 약 5,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 중합체 백본의 각각의 쇠의 분자량은 약 10,000 Da 내지 약 40,000 Da이다.

[0304] 적절한 생리학상 절단가능한 연결은 에스테르, 카르보네이트 에스테르, 카르바메이트, 술페이트, 포스페이트, 아실옥시알킬 에테르, 아세탈 및 케탈을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 접합체는 저장 시 및 투여 시 안정한 생리학상 절단가능한 결합을 보유해야 한다. 예를 들어, 중합체에 연결된 표적화 도메인 또는 변형된 표적화 도메인은 최종 제약 조성물의 제조 시, 적절한 전달 비히클 (사용되는 경우) 중에서의 용해 시, 및 경로에 상관없이 투여 시, 그의 완전성을 유지하여야 한다.

[0305] 본 발명은 또한 US 2017/0182181 (본원에 참조로 포함됨)에 개시된 약물 접합체의 세포내 전달을 위한 조정가능한 안정성을 갖는 포스페이트-기반 링커를 포함한다. 포스페이트-기반 링커는 원위에서 근위 방향으로 조정 요소, 임의로 스페이서 요소 및 반응성 관능기를 포함하는 링커 아암의 원위 단부에 공유 연결된 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트 또는 테트라포스페이트 기 (포스페이트 기)를 포함한다. 포스페이트-기반 링커의 포스페이트 기는 페이로드에 접합될 수 있고, 반응성 관능기는 세포-특이적 표적화 리간드, 예컨대 항체에 접합될 수 있다. 포스페이트-기반 링커의 일반적 구조는 다음과 같다: 포스페이트 기-조정 요소-임의적 스페이서 요소-관능성 반응성 기. 페이로드에 접합된 포스페이트-기반 링커는 하기 일반적 구조: 페이로드-포스페이트 기-조정 요소-임의적 스페이서 요소-관능성 반응성 기를 갖고, 표적화 리간드에 접합된 경우에는 일반적 구조: 페이로드-포스페이트 기-조정 요소-임의적 스페이서 요소-표적화 리간드를 갖는다. 이들 포스페이트-기반 링커는 혈액 내 세포내 환경 (예를 들어, 리소솜 구획)에서 분해되고 조정가능한 안정성을 갖는다. 포스페이트 기가 세포내 환경에서 절단되어 페이로드를 그의 천연 또는 활성 형태로 방출시키는 속도는 조정 요소의 구조에 의해 영향을 받을 수 있으며, 추가의 효과는 포스페이트 기의 치환뿐만 아니라 포스페이트 기가 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트 또는 테트라포스페이트인지 여부에 의해 매개된다. 추가로, 이들 포스페이트-기반 링커는 본원에 개시된 바와 같은 포스페이트-기반 링커가 아닌 링커를 사용하여 항체 또는 표적화 리간드에 동일한 페이로드가 접합된 접합체와 비교하여 접합체의 응집체 형성 경향이 감소되는 접합체, 예컨대 항체-약물 접합체를 구축하는 능력을 제공한다.

[0306] 일부 경우에, 표적화 도메인은 본원에 기재된 방법을 통해 수용성 중합체를 통해 페이로드에 연결된다. 일부

실시양태에서, 방법은 반응성 아미노산 측쇄를 포함하는 단리된 표적화 도메인을 링커와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 표적화 도메인 상에 존재하는 관능기를 링커 상에 존재하는 반응성 기와 반응시킴으로써 합성된다. 일부 경우에, 접합체는 링커 상에 존재하는 관능기를 페이로드 상에 존재하는 반응성 기와 반응시킴으로써 합성된다. 일부 경우에, 페이로드-링커 모이어티는 표적화 도메인에 접합된다. 일부 경우에, 표적화 도메인-링커 모이어티는 페이로드에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 수용성 중합체를 포함하는 링커에 연결된다.

[0307] 다른 실시양태에서, 표적화 도메인은 링커를 통해 페이로드에 접합된다. 일부 경우에, 링커는 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커이다.

[0308] 일부 실시양태에서, 링커는 0.1kDa 내지 5kDa이다. 다른 실시양태에서, 링커는 0.1kDa 내지 2.5kDa이다. 다른 실시양태에서, 링커 또는 중합체는 선형, 분지형, 다량체 또는 덴드리머이다. 또 다른 실시양태에서, 링커 또는 중합체는 이관능성 또는 다관능성 링커 또는 이관능성 또는 다관능성 중합체이다.

[0309] 다른 실시양태에서, 중합체는 수용성 중합체이다. 다른 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 일부 실시양태에서, PEG는 0.1kDa 내지 10kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, PEG는 0.1kDa 내지 5kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, PEG는 0.1kDa 내지 4kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, PEG는 0.1kDa 내지 3kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, PEG는 0.1kDa 내지 2kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, PEG는 0.1kDa 내지 2.5kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 약 0.1 kDa 내지 약 10 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 0.1 kDa 내지 50 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜)은 0.1 kDa 내지 2.5 kDa 또는 0.2 내지 2.2 kDa 또는 0.5 kDa 내지 2 kDa의 분자량을 갖는다. 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 일부 경우에 약 0.5 kDa 또는 약 1 kDa 또는 약 2 kDa 또는 약 2.5 kDa이다. 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 일부 경우에 0.1 kDa 또는 0.5 kDa 또는 1 kDa 또는 2.5 kDa이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 1K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 2.5K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 5K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 2.5K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 10K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 2K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 0.5K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 평균 분자량이다. 특정 실시양태에서, 평균 분자량은 수 평균 분자량 (Mn)이다. 평균 분자량은 GPC 또는 SEC, SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, 질량 분광측정법 또는 모세관 전기영동을 사용하여 결정 또는 측정될 수 있다.

[0310] 치료 방법

[0311] 본원에 기재된 접합체는 상태 및/또는 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 질환은 증식성 질환을 포함한다. 일부 경우에, 증식성 질환은 암을 포함한다. 일부 경우에, 암은 1개 이상의 종양을 포함한다. 일부 경우에, 암은 고형 또는 액상 종양을 포함한다. 일부 경우에, 접합체는 급속하게 분열하는 세포, 예컨대 종양 세포를 사멸시키거나 그의 성장을 억제하기 위해 투여된다. 일부 경우에, 증식성 질환 또는 상태의 치료를 필요로 하는 대상체에서 증식성 질환 또는 상태를 치료하는 방법은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 접합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 증식성 질환 또는 상태는 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양 암이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 결장직장암, 식도암, 안암, 두경부암, 신장암, 폐암, 흑색종, 난소암, 췌장암 또는 전립선암이다. 일부 경우에, 질환은 PCa (전립선암), CRPCa (거세 저항성 전립선암), 고형 종양 (신생혈관계), NSCLC (비소세포 폐암), HNSCC (두경부 편평 세포 암종), ESCC (식도암), GC (위암), CRC (결장직장암), SCLC (소세포 폐암), MPM (중피종), PDAC (췌장관 선암종), ALL (급성 림프모구성 백혈병), AML (급성 골수성 백혈병), MDS (골수이형성 증후군), MSI-고 종양, 흑색종, DLBCL (미만성 대 B 세포 림프종), 자궁내막암, 자궁경부암, 방광암, BrCa (유방암), TNBC (삼중 음성 유방암), NE-PCa (신경내분비 전립선암), GBM (교모세포종) 및 RCC (신세포 암종)를 포함한다.

[0312] 일부 경우에, 본원에서 표적화된 종양 세포는 1개 이상의 표적을 과다발현한다. 일부 경우에, 표적은 표면 마커 또는 수용체를 포함한다. 일부 경우에, 표적은 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6,

CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM 중 하나 이상으로부터 선택된다. 일부 경우에, 표적은 PSMA, EGFR, EGFRviii, MSLN, CEA, DLL3, FAP, CD33, HER3, PD-L1, EphA2, EphA4, HER2, SIRPa, DLK1, Muc16, LRP5, LRP6, endo180, LIV-1, SLAMF7, PTK7, GPR20, CDH6, CSP-1, CD71, PRLR, SEZ6, DLL1, NOTCH3 rec, NaPi2b, CD16, GCC, SSTR2, CAIX, CAXII, MC1R, CXCR4, B1R, GRPR, STEAP1, CD70, CD46, CD166, CLL-1, ADAM9, cKIT, CD36, CD73, ITGaVb3, ITGaVb6, GPC-1, CD38, CD51, FGFR3, Ly6E, CD44v6, ENPP3, CXCR3, CXCR5, FcRH5, VEGF, VEGFR2, CD45, CCR4, CD25, 5T4, ROR1, TROP-2, NECTIN4, cMET, CD19, CD22, CD30, CD33, CD123, BCMA, CD79b, AXL, RON, B7-H3, B7-H4, KAAG1, Muc1, ADAM-9, GPNMB, EDB 피브로넥틴, 조직 인자, GPNMB, Fo1Ra, ALPP, ALPPL2, MT1-MMP, CLDN18.2, CLDN6, CLDN9, p카드헤린, CEACAM6, CD47 및 EpCAM 중 둘 이상으로부터 선택된다. 일부 경우에, 접합체는 접합체가 종양 세포 상의 1개 이상의 표적에 결합되는 경우에 페이로드를 종양 세포에 가져오고, 페이로드는 종양 세포를 사멸시키거나, 억제하거나 또는 그의 성장을 늦춘다.

[0313] 일부 경우에, 본원의 접합체는 특정한 세포 또는 세포 군을 영상화하기 위해 투여된다. 일부 경우에, 세포 또는 세포 군은 종양 세포이거나 또는 종양 미세환경에 존재한다. 일부 경우에, 접합체가 종양 세포 상의 1개 이상의 표적에 결합되고 페이로드가 영상화제 (예컨대 시각적 염료 또는 방사성표지)인 경우에, 접합체는 페이로드를 종양 세포에 가져오고, 종양 세포는 접합체와 종양 세포의 회합의 결과로서 영상화된다.

[0314] 제약 조성물은 치료 (또는 예방)될 질환에 적절한 방식으로 투여된다. 적절한 용량 및 적합한 투여 지속기간 및 빈도는 환자의 상태, 환자의 질환의 유형 및 중증도, 활성 성분의 특정한 형태 및 투여 방법과 같은 인자에 의해 결정될 것이다. 일반적으로, 적절한 용량 및 치료 요법은 조성물(들)을 치료적 및/또는 예방적 이익 (예를 들어, 개선된 임상 결과)을 제공하거나 또는 증상 중증도를 경감시키기에 충분한 양으로 제공한다. 최적 용량은 일반적으로 실험 모델 및/또는 임상 시험을 사용하여 결정된다. 최적 용량은 환자의 체질량, 체중 또는 혈액량에 좌우된다.

[0315] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 주사가능한 제약 조성물은 개시된 접합체의 주사가능한 제약 조성물 중 어느 하나의 투여로부터 이익을 얻을 포유동물에서의 질환 또는 상태의 치료를 위한 의학의 제조에 사용된다. 본원에 기재된 임의의 질환 또는 상태의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 이러한 질환 또는 상태를 치료하는 방법은 상기 포유동물에게 본원에 기재된 적어도 1종의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 활성 대사물, 전구약물 또는 제약상 허용되는 용매화물을 치료 유효량으로 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0316] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 화합물(들)을 함유하는 조성물은 예방적 및/또는 치유적 치료를 위해 투여된다. 특정 치료 용도에서, 조성물은 질환 또는 상태를 이미 앓고 있는 환자에게 질환 또는 상태의 증상 중 적어도 하나를 치유하거나 또는 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 용도에 효과적인 양은 질환 또는 상태의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태, 체중 및 약물에 대한 반응 및 치료하는 의사의 판단에 좌우된다. 치료 유효량은 용량 증량 및/또는 용량 범위설정 임상 시험을 포함하나 이에 제한되지 않는 방법에 의해 임의로 결정된다.

[0317] 예방 용도에서, 본원에 기재된 화합물을 함유하는 조성물은 특정한 질환, 장애 또는 상태에 걸리기 쉽거나 또는 달리 그의 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방 유효량 또는 예방 유효 용량"인 것으로 정의된다. 이러한 용도에서, 정확한 양은 또한 환자의 건강 상태, 체중 등에 좌우된다. 환자에서 사용되는 경우에, 이러한 용도를 위한 유효량은 질환, 장애 또는 상태의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응 및 치료하는 의사의 판단에 좌우될 것이다. 한 측면에서, 예방적 치료는 질환 또는 상태의 증상의 복귀를 예방하기 위해, 포유동물, 즉 치료될 질환의 적어도 1종의 증상을 이전에 경험하였고 현재 완화 상태인 포유동물에게 본원에 기재된 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0318] 특정 실시양태에서, 화합물의 투여는 환자의 질환 또는 상태의 증상을 호전시키거나 또는 달리 제어하거나 또는 제한하기 위해 만성적으로, 즉 환자의 삶의 지속기간 전반을 포함한 연장된 기간 동안 투여된다.

[0319] 제조 방법

- [0320] 본원에 기재된 접합체는 생체내 또는 시험관내 방법 또는 방법의 조합을 사용하여 합성될 수 있다. 일부 경우에, 방법은 생체내 방법이다. 일부 경우에, 방법은 시험관내 방법이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산을 포함하는 표적화 도메인은 생체내 합성되고, 페이로드는 시험관내 화학적 방법을 사용하여 부착된다.
- [0321] 일부 경우에, 방법은 생체외 방법이다. 일부 경우에, 천연 아미노산 돌연변이 또는 비천연 아미노산 돌연변이를 포함하는 본원에 기재된 접합체는 재조합적으로 생산되거나 또는 화학적으로 합성된다. 일부 경우에, 본원에 기재된 표적화 도메인은, 예를 들어 숙주 세포 시스템에 의해 또는 무세포 시스템에서 재조합적으로 생산된다.
- [0322] 일반적으로, 비-표준 아미노산을 포함하는 표적 폴리펩티드를 제조하는 방법이 공지되어 있다. 일부 경우에, 비천연 아미노산에 동족인 아미노-아실 tRNA 신테타제/tRNA 쌍은 이것이 사용되는 세포의 세포 성분에 대해 직교성이다. 외인성 아미노-아실 tRNA 신테타제/tRNA 쌍의 직교성 (및 따라서 적합성)은 숙주 유기체의 유형에 의존적이다. 4종의 주요 직교 아미노아실-tRNA 신테타제가 유전자 코드 확장을 위해 개발되었다: 메타노코쿠스 잔나쉬이(*Methanococcus jannaschii*) 티로실-tRNA 신테타제 (MjTyrRS)/tRNA_{CUA} 쌍, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 티로실-tRNA 신테타제 (EcTyrRS)/tRNA_{CUA} 쌍, 이. 콜라이 류실-tRNA 신테타제 (EcLeuRS)/tRNA_{CUA} 쌍 및 특정 메타노사르시나(*Methanosarcina*)로부터의 피롤리실-tRNA 신테타제 (PyIRS)/tRNA_{CUA} (tRNA^{py1}) 쌍. PyIRS/tRNA_{CUA} 쌍은 박테리아, 진핵 세포 및 동물에서 직교성이다 (예를 들어, 문헌 [Chin, Jason W. "Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals." Annual review of biochemistry 83 (2014): 379-408] 참조).
- [0323] 일부 경우에, 본원에 제공된 비천연 아미노산 (UAA)은 피롤리실-tRNA 신테타제 (tRNA^{py1})를 사용하여 혼입된다. 비천연 아미노산 (UAA)은 번역에 사용될 수 있도록 전달 RNA 분자 (tRNA) 상에 도입된다. 그러나, tRNA에 대한 비천연 아미노산의 부착이 반드시 자연 발생 아미노아실-tRNA 신테타제에 의해 달성되는 것은 아닐 수 있다. 따라서, 조작된 아미노아실-tRNA 신테타제, 예컨대 생성된 tRNA^{py1} 돌연변이체 라이브러리로부터 제조 및 선택된 조작된 tRNA^{py1}은 목적하는 UAA가 돌연변이유발에 혼입될 수 있도록 목적하는 UAA를 tRNA에 부착시키는 데 유용할 수 있다.
- [0324] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 UAA (예를 들어, 화학식 (IA)의 UAA)는 이러한 UAA를 부착시킬 수 있는 조작된 돌연변이체 tRNA^{py1} 변이체를 사용하여 tRNA에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 tRNA^{py1} 변이체는 1개의 아미노산 돌연변이를 도입한다 (즉, UAA를 혼입시킴). 다른 실시양태에서, 돌연변이체 tRNA^{py1} 변이체는 다중 아미노산 돌연변이를 도입한다. 일부 실시양태에서, tRNA^{py1} 변이체의 라이브러리가 제조되고, 목적하는 UAA의 부착을 위한 적절한 tRNA^{py1} 변이체를 선택하기 위해 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 스크리닝된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체에 UAA(들)를 도입하는 데 사용된 tRNA^{py1} 변이체는 US 8,735,093, US 9,133,449, WO2020206341 (이들 각각은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 tRNA^{py1} 변이체이다.
- [0325] 다양한 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제가 사용될 수 있다. 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 메타노사르시나 바르케리(*Methanosarcina barkeri*), 메타노사르시나 마제이(*Methanosarcina mazei*), 메타노사르시나 알부스(*Methanosarcina alvus*) 또는 메타노사르시나 잔나쉬이(*Methanosarcina jannaschii*)로부터의 피롤리실-tRNA 신테타제 또는 그의 키메라로부터 유래될 수 있거나 또는 그의 변이체일 수 있다.
- [0326] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제의 기질-결합 부위 내에 적어도 5개의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 90의 아미노산 서열 내에 적어도 5개의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 기질-결합 부위는 서열식별번호: 90의 아미노산 서열에 제시된 바와 같은 위치 302에서의 잔기 알라닌, 위치 305에서의 류신, 위치 306에서의 티로신, 위치 309에서의 류신, 위치 322에서의 이소류신, 위치 346에서의 아스파라긴, 위치 348에서의 시스테인, 위치 384에서의 티로신, 위치 401에서의 발린 및 위치 417에서의 트립토판을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 5개의 아미노산 잔기 치환은 서열식별번호: 90의 아미노산 서열에 제시된 바와 같은 위치 302에서의 알라닌의 치환, 위치 346에서의 아스파라긴의 치환, 위치 348에서의 시스테인의 치환, 위치 384에서의 티로신의 치환 및 위치 417에서의 트립토판의 치환으로부터 선택된다.

코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91의 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 80% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 85% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 90% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 91% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 92% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 93% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 94% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 95% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 96% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 97% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 98% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제는 서열식별번호: 91에 대해 적어도 99% 동일성인 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0333] 일부 경우에, 본원에서의 돌연변이체 피롤리실-tRNA 신테타제와 연관된 서열이 표 1B에 있다.

[0334] 표 1B

SEQ ID NO.	설명	서열
84	FSYRS의 아미노산 서열	MDKKPLNLTISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMA CGDHLVVNNSRSSRTARALRHHKYRKTCKRCRVSDLEDLN KFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARAPKPL ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISSISTG ATASALVKGNTNPITSMSPVQASAPALTKSQTDRLEVLL NPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQIYAEERENYL GKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDTELSK QIFRVDKNFCLRPLIPNLNYLRKLDRALPDIKIFEIGPC YRKESDGEHLEEFTMLTFIQMGSGCTRENLESIITDFLNH LGIDFKIVGDSCMVLGDTLDVMHGDLELSSAVVGPILDR EWGIDKPKIGA GFGLERLLKVKHDFKNIKRAARSESYNGISTNL*
85	FSYRS의 핵산 (DNA) 서열	ATGGATAAAAAGCCTTGAACACTCTGATTTCTGCGACC GGCTGTGGATGTCCCACCGGCACCATCCACAAAAT CAAACACCATGAAGTTAGCCGTTCACAAAATCTCATTG AATGGCTTGCAGCGATCACCTGGTTGTCAACAACCTCC GTTCTTCTCGTACCGCTCGCGCACTGCGCCACCACAAAAT ATCGCAAAACCTGCAAACGTTGCCGTGTTAGCGATGAG GACCTGAACAAATTCCTGACCAAAAGCTAACGAGGATCA GACCTCCGTAAAAGTGAAGGTAGTAAGCGCTCCGACCC GACTAAAAAGGCTATGCCAAAAAGCGTGGCCCGTGCC CCGAAACCTCTGGAAAACACCGAGGCGGCTCAGGCTCA ACCATCCGGTTCTAAATTTTCTCCGGCGATCCCAGTGTC CACCAAGAATCTGTTCCGTACCAGCAAGCGTGTCTAC CAGCATTAGCAGCATTCTACCGGTGCTACCGCTTCTGC GCTGGTAAAAGG TAACACTAACCCGATTACTAGCATGTCTGCACCGGTACA GGCAAGCGCCCCAGCTCTGACTAAATCCAGACGGACC GTCTGGAGGTGCTGCTGAACCCAAAGGATGAAATCTCT CTGAACAGCGGCAAGCCTTCCCGTGAGCTGGAAAAGCGA GCTGCTGTCTCGTCGTA AAAAGGATCTGCAACAGATCTA CGTGAGGAACGCGAGA ACTATCTGGGTAAGCTGGAGC GCGAAATTA CTGCTTCTTCGTGGATCGCGGTTTCTCGG AGATCAAATCTCCGATTCTGATTCCGCTGGAATACATTG AACGTATGGGCATCGATAATGATACCGAACTGTCTAAA CAGATCTTCCGTGTGGATAAAAACTTCTGTCTGCGTCCG ATGCTGATTCCGA ACTTGTACA ACTATTTACGTAAACTG GACCGTGCCCTGCCGGACCCGATCAAAAATATTCGAGAT CGGTCCCTTGCTACCGTAAAGAGTCCGACGGTAAAGAGC ACCTGGAAGAAT TCACCATGCTGACATTCATTCAGATGGGTAGCGGTTGCA CGCGTGAAAACCTGGAATCCATTATCACCGACTTCTGTA ATCACCTGGGTATCGATTTCAA AATTGTTGGTGACAGCT GTATGGTGTTAGGCGATACGCTGGATGTTATGCACGGC GATCTGGAGCTGTCTTCCGCAGTTGTGGGCCCAATCCCG

[0335]

		<p>CTGGATCGTGAGTGGGGTATCGACAAACCTAAAATCGG TCGGGGTTTTGGTCTGGAGCGTCTGCTGAAAGTAAAAC ACGACTTCAAGAACATCAAACGTGCTGCACGTTCCGAG TCTATTACAATGGTATTTCTACTAACCTGTAA</p>
<p>86</p>	<p>pEVOL-FSYRS DNA 서열</p>	<p>ACTAGTATGGATAAAAAGCCTTGAACACTCTGATTTCT GCGACCGTCTGTGGATGTCCCACCGGCACCATCCA CAAAATCAAACACCATGAAGTTAGCCGTCCAAAATCT ACATTGAAATGGCTTGCGGCGATCACCTGGTTGTCAACA ACTCCCGTTCTTCTCGTACCGCTCGCGCACTGCGCCACC ACAAATATCGCAAAACCTGCAAACGTTGCCGTGTAGC GATGAGGACCTGAACAAATTCCTGACCAAAGCTAACGA GGATCAGACCTCCGTAAAAGTGAAGGTAGTAAGCGCTC CGACCCGTACTAAAAAGGCTATGCCAAAAAGCGTGGCC CGTGCCCCGAAACCTCTGGAAAAACCCGAGGCGGCTCA GGCTCAACCATCCGGTTCTAAATTTTCTCCGGCGATCCC AGTGTCCACCCAAGAATCTGTTTCCGTACCAGCAAGCGT GTCTACCAGCATTAGCAGCATTTCTACCGGTGCTACCGC TTCTGCGCTGGTAAAAGGTAACACTAACCCGATTACTAG CATGTCTGCACCGGTACAGGCAAGCGCCCCAGCTCTGA CTAAATCCCAGACGGACCGTCTGGAGGTGCTGCTGAAC CCAAAGGATGAAATCTCTCTGAACAGCGGCAAGCCTTT CCGTGAGCTGGAAAAGCGAGCTGCTGTCTCGTCGTA AGGATCTGCAACAGATCTACGCTGAGGAACCGGAGAAC TATCTGGGTAAGCTGGAGCGCGAAATTAATCTCGTTCTTC GTGGATCGCGGTTTCTGGAGATCAAATCTCCGATTCTG ATTCCGCTGGAATACATTGAACGTATGGGCATCGATAAT GATACCGAACTGTCTAAACAGATCTTCCGTGTGGATAA AAATCTGTCTGCGTCCGATGCTGATTCCGAACCTTGTA CAACTATTTACGTAAACTGGACCGTGCCCTGCCGGACCC GATCAAAATATTTCGAGATCGGTCCCTTGCTACCGTAAAG AGTCCGACGGTAAAGAGCACCTGGAAGAATTCACCATG CTGACATTCATTAGATGGGTAGCGGTTGCACGCGTGA AAACCTGGAATCCATTATCACCGACTTCTGAATCACCT GGGTATCGATTTCAAAATGTTGGTGACAGCTGTATGGT GTTAGGCGATACGCTGGATGTTATGCACGGCGATCTGG AGCTGTCTCCGCAAGTTGTGGGCCCAATCCCGCTGGATC GTGAGTGGGGTATCGACAAACCTAAAATCGGTGCGGGT TTTGGTCTGGAGCGTCTGCTGAAAGTAAAACACGACTTC AAGAACATCAAACGTGCTGCACGTTCCGAGTCCATTAC AATGGTATTTCTACTAACCTGTAAGTCGACCATCATCAT CATCATATTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTT TTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATT AAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTT GCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCA TGCCGAACTCAGAAAGTAAAACGCCGTAGCGCCGATGGT AGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAACCTGCCA GGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGG GCCTTGTGTTGAGCTCCCGTCAATCATCCCCATA ATCCTTGTAGATTATCAATTTTAAAAAACTAACAGTTG TCAGCCTGTCCCCTTTAATATCATACGCCGTTATACGT TGTTTACGCTTTGAGGAATCCCATATGATACGCGGCCGC</p>

[0336]

	<p>TTTCAAACGCTAAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAG GCCTACATGATCTCTGCAATATATTGAGTTTGCCTGCTT TTGTAGGCCGGATAAAGCGTTACGCCGCATCCGGCAA GAAACAGCAAACAATCCAAAACGCCGCTTACGCGGGC TTTTTTCTGCTTTCTTCGCGAATTAATTCCGCTTCGCAA CATGTGAGCACCGGTTATTGACTACCGGAAGCAGTGT GACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTTTGCTCA GGCTCTCCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATATGATCA GTGCACGGCTAACTAAGCGGCCTGCTGACTTTCTCGCCG ATCAAAGGCATTTTGCTATTAAGGGATTGACGAGGGC GTATCTGCGCAGTAAGATGCGCCCCGCATTGGAAACCT GATCATGTAGATCGAATGGACTCTAAATCCGTTACGCCG GGTTAGATTCCCGGGGTTTCCGCCAAATTCGAAAAGCCT GCTCAACGAGCAGGCTTTTTTGCATGCTCGAGCAGCTCA GGGTGCAATTTGCTTTTCAATTTCTGCCATTCATCCGCTT ATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCGTTTAAGG GCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCT GCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATT TGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACC TGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCTTGCGTA TAATATTTGCCCATGGTGAACCGGGGGCGAAGAAGTT GTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAACCT CACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAA TAAACCCTTTAGGGAATAGGCCAGGTTTACCAGTAAAC ACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGG AAATCGTCGTGGTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGT TTCAGTTTGTCTATGGAACCGGTGTAACAAGGGTGAA CACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCA TACGGAATCCGGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGA ATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTT TTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACG GTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCC TCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACG GTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCT TAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAATACGCC GGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCT CTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTCGCCAAAAGTTG GCCAGGGCTTCCCGTATCAACAGGGACACCAGGATT TATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTA TTCGGCGCAAAGTGCCTCGGGTGATGCTGCCAACTTACT GATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAGGTGCTCCAGTGG CTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTACGCTACTGA CGGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATC AGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCAC TGATGAGGGTGTCAAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAG AAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGAT ACAGGATATATCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTAC GCTCGGTGCTTTCGACTGCGGGCAGCGGAAATGGCTTAC GAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGAT ACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGCAAAGCCGTT TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAAT</p>
--	--

[0337]

	<p>CTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGAC TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCG TGCGCTCTCCTGTTCCCTGCCTTTCGGTTTACCGGTGTCAT TCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGA CACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTTCGCTCCAAGCTGGACT GTATGCACGAACCCCCGTTTCAGTCCGACCGCTGCGCCT TATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGAAAGAC ATGCAAAAAGCACCCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGA TTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGG CTAAACTGAAAGGACAAGTTTGGTGACTGCGCTCCTCC AAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGA GAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTCGT TTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCT CAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAAATATTTCTAG ATTTTCAGTGAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAA GTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCATGTTTG ACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGTACCCAATTATGACA ACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTACAACCCGG CACGGAACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTAA ATACCCGCGAGAAAATAGAGTTGATCGTCAAAAACCAACA TTGGCACCAGCGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCT CAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCG CCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAA GATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGT GCGACGCTGGCGATATCAAAATTGCTGTCTGCCAGGTG ATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATC CATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCG CCGCAGTAAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCA GCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCCCGGCGTTAATGA TTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCTT CATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGAC GGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACG AAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTGCGGAGCCTCCG GATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTGCGGGGAAC AGCAAAAATATCACTCGGTCGGCAAACAAATTCTCGTCC CTGATTTTTACCACCCCCTGACCGCGAATGGTGAGATT GAGAATATAACCTTTCATTCCCAGCGGTCCGGTCGATAAA AAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAAC CCGCCACCAGATGGGCATTAACGAGTATCCCGGCAGC AGGGGATCATTTTGGCCTTCAGCCATACTTTTCATACTC CCGCCATTAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATC AGACATTGCCGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCG CTAACCAAACCGGTAACCCCGTTATTAAGCATTCTG TAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTA ACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATT GATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCA TTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTT TTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTT GGGCTAACAGGAGGAATT</p>
--	---

[0338]

87	FSKRS의 아미노산 서열	MTVKYTDIQRLREYNGNGTYEQKFEDLASRDAAFSKE MSVASTDNEKKIKGMIANPSRHGLTQLMNDIADALVAEGF IEVRTPIFISKDALARMTTITDKPLFKQVFWIDEKRALRPML APNLGSVARDLRDHTDGPVKIFEMGSCFRKESHSGMHLEE FTMLNLFDMGPRGDATEVLKNYISVVMKAAAGLPDYDLVQ EESDVYKETIDVEINGQEVCSAAVGPPTIDAAHDVHEPWS GAGFGLERLLTIREKYSTVKKGGASISYLNKAKIN
88	FSKRS의 핵산 (DNA) 서열	ATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCAACGCCT GCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGAAAGTTT TTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCTTCAGCAAG GAAATGAGCGTGGCCAGCACCGACAACGAGAAGAAAA TCAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACGGCCTG ACCCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTGGTGGC GGAGGGTTTCATTGAAGTGCCTACCCCGATCTTTATTAG CAAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGAAGACA AGCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATGAGAAA CGTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTGGGTAG CGTGGCTCGTACCTGCGCGATCACACCGACGGTCCGG TGAAAATCTTCGAAAATGGGCAGCTGCTTTCGTAAAGAG AGCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTCACCATGCT GAATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGCGACGCTACCG AAGTGCTGAAGAACTACATTAGCGTGGTGATGAAAGCT GCCGGCCTGCCGGACTACGATCTGGTGCAGGAAGAGAG CGACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAAATTAACG GTCAGGAAGTGTGCAGCGCGGCTGTGGGTCCAACCTCCT ATTGATGCGGCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAGCGG TGCTGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGACCATCCGCGA GAAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCATCT CCTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTA
89	pEVOL-FSKRS	ACTAGTATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCA ACGCCTGCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGA AAGTTTTTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCTTCA GCAAGGAAATGAGCGTGGCCAGCACCGACAACGAGAA GAAAATCAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACG GCCTGACCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTG GTGGCGGAGGGTTTCATTGAAGTGCCTACCCCGATCTTT ATTAGCAAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGA AGACAAGCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATG AGAAACGTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTG GGTAGCGTGGCTCGTGACCTGCGCGATCACACCGACGG TCCGGTGAAAATCTTCGAAAATGGGCAGCTGCTTTCGTAA AGAGAGCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTCACCA TGCTGAATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGCGACGCTA CCGAAGTGCTGAAGAACTACATTAGCGTGGTGATGAAA GCTGCCGGCCTGCCGGACTACGATCTGGTGCAGGAAGA GAGCGACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAAATTA ACGGTCAGGAAGTGTGCAGCGCGGCTGTGGGTCCAAC CCTATTGATGCGGCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAG CGGTGCTGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGACCATCCG CGAGAAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCA TCTCCTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTAAGTCGACC

[0339]

[0340]

		<p>ATCATCATCATCATTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCT TGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGAT ACAGATTAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAAC AGAATTTGCCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCT GACCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGC CGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGA ACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAA AGACTGGGCCTTGTGTGAGCTCCCGGTCATCAATCAT CCCCATAATCCTTGTTAGATTATCAATTTAAAAAACTA ACAGTTGTCAGCCTGTCCCGCTTAAATATCATACGCCGT TATACGTTGTTTACGCTTTGAGGAATCCCATATGATACG CGGCCGCTTCAAACGCTAAATTGCCTGATGCGCTACGC TTATCAGGCCTACATGATCTCTGCAATATATTGAGTTTG CGTGCTTTTGTAGGCCGGATAAAGGCGTTCACGCCGCATC CGGCAAGAAACAGCAAACAATCCAAAACGCCGCGTTCA GCGGCGTTTTTCTGCTTTCTTCGCGAATTAATTCCGCT TCGCAACATGTGAGCACCGGTTTATTGACTACCGGAAG CAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTT TGCTCAGGCTCTCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATAT GATCAGTGCACGGCTAACTAAGCGGCCTGCTGACTTTCT CGCCGATCAAAGGCATTTTGTATTAAGGGATTGACG AGGGCGTATCTGCGCAGTAAGATGCGCCCCGCATTGGG GGACGGTCCGGCGACCAGCGGGTCTCTAAAACCTAGCC AGCGGGTTCGACGCCCGGTCTCTCGCCAAATTCGAA AAGCCTGCTCAACGAGCAGGCTTTTTTGCATGCTCGAGC AGCTCAGGGTCGAATTTGCTTTTGAATTTCTGCCATTCA TCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCG TTAAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCC CCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTA AGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATG ATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCG CTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAACCGGGGCG AAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTG GTGAAACTACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACAT ATTTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTTC ACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAA ACTGCCGGAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGAT GAAAACGTTTCAGTTTGTCTCATGGAAAACGGTGTAAAC AGGGTGAACACTATCCCATACACCAGCTCACCGTCTTT CATTGCCATACGGAATTCCGGATGAGCATTATCAGGC GGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAAATTGTGC TTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCC AGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGA CTGAAATGCCTCAAATGTCTTTACGATGCCATTGGGA TATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATT TTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAA AATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTATTATGGTGAAG TTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGC CAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGAC ACCAGGATTTATTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTAC AGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCCGGTGATGCTGC</p>
--	--	--

	<p>CAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAGGTG CTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTT AGCTACTGACGGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACCG CCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACT ATGTTGGCACTGATGAGGGTGTGAGTGAAGTGCTTCATG TGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGA ATATGTGATACAGGATATATCCGCTTCTCGCTCACTG ACTCGCTACGCTCGGTCGTTGACTGCGGCGAGCGGAA ATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGC CAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGG CAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGC ATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAAC CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGG CGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCTGCCTTTGCGTTT ACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCAT TCCACGCCGACACTCAGTTCGGGTAGGCAGTTCGCTC CAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCGTTTCACTCCG ACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA ACCCGAAAGACATGCAAAGCACCACTGGCAGCAGCC ACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATG CGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTG ACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGT TGGTAGCTCAGAGAACCCTCGAAAAACCGCCCTGCAAG GCGGTTTTTCGTTTTAGAGCAAGAGATTACGCGCAGA CCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGAT AAAATATTTCTAGATTTCAAGTGAATTTATCTCTTCAA TGTAGCACCTGAAGTCAGCCCATACGATATAAGTTGTA ATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTGTA CCCAATTATGACAACCTGACGGCTACATCACTTCACTTT TCTTCAACCCGGCACGGAACTCGCTCGGGCTGGCCCC GGTGCATTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATC GTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCA TCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATC GTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACT GCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAA GCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATTGC TGCTGCCAGGTGATCGCTGATGTAAGTGAACGCTCGC GTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAA TCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGAT TTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCC CGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGC GGCTGGTGGCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATT GGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGT AGGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATAACCAT TCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCT CCTGGCGGGAACAGCAAATATCACTCGGTGCGCAAAC AAATTCGTCCTGATTTTTACCAACCCCTGACCGCG AATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCATTCCCAGCGG TCGGTCGATAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAA TCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAG TATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTGCCTTCAGCCATA</p>
--	---

[0341]

		CTTTTCATACTCCC GCCATT CAGAGAAGAAACCAATTGT CCATATTGCATCAGACATTGCCGTC ACTGCGTCTTTAC TGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGAC AAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAA AAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCT ATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTA CCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA CCCGTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATT
90	메타노사르시 나 마제이 피롤리실-tRNA 신테타제의 야생형 아미노산 서열	MDKKPLNLT LISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMA CGDHLVVNNSRSSRTARALRHHKYRKTCKRCRVSDLEDLN KFLTkanEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARAPKPL ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISISTG ATASALVKGNTNPITSM SAPVQASAPALTKSQTRLEVLL NPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQIYAEERENYL GKLEREITRFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDEL SK QIFRVDKNFCLRPMLAPNLNLYLRKLDRALPDPIKIFEIGPC YRKESDGEKHELEFTMLNFCQMGSGCTRENLESIITDFLNH LGIDFKIVGDS CMVYGD TLDVMHGDLELSSAVVGPILDR EWGIDKPWIGAGFGLERLLVKHDFKNIKRAARSESYNG ISTNL*
91	FSKRS-OPT 뉴클레오티드 서열	ATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCAACGCCT GCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGAAAAGTT TTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCTT CAGCAAG GAAATGAGCATTGCCAGCACCGACAACGAGAAGAAAAT CAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACGGCCTGA CCCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTGGTGGCG GAGGGTTTCATTGAAGTGC GTACCCCGATCTTTATTAGC AAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGAAGACAA GCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATGAGAAAAC GTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTGGGTAGC GTGGCTCGTGACCTGCGCGATCACACCGACGGTCCGGT GAAAATCTTCGAAATGGGCAGCTGCTTTCGTAAGAGA GCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTACCATGCTG AATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGGCAGCTACCGA AGTGCTGGA AAACTACATTAGCGTGGTGATGAAAGTGG CCGGCTGCCGGACTACGATCTGGTGCAGGAAGAGAGC GACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAATTAACGG TCAGGAAGTGTGCAGCGCGGCTGTGGGTCCAACTCCTA TTGATGCGGCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAGCGGT GCTGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGACCATCCGCGAG AAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCATCTC CTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTAA
92	FSKRS-OPT 아미노산 서열	MTVKYTD AQIQLREYNGTYEQKVFEDLASRDAAFSKE MSIASTDNEKKIKGMIANPSRHGLTQLMNDIADALVAEGFI EVRTPIFISKDALARMTITEDKPLFKQVFWIDEKRALRPML APNLGSVARDLRDHTDGPVKIFEMGSCFRKESHSGMHLEE FTMLNLFDMGPRGD ATEVLENYISVVMKVAGLPDYDLVQ EESDVYKETIDVEINGQEVCSAAVGP TPIDAAHDVHEPWS GAGFGLERLLTIREKYSTVKKGGASISYLN GAKIN

[0342]

<p>93</p>	<p>PEVOL-FSKRS- OPT</p>	<p>ACTAGTATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCA ACGCCTGCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGA AAGTTTTTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCTTCA GCAAGGAAATGAGCATTGCCAGCACCGACAACGAGAA GAAAATCAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACG GCCTGACCCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTG GTGGCGGAGGGTTTCATTGAAGTGCGTACCCCGATCTTT ATTAGCAAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGA AGACAAGCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATG AGAAACGTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTG GGTAGCGTGGCTCGTGACCTGCGCGATCACACCGACGG TCCGGTGAAAATCTTCGAAAATGGGCAGCTGCTTTCGTAA AGAGAGCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTCACCA TGCTGAATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGCGACGCTA CCGAAGTGCTGGAAAACACTATTAGCGTGGTGATGAAA GTGGCCGGCCTGCCGACTACGATCTGGTGACGGAAGA GAGCGACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAAATTA ACGGTCAGGAAGTGTGCAGCGCGGCTGTGGGTCCAAC CTATTGATGCGGCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAG CGGTGCTGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGACCATCCG CGAGAAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCA TCTCTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTAAGTCGACC ATCATCATCATCATATTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCT TGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGAT ACAGATTAATAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAAC AGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCT GACCCCATGCCAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGC CGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGA ACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAA AGACTGGCCTTGTTTGTGAGCTCCCGGTCATCAATCAT CCCCATAATCCTTGTTAGATTATCAATTTAAAAAACTA ACAGTTGTCAGCCTGTCCCGCTTTAATATCATAACGCCGT TATACGTTGTTTACGCTTTGAGGAATCCCATATGATACG CGGCCGCTTTCAAACGCTAAATTGCCTGATGCGCTACGC TTATCAGGCCTACATGATCTCTGCAATATATTGAGTTTG CGTGCTTTTGTAGGCCGGATAAAGGCGTTCACGCCGCATC CGGCAAGAAACAGCAAACAATCCAAAACGCCGCTTCA GCGGCGTTTTTTCTGCTTTTCTTCGGAATTAATTCCGCT TCGCAACATGTGAGCACCGTTTATTGACTACCGGAAG CAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTT TGCTCAGGCTCTCCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATAT GATCAGTGCACGGCTAACTAAGCGGCCTGCTGACTTTCT CGCCGATCAAAGGCATTTTGTCTATTAAGGGATTGACG AGGGCGTATCTGCGCAGTAAGATGCGCCCCGCATTGGG GGACGGTCCGGCGACCAGCGGGTCTCTAAAACCTAGCC AGCGGGGTTCGACGCCCGGTCTCTCGCCAAAATTCGAA AAGCCTGCTCAACGAGCAGGCTTTTTTGCATGCTCGAGC AGCTCAGGGTCAATTTGCTTTTCGAATTTCTGCCATTCA TCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCG TTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCC CCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTA</p>
-----------	-----------------------------	--

[0343]

	<p>AGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATG ATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCG CTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCG AAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTG GTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACAT ATTCTCAATAAACCCCTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTC ACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAA ACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGAT GAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGAAAAACGGTGTAACA AGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTT CATTGCCATACGGAATTCCGGATGAGCATTTCATCAGGC GGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGC TTATTTTTCTTACGGTCTTAAAAAAGCCGTAATATCC AGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGA CTGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGA TATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATT TTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAA AATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAG TTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTCGC CAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGAC ACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCAC AGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCCGGTGATGCTGC CAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAGGTG CTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTT AGCTACTGACGGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACCG CCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACT ATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCAAGTGAAGTCTCATG TGGCAGGAGAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGA ATATGTGATACAGGATATATTCGCTTCTCGTCACTG ACTCGCTACGCTCGGTCTGTTTCGACTGCGGCGAGCGGAA ATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGC CAGGAAGATACTTAACAGGGAAAGTGAGAGGGCCGCGG CAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGC ATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAAC CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGG CGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCTGCTTTCGGTTT ACCGGTGTCACTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCAT TCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTC CAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCGTTTCAAGTCCG ACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA ACCCGAAAGACATGCAAAAAGCACCCTGGCAGCAGCC ACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATG CGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTG ACTGCGCTCCTCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGT TGGTAGCTCAGAGAACCCTCGAAAAACCGCCCTGCAAG GCGGTTTTTTCGTTTTTACAGCAAGAGATTACGCGCAGA CAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGAT AAAATATTCTAGATTTTCAAGTGAATTTATCTCTTCAAA TGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTA ATTCTCATGTTTACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGTA CCCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTTTT</p>
--	--

[0344]

		<p>TCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCTCGGGCTGGCCCC GGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATC GTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCA TCCGGGTGGTGC TCAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATAC GTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACT GCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAA GCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAATTC TGCTGCCAGGTGATCGCTGATGTAAGTACAAGCCTCGC GTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAA TCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGAT TTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCC CGGCGTTAATGATTTGCCAAACAGGTCGCTGAAATGC GGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATT GGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGT AGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATACCAT TCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCT CCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACTCGGTCGGCAAAC AAATTCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCCCTGACCGCG AATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCATTCCCAGCGG TCGGTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAA TCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAG TATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTGCCTTCAGCCATA CTTTTCATACTCCCGCCATTAGAGAAGAAACCAATTGT CCATATTGCATCAGACATTGCCGTCCTACTGCTCTTTTAC TGGCTCTTCTCGCTAACCAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGAC AAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAA AAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACTTTGCT ATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTA CCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTACTGTTTCTCCATA CCCCTTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATT</p>
--	--	---

[0345]

[0346]

일부 경우에, 표적화 도메인은 숙주 세포 시스템에 의해 재조합적으로 생산된다. 일부 경우에, 숙주 세포는 진핵 세포 (예를 들어, 포유동물 세포, 곤충 세포, 효모 세포 또는 식물 세포) 또는 원핵 세포 (예를 들어, 그람-양성 또는 그람-음성 박테리아)이다. 일부 경우에, 진핵 숙주 세포는 포유동물 숙주 세포이다. 일부 경우에, 포유동물 숙주 세포는 안전한 세포주이거나 또는 관심 유전 물질을 그 자신의 계통 내로 혼입시켰고 다중 세대의 세포 분열 후에 그 유전 물질의 생성물을 발현하는 능력을 갖는 세포주이다. 다른 경우에, 포유동물 숙주 세포는 일시적 세포주이거나 또는 관심 유전 물질을 그 자신의 계통 내로 혼입시켰고 다중 세대의 세포 분열 후에 유전 물질의 생성물을 발현하는 능력을 갖지 않는 세포주이다.

[0347]

예시적인 포유동물 숙주 세포는 293T 세포주, 293A 세포주, 293FT 세포주, 293F 세포, 293H 세포, A549 세포, MDCK 세포, CHO DG44 세포, CHO-S 세포, CHO-K1 세포, Expi293F 세포™ 세포, Flp-In™T-REx™293 세포주, Flp-In™-293 세포주, Flp-In™-3T3 세포주, Flp-In™BHK 세포주, Flp-In™-CHO 세포주, Flp-In™-CV-1 세포주, Flp-In™The Jurkat 세포주, 프리스타일(FreeStyle)™293-F 세포, 프리스타일™CHO-S 세포, 그립타이트(GripTite)™293MSR 세포주, GS-CHO 세포주, 헤파RG(Heparg)™ 세포, T-REx™Jurkat 세포주, Per.C6 세포, T-REx™-293 세포주, T-REx™-CHO 세포주 및 T-REx™HeLa 세포주를 포함한다.

[0348]

일부 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 곤충 숙주 세포이다. 예시적인 곤충 숙주 세포는 드로소필라 S2 세포, Sf9 세포, Sf21 세포 및 셀룰러 하이 파이브(Cellular High Five)™ 세포를 포함한다.

[0349]

일부 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 효모 숙주 세포이다. 예시적인 효모 숙주 세포는 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 효모 균주, 예컨대 GS115, KM71H, SMD1168H 및 X-33, 및 사카로미세스 세레비시아에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 효모 균주, 예컨대 INVSC1을 포함한다.

[0350]

일부 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 식물 숙주 세포이다. 일부 경우에, 식물 세포는 조류로부터의 세포를 포함한다. 예시적인 식물 세포주는 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 137c 또는 시네코코쿠스 엘롱가투스(*Synechococcus elongatus*) PPC 7942로부터의 균주를 포함한다.

[0351]

일부 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 숙주 세포이다. 예시적인 원핵 숙주 세포는 BL21, BL21(DE3), Mach1™, DH10B™, TOP10, DH5 α, DH10Bac™, OmniMax™, MegaX™, DH12S™, INV110, TOP10F', INV αF, TOP10/P3, ccdB 서바이벌, PIR1, PIR2, Stb12™, Stb13™ 또는 Stb14™를 포함한다.

[0352]

일부 경우에, 본원에 기재된 표적화 도메인을 생산하기 위한 적합한 핵산 분자 또는 벡터는 진핵 또는 원핵 공

급원으로부터 유래된 임의의 적합한 벡터를 포함한다. 예시적인 핵산 분자 또는 벡터는 박테리아 (예를 들어, 이. 콜라이), 곤충, 효모 (예를 들어, 피키아 파스토리스), 조류 또는 포유동물 공급원으로부터의 벡터를 포함한다. 박테리아 벡터는, 예를 들어 pACYC177, pASK75, pBAD 벡터 시리즈, pBADM 벡터 시리즈, pET 벡터 시리즈, pETM 벡터 시리즈, pGEX 벡터 시리즈, pHAT2, pMal-C2, pMal-p2, pQE 벡터 시리즈, pRSET A, pRSET B, pRSET C, pTrcHis2 시리즈, pZA31-Luc, pZE21-MCS-1, pFLAG ATS, pFLAG CTS, pFLAG MAC, pFLAG Shift-12C, pTAC-MAT-1, pFLAG CTC 또는 pTAC-MAT-2를 포함한다.

[0353] 곤충 벡터는, 예를 들어 pFastBac1, pFastBac DUAL, pFastBac ET, pFastBac HTa, pFastBac HTb, pFastBac HTc, pFastBac M30a, pFastBac M30b, pFastBac, M30c, pVL1392, pVL1393M 10, pVL1393M11, pVL1393M 12, FLAG 벡터, 예컨대 pPolh-FLAG1 또는 pPolh-MAT2 또는 MAT 벡터, 예컨대 pPolh-MAT1 또는 pPolh-MAT 2를 포함한다.

[0354] 효모 벡터는, 예를 들어 pDESTTM14 담체, pDESTTM15 담체, pDESTTM17 담체, pDESTTM24 담체, pYES-DEST52 벡터, pBAD-DEST49 표적 벡터, pA0815 피키아 효모 벡터, pFLD1 피키아 파스토리스 벡터, pGAPZA, 피키아 파스토리스 C 벡터, 피키아 파스토리스 pPIC3.5K 벡터, pPIC 6A, B 및 피키아 파스토리스 C 벡터, pPIC9K 벡터, pTEF1/Zeo, pYES2 효모 벡터, pYES2/CT 효모 벡터, pYES2/NT A, B 및 C 효모 모체 또는 pYES3/CT 효모 벡터를 포함한다.

[0355] 조류 벡터는, 예를 들어 pChlamy-4 벡터 또는 MCS 벡터를 포함한다.

[0356] 포유동물 벡터는, 예를 들어 일시적 발현 벡터 또는 안정한 발현 벡터를 포함한다. 예시적인 포유동물 일시적 발현 벡터는 p3xFLAG-CMV 8, pFLAG-Myc-CMV19, pFLAG-Myc-CMV 23, pFLAG-CMV 2, pFLAG-CMV 6a, b, c, pFLAG-CMV 5.1, pFLAG-CMV 5a, b, c, p3xFLAG-CMV 7.1, pF-CMV 20, p3xFLAG-Myc-CMV 24, pCMV-FLAG-MAT1, pCMV-FLAG-MAT2, pBICEP-CMV 3 또는 pBICCMV-4를 포함한다. 예시적인 포유동물 안정한 발현 벡터는 pFLAG-CMV 3, p3xFLAG-CMV 9, p3xFLAG-CMV 13, pFLAG-Myc-CMV 21, p3xFLAG-Myc-CMV 25, pFLAG-CMV 4, p3xFLAG-CMV 10, p3xFLAG-CMV14, pFLAG-Myc-CMV 22, p3xFLAG-Myc-CMV 26, pBICEP-CMV 1 또는 pBICEP-CMV 2를 포함한다. 일부 경우에, 무세포 시스템이 본원에 기재된 표적화 도메인을 생산하는 데 사용된다. 일부 경우에, 무세포 시스템은 세포로부터의 세포질 및/또는 핵 성분의 혼합물을 포함하고, 시험관내 핵산 합성에 적합하다. 일부 경우에, 무세포 시스템은 원핵 세포 성분을 이용한다. 다른 경우에, 무세포 시스템은 진핵 세포 성분을 이용한다. 핵산 합성은, 예를 들어 드로소필라 세포, 크세노푸스 난, 고세균 또는 HeLa 세포를 기재로 하는 무세포 시스템에서 달성된다. 예시적인 무세포 시스템은 이. 콜라이 S30 추출물 시스템, 이. 콜라이 T7S 30 시스템 또는 XpressCF 및 XpressCF+를 포함한다.

[0357] 무세포 번역 시스템은 플라스미드, mRNA, DNA, tRNA, 신테타제, 방출 인자, 리보솜, 샤페론, 번역 개시 및 신장 인자, 천연 및/또는 비천연 아미노산, 및/또는 단백질 발현을 위한 다른 성분과 같은 성분을 다양하게 포함한다. 이러한 성분은 수율을 개선시키거나, 합성 속도를 증가시키거나, 단백질 생성물의 충실도를 증가시키거나 또는 비천연 아미노산을 혼입시키기 위해 임의로 변형된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비천연 아미노산-함유 표적화 도메인은 US 8,778,631, US2017/0283469, US 2018/0051065, US 2014/0315245 또는 US 8,778,631에 기재된 무세포 번역 시스템을 사용하여 합성된다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템은 변형된 방출 인자를 포함하거나 또는 심지어 1종 이상의 방출 인자가 시스템으로부터 제거된다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템은 감소된 프로테아제 농도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템은 비천연 아미노산을 코딩하는 재할당된 코돈을 갖는 변형된 tRNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산을 혼입시키기 위한 본원에 기재된 신테타제는 무세포 번역 시스템에 사용된다. 일부 실시양태에서, tRNA를 무세포 번역 시스템에 첨가하기 전에 효소적 또는 화학적 과정을 사용하여 tRNA에 비천연 아미노산이 프리로딩된다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템을 위한 성분은 변형된 유기체, 예컨대 변형된 박테리아, 효모 또는 다른 유기체로부터 수득된다.

[0358] 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 발현 숙주 시스템을 통해 또는 무세포 시스템에 의해 원형 배열로 생산된다.

[0359] 직교 또는 확장된 유전자 코드가 본원에 기재된 표적화 도메인을 생성하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 표적화 도메인의 핵산 서열에 존재하는 1개 이상의 특정 코돈이 비천연 아미노산을 코딩하도록 할당되어, 직교 tRNA 신테타제/tRNA 쌍의 사용을 통해 접합체 (예를 들어, 표적화 도메인) 내로 유전자 혼입될 수 있다. 직교 tRNA 신테타제/tRNA 쌍은 tRNA에 비천연 아미노산을 장전시킬 수 있고, 코돈에 반응하여 비천연 아미노산을 폴리펩티드 쇠 내로 혼입시킬 수 있다.

[0360] 일부 경우에, 코돈은 앰버, 오키, 오팔 코돈 또는 사중 코돈이다. 일부 경우에, 코돈은 비천연 아미노산을 운반하는 데 사용될 직교 tRNA에 상응한다. 일부 경우에, 코돈은 앰버 코돈이다. 다른 경우에, 코돈은 직교 코돈이다.

[0361] 일부 경우에, 코돈은 직교 리보솜 리보-Q1에 의해 디코딩될 수 있는 사중 코돈이다. 일부 경우에, 사중 코돈은 문헌 [Neumann et al., "Encoding multiple unnatural amino acid analysis of a quadruplet-decoding ribosome," Nature, 464(7287):441-444 (2010)]에 기재된 바와 같다.

[0362] 일부 경우에, 본 개시내용에 사용된 코돈은 재코딩된 코돈, 예를 들어 동의 코돈 또는 대체 코돈으로 대체된 희귀 코돈이다. 일부 경우에, 재코딩된 코돈은 문헌 [Napolitano et al., "Emergent rules for codon choice isolated by editing of a ray array code in Escherichia coli," PNAS, 113(38): E5588-5597 (2016)]에 기재된 바와 같다. 일부 경우에, 재코딩된 코돈은 문헌 [Ostrov et al., "Design, synthesis, and testing translated a 57-code gene," Science 353(6301): 819. sub.822 (2016)]에 기재된 바와 같다.

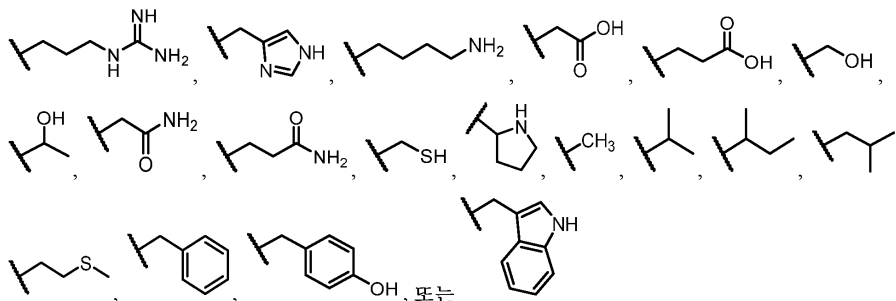
[0363] 정의

[0364] 용어 "아미노산"은 자연 발생 및 합성 아미노산, 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 것, 뿐만 아니라 이후에 변형되는 아미노산, 예를 들어 히드록시프롤린, g-카르복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉 수소, 카르복실 기, 아미노 기 및 R 기에 결합된 탄소를 갖는 화합물, 예를 들어 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술포시드, 메티오닌 메틸 술포늄을 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기를 갖거나 (예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 지칭한다.

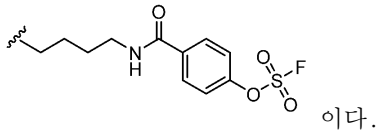
[0365] 용어 "비-자연 발생 아미노산" 및 "비천연 아미노산"은 자연에서 발견되지 않는 아미노산 유사체, 합성 아미노산 및 아미노산 모방체, 예를 들어 아릴아미드, 비닐 술폰아미드, 술포닐 플루오라이드, 아릴 술포닐 플루오라이드 및 4-술포테트라플루오로페닐 (STP) 에스테르를 함유하는 아미노산 잔기를 지칭한다.

[0366] 아미노산은 본원에서 IUPAC-IUB 생화학적 명명 위원회에 의해 권장되는 그의 통상적으로 공지된 3-문자 기호 또는 1-문자 기호에 의해 지칭될 수 있다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 그의 통상적으로 허용되는 단일-문자 코드에 의해 지칭될 수 있다.

[0367] 용어 "아미노산 측쇄"는 아미노산 상에 함유된 관능성 치환기를 지칭한다. 예를 들어, 아미노산 측쇄는 자연 발생 아미노산의 측쇄일 수 있다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 것 (예를 들어, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린), 뿐만 아니라 이후에 변형되는 아미노산, 예를 들어 히드록시프롤린, g-카르복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. 측면에서, 아미노산 측쇄는 비-천연 아미노산 측쇄일 수 있다. 측면에서, 아미노산 측쇄는 H,

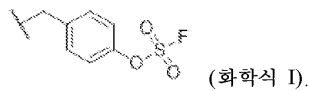


[0368] 비천연 아미노산 측쇄는  이다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산 측쇄는

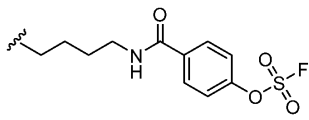


[0369]

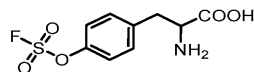
용어 "비-천연 아미노산 측쇄" 또는 "비천연 아미노산 측쇄" 또는 "Uaa"는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 즉 수소, 카르복실 기, 아미노 기 및 R 기에 결합된 탄소를 갖는 화합물, 예를 들어 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄, 알릴알라닌, 2-아미노이소부티르산의 관능성 치환기를 지칭한다. 비-천연 아미노산은 자연적으로 발생하거나 화학적으로 합성되는 비-단백질생성 아미노산이다. 이러한 유사체는 변형된 R 기를 갖거나 (예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 유지한다. 비제한적 예는 엑소-시스-3-아미노비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카르복실산 히드로클로라이드, 시스-2-아미노시클로헵탄카르복실산 히드로클로라이드, 시스-6-아미노-3-시클로헥센-1-카르복실산 히드로클로라이드, 시스-2-아미노-2-메틸시클로헥산카르복실산 히드로클로라이드, 시스-2-아미노-2-메틸시클로헵탄카르복실산 히드로클로라이드, 2-(Boc-아미노메틸), 벤조산, 2-(Boc-아미노)옥탄디오산, Boc-4,5-데히드로-Leu-OH (디시클로헥실암모늄), Boc-4-(Fmoc-아미노)-L-페닐알라닌, Boc-P-호모피르-OH, Boc-(2-인다닐)-Gly-OH, 4-Boc-3-모르폴린아세트산, 4-Boc-3-모르폴린아세트산, Boc-펜타플루오로-D-페닐알라닌, Boc-펜타플루오로-L-페닐알라닌, Boc-Phe(2-Br)-OH, Boc-Phe(4-Br)-OH, Boc-D-Phe(4-Br)-OH, Boc-D-Phe(3-Cl)-OH, Boc-Phe(4-NH₂)-OH, Boc-Phe(3-NH₂)-OH, Boc-Phe(3,5-F₂)-OH, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-(3,4-디메톡시페닐)아세트산 푸름, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-(2-플루오로페닐)아세트산 푸름, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-(3-플루오로페닐)아세트산 푸름, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-(4-플루오로페닐)아세트산 푸름, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-(4-메톡시페닐)아세트산 푸름, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-페닐아세트산 푸름, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-(3-피리딜)아세트산 푸름, 2-(4-Boc-피페라지노)-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]아세트산 푸름, Boc-P-(2-퀴놀릴)-Ala-OH, NBoc-1,2,3,6-테트라히드로-2-피리딘카르복실산, Boc-P-(4-티아졸릴)-Ala-OH, Boc-b-(2-티에닐)-D-Ala-OH, Fmoc-N-(4-Boc-아미노부틸)-Gly-OH, Fmoc-N-(2-Boc-아미노에틸)-Gly-OH, Fmoc-N-(2,4-디메톡시벤질)-Gly-OH, Fmoc-(2-인다닐)-Gly-OH, Fmoc-펜타플루오로-L-페닐알라닌, Fmoc-Pen(Trt)-OH, Fmoc-Phe(2-Br)-OH, Fmoc-Phe(4-Br)-OH, FmocPhe(3,5-F₂)-OH, Fmoc-P-(4-티아졸릴)-Ala-OH, Fmoc-P-(2-티에닐)-Ala-OH, 4-(히드록시메틸)-D-페닐알라닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 하기 화학식 I의 구조를 포함한다:



일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 하기 화학식 II의 구조를 포함한다:

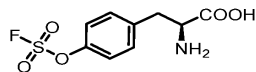


일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 2-아미노-3-(4-((플루오로술포닐)옥시)페닐)프로판산이다:



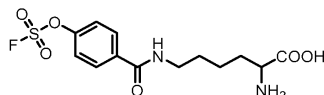
티로신 (FSY)이다:

일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 플루오로술포닐



티로신 (FSY)이다:

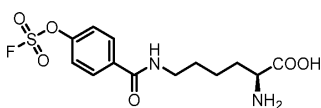
일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 N6-(4-((플루오로술포



닐)옥시)벤조일)리신이다:

[0370]

일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 플루오로술포닐옥시벤조일-L-리신 (FSK)이다:



[0371]

"보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 둘 다에 적용된다. 특정한 핵산 서열과 관련하여, "보존적으로 변형된 변이체"는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 지칭한다. 유전자 코드의 축중성으로 인해, 다수의 핵산 서열은 임의의 주어진 단백질을 코딩할 것이다. 예를 들어, 코돈 GCA,

GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 코돈에 의해 알라닌이 특정되는 모든 위치에서, 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경시키지 않으면서 기재된 상응하는 코돈 중 임의의 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종인 "침묵 변이"이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 기재한다. 통상의 기술자는 핵산 내의 각각의 코돈 (통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 및 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)이 기능적으로 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 각각의 기재된 서열에 내포된다.

[0372] 아미노산 서열에 관하여, 통상의 기술자는 코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 작은 백분율의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 개별 치환, 결실 또는 부가가 "보존적으로 변형된 변이체" (변경이 아미노산의 화학적으로 유사한 아미노산으로의 치환을 유발함)라는 것을 인식할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 본 개시내용의 다형성 변이체, 중간 상동체 및 대립유전자에 추가적이고 이를 배제하지 않는다.

[0373] 하기 8개의 군은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산을 함유한다: (1) 알라닌 (A), 글리신 (G); (2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); (3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); (4) 아르기닌 (R), 리신 (K); (5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); (6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W); (7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 (8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M). (예를 들어, 문헌 [Creighton, Proteins (1984)] 참조).

[0374] 일부 실시양태에서, 본원에서 지칭되는 피롤리실-tRNA 신테타제 ($tRNA^{py1}$)는 α -아미노산 피롤리신 또는 유사한 비천연 아미노산을 동족 tRNA에 부착시켜 옴버 정지 코돈 (즉, UAG)에서의 단백질생성 동안 피롤리신 또는 유사한 비천연 아미노산의 혼입을 가능하게 하는 데 필요한 반응을 촉매하는 아미노아실-tRNA 신테타제이다. 피롤리신을 자연적으로 혼입시키는 메타노사르시나 종으로부터의 야생형 $tRNA^{py1}$ 은 이. 콜라이 및 진핵 세포에서 내인성 tRNA 및 아미노아실-tRNA 신테타제에 대해 직교성이다. 이러한 쌍 및 그의 합성적으로 진화된 유도체 또는 변이체를 사용하여, 본 발명자들 및 다른 자들은 이. 콜라이, 효모 및 포유동물 세포에서 목적하는 단백질 내 특정 부위에의 번역후 변형된 아미노산, 화학적 핸들 및 광케이징 아미노산을 포함한 비천연 아미노산의 효율적인 혼입을 지시하였다.

[0375] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 $tRNA^{py1}$ 은 $tRNA^{py1}$ 활성을 (예를 들어, 야생형 $tRNA^{py1}$ 과 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 활성 내에서) 유지하는 피롤리실-tRNA 신테타제의 임의의 재조합 또는 자연 발생 형태 또는 그의 변이체, 상동체 또는 이소형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체, 상동체 또는 이소형은 자연 발생 피롤리실-tRNA 신테타제와 비교하여 전체 서열 또는 서열의 일부분 (예를 들어, 50, 100, 150 또는 200개의 연속 아미노산 부분)에 걸쳐 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 $tRNA^{py1}$ 은 비천연 아미노산 (UAA)이 혼입되도록 $tRNA^{py1}$ 에 대한 비천연 아미노산 (UAA) (예를 들어, 화학식 (IA)의 UAA, 예컨대 플루오로술페이트 L-티로신 (FSY))의 부착을 촉매한다.

[0376] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 $tRNA^{py1}$ 은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 조작될 수 있는 $tRNA^{py1}$ 유도체 또는 변이체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 $tRNA^{py1}$ 은 약 70 내지 90개의 뉴클레오티드를 함유하는 단일-가닥 RNA 분자로서, 가닥내 염기 쌍형성을 통해 폴딩되어 특징적인 클로버잎 구조를 형성함으로써, 특정 아미노산 (예를 들어, 화학식 (IA)의 UAA, 예컨대 FSY)을 운반하고 이를 단백질 합성 동안 mRNA 상의 그의 상응하는 코돈에 매칭시킨다.

[0377] "영상화 리간드" 또는 "검출가능한 작용제"는 적절한 수단, 예컨대 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 화학적, 자기 공명 영상화 또는 다른 물리적 수단에 의해 검출가능한 조성물이다. 예를 들어, 유용 검출가능한 작용제는 3H , ^{14}C , ^{18}F , ^{33}P , ^{35}S , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , ^{99m}Tc , ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{112}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , $^{154-158}Gd$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{212}Pb / ^{212}Bi 및 ^{227}Th , Cr , V , Mn , Fe , Co ,

Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, ³²P, 형광단 (예를 들어, 형광 염료), 전자-밀집 시약, 효소 (예를 들어, ELISA에 통상적으로 사용되는 바와 같음), 비오틴, 디곡시게닌, 상자성 분자, 상자성 나노입자, 초소형 초상자성 산화철 ("USPIO") 나노입자, USPIO 나노입자 응집체, 초상자성 산화철 ("SPIO") 나노입자, SPIO 나노입자 응집체, 단결정질 산화철 나노입자, 단결정질 산화철, 나노입자 조영제, 리포솜 또는 가돌리늄 킬레이트 ("Gd-킬레이트") 분자를 함유하는 다른 전달 비히클, 가돌리늄, 방사성동위원소, 방사성핵종 (예를 들어, 탄소-11, 질소-13, 산소-15, 플루오린-18, 루비듐-82), 플루오로데옥시글루코스 (예를 들어, 플루오린-18 표지됨), 임의의 감마선 방출 방사성핵종, 양전자 방출 방사성핵종, 방사성표지된 글루코스, 방사성표지된 물, 방사성표지된 암모니아, 바이오콜로이드, 마이크로버블 (예를 들어, 알부민, 갈락토스, 지질 및/또는 중합체를 포함한 마이크로버블 쉘; 공기, 중질 기체(들), 퍼플루오로카본, 질소, 옥타플루오로프로판, 퍼플렉산 지질 마이크로구체, 퍼플루트렌 등을 포함한 마이크로버블 기체 코어 포함), 아이오딘화 조영제 (예를 들어, 아이오핵술, 아이오딧사놀, 아이오베르술, 아이오파미들, 아이옥실란, 아이오프로미드, 디아트리지오에이트, 메트리조에이트, 아이옥사글레이트), 황산바륨, 이산화토륨, 금, 금 나노입자, 금 나노입자 응집체, 형광단, 2-광자 형광단 또는 합텐 및 단백질 또는 예를 들어 방사성표지를 표적 펩티드와 특이적으로 반응성인 펩티드 또는 항체 내로 혼입시킴으로써 검출가능하게 될 수 있는 다른 엔티티를 포함한다. 검출가능한 모이어티는 1가 검출가능한 작용제 또는 또 다른 조성물과 결합을 형성할 수 있는 검출가능한 작용제이다.

[0378]

본 개시내용의 실시양태에 따라 영상화제 및/또는 표지체로서 사용될 수 있는 방사성 물질 (예를 들어, 방사성 동위원소)은 ³H, ¹⁴C, ¹⁸F, ³³P, ³⁵S, ⁴⁵Ti, ⁴⁷Sc, ⁵²Fe, ⁵⁹Fe, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷⁷As, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Sr, ⁸⁹Zr, ⁹⁴Tc, ⁹⁴Tc, ^{99m}Tc, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Pd, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ¹¹²In, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁴Sm, ¹⁵⁸Gd, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁹Er, ¹⁷⁵Lu, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²¹¹At, ²¹¹Pb, ²¹²Bi, ²¹²Pb, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴⁹Tb, ²¹²Pb/²¹²Bi 및 ²²⁷Th를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 실시양태에 따라 추가의 영상화제로서 사용될 수 있는 상자성 이온은 전이 이온 및 란타나이드 금속 (예를 들어, 21-29, 42, 43, 44 또는 57-71의 원자 번호를 갖는 금속)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이들 금속은 Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb 및 Lu의 이온을 포함한다.

[0379]

본원에 사용된 용어 "연결" 또는 "링커"는 링커의 관능기와 또 다른 분자 사이의 화학 반응으로부터 형성된 결합 또는 화학적 모이어티를 지칭한다. 이러한 결합은 공유 연결 및 비-공유 결합을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않으며, 이러한 화학적 모이어티는 에스테르, 카르보네이트, 이민 포스페이트 에스테르, 히드라존, 아세탈, 오르토에스테르, 펩티드 연결 및 올리고뉴클레오티드 연결을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 가수분해적으로 안정한 연결은 연결이 물 중에서 실질적으로 안정하고, 연장된 기간 동안, 아마도 심지어 무기 한으로 생리학적 조건 하를 포함하나 이에 제한되지는 않는 유용한 pH 값에서 물과 반응하지 않는 것을 의미한다. 가수분해적으로 불안정한 또는 분해가능한 연결은 연결이 물에서 또는 예를 들어 혈액을 포함한 수용액에서 분해가능하다는 것을 의미한다. 효소적으로 불안정한 또는 분해가능한 연결은 연결이 1종 이상의 효소에 의해 분해될 수 있다는 것을 의미한다. 단지 예로서, PEG 및 관련 중합체는 중합체 백본에 또는 중합체 백본과 중합체 분자의 말단 관능기 중 하나 이상 사이의 링커 기에 분해가능한 연결을 포함할 수 있다. 이러한 분해가능한 연결은 PEG 카르복실산 또는 활성화된 PEG 카르복실산과 생물학적 활성제 상의 알콜 기의 반응에 의해 형성된 에스테르 연결을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 이러한 에스테르 기는 일반적으로 생리학적 조건 하에 가수분해되어 생물학적 활성제를 방출시킨다. 다른 가수분해적으로 분해가능한 연결은 카르보네이트 연결; 아민과 알데히드의 반응으로부터 생성된 이민 연결; 알콜을 포스페이트 기와 반응시킴으로써 형성된 포스페이트 에스테르 연결; 히드라지드와 알데히드의 반응 생성물인 히드라존 연결; 알데히드와 알콜의 반응 생성물인 아세탈 연결; 포르메이트와 알콜의 반응 생성물인 오르토에스테르 연결; PEG와 같은 중합체의 단부에 있는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 아민 기와 펩티드의 카르복실 기에 의해 형성된 펩티드 연결; 및 중합체의 단부에 있는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 포스포라미다이트 기와 올리고뉴클레오티드의 5' 히드록실 기에 의해 형성된 올리고뉴클레오티드 연결을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 링커는 짧은 선형, 분지형, 멀티-아암형 또는 덴드리머 분자, 예컨대 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 분지형일 수 있다. 다른 실시양태에서, 링커는 이관능성 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 삼관능성 링커일 수 있다. 이들 링커 기로부터의 작용제의 방출 메커니즘은, 예를 들어 광불안정성 결합의 조사 및 산-촉매된 가수분해를 포함한다. 링커의 길이는 폴리펩티드와 그에 연결된 분자 사이의 목적하는 공간적 관계에 따라 미리 결정되거나 선택될 수 있다.

- [0380] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 여기서 중합체는 실시양태에서 아미노산으로 이루어지지 않은 모이어티에 접합될 수 있다. 상기 용어는 1개 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모방체인 아미노산 중합체, 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 중합체 및 비-자연 발생 아미노산 중합체에 적용된다. "융합 단백질"은 단일 모이어티로서 재조합적으로 발현되는 2개 이상의 별개의 단백질 서열을 코딩하는 키메라 단백질을 지칭한다.
- [0381] 아미노산 또는 뉴클레오티드 염기 "위치"는 참조 서열 내의 각각의 아미노산 (또는 뉴클레오티드 염기)을 N-말단 (또는 5'-단부)에 대한 그의 위치에 기초하여 순차적으로 확인하는 번호로 표시된다. 최적 정렬을 결정할 때 고려되어야 하는 결실, 삽입, 말단절단, 융합 등으로 인해, 일반적으로 N-말단으로부터 간단히 카운팅함으로써 결정된 시험 서열 내의 아미노산 잔기 번호는 참조 서열 내의 그의 상응하는 위치의 번호와 반드시 동일하지는 않을 것이다. 예를 들어, 변이체가 정렬된 참조 서열에 비해 결실을 갖는 경우에, 변이체에는 결실 부위에 대한 참조 서열 내의 위치에 상응하는 아미노산이 존재하지 않을 것이다. 정렬된 참조 서열에 삽입이 있는 경우에, 그러한 삽입은 참조 서열 내의 넘버링된 아미노산 위치에 상응하지 않을 것이다. 말단절단 또는 융합의 경우에, 참조 또는 정렬된 서열에는 상응하는 서열 내의 어떠한 아미노산에도 상응하지 않는 아미노산의 스트레치가 존재할 수 있다.
- [0382] 용어 "를 참조하여 넘버링된" 또는 "에 상응하는"은, 주어진 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 넘버링과 관련하여 사용되는 경우에, 주어진 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 명시된 참조 서열과 비교될 때 그 참조 서열의 잔기의 넘버링을 지칭한다.
- [0383] 단백질 내의 아미노산 잔기는 그것이 주어진 잔기와 동일한 단백질 내의 필수 구조적 위치를 점유하는 경우에 주어진 잔기에 "상응한다". 예를 들어, 선택된 단백질 내의 선택된 잔기가 PyIRS 단백질 내의 Ala302와 동일한 필수 공간적 또는 다른 구조적 관계를 점유하는 경우에, 그 선택된 잔기는 PyIRS 단백질의 Ala302에 상응한다. 실시양태에서, 선택된 단백질이 PyIRS 단백질과의 최대 상동성으로 정렬되는 경우에, 정렬된 선택된 단백질 내에서 Ala302와 정렬되는 위치는 Ala302에 상응하는 것으로 언급된다. 1차 서열 정렬 대신에, 예를 들어 선택된 단백질의 구조가 PyIRS 단백질과의 최대 상동도로 정렬되고 전체 구조가 비교되는 경우에 3차원 구조적 정렬이 또한 사용될 수 있다. 이 경우에, 구조 모델에서 Ala302와 동일한 필수 위치를 점유하는 아미노산은 Ala302 잔기에 상응하는 것으로 언급된다.
- [0384] "서열 동일성의 백분율"은 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교 윈도우에 걸쳐 비교함으로써 결정되며, 여기서 비교 윈도우 내의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 부분은 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열 (이는 부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭되는 위치의 수를 산출하고, 매칭되는 위치의 수를 비교 윈도우 내의 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다.
- [0385] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "동일한" 또는 퍼센트 "동일성"은 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 하기 기재된 디폴트 파라미터로 사용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정시 (예를 들어, NCBI 웹 사이트 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ 등 참조), 2개 이상의 서열 또는 하위서열이 동일하거나 또는 명시된 백분율의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 갖는 것 (즉, 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 상동도로 비교 및 정렬된 경우에, 명시된 영역에 걸쳐 약 60% 동일성, 바람직하게는 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 동일성)을 지칭한다. 이어서, 이러한 서열은 "실질적으로 동일한" 것으로 언급된다. 이 정의는 또한 시험 서열의 상보체를 지칭하거나 그에 적용될 수 있다. 정의는 또한 결실 및/또는 부가를 갖는 서열, 뿐만 아니라 치환을 갖는 서열을 포함한다. 하기 기재된 바와 같이, 바람직한 알고리즘은 갭 등을 설명할 수 있다. 바람직하게는, 동일성은 적어도 약 25개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐 또는 보다 바람직하게는 50-100개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 길이인 영역에 걸쳐 존재한다.
- [0386] "항체"는 복잡한 내부 구조를 갖는 크고 복잡한 단백질이다. 천연 항체 분자는 폴리펩티드 쇄의 2개의 동일한 쌍을 함유하며, 각각의 쌍은 1개의 경쇄 및 1개의 중쇄를 갖는다. 각각의 경쇄 및 중쇄는 차례로 다음 2개의 영역으로 이루어진다: 표적 항원에 결합하는 데 수반되는 가변 ("V") 영역 및 면역계의 다른 성분과 상호작용하는 불변 ("C") 영역. 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 3-차원 공간에서 함께 합쳐져 항원 (예를 들어, 세포 표면 상의 수용체)에 결합하는 가변 영역을 형성한다. 각각의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 내에는, 상보성 결정 영역 ("CDR")으로 불리는 3개의 짧은 절편 (평균 10개의 아미노산 길이)이 존재한다. 항체 가변 도메인 내의 6개의

CDR (경쇄로부터 3개 및 중쇄로부터 3개)은 3-차원 공간에서 함께 폴딩되어 표적 항원 상에 도킹되는 실제 항체 결합 부위를 형성한다. CDR의 위치 및 길이는 문헌 [Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987]에 의해 정확하게 정의되었다. CDR에 함유되지 않은 가변 영역의 부분은 프레임워크 ("FR")로 불리며, 이는 CDR을 위한 환경을 형성한다.

[0387] 용어 "항체"는 관련 기술분야에 통상적으로 공지된 그의 의미에 따라 사용된다. 항체는, 예를 들어 무손상 이뮤노글로불린으로서 또는 다양한 펩티다제를 사용한 소화에 의해 생산된 다수의 잘 특징화된 단편으로서 존재한다. 따라서, 예를 들어 펩신은 힌지 영역 내의 디설피드 연결 아래에서 항체를 소화시켜, 경쇄 그 자체가 디설피드 결합에 의해 VH-CH1에 연결된 Fab의 이량체인 F(ab)'2를 생산한다. F(ab)'2는 온화한 조건 하에 환원되어 힌지 영역 내의 디설피드 연결을 파괴함으로써 F(ab)'2 이량체를 Fab' 단량체로 전환시킬 수 있다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다 (문헌 [Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993)] 참조). 다양한 항체 단편이 무손상 항체의 소화의 관점에서 정의되지만, 통상의 기술자는 이러한 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 사용함으로써 신생 합성될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본원에 사용된 용어 항체는 또한 전체 항체의 변형에 의해 생산된 항체 단편 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 신생 합성된 것 (예를 들어, 단일 쇄 Fv) 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 확인된 것 (예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)])을 포함한다.

[0388] 예시적인 이뮤노글로불린 (항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 폴리펩티드 쇄의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각각의 쌍은 1개의 "경쇄" (약 25 kD) 및 1개의 "중쇄" (약 50-70 kD)를 갖는다. 각각의 쇄의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 초과인 아미노산의 가변 영역을 규정한다. 용어 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH)는 각각 이들 경쇄 및 중쇄를 지칭한다. Fc (즉, 결정화가능 단편 영역)는 이뮤노글로불린의 "기저부" 또는 "꼬리"이고, 전형적으로 항체의 부류에 따라 2 또는 3개의 불변 도메인에 기여하는 2개의 중쇄로 구성된다. Fc 영역은, 특이적 단백질에 결합함으로써, 각각의 항체가 주어진 항원에 대한 적절한 면역 반응을 생성하는 것을 보장한다. Fc 영역은 또한 다양한 세포 수용체, 예컨대 Fc 수용체 및 다른 면역 분자, 예컨대 보체 단백질에 결합한다.

[0389] 본원에 제공된 항체 "변이체"는 항원에 결합할 수 있고 항체 또는 그의 단편의 1개 이상의 구조적 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 항체 변이체의 비제한적 예는 단일-도메인 항체 (나노바디), 아피바디 (모노클로날 항체보다 작고 (예를 들어, 약 6kDa), 높은 친화도로 항원에 결합할 수 있으며, 모노클로날 항체를 모방할 수 있는 폴리펩티드), 단일특이적 Fab2, 이중특이적 Fab2, 삼중특이적 Fab3, 1가 IgG, scFv, 이중특이적 디아바디, 삼중특이적 트리아바디, scFv-Fc, 미니바디, IgNAR, V-NAR, hcIgG, VhH 또는 펩티바디를 포함한다. 본원에 제공된 "펩티바디"는 항체의 Fc 도메인에 (공유 또는 비-공유 링커를 통해) 부착된 펩티드 모이어티를 지칭한다. 관련 기술분야에 공지된 항체 변이체의 추가의 비제한적 예는 연골 어류 또는 낙타류에 의해 생산된 항체를 포함한다. 낙타류로부터의 항체 및 그의 가변 영역 및 그의 생산, 단리 및 사용 방법에 대한 일반적 설명은 참고문헌 WO 97/49805 및 WO 97/49805에서 찾아볼 수 있으며, 이들은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 마찬가지로, 연골 어류로부터의 항체 및 그의 가변 영역 및 그의 생산, 단리 및 사용 방법은 WO2005/118629에서 찾아볼 수 있으며, 이는 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0390] "단일-도메인 항체" 또는 "나노바디"는 단일 단량체 가변 항체 도메인을 갖는 항체 단편을 지칭한다. 전체 항체와 같이, 이는 특이적 항원에 선택적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 인간 또는 인간화 단일 도메인 항체이다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 낙타류 단일 도메인 항체이다. 단일 도메인 항체는 조각된 단일 도메인 항체일 수 있고, 비천연 아미노산을 포함할 수 있다.

[0391] 본원에 제공된 용어 "항원"은 본원에 제공된 항체 결합 도메인에 결합할 수 있는 분자를 지칭한다. 본원에 제공된 "항원 결합 도메인"은 항원 (에피토프)에 결합하는 항체의 영역이다. 상기 기재된 바와 같이, 항원 결합 도메인은 중쇄 및 경쇄 각각의 1개의 불변 및 1개의 가변 도메인 (각각 VL, VH, CL 및 CH1)을 포함할 수 있다. 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 중쇄 가변 도메인 및/또는 중쇄 불변 도메인을 포함하지 않는다. 파라토프 또는 항원-결합 부위는 항원 결합 도메인의 N-말단 상에 형성된다. 항원 결합 도메인의 2개의 가변 도메인은 항원의 에피토프에 결합할 수 있다. 항체는, 예를 들어 무손상 이뮤노글로불린으로서 또는 다양한 펩티다제를 사용한 소화에 의해 생산된 다수의 잘 특징화된 단편으로서 존재한다. 따라서, 예를 들어 펩신은 힌지 영역 내의 디설피드 연결 아래에서 항체를 소화시켜, 경쇄 그 자체가 디설피드 결합에 의해 VH-CH1에 연결된 Fab의 이량체인 F(ab)'2를 생산한다. F(ab)'2는 온화한 조건 하에 환원되어 힌지 영역 내의 디설피드 연결을

과피함으로써 F(ab)'₂ 이량체를 Fab' 단량체로 전환시킬 수 있다. Fab' 단량체는 본질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 항원 결합 부분이다 (문헌 [Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993)] 참조). 다양한 항체 단편이 무손상 항체의 소화의 관점에서 정의되지만, 통상의 기술자는 이러한 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 사용함으로써 신생 합성될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본원에 사용된 용어 항체는 또한 전체 항체의 변형에 의해 생산된 항체 단편 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 신생 합성된 것 (예를 들어, 단일쇄 Fv) 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 확인된 것 (예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)] 참조)을 포함한다.

[0392]

실시에

[0393]

실시에 1 - PSMA sdAb에 대한 커플링 부위의 확인

[0394]

단일 도메인 항체 (sdAb) C1 (서열식별번호: 1)을 사용하여 FSY-함유 표적화 분자와의 커플링을 위한 표적으로서의 PSMA의 상용성을 평가하기 위해, CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 내의 각각의 선택된 코돈을 TAG 정지 코돈으로 대체하고 FSY를 적절한 위치에 혼입시키는 코딩된 단백질을 생산하여 FSY 부위를 스크리닝하였다. 대략 19개의 잠재적 부위가 확인되었으며, 대다수는 CDR1 및 CDR3 영역에 클러스터링되어 있었다. 이들 TAG 부위는 CDR1 (부위 26-35: GYTDSNYMS, 서열식별번호: 5); CDR2 (50-66: VNTGRGTSYADSVKG, 서열식별번호: 6), CDR3 (99-116, Cys101, Cys104 제외, AACHFCDSLPKTQDEYIL, 서열식별번호: 7)에 위치한다. 제2 sdAb C2 (서열식별번호: 2)를 FSY 변형 부위에 대해 유사하게 평가하였다. 대략 8개의 부위가 C2 CDR에서 FSY에 대한 잠재적 배치로서 발견되었으며, 대다수는 CDR2 및 CDR3에 클러스터링되어 있었다. 이들 TAG 부위는 CDR1 (부위 26-35 RFMISEYSMH, 서열식별번호: 8); CDR2 (50-65: TINPAGTTDYAESVKG, 서열식별번호: 9), CDR3 (96-100 DGYGY, 서열식별번호: 10)에 위치한다.

[0395]

실시에 2 - FSY-변형된 sdAb의 발현

[0396]

ORF 삽입물이 걸여된 벡터 pBAD 서열 (인비트로젠(Invitrogen) #43001)을 각각 정방향 및 역방향 프라이머 (서열식별번호: 80) 및 (서열식별번호: 81)로 PCR 증폭시켰다.

[0397]

생성된 PCR-증폭된 벡터를 겔 추출하고, 자이모(Zymo) PCR 정제 키트 (자이모클린 겔 DNA 회수 키트 카탈로그# D4002)를 사용하여 정제하였다. C2 WT His 및 C1 WT His에 대한 dsDNA 서열을 PCR-증폭된 pBAD-백본과 라이게이션시키고, 이, 콜라이 DH10b 화학적-적격 세포 (피셔 써모 사이언티픽(Fisher Thermo Scientific)TM DH10B 적격 세포; 고효율; FEREC0113) 내로 형질전환시켰다. 클론을 미니프랩하고, 서열을 pBAD-정방향 프라이머를 사용하여 확인하였다. 발현 카세트는 또한 PeIB 리더 서열 및 His6 태그를 포함하였다. C1 및 C2 wt의 DNA 서열은 각각 서열식별번호: 73 및 서열식별번호: 74이다. FSY 잔기가 혼입된 구축물의 경우, TAG 코돈을 sdAb 또는 이중과라토프 구축물의 오픈 리딩 프레임 내의 아미노산 치환을 위한 목적하는 위치의 DNA 서열 내로 조작하였다.

[0398]

C1 TAG 라이브러리의 구축. C1의 CDR 영역에서 확인된 부위 (실시에 1 참조) 내에서 각각의 코돈 대신에 TAG 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 (dsDNA 서열)를 IDT에 의해 합성하였다. 이들 TAG 부위는 CDR1 (부위 26-35); CDR2 (50-66), CDR3 (99-116, Cys101, Cys104 제외)에 위치한다. 이들 부위는 하기 서열에서 밑줄표시된다:

QVQLQESGGGSVQAGGSLRSLCTAPGYTDSNYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGS
TSYADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDTAIYYCAVAACHFCDSLPKTQDEYIL
 WGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYG (SEQ ID NO:1)

[0399]

각각의 이들 TAG 돌연변이체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 상기 기재된 바와 같이 pBAD-백본 내로 클로닝하고, 서열을 확인하였다.

[0400]

C2 TAG 라이브러리의 구축. 실시에 1에서 확인된 C2의 CDR 영역 내의 각각의 잔기를 대체하는 단일 TAG 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 서열을 IDT에 의해 합성하였다. C2 WT His 단백질 서열의 아미노산 서열 내의 이들 영역은 하기 서열에서 밑줄표시된다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTD
YAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGRGQGTQVTVSS (SEQ
 ID NO:2)

[0402]

- [0403] 각각의 이들 TAG 돌연변이체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 상기 기재된 바와 같이 pBAD-백본 내로 클로닝하고, 서열을 확인하였다.
- [0404] 라이브러리 균주 생성. 조작된 Mb FSYRS 아미노아실 tRNA 신테타제를 발현하는 pEVOL-FSYRS 플라스미드를 젠스 크립트 (주문 번호 U168NGE200; 카탈로그# SC1010) (참고문헌: [J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 15, 4995-4999])에 의해 합성하고, 표준 방법을 사용하여 화학적으로 적격인 DH10b 적격 세포 내로 형질전환시켜 모 균주 FSYRS-DH10b를 생성하였다. 각각의 C1 CDR TAG 또는 C2 CDR TAG 변이체를 코딩하는 개별 플라스미드를 표준 방법을 사용하여 화학적으로 적격인 FSYRS-DH10b 내로 형질전환시켰다. 단일 콜로니를 100 ug/ml 암피실린 및 34 ug/ml 클로람페니콜을 함유하는 2xYT 배지 (테크노바(Teknova)# Y0166) 중에 접종하고, 37°C에서 대략 220 rpm으로 진탕하면서 밤새 성장시켰다. 밤새 성장시킨 배양물을 멸균 50% 글리세롤과 1:1 혼합하고, -80°C에서 저장하였다.
- [0405] 발현 및 정제. FSYRS-DH10b 모 배경에서 개별 CDR 잔기가 TAG로 돌연변이된 sdAb를 코딩하는 플라스미드를 보유하는 균주를 100 ug/ml 암피실린 및 34 ug/ml 클로람페니콜의 존재 하에 2xYT 배지 (테크노바# Y0166) 중에서 배양하였다. 유도 전에, 세포를 37°C의 온도에서 성장시켰다. OD₆₀₀ 0.6에서, 배양물을 1 mM FSY로 보충하고, 0.2% 아라비노스의 첨가에 의해 유도하였다. 유도 시에, 배양물을 밤새 총 16시간 동안 220 RPM으로 진탕하면서 25°C로 이동시켰다.
- [0406] 세포를 4°C에서 30분 동안 2200xg로 펠릿화함으로써 발현물을 수거하였다. 상청액을 제거하고, 세포 펠릿을 칭량하고, -80°C에서 저장하였다. 세포 펠릿을 용해시키기 위해 B-PER 단백질 추출 시약 (써모피셔 #78243)을 4 mL/g 펠릿으로 첨가하여 재현탁시켰다. 샘플을 실온에서 15분 동안 중간 속도의 오비탈 진탕기 상에 놓아둠으로써 재현탁된 펠릿이 용해되도록 하였다. 이어서, 용해된 세포를 30분 동안 2200xg로 회전 침강시켰다. 상청액 중 가용성 분획을 추가 정제하기 위해 꺼냈다.
- [0407] 가용성 분획을 정제하기 위해, HisPur Ni-NTA 수지 (써모피셔# 88222)를 사용하여 용해물로부터 가용성 물질을 포획하였다. 수지 저장 완충제를 제거하고, 세척 완충제 (40 mM 인산나트륨, pH 7.2, 300 mM NaCl, 20 mM 이미다졸) 중에서 배치 세척하여 평형화시켰다. 배치 세척을 총 50x 수지 부피에 대해 반복하였다. 상기 기재된 정화된 용해물을 세척된 Ni-NTA 수지에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 일정하게 회전시키면서 결합되도록 하였다. 결합 후, 단백질-결합된 수지를 세척 완충제 중에서 수지 부피의 50x로 배치 세척하여 미결합 오염물을 제거하였다. 이어서, 단백질-결합된 수지를 스핀 칼럼으로 옮기고, 700xg로 잠시 회전시켜 남아있는 세척 완충제를 제거하였다. 이어서, 표적 단백질을 용리 완충제 (40 mM 인산나트륨, 7.2, 300 mM NaCl, 500 mM 이미다졸)를 함유하는 완충제를 사용하여 용리시켰다. 용리 완충제를 수지 부피의 2x로 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션되도록 하였다. 샘플을 잠시 회전시키고, 용리된 단백질을 새로운 튜브에 수집하였다. 용리 절차를 동일한 조건을 사용하여 2회 반복하였다. 용리 분획을 풀링하고, 용리 완충제로 블랭킹하면서 나노드롭 2000 상에서 A₂₈₀에 의해 정량화하였다. 이어서, Ni-NTA 정제된 단백질을 0.5 mL, 3 kDa MWCO PES 스핀 필터 (써모피셔# 88512)를 사용하여 농축시키고, 샘플의 8-10x 부피에서의 반복 희석 및 농축을 통해 1x PBS로 완충제 교환하였다.
- [0408] 실시예 3 - FSY-변형된 sdAb 및 PSMA의 공유 상호작용
- [0409] 실시예 2로부터의 반-정제된 sdAb 생성물을 상업용 PSMA (시노 바이오(Sino Bio), cat#15877-H07H)와 함께 대략 7:1 (sdAb:PSMA, PSMA 최종 농도는 0.125 mg/mL, 1.25 uM이었음)의 몰비로 1x PBS 중에서 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 가교를 환원 SDS-PAGE에 의해 분석하였다 (도 1a-1e).
- [0410] C1 sdAb의 CDR1 및 CDR3에서 평가된 부위는 하기 표 3에 제시된 바와 같은 PSMA에 대한 가교 능력의 스펙트럼을 나타냈다.

[0411]

표 3 - C1 sdAb 부위의 가교 효율			
CDR 영역	약한 가교 (<50%)	가교 부위 (>50%)	가교 부위 (80-90%)
CDR1	26	28, 29, 30	28
CDR3	99, 103, 105, 108, 111, 110, 114, 115	102, 112, 113	102, 112, 113

[0412] 부위 위치는 서열식별번호: 1에 대해 열거된다.

[0413] 제2 PSMA-특이적 sdAb C2를 실시예 1의 방법과 유사한 방법을 사용하되 sdAb:PSMA 몰비가 대략 8:1이도록 변형을 가하여 가교 효율에 대해 평가하였다. 가교의 결과가 도 2a-2c에 제시된다. C2 sdAb의 CDR2 및 CDR3에서 평가된 부위는 하기 표 4에 제시된 바와 같은 PSMA에 대한 가교 능력의 스펙트럼을 나타냈다.

표 4 - C2 sdAb 부위의 가교 효율			
CDR 영역	약한 가교 (<50%)	가교 부위 (>50%)	가교 부위 (80-90%)
CDR2	56	50, 53, 58	52, 54
CDR3	100	0	0

[0414]

[0415] 부위 위치는 서열식별번호: 2에 대해 열거된다.

[0416] 실시예 4 - 가교 동역학

[0417] FSY-변형된 sdAb의 하위세트를 선택하여 PSMA 가교 동역학을 평가하였다. sdAb를 PSMA와 함께 5:1 몰비로 인큐베이션하였다 (PSMA 최종 농도는 0.125 mg/mL, 1.25 uM이었음). 샘플을 0-180분의 시점에 취하고, 가교된 PSMA의 백분율을 SDS-PAGE에 의해 평가하였다. 도 3a 및 3b에 제시된 바와 같이, 변형된 sdAb는 다양한 커플링 동역학을 나타냈다. sdAb-PSMA 가교 밴드를 정량화함으로써 가교 밴드 백분율을 계산하고, 이미지J를 사용하여 PSMA 밴드 강도를 정량화하였다.

[0418] 실시예 5 - 변형된 CDR3을 갖는 PSMA 표적화 구축물

[0419] C1 (서열식별번호: 1)의 CDR3 (서열식별번호: 7) 내의 2개의 시스테인 잔기를 알라닌 (C101A 및 C104A)으로 변형시켜 이들 잔기를 제거하여 C39를 생성함으로써 PSMA-표적화된 sdAb C1 구축물을 생성하였다. 이어서, 이 구축물을 추가로 변형시켜 잔기 102에 FSY를 설치하였다 (C1-C101A/C104A/H102(FSY), 서열식별번호: 4, 이하 C39-102FSY로 지칭됨). 이들 sdAb 구축물의 다이어그램이 도 4에 제시된다. 구축물을 성숙 단백질로부터 절단된 pelB 리더 서열 (서열식별번호: 15)로 합성하고, 6개의 C-말단 히스티딘을 His-태그 정제에 사용하였다. 이들 구축물의 가교 능력을 실시예 3의 방법을 사용하여 평가하였다. SDS-PAGE 분석은 모든 구축물이 이들 조건 하에 대등한 수준으로 가교되었다는 것을 나타냈다.

[0420] FSY 함유 PSMA-표적화된 sdAb C39-FSY C1을 실시예 2에 기재된 바와 같이 클로닝하고, 발현시켰다. C39-FSY C1을 추가의 카피의 C1-C101A/C104A/H102H (서열식별번호: 71, FSY 부재)와 연결시켜 이중파라토프 구축물 (C1-C101A/C104A/H102(FSY)-L1-C1-C39, 서열식별번호: 21, 이하 C40-FSY로 지칭됨)을 생성하였다. 2개의 sdAb 아미노산 서열 사이에 GGGGSGGGG 링커를 부가하여 구축물을 설계하였다. 이어서, 이중파라토프 구축물을 실시예 2에 기재된 바와 같이 pBAD 벡터 내로 클로닝하고, 발현시켰다. 구축물을 성숙 단백질로부터 절단된 pelB 리더 서열 (서열식별번호: 15)로 합성하고, 6개의 C-말단 히스티딘을 His-태그 정제에 사용하였다.

[0421] 단일파라토프 sdAb 및 이중파라토프 구축물을 SDS-PAGE에 의해 시간 경과에 걸쳐 PSMA에 대한 가교에 대해 평가하였다. SDS-PAGE 분석은 이량체 형태 C40-102FSY가 단량체 C39-102FSY보다 2배 더 빠르게 가교된다는 것을 나타냈다 (t1/2 최대 가교: 이량체의 경우 ~ 30분 대 단량체의 경우 ~60분) (도 5a-5b).

[0422] C39-102FSY 아미노산 서열 (*는 102 FSY 위치, 서열식별번호: 4, 알라닌 변형은 밑줄표시됨):

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSNYYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGS
 TSYADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDTAIYYCAVAAA*FADSLPKTQDEYIL
 WGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSCHHHHHH

[0423]

[0424] 실시예 6 - 구축물의 합성

[0425] 조작된 C-말단 시스테인 잔기를 통한 부위 특이적 접합. sdAb 화합물에 대한 부위-특이적 생체접합을 가능하게 하기 위해, 추가의 Cys 잔기를 구축물의 C-말단 근처에서 조작하였다. sdAb-Cys 화합물을 제조하고, 1x PBS, pH 7.4, 5 mM EDTA 중에서 1 mg/ml로 체제화하였다. TCEP을 온화한 환원을 위해 10mM로 첨가하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 제바 스핀 칼럼을 사용하여 완충제 교환함으로써 TCEP를 제거하고, 1x PBS, pH 7.4, 1 mM EDTA로 교환하였다. 이어서, 말레이미드-반응성 페이로드 화합물 (예컨대 AZ 염료 647 말레이미드 cat#: 1122-5)을 10x 몰 과량으로 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 또는 4°C에서 16시간 동안 인

큐베이션하였다. 미반응 말레이미드 화합물을 크기 배제 크로마토그래피, 탈염 칼럼, 투석 또는 TFF를 사용하여 샘플로부터 제거하였다. 샘플을 환원 및 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE에 적용하여 표지 효율을 관찰하고, LC-MS를 사용하여 분석함으로써 무손상 질량 및 표지된 종과 비-표지된 종의 상대 비율을 정량화하였다.

[0426] 실시예 7 - 가교 활성에 대한 검정

[0427] 분자를 표적화된 종양 항원에 대한 특이적 결합 및 가교에 대해 검정하였다. PSMA-표적화 구축물의 세포 결합 효력을 평가하기 위해, 특이적 FSY- 또는 Tyr-함유 sdAb를 사용하여 특이적 관심 항원에 대한 공유 가교의 효과를 시험하였다. 이들 시험 물품을 연속 희석하고, 시험관내 배양된 전립선암 세포주 LnCAP (PSMA+) 및 PC3 (PSMA-)과 회합시켰다. 37°C에서 상이한 시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 세척하고, 배지를 교체하여 미결합 물질을 제거하였다. 샘플을 항-His 태그 항체 또는 항-VHH를 사용하여 유동 세포측정법에 의해 분석함으로써, 투입 농도의 함수로서 결합된 집단을 측정하였다. 가교 효율 및 특이성을 측정하기 위해, 세포를 수집하고, 용해시키고, 항-his 또는 항-VHH 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅함으로써 겔 이동을 통해 공유 결합된 집단을 측정하고, 항-PSMA 항체를 사용한 겔 이동 웨스턴 블롯과 비교하여, sdAb 시험 물품에 가교된 총 표적 항원을 측정하였다.

[0428] 접합체 분자를 기능적 활성에 대해, 이 경우 시험관내에서 표적 항원을 발현하는 종양 세포에 특이적으로 독성 페이로드를 전달하는 능력에 대해 추가적으로 검정하였다. 조작된 C-말단 또는 근위 Cys 잔기를 함유하는 구축물을 실시예 8에 기재된 일반적 방법을 사용하여 세포독성 페이로드, 예컨대 MMAE 또는 다른 부류의 고도-세포 독성 화합물에 커플링시켰다. 용량-반응 곡선을 생성하고, 샘플을 시험관내에서 LnCAP 및 PC3 세포와 함께 인큐베이션하였다. 다양한 기간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 세척하여 유리 화합물을 제거하고, 세포 생존율을 프로메가 사이토스그린(Promega CytoxGreen)과 같은 검정 또는 리포터 화합물 검출, 프레스토 블루(Presto Blue), CCK-8 또는 유사한 시약에 의한 생존 세포의 검출 및/또는 아넥신 V-FITC, 아이오딘화프로피듐 염색 또는 유사한 시약을 통한 아포토시스의 측정을 통해 세포 생존율을 측정하는 다른 검정을 사용하여 측정하였다.

[0429] 실시예 8 - 생체내 전달

[0430] 생체내에서 종양 조직에 특이적으로 페이로드를 전달하는 구축물의 능력을 측정하고, 구축물 대 비-공유 sdAb 접합체의 종양 노출을 비교하기 위해, 형광단 표지를 대용 페이로드로서 사용하여 시간 경과에 따른 추적/생체 분포 측정을 가능하게 하였다. 단일 잔기가 Tyr 또는 FSY로 치환된 sdAb 구축물 (예를 들어, C1, C2 또는 C3)을 말레이미드 화학을 통해 화학적 형광단 (알렉사647 또는 유사물)에 조작된 시스테인 잔기를 통해 접합시키고, 실시예 6에 기재된 바와 같이 정제하였다. 형광단-표지된 sdADC 접합체 분자를 PSMA + 또는 - 종양을 보유하는 수컷 NSG 마우스에 꼬리 정맥 IV 주사를 통해 투여하고, 시험 물품의 생체분포를 AmiX 영상화기 또는 유사물을 사용한 전체-동물 영상화를 통해 시간 경과에 따라 관찰하였다. 종양-특이적 및 말초 노출을 영상 밀도측정법을 통해 정량화하고, sdAb의 FSY 버전과 Tyr 버전을 비교하였다.

[0431] 실시예 9: 추가의 FSY-변형된 SdAb의 설계

[0432] C3 wt 서열 (IDT로부터 합성됨, 서열식별번호: 3)을 NdeI 및 HindIII 제한 효소에 의해 소화된 벡터 (젠스크립트에 의해 합성됨) 내로 클로닝하여 C3 wt 항-PSMA sdAb를 구축하였다. 발현 카세트는 또한 PeIB 리더 서열 및 His6 태그를 포함하였다. C3 wt DNA 서열은 서열식별번호: 75로서 제시된다.

[0433] CDR 영역 내의 아미노산 서열을 FSY 변형을 위해 선택된 부위에서 플라스미드 내에서 TAG 코돈으로 변화시켰다. ORF 내의 이들 TAG 돌연변이체는 젠스크립트에 의해 부위-지정 돌연변이유발을 통해 제조되었다.

C3 CDR1 (26-35: GWPYSTYSMN, SEQ ID NO:11); CDR2 (50-65:

GISSTMSGIIFAESKAG, SEQ ID NO:12); CDR3 (99-113: RRDYLSSSSSDDFDY, SEQ ID

NO:13).

[0434]

[0435] 실시예 10 - FSY-변형된 sdAb의 스크리닝

[0436] 실시예 9로부터의 C3 구축물을 실시예 2에 기재된 바와 같이 DH10b 적격 세포 내로 pEVOL-FSYRS와 함께 공동-형질 전환시켰다. 형질전환물로부터 단일 콜로니를 골라내고, 37°C 하에 220 rpm으로 진탕하면서 100 ug/mL Amp+34 ug/mL Cm으로 보충된 24 딥 웰 플레이트 내 1 mL 2xYT 중에 접종하였다. OD가 0.5에 도달하였을 때, 온도를 25°C로 감소시켰다. 0.2% 아라비노스 + 1 mM FSY를 첨가하여 각각의 웰에 대한 발현을 유도하였다. 생성물을 25°C에서 밤새 발현시켰다. 밤새 후, 세포를 1.5 mL 에펜도르프 튜브로 옮기고, 벤치탑 원심분리에 의해 회전시켰다. 상청액을 제거하였다. 펠릿을 세포 용해시키기 위해 50 uL B-per (써도피서 #78243)로 15분

동안 처리하였다. 그 후, 세포 용해물을 4°C 벤치탑 원심분리에 의해 최대 속도로 회전 침강시켰다.

[0437] 3 uL 상청액을 3 uL PBS 또는 3 uL 0.25 mg/mL PSMA와 함께 인큐베이션하여 가교 반응을 개시하였다. 반응물을 37°C에서 보다 짧은 시간 윈도우인 3시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 인큐베이션 혼합물을 2XSDS-로딩 염료로 처리하였다. SDS-PAGE를 실행하고 쿠마시 블루로 염색하여 가교를 조사하였다. 결과가 도 6a 및 6b에 제시되고, 하기 표 5에 요약된다.

표 5 - 3시간 이내 C3 sdAb와 PSMA의 가교 효율			
CDR 영역	약한 가교 (<50%)	가교 부위 (>50%)	가교 부위 (80-90%)
CDR1	0	0	0
CDR3	0	58, 62	0
CDR3	101, 103, 107	0	0

[0438]

[0439] 부위 위치는 서열식별번호: 3에 대해 열거된다.

[0440]

[0440] 실시예 11 - FSK-변형된 FAP sdAb의 확인 및 동역학

[0441]

[0441] 서열 분석 (abYsis)을 사용하여 Fap 항체 서열에서 상보성 결정 영역 (CDR) 루프 위치를 규정하였다. 각각의 CDR 잔기를 TAG 코돈으로 개별적으로 대체하기 위해 라이브러리를 구축하고, 생성된 단백질을 각각의 위치에 비천연 아미노산 FSK를 혼입시키는 조건 하에 발현시켰다.

[0442]

[0442] C8 FAP 라이브러리 생성. sdAb 내의 상이한 FSK 혼입 부위를 평가하기 위해, 벡터 pBAD-C8 WT (서열식별번호: 82)를 하기와 같이 구축하였다: IDT 캄파니에 의해 C8 WT 서열 (서열식별번호: 23)을 이. 콜라이 발현을 위해 코돈 최적화하고, 합성하였다. C8 WT g블록 서열 (서열식별번호: 78)을 NdeI 및 HindIII 제한 효소에 의해 소화된 pBAD 벡터 (젠스크립트) 내로 클로닝하여 pBAD-C8 WT 벡터를 구축하였다.

[0443]

[0443] 라이브러리 균주 생성. 상응하는 신테타제의 발현을 위해, 조작된 Ma FSKRS 아미노아실 tRNA 신테타제 (서열식별번호: 87)를 코딩하는 pEVOL-FSKRS 플라스미드 (젠스크립트)를 합성하고, pEVOL-FSKRS (서열식별번호: 89)를 화학적으로 적격인 DH10b 적격 세포 내로 형질전환시켜 모 균주 FSKRS-DH10b를 생성하였다. 각각의 C8 CDR TAG 변이체를 코딩하는 개별 플라스미드를 화학적으로 적격인 FSKRS-DH10b 세포 내로 형질전환시켰다. 단일 콜로니를 100ug/ml 암피실린 및 34ug/ml 클로람페니콜을 함유하는 슈퍼브로쓰 배지 (테크노바# S1530) 중에 접종하고, 37°C에서 대략 220 rpm으로 밤새 진탕하면서 성장시켰다.

[0444]

[0444] 발현 및 정제. FSKRS-DH10b 모 배경에서 개별 CDR 잔기가 TAG로 돌연변이된 sdAb를 코딩하는 플라스미드를 보유하는 균주를 100 ug/ml 암피실린 및 34 ug/ml 클로람페니콜의 존재 하에 슈퍼브로쓰 배지 중에서 배양하였다. 각각의 풀로부터의 단일 콜로니를 관련 항생제를 함유하는 5 mL 슈퍼브로쓰 배지 중에 접종하고, 37°C에서 밤새 성장시켰다. 다음 날, 세포를 100 ug/ml 암피실린 및 34 ug/ml 클로람페니콜, 1 mM FSK, 0.2% 아라비노스를 함유하는 30 mL 슈퍼브로쓰 배지 중에 1:10 비로 희석 (3 mL 대 30 mL 희석)하였다. 세포를 30°C에서 220 rpm으로 6시간 동안 FSK 혼입에 대해 유도하였다. 발현 후, FSK-변형된 sdAb (C8-FSK)를 실시예 2에 기재된 방법에 따라 수거하고 정제하였다.

[0445]

[0445] 가교 동역학. FAP 수용체 (아크로바이오시스템(Acrobiosystem) #AP-H5263-100ug)를 풀링된 항체 혼합물 (표 6)과 함께 ~ 8:1 (항체:수용체)의 물비로 37°C, 1XPBS, pH 7.4에서 1시간, 2시간 또는 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 100 mM DTT를 함유하는 1X 랩리 샘플 완충제를 첨가함으로써 가교 반응을 정지시켰다. 샘플을 95°C에서 5분 동안 가열하고, 이어서 트리스-글리신 SDS-PAGE (4-20% 미니-프로테안(Mini-PROTEAN)® TGX™)를 실행하였다. 후속적으로, 이미지J 소프트웨어를 사용하여 상대 밴드 강도를 정량화하였다. FSK 풀링된 이동의 결과는 폴 2 및 3 내에서의 가교 활성을 통한 FAP 수용체 이동을 입증하였다 (도 7a).

[0446] 표 6. C8 FSK 혼합물 발현을 위한 설계된 CDR 폴

폴 번호	CDR 영역
1	CDR1 (26-35)
2	CDR2 (50-57)
3	CDR2 (58-65)
4	CDR3 (98-106)

[0447]

[0448]

FAP와의 가교를 담당하는 단일 FSK 부위의 확인. 가교를 담당하는 개별 FSK 부위를 확인하기 위해, 각각의 TAG 돌연변이체를 상기 기재된 바와 같이 DH10b 세포 내로 pEVOL-FSKRS와 함께 공동-형질전환시키고, 발현시키고, 정제하였다. 후보 풀로부터의 각각의 개별 FSK 돌연변이체를 겔 이동의 조사를 위해 FAP 수용체와 함께 인큐베이션하였다 (도 7b). CDR2 내의 9개의 FSK 돌연변이체는 FAP와 가교하는 것으로 밝혀졌다 (52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 62, 64). 1개의 부위 (56)는 1시간 이내에 모든 가교 부위 중에서 가장 높은 가교 수율을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0449]

FAP 수용체에 대한 C8-FSK 가교 동역학의 측정. FSK 가교 동역학을 평가하기 위해, C8-54FSK 및 C8-56FSK를 FAP 수용체와 함께 15, 30, 60 및 120분 동안 인큐베이션하고, 가교 수율에 대해 검사하였다. 56 FSK 부위는 다른 부위와 비교하여 가장 높은 가교 속도를 갖는 것으로 밝혀졌으며, 이는 C8-56FSK가 가장 빠른 가교 속도 (2시간 이내에 >50% 가교)를 갖는다는 것을 나타낸다 (도 7c).

[0450]

실시예 12 - FSY-변형된 Her3 SdAb의 확인 및 동역학

[0451]

C9 라이브러리 생성. 서열 분석을 사용하여 (abYsis) Her-3 항체 서열에서 상보성 결정 영역 (CDR) 루프 위치를 규정하였다. 각각의 CDR 잔기를 TAG 코돈으로 개별적으로 대체하기 위해 라이브러리를 구축하고, 이를 각각의 위치에 비천연 아미노산 FSY를 혼입시키는 조건 하에 발현시켰다.

[0452]

벡터 pBAD-C9 WT를 구축하였다. C9 WT 서열 (서열식별번호: 24)을 이. 콜라이 발현을 위해 코돈 최적화하였다. C9 g블록 서열 (서열식별번호: 79)을 NdeI 및 HindIII 제한 효소에 의해 소화된 pBAD 벡터 (젠스크립트 cat# SC1010) 내로 클로닝하여 pBAD-C9 WT 벡터 (서열식별번호: 83)를 구축하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이, 예외로 pEVOL-FSYRS 플라스미드 및 개별 돌연변이체 pBAD-C9 돌연변이체를 형질전환시키고, DH10b 세포보다는 BL21 세포에서 발현시켜, C9-FSY 변이체의 라이브러리를 생성하였다. FSY-변형된 sdAb (C9-FSY)의 발현은 FSY-변형된 C9 sdAb를 모 균주 FSYRS-BL21에서 발현시키고 그로부터 정제한 것을 제외하고는 실시예 2에 기재된 방법에 따랐다.

[0453]

가교를 담당하는 폴의 확인. 가교 상용성 FSY 부위를 함유하는 CDR의 영역을 초기에 확인하기 위해, 다중 CDR 영역에 TAG 부위를 갖는 플라스미드를 함유하는 균주를 초기에 폴링하였다 (표 7). 폴링된 균주를 실시예 2에 기재된 바와 같이 발현시키고, Ni-NTA 친화도를 통해 정제하고, 농도에 대해 정규화하고, SDS-PAGE 겔 이동을 통해 가교에 대해 평가하였다. C9-FSY 폴 혼합물을 Her3 (아크로바이오시스템 #ER3-H5223-100ug)과 3:1 비 (3 ug C9 FSY 대 1 ug Her3 수용체)로 37°C, 1xPBS, pH 7.4에서 밤새 인큐베이션하였다. 반응을 4-20% 미니-프로테안® TGX™ 상에서 실행한 다음, 쿠마시 블루로 염색하였다. 폴링된 이동의 결과는 폴 2, 3 및 4 내에서의 Her3 수용체 가교 활성을 입증하였다 (도 8a).

[0454]

표 7. C9 FSY 혼합물 발현을 위한 설계된 CDR 폴

폴 번호	CDR 영역
1	CDR1 (28-37)
2	CDR2 (52-58)
3	CDR2 (59-63)
4	CDR2 (64-68)
5	CDR3 (101-106)
6	CDR3 (107-112)
7	CDR3 (113-118)

[0455]

[0456]

Her3과의 가교를 담당하는 단일 FSY 부위의 확인. 가교를 담당하는 각각의 개별 FSY 부위를 확인하기 위해, 각

각의 TAG 돌연변이체를 상기 기재된 바와 같이 pEVOL-FSYRS와 함께 BL21 세포 내로 공동-형질전환시키고, 발현시키고, 정제하였다. 후보 풀로부터의 각각의 개별 FSY 돌연변이체를 Her3 수용체와 함께 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 반응을 4-20% 미니-프로테안® TGX™ 상에서 실행하고 쿠마시 블루 염색하여 가교를 평가하였다 (도 8b). CDR2 내의 8개의 C9-FSY 돌연변이체가 Her3과의 가교를 지지하는 것으로 밝혀졌다 (53, 55, 56, 57, 58, 60, 64, 67). 2개의 부위 (55, 57)는 모든 가교 부위 중에서 가장 높은 가교 수율을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0457] 가장 빠른 속도를 갖는 C9-FSY 가교 부위의 확인. 가장 빠른 속도를 갖는 FSY 가교 부위를 확인하기 위해, 상기 확인된 FSY 부위를 갖는 C9를 Her3 수용체 (아크로마이오시스시스템)와 함께 인큐베이션하고, 가교 수율을 결정하였다. C9-FSY 돌연변이체를 Her3 수용체와 함께 8:1의 몰비로 1x PBS, pH 7.4 중에서 인큐베이션하였다. 1시간 후에 100 mM DTT를 함유하는 최종 1X SDS-로딩 염료에 첨가함으로써 인큐베이션을 정지시키고, 4-20% 미니-프로테안® TGX™와 쿠마시 블루 염색에 의해 반응을 분석하였다.

[0458] 고유한 55 FSY 부위는 다른 부위와 비교하여 가장 높은 가교 수율 (1시간 이내에 > 50%)을 갖는 것으로 밝혀졌으며, 이는 55 FSY가 가장 빠른 가교 속도를 갖는다는 것을 나타낸다 (도 8c). C9-55FSY를 Her3 수용체와 함께 인큐베이션하고, 0, 15, 30, 60, 120 및 180분의 시간 경과에 걸쳐 반응을 정지시킴으로써 추가로 분석하였다. 도 8d에 제시된 바와 같이, 가교는 급속하게 진행되었고, 15분 이내에 검출되었으며, 1시간 이내에 50% 초과 가교가 나타났다.

[0459] 실시예 13 - FSY-변형된 및 비변형된 C2 sdAb의 결합 친화도

[0460] 위치 54에 FSY를 갖는 C2 sdAb (C2-54FSY)를 선택하여 동일한 위치에 티로신을 갖는 C2 sdAb (C2-54TYR)와 결합 친화도를 비교하였다. 단백질을 실시예 2에서와 같이 제조한 다음, FPLC 크기 배제 크로마토그래피 (하이로드 16/600 슈퍼팩스 200 pg 크기 배제 칼럼 시티바(Cytiva) #28989335)를 통해 추가로 정제하였다. 1x DPBS를 실행 완충제로서 사용하고, 단백질을 등용매 용리에 의해 수집하였다. 각각의 C2 sdAb에 대해, 단량체 피크 분획을 환원 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 폴딩하고, 음이온 교환 실행 완충제 (20 mM 트리스, 7.5 및 20 mM NaCl) 중에 4°C에서 밤새 투석하였다. 내독소를 제거하기 위해, 투석된 샘플 풀을 하이트랩 Q XL, 1 ml 칼럼 (시티바 #17515801) 상에 관통 모드로 실행시켰으며, 내독소는 칼럼에 결합하였다. 관통물을 수집하고, 내독소 수준에 대해 체크하였다. 최종적으로, 완전히 정제된 샘플을 최종 제제 완충제로서 1x DPBS 중에 투석하였다. 샘플을 분취하고, -80°C에서 저장하였다.

[0461] 결합 동역학을 AHC 센서 (사르토리우스(Sartorius) 품목 #18-5060)에 의한 생물층 간섭측정법을 사용하여 측정하였다. Fc 태그를 갖는 PSMA (50 nM) (아크로마이오시스시스템 PSA-H5264-100ug)와 C2-54FSY 또는 C2-54TYR sdAb (단백질 농도 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM). OCTET 측정을 위한 단계를 다음과 같이 수행하였다: 기준선: 60초; 수용체 로딩: 300초; 비-결합 수용체 세척: 300초; 회합을 위한 sdAb 로딩: 100초; 해리: 600초. C2-54TYR은 9.1 nM의 KD를 가졌고, C2-54FSY는 10.9 nM의 KD를 가졌으며, 이는 위치 54에서의 티로신 대신에 FSY의 혼입이 결합 친화도를 변화시키지 않았다는 것을 나타낸다.

[0462] 실시예 14 - 세포 결합 검정

[0463] C2-54FSY 및 C2-54TYR sdAb를 유동 세포측정법을 사용하여 인간 전립선 종양 세포주 LNCaP (PSMA+) 및 PC3 (PSMA-)에의 결합에 대해 평가하였다. 실시예 13으로부터의 단백질을 FACS 완충제 (1xPBS + 2% HI-FBS)에 의해 3 µM (1000 µL)로 제제화한 다음, 5x 연속 희석하여 (200 µL sdAb 대 800 µL FACS 완충제) 검정을 위한 8개의 농도 포인트를 생성하였으며, 최저 농도는 0.0000384 µM이었다. 대조군 sdAb (인간 PSMA 알렉사 플루오르 알렉사 플루오르® 647-접합된 항체)를 FACS 완충제 (1xPBS + 2% HI-FBS)에 의해 1 µM (450 µL)로 제제화한 다음, 3x 연속 희석하였으며 (150 µL 시험 물품 대 300 µL FACS 완충제), 최저 농도는 0.00045 µM이었다.

[0464] 결합 검정. LNCaP 및 PC3 세포주 (ATCC)를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청 (써도 피서)으로 보충된 RPMI-1640 및 F12K 배지 중에 유지하였다. 세포를 지수 성장기에서 수거하고, 계수하고, v-바닥 96-웰 플레이트에 100 µL 세포/웰로 분취하였다. 세포를 원심분리에 의해 펠릿화하였다. C2 sdAb 및 대조군 sdAb 샘플을 세포에 첨가하고, 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. C2 sdAb로 처리된 세포의 경우, 인큐베이션 후, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척하고, 5 µg/mL의 2차 항체 (알렉사 플루오르 647 아피니퓨어 염소 항-알파카 IgG, VHH 도메인)를 함유하는 100 µL의 빙냉 FACS 완충제와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척하고, 4°C 고정 완충제 (써도피서, 카탈로그 번호 0082249)로 30분 동안 고정시켰다. 대조군 sdAb로 처리된 세포의 경우, 인큐베이션 후, 세포를 FACS 완충제로

2회 세척하고, 4°C 고정 완충제 (써모피셔, 카탈로그 번호 0082249)로 30분 동안 고정시켰다. 고정 후, 세포를 2회 세척하고, 아튼 유동 세포측정법 (써모피셔)으로 분석하였다.

[0465] 미가공 데이터 (FCS 파일)를 분석하였다 (플로우조 10.7.2). FSC-A 및 SSC-A를 사용하여 총 세포를 분리하고, FSC-A 및 SSC-A로 무손상 세포를 게이팅하였다. 이어서, FSC-H 대비 FSC-A로 단일선을 게이팅 아웃하였다. 단일선을 알렉사 플루오르-647로 분리하였다. 샘플의 알렉사 플루오르-647 신호 강도의 기하 평균 강도를 추가의 분석 및 플롯팅에 사용하였다. 샘플의 알렉사 플루오르-647의 기하 평균 강도의 평균 값 및 STDEV 값을 계산하였다 (마이크로소프트 365 MSO 버전 2202 빌드 16.0.14931.20128 64-비트용 마이크로소프트® 엑셀®). 곡선 피트 및 플롯팅을 '로그(효능제) 대 반응-가변 기울기 (4개의 파라미터)' (그래프패드 프리즘 9.2.0)로 수행하였다.

[0466] C2-54TYR 및 C2-54FSY는 용량 의존성 방식으로 LNCaP 세포에 결합하였지만, PSMA 음성 PC3 세포에 대한 결합은 나타내지 않았다 (도 9). C2-54TYR 및 C2-54FSY에 대한 결합 친화도를 LNCaP 세포의 유동 염색 후 EC50 값으로부터 측정하였다 (표 8).

[0467] 표 8. LNCaP 세포에서의 C2 sdAb의 결합 친화도

	C2-54TYR	C2-54FSY
EC50	14.88nM	12.25nM
EC50 범위	8.83nM 내지 27.05nM	8.98nM 내지 16.88nM
R 제곱	0.978	0.99

[0468]

[0469] 실시예 15 - 표적 세포에 대한 FSY-변형된 sdAb의 가교

[0470] C2-54TYR, C2-54FSY 및 C3-101FSY의 가교를 세포 결합에 대해 비교하였다. LNCaP 및 PC3 세포를 실시예 14에 기재된 바와 같이 배양하였다. 세포를 그의 성장 배지 중에 넣어 6-웰 플레이트에 500,000개 세포/웰의 밀도로 플레이트하였다. 시딩 48시간 후에, 배양 배지를 제거하고, sdAb를 갖는 0.8 mL 배양 배지를, 나타낸 농도 및 시점에 첨가하였다 (표 9 및 10 참조). 세포를 2회 헹구고 (1 mL/웰의 1xPBS), 0.2 mL/웰의 0.25% EDTA-트립신 (킵코(Gibco), 카탈로그 번호 25200-056)을 첨가하였다. 인큐베이터에서 5분 인큐베이션한 후, 1ml 완전 배지를 첨가하여 트립신을 중화시켰다. 세포를 헹구고 펠릿화하였다.

[0471] 세포를 프로테아제 억제제 각테일로 보충된 RIPA 완충제 (산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 카탈로그 번호 SC-24948A) 중에 용해시켰다. 변성된 샘플을 4-20% 크리테리온 TGX 젤 (바이오-라드(Bio-Rad), 카탈로그 번호 5671095)에서의 전기영동에 이어서, 키트 (바이오-라드, 카탈로그 번호 1704271) 및 피어스 패스트 웨스턴 블롯 키트 (써모 사이언티픽, 카탈로그 번호 35060, 35061)를 사용하고 1차 항체 항-인간 PSMA (인비트로젠, 카탈로그 번호 37-3900) 또는 항-알파카 VHH (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 카탈로그 번호 128-035-232), 내부 표준 항-GAPDH (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology), 카탈로그 번호 CST-2118)를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다.

[0472] 아주르 바이오시스템(Azure Biosystem) C600에 의해 영상을 획득하였다. GIMP 2.10.28을 사용하여 영상을 처리하였다. 웨스턴 블롯에서의 밴드의 밀도를 이미지J 1.51j8로 지침에 따라 결정하였다 (imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#infobox:Densitometry, Section 30.13). 가교된 PSMA 대 총 PSMA의 백분율을 하기 식으로 계산하였다: 가교된 PSMA의 밀도/(가교된 PSMA의 밀도 + 비가교된 PSMA의 밀도) x 100%.

[0473] 항-PSMA 항체로 검출된 우세한 밴드 (~100kD)가 LNCaP 세포로부터의 웨스턴 블롯에서 관찰되었지만 (도 10a), 유사한 분자량을 갖는 밴드가 PC3 세포에서는 검출되지 않았으며 (도 10b), 이는 항-PSMA 항체의 특이성을 입증하고, LNCaP 세포에서의 PSMA 발현의 특이성을 확인시켜 주었다. C2-54FSY로 처리된 LNCaP 세포에서, PSMA 위에 추가의 밴드가 검출되었다. 밴드의 강도는 시간 및 농도 의존성 방식으로 증가하였으며, 이는 특이적 가교를 나타낸다. 그러나, 다양한 농도의 C2-54TYR로 다양한 시간 동안 처리된 LNCaP 세포에서, 유사한 강도의 비-가교된 PSMA 밴드는 관찰되었지만, 가교된 밴드는 관찰되지 않았으며, 이는 FSY가 없는 sdAb는 LNCaP 세포에서 PSMA에 가교되지 않았다는 것을 나타낸다 (도 10b). 가교의 정량화는 C2-54TYR이 LNCaP 세포에서 시간 및 용량 의존성 방식으로 PSMA에 가교되었다는 것을 나타냈다 (표 9 및 도 10c).

[0474] 표 9. LNCaP 세포에서 C2-54FSY와 PSMA의 가교 동역학

	농도		
	1μM	24 nM	4.8 nM
처리 후 시간 (hr)	가교된 PSMA (총 PSMA%)		
0	0.0	0.0	0.0
1	5.1	1.4	0.5
3	17.1	9.2	0.5
6	41.7	18.5	1.2
9	50.9	29.7	2.2
24	71.8	50.8	3.1

[0475]

[0476] C3-101FSY로 처리된 LNCaP 세포에서, 유사한 패턴이 관찰되었고, 가교된 밴드 (PSMA-sdAb)의 강도는 시간 및 농도 의존성 방식으로 증가하였다. C3-101FSY의 분자량이 C2-54FSY보다 더 높기 때문에, 가교된 밴드는 C2-54FSY의 가교 밴드보다 더 높은 겔보기 분자량으로 이동하였다 (도 11a). C2-54FSY 및 C3-101FSY의 가교 동역학의 비교가 표 10 및 도 11b에 제시된다.

[0477]

표 10. LNCaP 세포에서 C2-54FSY 및 C3-101FSY와 PSMA의 가교 동역학

처리 후 시간 (hr)	처리			
	1μM	24nM	1μM	24nM
	C2-54FSY	C2-54FSY	C3-101FSY	C3-101FSY
	가교된 PSMA (총 PSMA%)			
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	3.5	1.4	38.2	4.4
3	8.6	3.8	60.2	12.8
6	22.6	7.7	87.2	13.5
9	37.2	12.4	88.6	14.0
24	58.5	26.6	80.8	6.0

[0478]

[0479] 실시예 16 - 생체내 가교 검정

[0480] 본 연구는 2개의 마우스 이종이식 종양 모델 LNCaP 및 PC3에서 C2-54TYR 및 C2-54FSY와 PSMA의 생체내 가교, 전신 및 종양내 노출을 평가하였다. LNCaP 및 PC3 세포주 (ATCC)를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청 (씨모 피셔)으로 각각 보충된 RPMI-1640 및 F12K 배지 중에 유지하였다. 세포를 지수 성장기에서 수거하고, 냉장 원심분리기에서 335xg로 원심분리하고, 배지를 흡인하였다. 세포 접종을 위해, 세포 펠릿을 PC3의 경우 100 ul의 무혈청 F-12K 배지 또는 LNCaP의 경우 RPMI 플러스 100 μL의 매트릭셀 중에 재현탁시켰다. 5백만개의 PC3 세포 또는 3백만개의 LNCaP 세포를 함유하는 200 μL를 수컷 NSG 마우스 (잭슨 랩스(Jackson Labs))의 측복부 내로 이식하였다. 종양 크기가 ~200 mm³에 도달하였을 때, C2-54TYR 및 C2-54FSY를 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 협부 채혈을 통해 말초 혈액 샘플을 수집하였다. 6시간 후, 마우스를 희생시키고, 말초 혈액 샘플 및 종양 둘 다를 수거하고, 칭량하고, -80°C에서 동결시켰다.

[0481] 종양 샘플 (~30 내지 40 mg)을 프로테아제 억제제 카테일을 함유하는 1ml RIPA 완충제 (산타 크루즈 바이오테크 놀로지, 카탈로그 번호 SC-24948A)와 함께 첨가한 다음, 퀴아젠(Qiagen) 티슈라이저 II 샘플 파괴기로 균질화시켰다. 균질화 후, 샘플을 4°C에서 10분 동안 12,000rpm으로 원심분리하였다. 상청액을 보관하고, 펠릿을 폐기하였다. 원심분리 과정을 1회 반복하였다 (총 2회).

[0482] 종양 용해물의 단백질 농도를 BCA 단백질 검정 키트 (씨모 사이언티픽, 카탈로그 번호 23225)를 사용하여 정량화하였다. 샘플을 RIPA 완충제에 의해 동일한 농도로 제제화한 다음, 6x 환원된 로딩 완충제 (알파 에이사 (Alfa Aesar), 카탈로그 번호 J61337)를 첨가한 후에 100°C에서 10분 동안 가열하였다. 변성된 샘플을 4-20%

크리테리온 TGX 겔 (바이오-라드, 카탈로그 번호 5671095)에서의 전기영동에 이어서, 가교를 검출하기 위한 항-PSMA 및 항-VHH 및 로딩 대조군으로서의 항-GAPDH 항체를 사용한 웨스턴 블롯 (바이오-라드, 카탈로그 번호 1704271 및 써모 사이언티픽, 카탈로그 번호 35060, 35061)에 의해 분석하였다. 아주르 바이오시스템 C600에 의해 영상을 획득하였다. GIMP 2.10.28을 사용하여 영상을 처리하였다. 혈장을 ELISA에 적용하고, 데이터를 처리하고, 플롯팅하였다 (그래프패드 프리즘 9.2.0). 평균 값 및 STDEV를 계산하고, 혈장 농도의 유의성을 독립표본 양측 스튜던트 t 검정을 사용하여 평가하였다.

[0483] C2-FSY 또는 C2-TYR을 투여한 동물로부터 유래된 LNCaP 및 PC3 종양으로부터의 샘플을 상기 기재된 바와 같이 제조하고, 항-VHH 항체로 웨스턴 블롯팅하여 비-가교된 C2 화합물 (블롯의 15kD 영역) 및 가교된 C2 화합물 (PSMA 위의 ~100kD 영역)을 검출하였다. C2-54FSY를 투여한 동물로부터의 LNCaP 종양 샘플에서, 항-VHH 웨스턴 블롯은 모든 샘플에서 PSMA 영역 위의 밴드 (~100kD)를 검출한 반면, C2-54TYR 또는 비히클 샘플에서는 가교 밴드가 관찰되지 않았으며 (도 12a), 이는 C2-54FSY에 의한 특이적이고 재현가능한 가교를 나타낸다. 항-VHH 신호는 PC3 종양 샘플에서 관찰되지 않은 반면, C2-54TYR 및 C2-54FSY로 처리된 LNCaP 샘플에서 밴드의 차등 패턴이 관찰되었다. 비-가교된/유리 sdAb를 보여주는 블롯의 ~15kD 영역에서, C2-54TYR 및 C2-54FSY 처리된 LNCaP 샘플 둘 다는 유사한 강도의 밴드를 나타냈으며, 이는 유사한 수준의 비가교된 sdAb의 존재를 입증한다. C2-54FSY 처리된 LNCaP 종양 조직에서 특이적으로 ~ 100kD로 이동한 추가의 밴드가 관찰된 반면, C2-54TYR 처리된 동물로부터의 PC3 샘플 또는 LNCaP 샘플에서는 이 영역에서 밴드가 관찰되지 않았으며, 이는 C2-54FSY의 PSMA에 대한 가교를 나타낸다.

[0484] sdAb의 전신 노출을 추정하고 비교하기 위해, C2-54TYR 및 C2-54FSY의 혈장 농도를 ELISA를 사용하여 투여 30분 및 6시간 후에 측정하였다 (표 11 및 도 12b).

[0485] 표 11. C2-54TYR 및 C2-54FSY의 혈장 농도 (ng/ml)

		투여 30분 후				투여 6시간 후			
		군			평균±STDEV	군			평균±STDEV
PC3 종양 보유 마우스	C2- 54TYR	7746.7	23430.0	17463.3	16213.3±7916.0	33.2	31.2	10.3	24.9±12.7
	C2- 54FSY	18713.3	16696.7	22113.3	19174.4±2737.6	43.9	39.9	45.7	43.2±3.0
LNCaP 종양 보유 마우스	C2- 54TYR	8530.0	8146.7	8163.3	8280±216.7	9.3	11.5	45.7	22.2±20.4
	C2- 54FSY	12246.7	14313.3	9463.3	12007.8±2433.8	34.5	82.9	36.8	51.4±27.3

[0486] 결과는 단일 IV 투여 후, C2-54TYR 및 C2-54FSY가 종양에 접근하여 PSMA-의존성 방식으로 축적된다는 것을 나타낸다. 그러나, C2-54FSY만이 종양에서 PSMA에 특이적으로 가교된다.

[0488] 실시예 17 표적-특이적 가교를 위한 FSK-변형된 및 FSY-변형된 sdAb의 구축

[0489] 일반적으로 실시예 2 및 11의 방법에 따라 라이브러리 및 라이브러리 균주를 구축하고, 발현시키고, 정제하였다. FSY 또는 FSK 삽입과 상용성인 부위를 함유하는 CDR의 영역을 초기에 확인하기 위해, CDR 영역의 코딩 영역 내에 TAG 코돈을 갖는 플라즈미드를 함유하는 균주를 구축하였다. 표 12는 스크리닝에 사용된 sdAb 및 CDR 서열을 보여준다.

[0490] 표 12: FSY 및 FSK 삽입을 갖는 sdAb

sdAb	표적	CDR	CDR 아미노산 서열	FSY 삽입	FSK 삽입
C14 (SEQ ID NO: 28)	CEA5	CDR1 (26-35)	GDTYGSYWWMG	x	x
		CDR2 (50-66)	AINRGGGYTVYADSVKG	x	x
		CDR3 (99-112)	SGVLGGLHEDWFNY	x	x
C8 (SEQ ID NO: 23)	FAP	CDR1 (26-35)	GSIFVGNAMG	x	
		CDR2 (50-65)	GITSDGITYYPDSVKG	x	
		CDR3 (98-106)	WPPRIGFAS	x	
C12 (SEQ ID NO: 27)	폴레이트 수용체 알파	CDR1 (26-35)	ETFGVVFTLG	x	
		CDR2 (50-65)	RVTGTDTVDYAESVKG	x	
		CDR3 (98-100)	GAY	x	
C11 (SEQ ID NO: 26)	MSLN	CDR1 (26-35)	GIDLSLYRMR	x	x
		CDR2 (50-65)	LITDDGTSYYEDSVKG	x	x
		CDR3 (98-106)	ETPLSPVNY	x	x
C10 (SEQ ID NO: 25)	MSLN	CDR1 (26-35)	GSIFGIRTMD	x	
		CDR2 (50-65)	RITMDGRVVFHADSVKG	x	
		CDR3 (98-106)	SGLTSREDY	x	
C18 (SEQ ID NO: 34)	HER3	CDR1 (26-35)	GRTSSKYAMG	x	x
		CDR2 (50-66)	TISWSDGSTYYADSVKG	x	
		CDR3 (99-113)	AVDVLAGTFEYDY	x	
C20 (SEQ ID NO: 37)	CD123	CDR1 (26-35)	GRAINTYAMG	x	
		CDR2 (50-66)	AISWNGGHTRYADSVQ G	x	
		CDR3 (99-114)	YSDYHRIATMEADADS	x	
C21 (SEQ ID NO: 38)	5T4	CDR1 (26-35)	DFTFRNYEMS 또는 DFTFRSYEMS	x	x
		CDR2 (50-66)	SISGSGSTYYAHSLKG	x	x
		CDR3 (99-109)	LRDGFNNGFDY	x	x

[0491]

[0492]

스크리닝. 일반적으로 실시예 11 및 12의 방법에 따라 CDR 영역의 코딩 영역 내에 TAG 코돈을 갖는 플라스미드를 함유하는 균주를 풀에서 스크리닝하고, 가교를 검정하였다. 표적에 대한 가교 활성을 나타내는 풀을, 개별 FSY 또는 FSK 돌연변이체를 가교에 대해 평가하여 추가로 분석하였다. 가교를 나타내는 개별 돌연변이체가 표 13에 제시된다.

[0493] 표 13: sdAb의 가교를 위한 FSY 및 FSK 삽입의 확인

sdAb	가교 검정을 위한 표적 (인간)	FSY 위치	FSK 위치
C14	CEACAM5	55	52
C8	FAP	54, 55, 56	52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 62, 64 (상기 실시예 11)
C12	플레이트 수용체 알파 (FOLRa)	58	시험되지 않음
C11	MSLN	53, 54, 101, 102, 103, 104, 105	53
C10	MSLN	29, 30, 31, 32, 33, 52, 53, 54, 100, 101	시험되지 않음
C18	HER3	33, 101, 103	30, 31, 32, 35
C20	CD123	56, 57, 58	시험되지 않음
C21	5T4	59	27

[0494]

[0495]

가교 검정의 표적에 사용된 시약. CEACAM5는 아크로바이오시스템 (# CE5-HF255-25 µg) 및 시노바이올로지칼 (#11077-H02H-100 µg)로부터 구입하였다. FAP 수용체는 아크로바이오시스템 (#AP-H5263-100ug)으로부터 구입하였다. 인간 Fo1Ra (플레이트 수용체 알파) 수용체는 아크로바이오시스템 (#F01-H5253-100ug)으로부터 구입하였다. MSLN (메소텔린)은 시노바이올로지칼 (Cat: 13128-HNCH, Cat: 13128-H01H-B) 및 아크로바이오시스템 (#MSN-H526x-100ug)으로부터 구입하였다. 인간 MSLN 세포의 도메인은 아크로바이오시스템 (#MSN-H5253-100ug, #MSN-HF223-25ug)으로부터 구입하였다. Her3 세포의 도메인은 아크로바이오시스템 (#ER3-H5223-100ug)으로부터 구입하였다. 인간 CD123 단백질 세포의 도메인은 시노바이올로지칼 (#10518-H02H-50ug)로부터 구입하였다. 인간 5T4 세포의 도메인은 아크로바이오시스템 (#TPG-H5253-100ug)으로부터 구입하였다.

[0496]

C8 FSY sdAb에 대해, 가교 동역학을 실시예 11의 방법에 따라 분석하였다. 도 13은 0-180분의 가교를 보여준다. C8-54 FSY 부위는 다른 부위와 비교하여 가장 높은 가교 속도를 갖는 것으로 밝혀졌다 (2시간 이내에 ~ 50% 가교). 유사하게, HER3 수용체에 대한 C18-FSY 및 C18-FSK sdAb의 가교 속도를 비교하였다. 위치 33, 101 및 103에서와 같이, 위치 101 FSY가 가장 높은 가교 효율 및 속도를 달성하는 것으로 관찰되었다. 위치 30, 32, 35에서의 C18 sdAb FSK 변이체의 경우, 위치 35 FSK가 Her3에 대한 가장 높은 가교 효율 및 속도를 달성하는 것으로 관찰되었다. C20 FSY sdAb 내 3개의 부위의 평가는 위치 57이 CD123에 대한 가장 높은 가교 효율 및 속도를 달성하였다는 것을 나타냈다.

[0497]

실시예 18 FSY-변형된 DARPIn의 확인 및 동역학

[0498]

Her2-결합 DARPIn (C15)을 FSY 아미노산의 삽입을 통해 가교 능력에 대해 스크리닝하였다. 일반적으로 실시예 2의 방법에 따라 라이브러리 및 라이브러리 균주를 구축하고, 발현시키고, 정제하였다. C15 WT 서열 (서열식별 번호: 29)은 표 14에 제시되며, FSY 삽입에 의해 스크리닝된 영역은 볼드체로 제시되고, FSY 치환의 아미노산 위치는 표의 제2 행에 제시된다.

[0499]

표 14. FSY의 HER2 DARPIn 내로의 치환을 위한 아미노산 위치

DARPIn C15 wt 아미노산 서열	MDLGKLLLEAARAGQDDEV RILMANGADVNAH DFYGITPLHLAA NFGHLEIVEVLLKHGADVNA FDYDNTPLHLA ADAGHLEIVEVLLKY GADVNASDRDGHTPLHLAAREGHLEIVEVLLKNGADVNAQDKFGK TAFDISIDNGNEDLAEILQKLA AAALEHHHHHHH
라이브러리 내 FSY 부위	2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 33, 34, 35, 36, 37, 66, 67, 68, 69

[0500]

[0501]

일반적으로 실시예 11의 방법에 따라 가교 효율을 위해 각각의 개별 C15-FSY 돌연변이체를 Her2 수용체와 함께 인큐베이션하였다. C15 내의 부위 9, 12, 37, 66, 68은 도 14에 제시된 바와 같이 Her2 수용체와의 가교를 입증하였다. 가장 빠른 속도를 갖는 FSY 가교 부위를 확인하기 위해, 상기 확인된 FSY 부위를 갖는 DARPIn을 Fc-태그부착된 Her2 (아크로바이오시스템: 아크로바이오시스템: #HER2-H5253-100ug)와 함께 인큐베이션하고, 15 및

30분에 가교에 대해 검사하였다. C15-66 FSY 부위는 다른 부위와 비교하여 더 높은 가교 수율을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0502] FSY 치환이 부재하는 DARPin의 1개의 카피인 C16 (서열식별번호: 30)을 5개의 아미노산 GGGGS 링커에 의해 C15-66FSY의 C-말단에 융합시켜 융합 단백질을 제조함으로써 이중과라토프 DARPin (C15-66FSY-C16, 이하 C38-FSY로 지칭됨)을 구축하였다. 일반적으로 실시예 11의 방법에 따라 C38-FSY 단백질을 Fc-태그부착된 Her2와 함께 인큐베이션하고, 가교에 대해 검사하였다. 도 15에 제시된 바와 같이, 이중과라토프 C38-FSY는 시간 의존성 방식으로 2.5시간 이내에 50% 가교로 Her2와 가교되었다.

[0503] 실시예 19 표적화된 영상화 페이로드와의 세포 결합

[0504] 일반적으로 실시예 2의 방법에 따라 C22-TYR 및 C22-FSY (각각 서열식별번호: 39 및 40)를 발현시키고, 정제되, 예외로 Ni-NTA 수지로부터의 용리 후, 이어서 정제된 단백질을 4°C에서 밤새 1:100의 희석 배율을 사용하여 음이온 교환 실행 완충제 (20 mM 트리스, 7.5 및 20 mM NaCl)로 완충제 교환하였다. 투석된 샘플 풀을 하이트 랩 Q XL, 5 ml 칼럼 (시티바 #17515801) 상에 관통 모드로 통과시켰으며, 내독소는 칼럼에 결합하였다. sdAb 단량체 관통물 분획을 환원 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 폴링하였다. 이어서, 정제된 C22-TYR 및 C22-FSY를 AZ 염료 680 (클릭 케미스트리 툴즈(Click Chemistry Tools), 카탈로그#1578-25)에 접합시켰다.

[0505] 소르타제 매개된 라이게이션을 사용하여 AZ 염료 680 (클릭 케미스트리 툴즈, 카탈로그 #1578-25)을 C22-FSY 및 C22-TYR에 접합시켜 C23-TYR 및 C23-FSY를 생성하였다. 소르타제 g블록 서열을 IDT에 의해 코돈 최적화 및 정렬하고, pBAD 벡터 내로 클로닝하고, 기재된 바와 같이 제조하였다 (PubMed: 21697512). sdAb 구축물을 AZ 염료 680에 접합시키기 위해, PBS pH 7.4 중 상기 정제된 20 mg의 단백질을 1 mM CaCl₂, 0.5 mM AZ 염료 680, 2 mg 소르타제와 함께 30°C에서 진탕기에서 인큐베이션하였다 (sdAb의 최종 농도는 ~0.7 mg/mL이었음). 2시간 후, 2mM MTSET를 첨가하여 반응물을 쉐킷하였다. 쉐킷된 반응물을 2 mL Ni 수지 (PBS 평형화됨)에 배치 결합시켜 실온에서 30분 동안 미동시키면서 소르타제 및 비접합된 물질을 제거하였다. 비드를 회전시켜 미결합 분획으로부터의 수지의 분리를 용이하게 하고 (700g x 10분, 20°C), 관통물을 유리 칼럼에 로딩하여 수집하고, 비드를 PBS로 세척하여 남아있는 단백질을 수집하였다. 관통물 및 세척물을 합하고, 농축시키고 (5K MWC0, 4k rcf, 10°C, 1.5시간), 하이로드 26/600 슈퍼텍스 75 pg (시티바, # 28-9893-34) 상에 로딩하여 비접합된 염료를 제거하였다. 분획을 수집하고, SDS-PAGE에 의해 분석하고, 폴링하고, -80°C에서 저장하였다.

[0506] 생성된 접합체 C23-TYR 및 C23-FSY를 유동 세포측정법에 의해 인간 표피양 편평세포 암종 세포주 A431 (EGFR+) 및 인간 결장직장암 세포주 COLO320DM (EGFR-)에의 결합에 대해 평가하였다. 단백질을 FACS 완충제 (1xPBS + 2% HI-FBS+ 5mM EDTA)에 의해 30 μM (10x 최종)로 제제화한 다음, 5x 연속 희석하여 (20 μL sdAb 대 80 μL FACS 완충제) 검정을 위한 8개의 농도 포인트를 생성하였으며, 최저 농도는 0.000384 μM (10x 최종)이었다. A431 및 COLO320DM 세포주 (ATCC)를 둘 다 37°C에서 5% CO₂ 하의 가습 환경에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청 (썬도 피서)으로 보충된 RPMI-1640 중에 유지하였다. 세포를 지수 성장기에서 수거하고, 계수하고, 빙냉 FACS 완충제 중에 1.1x10⁶ 개/mL로 재현탁시키고, v-바닥 96-웰 플레이트 (코닝(Corning) 3897) 내에 90 μL/웰로 분취하였다. C23-TYR 및 C23-FSY 단백질을 A431 세포에 10uL/웰로 첨가하여 최종 농도를 1x로 만들었다. EGFR+ 세포에 대한 결합의 특이성을 제어하기 위해, 동일한 희석 범위의 시험 물품을 COLO320DM 세포에 첨가하였다. 얼음 상에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 2000 rpm으로 2분 동안 펠릿화한 다음, 200 μL FACS 완충제로 2회 세척한 다음, 100 μL의 빙냉 FACS 완충제 중에 재현탁시키고, 노보사이트 유동 세포측정기 (ACEA/애질런트(Aglient))로 분석하였다.

[0507] 미가공 데이터 (FCS 파일)를 플로우조 10.7.2로 분석하였다. FSC-A 및 SSC-A를 사용하여 총 무손상 세포를 확인한 다음, FSC-H 대비 FSC-A로 단일선을 게이팅 아웃하였다. 샘플의 AZ680의 기하 평균 형광 강도를 추가 분석 및 플로팅에 사용하였다. AZ680 채널에 대한 기하 평균 형광 강도 (기하평균 또는 기하MFI)를 사용하여 그 래프패드 프리즘 (V9.3.1)에서 '로그(효능제) 대 반응-가변 기술기 (4개의 파라미터)'를 사용하여 EC50을 계산하였다.

[0508] 도 16에 제시된 바와 같이 C23-FSY 및 C23-TYR은 용량-의존성 방식으로 A431 세포에 결합하였지만, EGFR 음성 COLO320DM 세포에 대한 결합은 나타내지 않았다. 표 15에 제시된 바와 같이 A431 세포의 염색 및 유동 세포측정법 후 EC50 값으로부터 C23-FSY 및 C23-TYR에 대한 결합 친화도를 측정하였다.

[0509] 표 15. A431 세포에 대한 C23-FSY 및 C23-TYR AF680 접합체의 결합 친화도

	C23-TYR	C23-FSY
EC50 (nM)	495	518
EC50 범위	415.2-613.1	444.7-618.2
R 제곱	0.99	1.00

[0510] 실시예 20 표적화된 영상화 페이로드를 사용한 생체내 종양 고정

[0511] 실시예 20 표적화된 영상화 페이로드를 사용한 생체내 종양 고정

[0512] 본 연구는 형광 표지된 sdAb의 생체내 가교를 평가하였다. 실시예 19의 방법에 따라 C22-FSY 및 C22-TYR을 변형시켜 AZ680 접합체 C23-FSY 및 C23-TYR (각각 서열식별번호: 42, 41)을 생성하였다. EGFR에 대한 C23-FSY 및 C23-TYR의 생체내 가교를 A431 표피양 편평세포 암종 이종이식 종양 모델에서 평가하였다. 인간 결장직장암 이종이식 모델 COLO320DM은 EGFR- 대조군으로서의 역할을 하였다. 세포주 둘 다를 공급업체의 프로토콜 (ATC C)에 따라 배양하였다. 주사 당일, 세포를 수거하고, 무혈청 배지 중에서 세척하고, 계수하고, 저온 무혈청 배지 중에 재현탁시켰다. A431 세포 펠릿을 100 mL의 무혈청 DMEM 중에 재현탁시키고, COLO320DM을 100 μ L RPMI1640 중에 재현탁시킨 다음, 세포를 100 mL의 매트릭셀과 혼합하여 5×10^6 개 생존 세포/100 μ L의 최종 농도를 생성하였다. 1천만개의 A431 또는 COLO320DM 세포를 함유하는 200 mL의 부피를 6-8주령의 암컷 Balb/c 누드 마우스 (찰스 리버(Charles River))의 우측 상부 측복부 내로 이식하였다. 종양 크기가 $\sim 200 \text{ mm}^3$ 에 도달하였을 때, 5mg/kg의 C23-FSY, C23-TYR 또는 비히클 대조군 (PBS)을 꼬리 정맥을 통해 10 mL/kg의 부피로 주사하였다. 투여 정확도의 확인을 위해 투여 0.5시간 후에 헤파 채혈을 통해 말초 혈액 샘플을 수집하였다.

[0513] 시험 물품의 생체분포를 표 16에 나타낸 바와 같이 2개의 상이한 시점에서 연구하였다. 동물을 안락사시키고, 종양을 수거하고, 칭량하고, 얼음 상에 놓고, 생체외에서 IVIS 영상화하고, 그 후에 웨스턴 블롯 분석을 위해 순간 동결시켰다.

[0514] 표 16. 생체분포 분석을 위한 시점

군	시점당 마우스의 수	시점 (시간)	PK를 위한 비-말단 혈청
비히클	1	8, 24	모든 마우스에 대해 0.5 h
C23-TYR	3	8, 24	모든 마우스에 대해 0.5 h
C23-FSY	3	8, 24	모든 마우스에 대해 0.5 h

[0515] 조직 처리. 종양 조각 (~ 30 내지 50 mg)을 칭량하고, 면도날을 사용하여 작은 조각으로 절단하였다. 절단된 종양 조각을 CK28-R 튜브 (베르틴 인스트루먼트(Bertin Instruments), Cat.P000916LYSK0-A)에 넣고, 홀트 프로테아제 & 포스파타제 억제제 카테일 (써모 사이언티픽 Cat. 78446)을 함유하는 0.5ml T-PER 완충제 (써모 사이언티픽 Cat. 78510)를 첨가하였다. 이어서, 조직을 프리셀리스 24 조직 균질화기로 균질화하였다. 균질화 후, 샘플을 4°C에서 10분 동안 12,000 x rpm으로 원심분리하였다. 이어서, 상층액을 보유하고, 펠릿을 폐기하였다. 원심분리 과정을 1회 더 반복하였다 (총 2회).

[0517] 겔 영상화. 종양 용해물의 단백질 농도를 피어스 래피드 골드 BCA 단백질 검정 키트 (써모 사이언티픽 Cat. A53225)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 정량화하였다. 키트로부터의 1 mg/mL BSA에서 시작하여 BSA의 7-포인트 2배 희석물을 표준물로서 사용하였다. 샘플을 T-PER 완충제에 의해 동일한 농도 (3.6 mg/mL)로 제제화한 다음, 95°C에서 10분 동안 1x 환원된 로딩 완충제 중에서 가열하여 3 mg/mL의 최종 농도를 수득하였다. 다음에, 각각의 샘플의 30ug 총 단백질을 전기영동을 위해 4-20% 크리테리온 TGX 겔 (바이오-라드, Cat.5671085) 상에 로딩하였다. NIR-700 채널이 구비된 아주르 바이오시스템 C600에 의해 영상을 획득하였다. GIMP 2.10.28을 사용하여 영상을 처리하였다.

[0518] 도 17은 A431 (EGFR+) 및 COLO320DM (EGFR-) 종양에서의 시간-의존성 방식의 종양내 유리- 및 EGFR-가교된 sdAb를 보여준다. 유리 sdAb는 $\sim 15\text{kD}$ 영역에서 검출되었고 (하부 패널, 유리 VHH로 라벨링됨), EGFR 가교된 sdAb 밴드는 $\sim 175\text{kD}$ 영역에서 검출되었다 (상부 패널, VHH-EGFR 가교로 라벨링됨). EGFR+ A431 종양에서 C23-FSY로는 EGFR의 시간-의존성 가교가 관찰되었지만 C23-TYR로는 관찰되지 않았다. EGFR- COLO320DM 종양에서는 유리-sdAb 체류도 가교도 관찰되지 않았다.

[0519] 생체의 IVIS 영상화 데이터 분석: 종양을 절개하고, AMI HTX로 영상화하고; 영상화 데이터를 아우라 소프트웨어

(스펙트럴 인스트루먼트즈 이미징(Spectral Instruments Imaging), 버전 4.0.7)로 분석하였다. 평균 방사 효율 값을 개별 종양 주위의 ROI의 생성으로부터 획득하였다 (아우라의 이클립스 ROI 툴). 총 방출 (광자/s)을 측정하고 기록하였다. 총 방출 값을 조직 중량에 대해 정규화하였다 (광자/s/g). 프리즘 (v 9.1.0 (221))에서 대응표본 T-검정 (* = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.005$)을 사용하여 통계적 유의성을 결정하였다. 도 18은 C23-FSY 및 C23-TYR의 투여 8 및 24시간 후에서의 A431 및 COLO320DM 종양 조직의 생체의 영상화를 보여준다.

[0520] 도 18a는 삼중 생물학적 복제물에 걸친 광자/s/g 종양 조직을 보여준다. 개별 동물로부터의 값이 제시되고, 중심 막대는 평균 강도를 나타내고, 오차 막대는 SEM을 나타낸다 (대응표본 t 검정에 의해 *는 $p = 0.024$ 를 나타내고, **는 $p = 0.002$ 를 나타냄). C23-FSY는 8 및 24시간 시점 둘 다에서 C23-TYR 단백질과 비교하여 A431 종양에서 유의하게 더 높은 수준으로 존재하였다. 24시간 후, C23-TYR은 A431 종양 조직에서 매우 낮은 수준으로 관찰된 반면, C23-FSY, 특히 EGFR-VHH 가교된 종은 현저하였다 (도 17, 18a). 시험 물품은 유사한 친화도를 갖기 때문에 (도 16), 이들 결과는 함께 FSY-함유 sdAb의 종양 AUC가 공유결합가에 의해 증가될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0521] 도 18b는 투여 8 및 24시간 후에 C23-FSY를 투여한 동물로부터의 A431 및 COLO320DM 종양의 정량적 생체의 형광 강도를 보여준다. 플롯은 삼중 생물학적 복제물에 걸친 광자/s/g 종양 조직을 보여준다. 개별 동물로부터의 값이 제시되고, 중심 막대는 평균 강도를 나타내고, 오차 막대는 SEM을 나타낸다. C23-FSY는 8 및 24시간 시점 둘 다에서 EGFR- COLO320DM 종양에 존재하는 양과 비교하여 A431 종양에 유의하게 더 높은 수준으로 존재하였으며, 이는 C23-FSY 단백질의 종양 고정 특이성을 입증한다.

[0522] 이들 결과는 가교-상용성 비천연 아미노산을 갖는 표적화 도메인, 예컨대 sdAb가 표적화 특이성을 갖는 종양에 페이로드 (여기서는 영상화 염료)를 운반할 수 있고, 또한 가교-상용성 비천연 아미노산이 없는 표적화 도메인과 비교하여 표적 부위에서의 페이로드의 체류를 개선시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0523] 실시예 21 표적화된 영상화 페이로드를 사용한 생체내 PSMA 종양 고정

[0524] 본 연구는 LNCaP 마우스 전립선암 이종이식 종양 모델에서 형광 표지된 sdAb의 생체내 PSMA 가교, 전신 및 종양 내 노출을 평가하였다.

[0525] 실시예 19의 방법에 따라 위치 101에 TYR 또는 FSY를 갖는 C29-101TYR 및 C29-101FSY (서열식별번호: 53 또는 54)를 사용하여 AZ 염료 680에 접합된 PSMA-표적화된 sdAb를 제조함으로써 C30-TYR 및 C30-FSY (각각 서열식별번호: 55, 56)를 생성하였다. LNCaP 세포를 37°C에서 5% CO₂ 하의 가습 환경에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청으로 보충된 RPMI-1640 배지 중에 유지하였다. 이식 당일, 세포를 수거하고, 무혈청 배지 중에서 세척하고, 계수하고, 저온 무혈청 배지 중에 재현탁시켰다. 세포 펠렛을 50 μ L의 무혈청 RPMI 중에 재현탁시키고, 50 μ L의 매트릭셀과 혼합하여 5×10^6 개 생존 세포/100 μ L의 최종 농도를 생성하였다. 5백만개의 LNCaP 세포를 함유하는 100 μ L의 부피를 수컷 NU/J 마우스 (잭슨 랩스)의 우측 상부 측복부 내로 이식하였다. 종양 크기가 $\sim 200 \text{ mm}^3$ 에 도달하였을 때, 5mg/kg의 C30-TYR 또는 C30-FSY를 10 mL/kg의 부피로 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 투여 정확도의 확인을 위해 투여 0.5시간 후에 험부 채혈을 통해 말초 혈액 샘플을 수집하였다. 시험 물품의 생체분포를 표 17에 제시된 바와 같이 8개의 상이한 시점 (투여 전, 투여 15분, 1시간, 6시간, 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간 후)에서 연구하였다. 안락사시킨 후, 종양 조직을 수거하고, 칭량하고, 생체 외에서 IVIS 영상화하고, 그 후에 웨스턴 블롯 분석을 위해 순간 동결시켰다.

[0526] 표 17 PK 샘플링을 위한 시점

군	시점당 마우스의 수	희생 시점 (시간)	PK를 위한 비-말단 혈청
비히클	1	0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 96	모든 마우스에 대해 0.5h, 예외로 말단 0.25h
C30-TYR	3	0.25, 1, 6, 24, 48	모든 마우스에 대해 0.5h, 예외로 말단 0.25h
C30-FSY	3	0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 96	모든 마우스에 대해 0.5h, 예외로 말단 0.25h

[0527]

[0528] 조직 처리, 단백질 정량화 및 정규화를 실시예 20의 방법을 사용하여 수행하였다. 유리 및 PSMA-가교된 sdAb 시험 물품의 정량화를 위해, C30-FSY의 2배 16-포인트 표준 곡선을 500 ng/mL에서 시작하여 T-PER 완충제 중에서 제조하였다. 표준물을 95°C에서 10분 동안 1x 환원된 로딩 완충제 중에서 가열하였다. 샘플 중 시험 물품

농도의 추정치에 기초하여, 상이한 겔에 대해 상이한 범위의 표준물을 사용하였다. 엑셀에서 선형 피트 함수를 사용하여 표준물의 밴드 면적 대 그의 농도를 사용하여 표준 곡선을 생성하였다. 영상에서의 밴드의 밀도를 이미지J 1.51j8로 지침에 따라 결정하였다 (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#infobox:Densitometry, Section 30.13>). 이미지J를 사용하여 샘플의 밴드의 면적을 수득한 후, 표준 곡선의 선형 피트로부터 추론된 식을 사용하여 레인 내의 TA의 양을 계산하였다. 30 µg의 총 단백질이 로딩됨에 따라, 레인 내의 TA의 양은 또한 30 µg의 총 단백질 내의 TA의 양이다. 종양 sdAb 농도 (pg sdAb/mg 종양 조직) = 레인 내의 sdAb 양 (pg)*(단백질 농도 (mg/ml) * (0.5 ml*1000/30 µg)/종양 조직 중량 (mg)). 생성된 표준 곡선은 R2 > 0.99인 적어도 5개의 포인트를 함유하였다. 그래프패드 프리즘으로 사다리꼴 규칙을 사용하여 곡선하 면적 (AUC)을 계산하였으며, 여기서 2개의 인접한 포인트 사이의 면적은 $\Delta X * [(Y1+Y2)/2] - \text{기준선}$ 으로 계산된다 (https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_area_under_the_curve.htm). C30-TYR에 대한 AUC는 1676이었고, C30-FSY에 대한 AUC는 4902이었다.

[0529] 도 19는 C30-TYR 및 C30-FSY의 투여 후에 종양 연관 유리 sdAb 및 PSMA-가교된 sdAb를 시간-의존성 방식으로 보여주는 SDS PAGE 겔의 형광 영상을 보여준다. 처리 후 지정된 시점에서, 종양을 수거하고, 겔 전기영동을 위해 처리하여 형광단-접합된 sdAb 시험 물품을 검출하였다. 유리 (비-가교된) sdAb-AF680은 ~20kD 영역에서 검출되었고 (하부 패널), C30-FSY에 대한 PSMA-가교된 sdAb-AF680 중은 100kD 영역에서 이동하였다 (상부 패널). *로 표시된 레인은 비히클 샘플을 나타낸다.

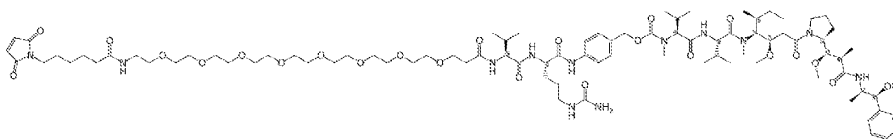
[0530] 도 20은 종양 연관 유리 및 PSMA-가교된 시험 물품의 정량적 분석을 보여준다. 상기 겔로부터의 유리 및 PSMA-가교된 중 밴드의 형광 밴드 강도를 밀도측정법 및 표준 곡선과의 비교를 통해 정량화하였다. 총 종양내 시험 물품 농도 (유리 및 PSMA-가교됨, pg/mg 종양 조직)가 시간 (h)에 대해 플롯팅되어 있다. *로 나타낸 데이터 포인트는 검출 및 정량화 한계 미만인 샘플을 나타낸다. C30-FSY의 종양 노출은 비-공유 C30-TYR에 비해 대략 3x 증가하였다.

[0531] 실시예 22 세포독성 페이로드의 전달

[0532] C25 및 C27 sdAb를 FSY 치환이 존재 및 부재하도록 제조하여 C25-54TYR, C25-54FSY, C27-101TYR 및 C27-101FSY (각각 서열식별번호: 45, 46, 49, 50)를 생성하였다. 일반적으로 실시예 2의 방법에 따라 단백질을 발현시키고, 정제하되, 예외로 Ni-NTA 수지로부터의 용리 후, 이어서 정제된 단백질을 4°C에서 밤새 1:100의 희석 배율을 사용하여 음이온 교환 실행 완충제 (20 mM 트리스, 7.5 및 20 mM NaCl)로 완충제 교환하였다. 투석된 샘플 풀을 하이트랩 Q XL, 5 ml 칼럼 (시타바 #17515801) 상에 관통 모드로 통과시켰으며, 내독소는 칼럼에 결합하였다. sdAb 단량체 관통물 분획을 환원 SDS-PAGE에 의해 분석하고, 풀링하였다.

[0533] sdAb 구축물을 MC-PEG8-VC-PABC-MMAE (하기 제시된 구조)에 접합시켜 C26-54 TYR, C26-54 FSY, C28-101TYR 및 C28-101FSY를 생성하였다. 샘플을 먼저 1 mM EDTA 및 1.5 당량의 TCEP (산소제거된 물 중 10mM)로 환원시키고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 환원 후에, 임의의 잔류 TCEP를 제바 스핀 탈염 칼럼 (써모 P/N 89891, 7K MWCO)을 사용하여, 1X PBS 중 1mM EDTA를 평형 완충제로서 사용하여 제거하였다. 프로필렌 글리콜 (PG) 및 디메틸아세트아미드 (DMA)를 반응 혼합물 (Cf = 10% v/v)에 첨가하여 링커 페이로드 용해도를 개선시키고, 1.5 당량의 링커-페이로드를 첨가하였다. 반응물을 서서히 볼텍싱하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션 하였다. 접합체 혼합물을 사전-수화된 투석 카세트 (~1ml 샘플:3500 mL 완충제 부피)에 첨가하고, 최소 2시간 동안 투석하였다. 투석 완충제를 교체하고, 샘플을 4°C에서 밤새 투석한 후에, A280 및 분석용 SEC에 의한 분석을 위해 샘플을 꺼냈다. 비접합된 링커 페이로드를 시타바 PD-10 칼럼 (카트리지가당 4.3mL의 세파텍스 G-25 흡착제)을 사용하여 표준 PD-10 스핀 프로토콜 (평형 완충제: 1X PBS, pH 7.4)에 따라 제거하였다. 용리액을 수집한 후에, 칼럼을 추가의 1mL의 1X PBS, pH 7.4로 행구었다. PD-10 상에서의 정제 후에, 샘플을 50mL의 1X PBS를 사용하는 써모 사이언티픽 슬라이드-A-라이저 미니 투석 장치 (3.5k MWCO)를 사용한 최종 투석 단계에 적용하였다. 모든 샘플을 0.2 µm 멸균 PES 필터에 통과시키고, -20°C에서 저장하였다.

[0534] MC-PEG8-VC-PABC-MMAE:



[0535]

[0536] 시험관내에서 불멸화된 PSMA-발현 종양 세포주에 특이적으로 세포독성 페이로드를 전달하는 FSY-함유 sdAb 접합

체의 능력을 비-공유 sdAb 접합체에 비해 측정하기 위해, 세포 투과성 페이로드 모노메틸 아우리스타틴을 약물 대 항체 비 (DAR) 1로 sdAb에 접합시켰다. PSMA를 발현하도록 조작된 PC3pip 세포주 및 PC3flu PSMA 음성 세포주 (오하이오주 클리블랜드 소재 케이스 웨스턴 리저브 유니버시티(Case Western Reserve University)의 사이닝 왕(Xinning Wang) 및 워렌 디. 헤스톤(Warren D. Heston) 교수에 의해 제공됨)을 37°C에서 5% CO₂ 하의 가슴 환경에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청 (써모 피셔, FB-12)으로 보충된 RPMI-1640 (써모 사이언티픽, 11875-903)으로 이루어진 성장 배지 중에 유지하였다. 세포를 트리플 익스프레스(TrypLE Express) (써모 사이언티픽, 14175-095)를 사용하여 지수 성장기에서 수거하고, 100 µL 성장 배지 중에 넣어 흑색 96-웰 편평 투명 바닥 플레이트 (코스타(Costar), 3603)에 800개 세포/웰로 시딩하였다. 이어서, 세포를 37°C에서 5% CO₂ 하의 가슴 환경에서 밤새 인큐베이션하여 세포가 플레이트에 부착되도록 하였다. 하기 표에 열거된 sdAb-MMAE 접합체를 성장 배지 중에 50x 최종 농도로 희석하고, 3배 증분으로 희석하여 10-포인트 희석 시리즈를 생성하였다. 각각의 50x 시험 물질 희석 시리즈의 2 µL의 부피를 웰에 삼중으로 첨가하여 1x의 최종 농도를 달성하였다 (각각의 시리즈에 대한 최고 농도를 표 18에 나타냄).

[0537] 표 18. 시험 물질 접합체

명칭	용량 반응 (1x)에서의 최고 농도
C26-54TYR	158 nM
C26-54FSY	137 nM
C28-101TYR	208 nM
C28-101FSY	127 nM

[0538]

[0539] 플레이트를 4일 동안 인큐베이터로 복귀시킨 후에, 세포 생존율을 평가하였다. 셀타이터-글로 (프로메가 (Promega), G5737)를 모든 플레이트에 50 µL/웰로 첨가한 다음, 플레이트를 실온에서 1분 동안 1000rpm으로 진탕하였다. 이어서, 발광을 빅터 X5 플레이트 판독기 (퍼킨엘머(PerkinElmer)) 상에서 판독하고, 상대 발광 단위 (RLU)로서 보고하였다. 생존율을 엑셀 (마이크로소프트 365 MSO, 버전 2202 빌드 16.0.14931.20128, 64-비트용 마이크로소프트® 엑셀®)에서 % 생존율 = 100*(처리된 RLU/비처리된 RLU)로서 계산하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 (V9.3.1)에서 % 생존율 대 시험 물질의 농도로서 플롯팅하고, IC50을 로그 [억제제] 대 반응 - 가변 기울기 (4개의 파라미터)를 사용하여 계산하였다.

[0540] PC3flu 세포주에 대한 sdAb-PEG8-VC-PABC-MMAE 접합체에 대해 극도로 낮은 수준의 세포독성 활성이 관찰되었으며, 이는 이러한 세포주 상에서의 PSMA 표적 발현의 결여와 일치한다. PSMA에 대해 14.9 nM의 추정 친화도를 갖는 C26-54TYR (LNCaP 세포에 대한 비-접합된 화합물에 대해 실시예 14에 제시된 바와 같음)은 PC3pip 세포에 대한 세포독성의 용량-의존성 증가를 나타냈으며, 이는 PSMA 결합 및 내재화를 통한 페이로드의 표적화된 전달과 일치한다. 표 19에 제시된 바와 같이, C26-54FSY는 페이로드를 전달하는 데 있어서 C26-54TYR보다 3.57x 더 강력하였으며, 이는 공유결합가가 단일 도메인 항체 약물 접합체의 세포 효력을 증진시킨다는 것을 입증한다. 제2 예에서, PSMA에 대해 >500nM 친화도를 갖는 C28-101TYR은 PC3pip 세포에 대해 낮은 수준의 세포독성 활성을 갖는 반면, C28-101FSY의 가교 활성은 효력을 400x 초과만큼 이동시켜 세포 효력에 대한 공유결합가의 영향을 확인시켜 주었다. MMAE에 접합된 sdAb에 대한 농도 대 세포 생존율 곡선을 보여주는 시험 물질의 세포독성의 비교가 도 21a (C26 구축물) 및 도 21b (C28 구축물)에 제시된다. sdAb-PEG8-VC-PABC-MMAE 접합체와의 4-일 인큐베이션 후, PSMA+ PC3pip 및 PSMA- PC3flu 세포의 생존율을 셀타이터-글로 검정에 의해 평가하였다. 용량-반응 분석을 삼중으로 수행하였으며, 기호는 평균을 나타내고, 오차 막대는 STDEV를 나타낸다.

[0541] 표 19. sdAb-PEG8-VC-PABC-MMAE 접합체의 세포 세포독성에 대한 IC50 값

	IC50 PC3pip (M)	IC50 PC3flu (M)
C26-54TYR	3.36e-9	>1e-7
C26-54FSY	9.39e-10	>1e-7
C28-101TYR	8.47e-8	>1e-7
C28-101FSY	1.8e-10	>1e-7

[0542]

[0543] 실시예 23 HER2 표적에 대한 세포독성 페이로드의 전달

[0544] HER2-표적화된 sdAb (C17; 서열식별번호: 31)를 HER2 표적에 대한 가교를 제공한 FSY 삽입에 대한 개별 위치를 확인하기 위해 평가하였다. 일반적으로 실시예 2의 방법에 따라 sdAb를 클로닝하고, 발현시키고, 정제하되, 예외로 특이적 단일 부위를, 풀링된 스크리닝의 사용보다는 변형 및 시험을 위해 선택하였다. FSY 삽입을 위해 선택된 부위가 표 20에 제시된다.

[0545] 표 20. HER2를 표적화하는 집중된 FSY 삽입 sdAb 라이브러리

	아미노산 서열	FSY 삽입을 위해 선택된 부위
CDR1	GYIFNSCGMG	30, 31, 33
CDR2	RISGDGDTWHKESVKG	50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60
CDR3	CYNLETY	99, 100, 101, 102, 103, 104
비-CDR		37, 44, 45, 47

[0546]

[0547] 위치 52 및 54를 HER2 표적에 대한 가교로서 확인하였다. FSY 가교 동역학을 평가하기 위해, C17의 52FSY 및 54FSY 변이체를 Her2 수용체와 함께 인큐베이션하고, 가교 효율에 대해 검사하였다. 도 22에 제시된 바와 같이, 54FSY 부위는 1시간 이내에 >90%의 가교로 가장 높은 가교 속도를 갖는 것으로 밝혀진 반면, 52FSY는 2시간 이내에 90% 가교에 도달하였다. 이들 2개의 구축물을 그의 비-FSY (TYR) 대응물과 함께 세포독성 페이로드의 접합을 위해 선택하였다.

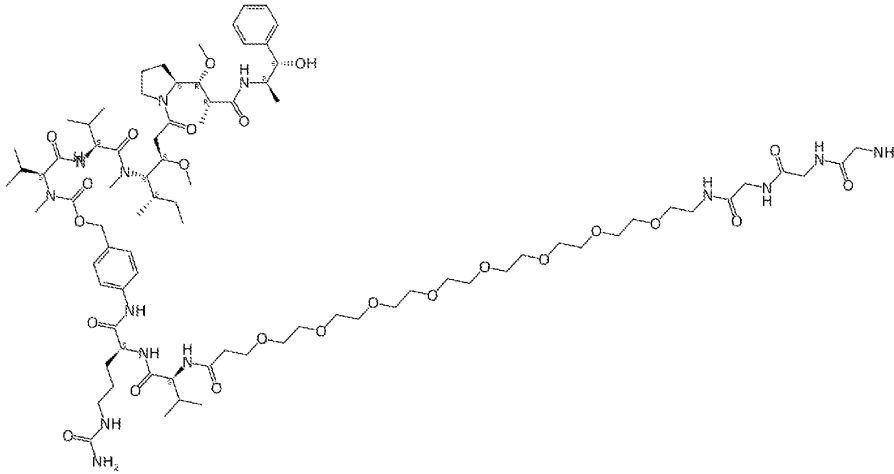
[0548] 표 21 C17 변이체에 기초한 접합체

명칭
C33-54FSY
C33-52FSY
C33-52TYR
C33-54TYR

[0549]

[0550] sdAb 구축물을 GGG-PEG8-vc-PABC-MMAE에 접합시키기 위해, C32-54TYR, C32-54 FSY, C32-52TYR 및 C32-52FSY 화합물을 상기와 같이 정제하였다. 화합물을 PBS pH 7.4 중에서 인큐베이션하고, 1 mM CaCl₂, 10 당량의 링커 페이로드 (10% DMA 중 원액 10mM) 및 소르타제 (2 mg 소르타제/10mg sdAb)와 함께 인큐베이션하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 반응물을 2 mL Ni 수지 (PBS 평형화됨)에 배치 결합시켜 실온에서 30분 동안 미동시키면서 소르타제 및 비접합된 물질을 제거하였다. 비드를 회전시켜 미결합 분획으로부터의 수지의 분리를 용이하게 하고 (700g x 10분, 20°C), 관통물을 유리 칼럼에 로딩하여 수집하고, 비드를 PBS로 세척하여 남아있는 단백질을 수집하였다. 관통물 및 세척물을 합하고, 농축시키고 (5K MWCO, 4k rcf, 10°C, 1.5시간), 하이로드 26/600 슈퍼팩스 75 pg (시티바, # 28-9893-34) 상에 로딩하여 비접합된 염료를 제거하였다. 분획을 수집하고, SDS-PAGE에 의해 분석하고, 풀링하고, -80°C에서 저장하였다.

[0551] GGG-PEG8-VC-PABC-MMAE:



[0552]

[0553] 52 및 54 위치에 TYR 또는 FSY를 함유하는 C33 접합체 (표 21)를 인간 유방암 세포주 BT-474 (HER2+)에의 결합에 대해 평가하였다. 단백질을 FACS 완충제 (1xPBS + 2% HI-FBS+ 5mM EDTA) 중에 3 μM (1x 최종)로 희석한 다음, 3x 연속 희석하여 검정을 위한 8개의 농도 포인트를 생성하였으며, 최저 농도는 0.00384 μM (1x 최종)이었다.

[0554] BT-474 세포주 (ATCC HTB-20)를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청 (씨모 피서, FB-12)으로 보충된 RPMI-1640 (씨모 사이언티픽, 11875-903)으로 이루어진 성장 배지 중에 유지하였다. 세포를 지수 성장기에서 수거하고, 빙냉 pH 6.0 FACS 완충제 (PBS pH6.0/2% FBS/5mM EDTA) 중에 1.0x10⁶ 개/mL로 재현탁시키고, v-바닥 96-웰 플레이트 (코닝 3897) 내에 100 μl/웰로 분취하였다. 세포를 2000 rpm으로 2분 동안 펠릿화한 다음, 100 μL/웰로 이중으로 pH6.0 FACS 완충제 중 시험 물품의 적정물 중에 재현탁시켰다. 얼음 상에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 2000 rpm으로 2분 동안 펠릿화한 다음, 200 μl FACS 완충제로 2회 세척하였다. 이어서, 세포를 AF488 염소 항-알파카 VHH 항체 (잭슨 이뮤노리서치 128-547-232)의 1:100 희석물을 함유하는 100 μl의 빙냉 FACS 완충제 pH 7.4 중에 재현탁시켰다. 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 2000 rpm으로 2분 동안 펠릿화하고, 200 μl FACS 완충제로 2회 세척한 다음, 100 μL pH 7.4 FACS 완충제 중에 재현탁시키고, 노보사이트 유동 세포측정기 (ACEA/애질런트)로 분석하였다.

[0555] 미가공 데이터 (FCS 파일)를 플로우조 10.7.2로 분석하였다. FSC-A 및 SSC-A를 사용하여 총 무손상 세포를 확인한 다음, FSC-H 대비 FSC-A로 단일선을 게이팅 아웃하였다. 샘플의 AF488의 기하 평균 형광 강도를 추가 분석 및 플롯팅에 사용하였다. AF488 채널에 대한 기하 평균 형광 강도 (기하평균 또는 기하MFI)를 사용하여 그래프패드 프리즘 (V9.3.1)에서 '로그(효능제) 대 반응-가변 기울기 (4개의 파라미터)'를 사용하여 EC50을 계산하였다. 시험 물품은 용량-의존성 방식으로 BT-474 세포에 결합하였다. 표 22에 제시된 바와 같이 BT-474 세포의 염색 및 유동 세포측정법 후 EC50 값으로부터 시험 물품에 대한 결합 친화도를 측정하였다.

[0556] 표 22. BT-474 세포에 대한 결합 친화도

시험 물품 (접합체)	EC50 (nM) pH 6.0
C33-54FSY	4.6
C33-54TYR	2.5
C33-52FSY	49
C33-52TYR	160

[0557]

[0558] 이어서, 시험관내에서 불멸화된 HER2-발현 중앙 세포주에 특이적으로 세포독성 페이로드를 전달하는 공유 sdAb 접합체의 능력을 비-공유 sdAb 접합체에 비해 측정하기 위해 접합체를 세포 기반 검정에서 사용하였다. BT-474 세포주를 상기 기재된 바와 같이 유지하였다. 세포를 트리플 익스프레스 (씨모 사이언티픽, 14175-095)를 사용하여 지수 성장기에서 수거하고, 100 μL 성장 배지 중에 넣어 흑색 96-웰 편평 투명 바닥 플레이트 (코스타, 3603)에 5000개 세포/웰로 시딩하였다. 이어서, 세포를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 밤새 인큐베이션하여 세포가 플레이트에 부착되도록 하였다. 다음 날, 1개의 플레이트를 CTG에 의해 분석하여 배경을 결정하였

다. 나머지 플레이트를 하기와 같이 C33-TYR 및 C33-FSY 접합체로 처리하였다: 표 23에 열거된 접합체를 성장 배지 중에 11x 최종 농도 (1.1 μM)로 희석한 다음, 5배 증분으로 희석하여 10-포인트 희석 시리즈를 생성하였다. 각각의 11x 시험 물품 희석 시리즈의 10μL의 부피를 웰에 삼중으로 첨가하여 1x의 최종 농도를 달성하였다. 한 세트의 플레이트를 5시간 동안 인큐베이터로 복귀시키고, 이 후에 각각의 웰을 100 μL 성장 배지로 1회 서서히 행군 다음, 성장 배지 (100 μL/웰)를 교체하고, 세포를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 6일 동안 배양함으로써 시험 물품을 세척하였다. 또 다른 세트의 플레이트를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 전체 6일 동안 시험 물품과 함께 인큐베이션하였다. 제6일에, 세포 생존율을 평가하기 위해, 모든 배양된 플레이트의 성장 배지를 제거하고, 셀타이터-글로 (프로메가, G5737)를 동등 부피의 PBS와 혼합하고, 모든 플레이트에 100 μL/웰로 첨가한 다음, 플레이트를 실온에서 1분 동안 1000rpm으로 진탕하였다. 이어서, 발광을 빅터 X5 플레이트 판독기 (피킨엘머) 상에서 판독하고, 상대 발광 단위 (RLU)로서 보고하였다. 생존율을 엑셀 (마이크로소프트 365 MSO, 버전 2202 빌드 16.0.14931.20128, 64-비트용 마이크로소프트® 엑셀®)에서 % 생존율 = 100*(처리된 RLU-배경 RLU/비처리된 RLU-배경 RLU)로서 계산하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 (V9.3.1)에서 % 생존율 대 시험 물품의 농도로서 플롯팅하고, IC50을 로그 [억제제] 대 반응 - 가변 기울기 (4 개의 파라미터)를 사용하여 계산하였다.

[0559] 결과가 도 23 및 표 23에 제시된다. 도 23a는 5시간 휴약을 보여주고, 도 23b는 연속 6일 노출을 보여준다. 모든 용량 반응 분석을 삼중으로 수행하였으며, 기호는 평균을 나타내고, 오차 막대는 STDEV를 나타낸다. FSY 변이체는 5-시간 휴약 연구 및 6-일 연속 노출 실험에서 그의 TYR 대응물에 비해 증가된 세포독성을 나타냈으며, 이는 공유 형태의 우수한 세포 효력을 나타낸다.

[0560] 표 23. 5시간 휴약 및 6일 노출에서 세포 세포독성에 대한 IC50 값.

명칭	IC50 (nM) - 5h	IC50 (nM) - 6일
C33-52TYR	>100	8.417
C33-52FSY	>100	1.599
C33-54TYR	21.56	0.3279
C33-54 FSY	1.00	0.106

[0561]

[0562] 실시예 24 이중과라토프 구축물의 평가 - 결합

[0563] 일련의 단일과라토프 sdAb 및 이중과라토프 sdAb를 FSY가 존재 및 부재하도록 표 24에 제시된 바와 같이 제조하고, PSMA 표적에 가교하는 그의 능력에 대해 비교하였다. 단백질을 일반적으로 실시예 2의 방법에 따르되 실시예 19에 나타난 바와 같이 변형을 가하여 발현시켰다.

[0564] 표 24 단일- 및 이중-과라토프 구축물

화합물 ID	구축물
C34-TYR	C2-54TYR-C24-101TYR
C34-FSY	C2-54TYR-C24-101FSY
C35-TYR	C24-101TYR-C24-101TYR
C36-FSY	C24-101FSY-C24-101FSY
C2-54TYR	C2-54TYR
C24-101TYR	C24-101TYR
C24-101FSY	C24-101FSY

[0565]

[0566] 일반적으로 실시예 14의 방법에 따르되 하기 변형을 가하여 유동 세포측정법을 사용하여 시험 물품을 PSMA+ LNCaP 인간 전립선 종양 세포에의 결합에 대해 평가하였다.

[0567] C34-TYR, C35-TYR 및 C2-54TYR을 FACS 완충제를 사용하여 3μM (1x 최종)으로 제제화한 다음, 5x 연속 희석하여 검정을 위한 12개의 농도 포인트를 생성하였으며, 최저 농도는 0.06 pM (1x 최종)이었다. 별도의 실험에서, C24-101TYR을 FACS 완충제로 제제화한 다음, 5x 연속 희석하여 검정을 위한 8개의 농도 포인트를 생성하였으며,

최저 농도는 38.4 pM (1x 최종)이었다. 검정에서의 LNCaP 세포는 모두에 대해 120,000개 세포/웰이었으며, 예외로 C24-101TYR은 160,000개/웰이었다. 얼음 상에서 2시간 동안 시험 물질과 함께 인큐베이션한 후, 세포를 세척당 200 μL/웰의 FACS 완충제 (500 x g, 3분)로 2회 세척한 다음, 암실에서 5 μg/ml의 알렉사 플루오르 488 아피니튜어 염소 항-알파카 IgG, VHH 도메인 (잭슨 이뮤노리서치, 코드: 128-545-230) 2차 항체를 함유하는 100 μL의 빙냉 FACS 완충제와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충제로 2회 세척하고 (200 μL/세척), 노보익스프레스 소프트웨어 버전 1.5.0을 사용하여 노보사이트 2060 (s/n 45-1-1511-2036-9) 유동 세포측정기 상에서의 획득을 위해 100 μL FACS 완충제 중에 재현탁시켰다. 미가공 데이터 (FCS 3.1 파일)를 분석하여 알렉사 플루오르-488 (FITC 채널 내)의 기하 평균 강도를 결정하였다 (플로우조 v.10.8.1, 윈도우). 샘플의 알렉사 플루오르-488의 기하 평균 강도의 평균 및 STDEV를 그래프패드 프리즘 (v 9.3.1)에서 시험 물질의 로그 농도에 대해 플롯팅하였다. EC50을 방정식 '로그(효능제) 대 반응-가변 기울기 (4개의 파라미터)'로 계산하였다. 데이터를 가시화하기 위해, 결합 곡선을 프리즘에서 각각의 시험 물질에 대해 정규화하였으며, 여기서 각각의 시험 물질에 대한 최저 값의 평균을 0%로 설정하고, 각각의 시험 물질에 대한 평균 최고 값을 100%로 설정하였다. 시험 물질에 대한 결합 친화도를 LNCaP 세포의 유동 염색 후 EC50 값으로부터 측정하였으며, 이는 표 25에 제시된다. 이중파라토프 단백질은 용량 의존성 방식으로 LNCaP 세포에 결합하였다. 데이터는 친화도가 모 단량체 화합물과 비교하여 증가하는 것으로 관찰되었기 때문에, 이중파라토프 화합물의 결합에서의 결합력 효과를 시사한다.

[0568] 표 25. LNCaP 세포에서의 결합 친화도

	C34-TYR	C35-TYR	C2-54TYR	C24-101TYR
EC50	2.30 nM	12.26nM	6.75nM	> 500nM
EC50 범위	2.16 내지 2.46 nM	11.48 내지 13.09 nM	5.06 내지 9.19 nM	N/A
R 제곱	0.99	0.99	0.99	0.99

[0569] 실시예 25 표적 세포에 대한 FSY-변형된 이중파라토프 구축물의 가교

[0570]

[0571] PSMA를 발현하는 세포에 대한 C34-FSY 및 C36-FSY의 가교를 1가 C24-101FSY와 비교하였다. 성장 배지 중 LNCaP 세포를 폴리-L-리신으로 코팅된 12-웰 플레이트에 250,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 시딩 48시간 후에, 배양 배지를 제거하고, 표 26에 나타난 농도의 시험 화합물을 함유하는 0.4 mL 배양 배지를 1 또는 6시간 동안 첨가하였다. 세포를 0.5 mL/웰의 빙냉 1xPBS로 2회 헹구고, 0.15 mL/웰의 1x 프로테아제 억제제 각테일 함유 RIPA 완충제를 첨가하였다. 얼음 상에서 10분 인큐베이션 후, 트리밍된 200 μL 피펫 팁으로 플레이트를 스크레이핑함으로써 세포 용해물을 수집하였다. 용해물을 1.5 mL 에펜도르프 튜브로 옮기고, 4°C에서 10분 동안 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후, 상청액을 새로운 1.5 mL 에펜도르프 튜브로 옮기고, 0.2 mL/웰의 0.25% EDTA-트립신 (김코, 카탈로그 번호 25200-056)을 첨가하였다.

[0572] 변성된 샘플을 전기영동에 이어서, 1차 항체 항-인간 PSMA (인비트로젠, 카탈로그 번호 37-3900) 또는 내부 표준 항-GAPDH (셀 시그널링 테크놀로지, 카탈로그 번호 CST-2118)를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 아주르 바이오시스템 C600에 의해 영상을 획득하였다. GIMP 2.10.28을 사용하여 영상을 처리하였다. 웨스턴 블롯에서의 밴드의 밀도를 이미지J 1.51j8로 지침에 따라 결정하였다 (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#infobox:Densitometry>, Section 30.13). 가교된 PSMA 대 총 PSMA의 백분율을 하기 식으로 계산하였다: 가교된 PSMA의 밀도/(가교된 PSMA의 밀도 + 비가교된 PSMA의 밀도) x 100%. 밀도 대 각각의 시험 물질 (구축물)의 농도의 플롯이 도 24a 및 24b에 제시된다.

[0573] 웨스턴 블롯 결과는 도 25a 및 25b에 제시된다. 시험된 모든 3개의 구축물은 PSMA에 가교할 수 있었다. 이중 파라토프 구축물 C34-FSY는 단량체보다 더 높은 겔보기 분자량으로 이동한 가교된 밴드를 나타냈으며, 이는 복합체의 증가된 질량을 반영하고, 반면 C36-FSY 구축물은 훨씬 더 높은 겔보기 분자량을 갖는 가교된 밴드를 보였으며, 이는 2개의 PSMA 분자의 가교를 나타낸다. 모든 FSY 화합물에 대한 밴드의 강도는 시간 및 농도 의존성 방식으로 증가하였으며, 이는 특이적 가교를 나타낸다. 가교의 정량화는 두 이중파라토프 구축물이 단일파라토프 구축물보다 PSMA에 대해 더 효율적이고 더 강력한 가교를 나타냈다는 것을 보여주었다 (표 26 및 도 25a 및 25b).

[0574] 표 26. LNCaP 세포에서의 가교 동역학

	처리					
	C24-101FSY		C34-FSY		C36-FSY	
	1시간	6시간	1시간	6시간	1시간	6시간
농도 (nM)	가교된 PSMA (총 PSMA%)					
0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	3.2	3.8	2.8
1.0	0	2.4	14.8	21.5	13.8	23.7
10.0	4.6	28.45	56.9	78.7	58.7	74.2
100.0	28.5	71.0	63.3	87.1	82.7	87.9
1000.0	41.4	75.85	70.4	89.9	90.3	92

[0575] 실시예 26 세포독성 페이로드를 갖는 이중파라토프 접합체

[0577] 실시예 24 및 25에 일반적으로 기재된 방법에 따르되 하기 변형을 가하여 이중파라토프 sdAb 화합물에 접합된 세포독성 페이로드를 함유하는 시험 물품을 제조하였다. 이중파라토프 화합물에 대한 PEG8-VC-PABC-MMAE 링커 페이로드의 시스테인-말레이미드 접합을 가능하게 하기 위해, 화합물 C34-FSY 또는 C34-TYR을 코딩하는 플라스미드 서열을 C-말단에 또는 그 근처에 cys 잔기를 함유하도록 변형시키고, 화합물을 101 위치에 FSY 또는 TYR을 혼입시키도록 발현시키고, 접합시키고, 정제하였다.

[0578] 이중파라토프 화합물에 대한 PEG8-VC-PABC-MMAE 링커 페이로드의 소르태그-매개된 접합을 가능하게 하기 위해, 화합물 C34-FSY 또는 C34-TYR을 코딩하는 서열을 C-말단 소르타제 인식 및 His 태그 서열을 함유하도록 변형시키고, 화합물을 101 위치에 FSY 또는 TYR을 혼입시키도록 발현시키고, 접합시키고, 정제하였다.

[0579] PSMA를 발현하도록 조작된 PC3pip 세포주 및 PC3flu PSMA 음성 세포주를 실시예 22에 기재된 바와 같이 연구를 위해 유지, 시딩 및 제조하였다. 이중파라토프 sdAb-MMAE 접합체를 성장 배지 중에 50x 최종 농도로 희석하고, 3배 증분으로 희석하여 10-포인트 희석 시리즈를 생성하였다. 각각의 시험 물품 희석 시리즈를 웰에 삼중으로 첨가하여 각각의 시리즈에 대해 1x의 최종 농도 (최고 농도)를 달성하였다.

[0580] 한 세트의 플레이트를 5시간 동안 인큐베이터로 복귀시키고, 이 후에 각각의 웰을 100 µL 성장 배지로 1회 서서히 행군 다음, 성장 배지 (100 µL/웰)를 교체하고, 세포를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 6일 동안 배양함으로써 시험 물품을 세척하였다. 또 다른 세트의 플레이트를 37°C에서 5% CO2 하의 가습 환경에서 전체 6일 동안 시험 물품과 함께 인큐베이션하였다. 제6일에, 세포 생존율을 평가하기 위해, 모든 배양된 플레이트의 성장 배지를 제거하고, 셀타이터-글로 (프로메가, G5737)를 동등 부피의 PBS와 혼합하고, 모든 플레이트에 100 µl/웰로 첨가한 다음, 플레이트를 실온에서 1분 동안 1000rpm으로 진탕하였다. 이어서, 발광을 빅터 X5 플레이트 판독기 (피킨엘머) 또는 유사물 상에서 판독하고, 상대 발광 단위 (RLU)로서 보고하였다. 생존율을 엑셀 또는 유사한 프로그램에서 % 생존율 = 100*(처리된 RLU-배경 RLU/비처리된 RLU-배경 RLU)로서 계산하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 (V9.3.1) 또는 유사한 프로그램에서 % 생존율 대 시험 물품의 농도로서 플롯팅하고, IC50을 로그 [억제제] 대 반응 - 가변 기울기 (4개의 파라미터)를 사용하여 계산하였다.

[0581] 실시예 27 PSMA+ 종양의 치료를 위한 마우스 이중이식 모델

[0582] 마우스 이중이식 종양 모델에서 종양 성장의 제어에 대한 티로신 및 FSY-함유 단일파라토프 및 이중파라토프 접합체의 효과를 평가하기 위해, 세포주 LNCaP (PSMA+) 및 PC3 (PSMA-)을 사용하였다. 세포주를 실시예 20 및 21에 기재된 바와 같이 유지시키고, 확장시키고, Balb/C 누드 마우스 내로 이식하였다. 종양 크기가 ~200 mm³에 도달하였을 때, 이중파라토프 C34-TYR 또는 C34-FSY 접합체 (실시예 25), 단일파라토프 C26-54TYR 또는 C26-54FSY 접합체 (실시예 22) 또는 비히클을 상이한 용량 및 스케줄로, 예컨대 7일 동안 매일 5mg/kg으로 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 종양 크기를 캘리퍼 측정을 통해 매일 측정하여 시간 경과에 따른 종양 성장을 추적하였다. 1000mm³에 도달한 종양을 보유하는 동물을 희생시키고, 생존 시간을 기록하였다.

[0583] 실시예 28 - EGFR-표적화된 이중파라토프 구축물

- [0584] FSY를 갖는 EGFR-표적화된 sdAb (C4-109FSY, 서열식별번호: 17) 및 링커에 의해 연결된 2개의 EGFR-표적화된 sdAb를 갖는 이중과라토프 구축물 (C4-109 TYR 또는 FSY)-L1-C5 (이하 C37-TYR 또는 C37-FSY로 지칭됨, 서열식별번호: 69)을 실시예 2에 기재된 바와 같이 구축하고, 클로닝하고, 발현시켰다. 구축물을 성숙 단백질로부터 절단된 peIB 리더 서열 (서열식별번호: 15)로 합성하고, 6개의 C-말단 히스티딘을 His-태그 정제에 사용하였다. 이중과라토프 구축물 C37은 제1 sdAb C4와 제2 sdAb C5 사이에 GGGGSGGGGS (서열식별번호: 14) 링커를 함유한다.
- [0585] FSY-변형된 sdAb를 EGFR 가교 동역학에 대해 평가하였다. 단백질을 EGFR과 8:1 몰비로 인큐베이션하였다 (EGFR 최종 농도는 0.125 mg/mL, 1.25 μM이었음). 샘플을 0-180분의 시점에 취하고, 가교된 EGFR의 백분율을 SDS-PAGE에 의해 평가하였다. sdAb-EGFR 가교 밴드를 정량화함으로써 가교 밴드 백분율을 계산하고, 이미지 J를 사용하여 EGFR 밴드 강도를 정량화하였다.
- [0586] 샘플을 시간 0에서 360분까지 취하였다. 커플링의 동역학이 도 26-27에 제시된다. 이중과라토프 구축물을 FSY 변형을 갖는 sdAb C4 (C4-109FSY)만을 포함하는 단일과라토프 구축물과 비교하였다. 도 27에 제시된 바와 같이, 이중과라토프 구축물 C37-FSY는, 단일과라토프 구축물과 비교하여 반수-최대 가교까지의 감소된 시간에 의해 측정된 바와 같이, 단일과라토프 C4-109FSY 서열보다 더 급속하게 EGFR에 커플링되었다.
- [0587] 실시예 29: 이중-다중특이적 결합 접합체의 구축
- [0588] 종양 세포 항원과 같은 표적에 대한 sdAb ("표적 sdAb1")가 동일한 세포 상에서 발현되는 상이한 종양 세포 항원에 표적화된 sdAb ("표적 sdAb2")에 링커에 의해 연결된, 다수의 별개의 항원을 표적화하는 이중-이중특이적 FSY-함유 화합물을 구축하였다. 각각의 경우에, 표적 sdAb1, 표적 sdAb2 또는 둘 다는 FSY를 함유할 수 있다. 이어서, 이중특이적 구축물을 실시예 2에 기재된 바와 같이 pBAD 벡터 내로 클로닝하고, 발현시켰다.
- [0589] 실시예 2로부터의 C4-109FSY (또는 그의 변이체)를 Her3 표적화 sdAb (FSY 부재)와 연결함으로써 EGFR 및 Her3의 세포의 도메인을 표적화하는 이중-이중특이적 FSY-함유 화합물을 생성하였다. C4 (FSY 부재)에 연결된 Her3 표적화 sdAb (FSY 존재)를 포함하는 대안적 구축물을 생성하였다. 2개의 sdAb 아미노산 서열 사이에 서열 GGGGS 또는 유사물의 반복부를 함유하는 링커를 부가하여 구축물을 설계하였다. 이어서, 이중특이적 구축물을 실시예 2에 기재된 바와 같이 pBAD 벡터 내로 클로닝하고, 발현시켰다. 이중특이적 구축물에 대한 예시적인 예상 아미노산 서열이 하기에 제시된다.
- MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMGQVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAFSGRTFSMY
TMGWFRQAPGKEREFVAANRGRGLSPDIADSVNGRFTISRDNKNTLYLQMDSLKPED
TAVYYCAADLQYGSSWPQRSSAEYDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLE
ESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADS
VKGRFTISRDNKNTVDLQMNLSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGLTXYDYWGQGTQV
TVSSHHHHHHH**
- [0590]
- [0591] X는 FSY 혼입 부위의 위치를 나타내며; 볼드체 N 말단 잔기는 성숙 단백질로부터 절단된 peIB 리더 서열이다. C-말단 6 히스티딘은 친화도 정제에 사용되는 His-태그를 포함한다. 생성을 위한 다른 이중특이적 구축물은 Her3-EGFR, EGFR-Her2, Her2-Her3, Her3-Her3 (동일하거나 상이한 에피토프), EGFR-cMET 및 EGFR-CEA를 포함할 수 있다.
- [0592] 이중특이적 FSY-변형된 sdAb를 사용하는 접합체를 링커/페이로드의 화학적 커플링을 위한 고유한 접합 부위를 조작하는 것을 통해 제조하였다. 상기 기재된 이중특이적 FSY-변형된 구축물을 구축물의 C-말단에, 또는 변형되는 경우 각각의 표적에 대한 결합을 파괴하지 않는 구축물 내의 대안적 허용 부위에, 유리 Cys 잔기를 함유하도록 변형시켰다. 대안적 방법은 링커/페이로드의 소르타제-매개된 또는 트랜스-글루타미나제 매개된 라이게이션, 리신 잔기에 대한 NHS-에스테르 접합 또는 관련 분야에서 통상적인 다른 방법을 포함할 수 있다. 링커 페이로드에 대한 접합체를 표적화 도메인 (sdAb 또는 다른 결합 단백질), 링커 및 페이로드를 연결하도록 생성하였으며, 페이로드는 독성 페이로드, 킬레이트화된 방사성금속, 펩티드 또는 단백질 독소 또는 다른 기능적 세포 독성 화합물을 포함할 수 있다.
- [0593] 이중특이적 FSY-변형된 sdAb 또는 그의 접합체를 각각 EGFR 및 Her3과의 시험관내 생화학적 가교에 대해 평가하였다. 단백질을 EGFR 또는 Her3 수용체 도메인과 함께 과량의 화학량론적 비, 예컨대 5:1 또는 8:1로 인큐베이션하였다. 샘플을 인큐베이션하고, sdAb-FSY 화합물에 가교된 EGFR 또는 Her3의 백분율을 SDS-PAGE를 사용하여

겔 이동을 통해 평가하고, 밀도측정법에 의해 정량화하였다.

[0594] 이중특이적 FSY-변형된 sdAb 또는 그의 접합체를 ELISA를 사용하여 EGFR 및 Her3에 대한 동시 결합에 대해 평가하였다. Her3 또는 EGFR의 세포의 도메인을 마이크로타이터 플레이트의 표면에 흡착시키고, 광범위하게 세척하였다. 플레이트를 비-특이적 상호작용에 대해 차단하고, 이중특이적 FSY-변형된 sdAb를 첨가하고, 인큐베이션하여 결합하도록 하였다. 이어서, 웰을 세척하여 미결합 물질을 제거한 다음, 제2 수용체 서브유닛을 첨가하고, 인큐베이션하여 결합하도록 하였다. 플레이트를 다시 세척하여 미결합 화합물을 제거하고, 제2 수용체를 항-수용체 항체를 사용하여 검출하였다. 대안적으로, 제2 수용체 서브유닛을 수용체 도메인과 검출 시스템, 예컨대 HRP 또는 형광 염료 사이의 융합체 또는 접합체로서 첨가하고, 표준 비색 또는 형광 검출에 의해 검출하였다. 특이성에 대한 대조군으로서, 제1 수용체, 이중특이적 화합물 또는 제2 수용체의 첨가는 절차에서 생략하였다. 항-수용체 항체의 결합은 항-종 HRP 2차 항체, 스트렙타비딘 HRP로 검출되는 비오틴화 항-수용체 항체, 형광 염료 접합된 2차 항체 또는 ELISA 검출을 위한 다른 유사한 방법 표준을 통해 검출할 수 있다.

[0595] 이중특이적 FSY-변형된 sdAb 또는 그의 접합체를 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 EGFR 및 Her3에 대한 동시 결합에 대해 평가하였다. Her3 또는 EGFR 수용체의 세포의 도메인을 NHS-에스테르 화학 또는 다른 표준 방법을 통해 SPR 칩의 표면에 고정화시켰다. 이어서, 이중특이적 FSY-변형된 sdAb 화합물을 수용체 1 표면과 회합시킨 후, 세척하여 미결합 물질을 제거하였다. 3원 복합체를 조립하고 검출하기 위해, 이어서 제2 수용체 서브유닛을 주입하고, 신호를 측정하였다. 특이성에 대한 대조군으로서, 제1 수용체, 이중특이적 화합물 또는 제2 수용체의 첨가는 수용체 서브유닛 사이에 일부 친화도가 관찰될 수 있기 때문에 절차로부터 생략하였다.

[0596] 이중특이적 FSY-변형된 sdAb 또는 그의 접합체를 EGFR 및 Her3 양성 세포에 대한 특이적 결합에 대해 평가하였다. 일련의 상이한 농도의 시험 물품을 세포에 투여하고, 시험 물품의 용량-의존성 결합을 유동 세포측정법에 의해 또는 세포-기반 ELISA 또는 유사한 방법에 의해 검출할 수 있다. 관찰된 결합 신호에 대한 각각의 수용체 특이성의 기여를 결정하기 위해, 경쟁적 항체 (콜드 경쟁자)를 큰 화학량론적 과량으로 첨가하여 EGFR, Her3 또는 둘 다의 수용체의 시험 물품 결합을 길항시켰다. 인큐베이션하고 세척하여 미결합 길항제 항체를 제거한 후, 일련의 농도의 이중특이적 시험 물품을 세포에 첨가하고, 결합하도록 하였다. 인큐베이션하고 세척하여 미결합 시험 화합물을 제거한 후, 시험 물품을 화합물에 특이적인 항체, 예컨대 항-에피토프 태그 또는 항-sdAb 항체 또는 다른 방법에 의해 검출하였다. 항-시험 샘플 항체의 결합은 유동 세포측정법을 통해, 또는 항-종 HRP 2차 항체, 스트렙타비딘 HRP로 검출되는 비오틴화 항-수용체 항체, 형광 염료 접합된 2차 항체를 통한 ELISA에 의해 또는 ELISA 검출을 위한 다른 유사한 방법 표준을 통해 검출할 수 있다.

[0597] 이중특이적 FSY-변형된 sdAb 또는 그의 접합체를 시험관내에서 표적 항원 또는 항원들을 발현하는 종양 세포에 특이적으로 독성 페이로드를 시험관내 전달하는 것에 대해 평가하였다. 조작된 C-말단 Cys 잔기를 함유하는 구축물을 상기 기재된 일반적 방법을 사용하여 세포독성 페이로드, 예컨대 MMAE 또는 다른 부류의 고도-세포독성 화합물에 커플링시켰다. 용량-반응 곡선을 생성하고, 샘플을 시험관내에서 SKBR3 및 Colo320DM 세포와 함께 인큐베이션하였다. 특이성에 대한 대조군으로서, 제1 수용체, 제2 수용체 또는 둘 다에 대한 교차-반응 항체를 특정 샘플에 첨가하였다. 다양한 기간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 세척하여 유리 화합물을 제거하고, 세포 생존율을 프로메가 사이토스그린과 같은 검정 또는 리포터 화합물 검출, 프레스토 블루 CCK-8 또는 유사한 시약에 의한 생존 세포의 검출 및/또는 아넥신 V-FITC, 아이오딘화프로피듐 염색 또는 유사한 시약을 통한 아포토시스의 측정을 통해 세포 생존율을 측정하는 다른 검정을 사용하여 측정하였다.

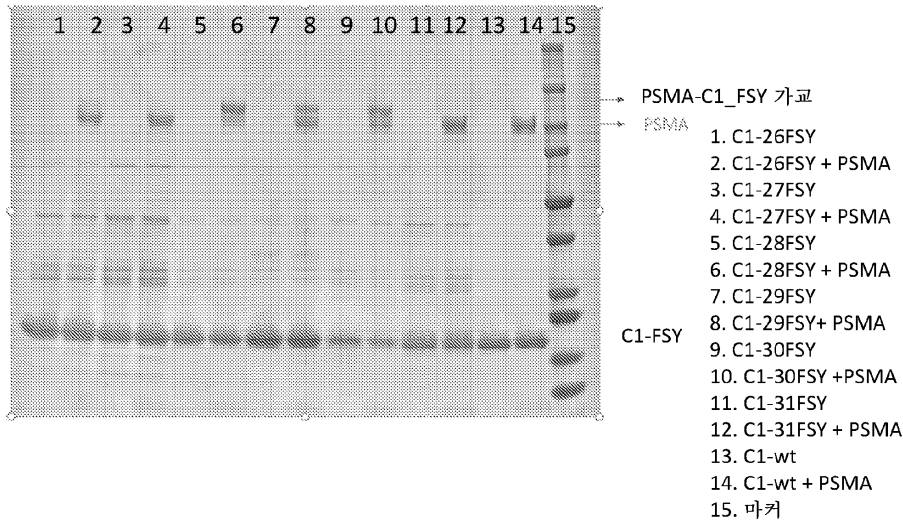
[0598] 이중특이적 FSY-변형된 sdAb 또는 그의 접합체를 종양 조직으로의 페이로드의 생체내 전달에 대해 평가하였다. 구축물 대 비-공유 sdAb 접합체의 종양 노출을 비교하기 위해, 형광단 표지를 대용 페이로드로서 사용하여 시간 경과에 따른 추적/생체분포 측정을 가능하게 하였다. 단일 잔기가 Tyr 또는 FSY로 치환된 sdAb 구축물을 말레이미드 화학 또는 상기 기재된 다른 방법을 통해 화학적 형광단 (알렉사680 또는 유사물)에 조작된 시스템 잔기를 통해 접합시키고, 상기 기재된 바와 같이 정제하였다. 형광단-표지된 sdADC 접합체 분자를 종양 항원 + 또는 - 이중특이적 종양을 보유하는 수컷 누드 마우스에 꼬리 정맥 IV 주사를 통해 투여하고, 시험 물품의 생체분포를 AmiX, IVIS 스펙트럼 영상화기 또는 유사물을 사용하여 전체-동물 영상화를 통해 시간 경과에 따라 관찰하였다. 종양-특이적 및 말초 노출을 영상 밀도측정법을 통해 정량화하고, sdAb의 FSY 버전과 Tyr 버전을 비교하였다. 영상화에 추가로, 종양 샘플을 수집하고, 겔-기반 검출 방법, 예컨대 웨스턴 블롯 또는 형광 영상화를 위해 처리하여, 투여 후 시간 경과에 따라 종양 조직 내 가교된 sdAb-수용체 복합체 및 유리 sdAb를 검출하였다.

[0599] 본 개시내용의 바람직한 실시양태가 본원에 제시되고 기재되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는

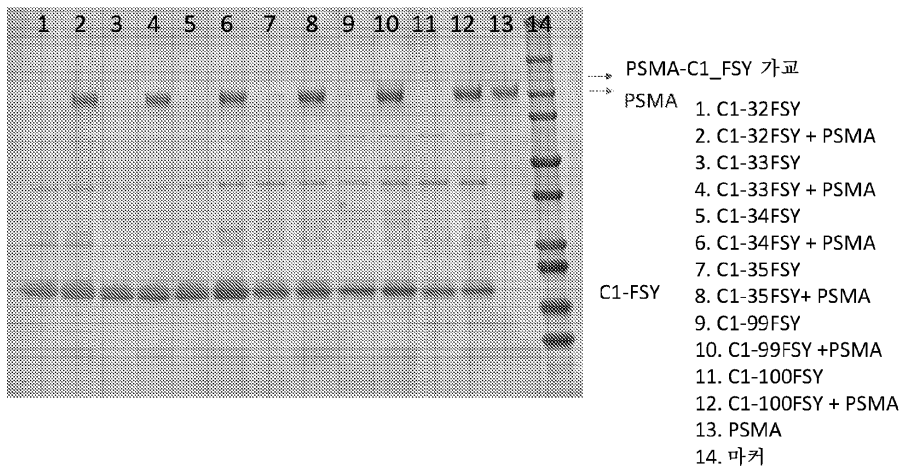
것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본 개시내용으로부터 벗어나지 않으면서 수많은 변형, 변화 및 치환이 이제 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 일어날 것이다. 본원에 기재된 본 개시내용의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 개시내용을 실시하는 데 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 하기 청구범위는 본 개시내용의 범주를 규정하고, 이들 청구범위의 범주 내의 방법 및 구조 및 그의 등가물은 그에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

도면

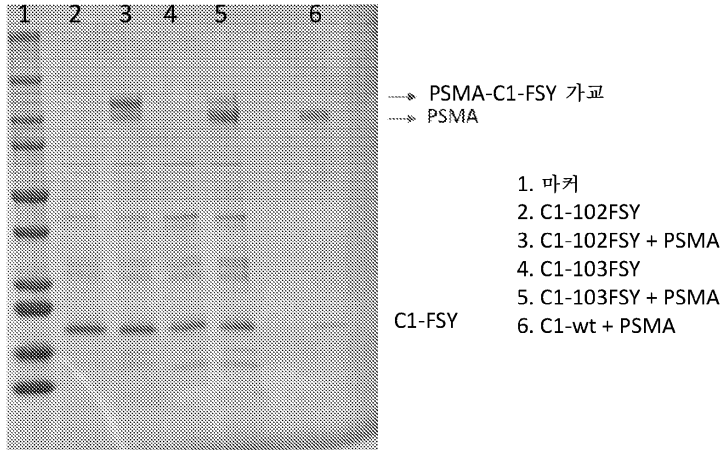
도면1a



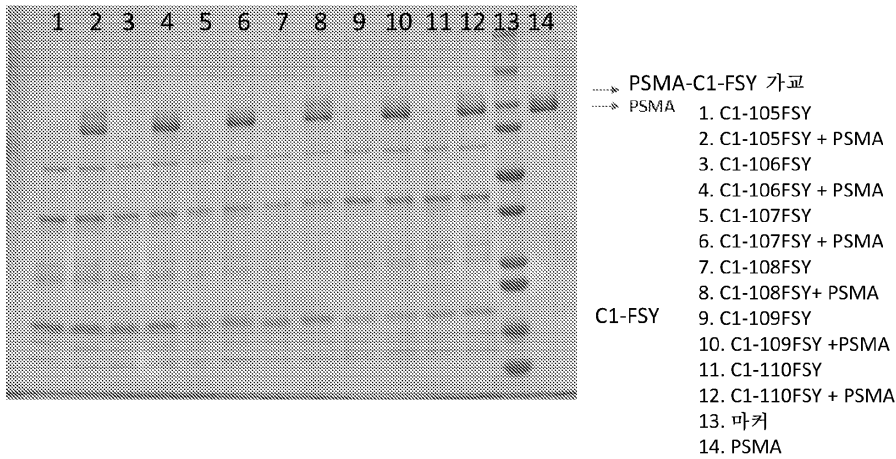
도면1b



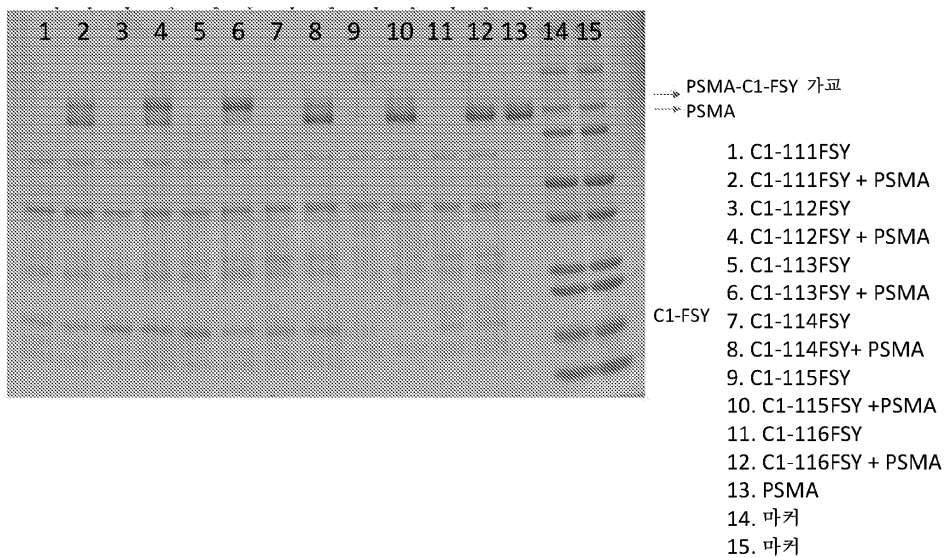
도면1c



도면1d

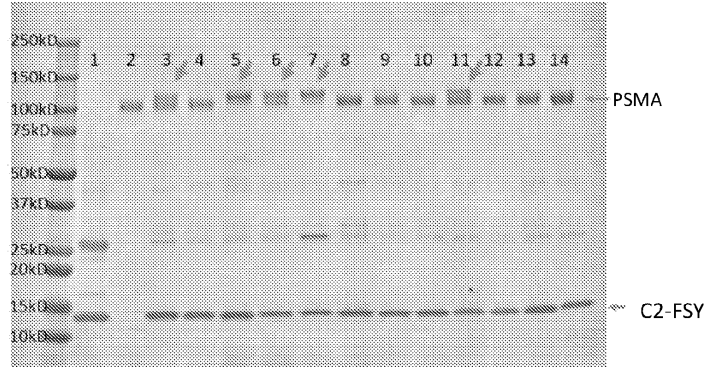


도면1e



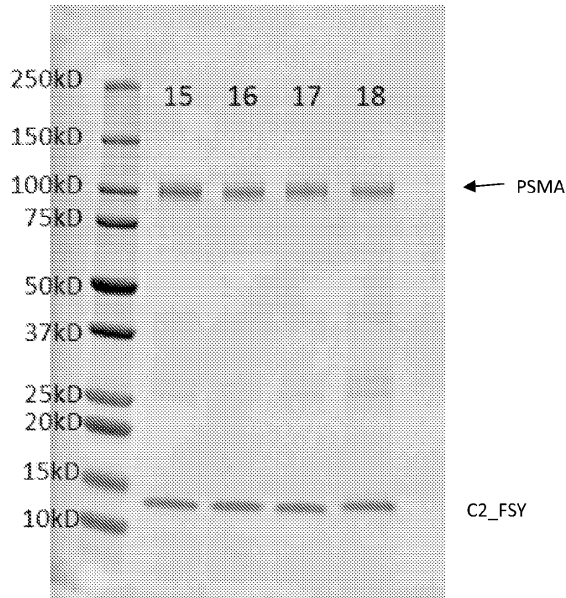
도면2a

1. C2-CDR2 풀
2. PSMA
3. C2-50FSY+PSMA
4. C2-51FSY+PSMA
5. C2-52FSY+PSMA
6. C2-53FSY+PSMA
7. C2-54FSY+PSMA
8. C2-55FSY+PSMA
9. C2-56FSY+PSMA
10. C2-57FSY+PSMA
11. C2-58FSY+PSMA
12. C2-59FSY+PSMA
13. C2-60FSY+PSMA
14. C2-61FSY+PSMA



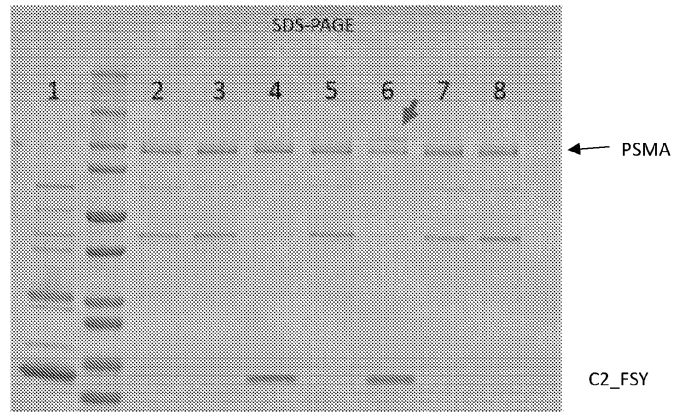
도면2b

15. C2-62FSY+PSMA
16. C2-63FSY+PSMA
17. C2-64FSY+PSMA
18. C2-65FSY+PSMA

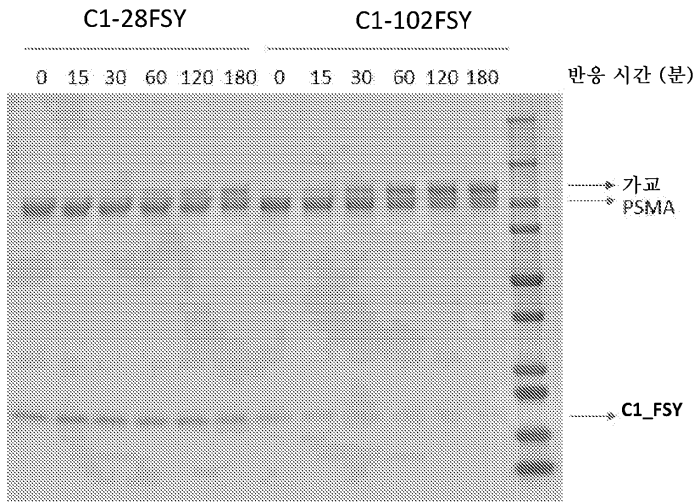


도면2c

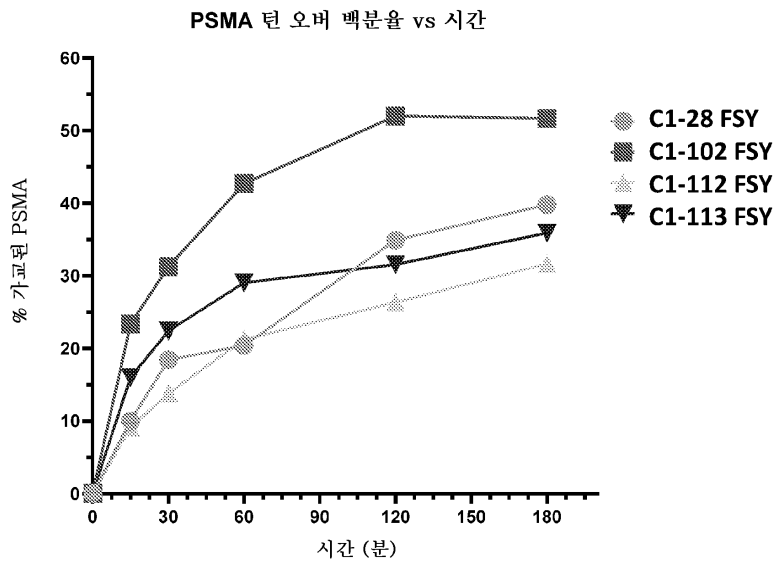
1. C2-CDR 3 풀
2. C2-96FSY+PSMA
3. C2-97FSY+PSMA
4. C2-98FSY+PSMA
5. C2-99FSY+PSMA
6. C2-100FSY+PSMA
7. C2-101FSY+PSMA
8. C2-102FSY+PSMA



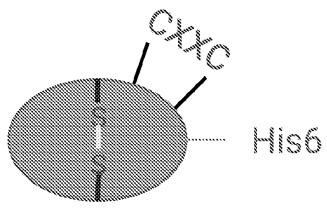
도면3a



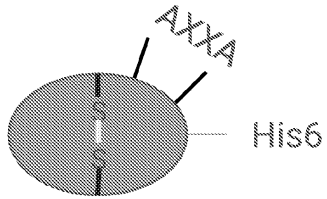
도면3b



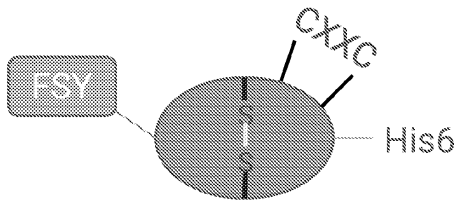
도면4



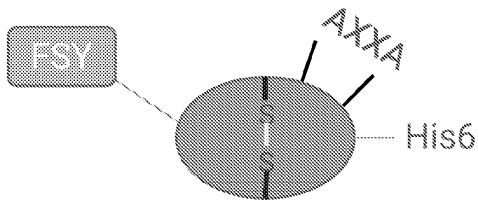
C1



C39

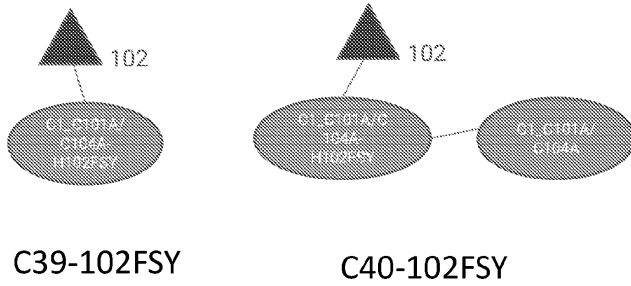
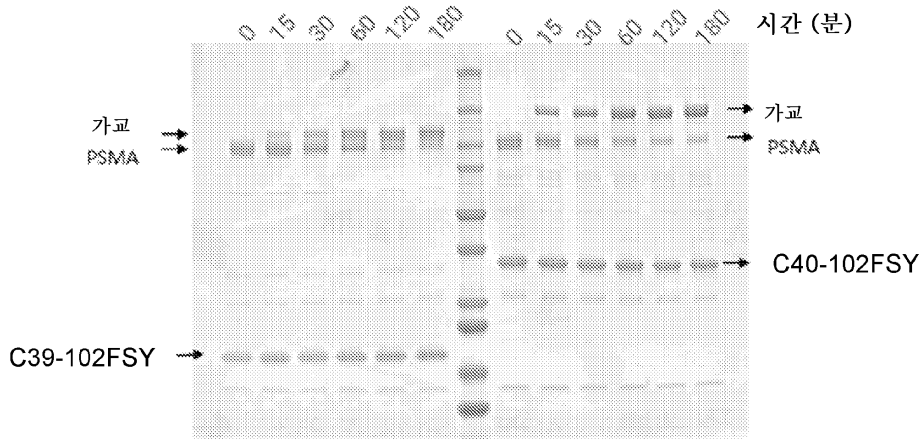


C1- 102FSY

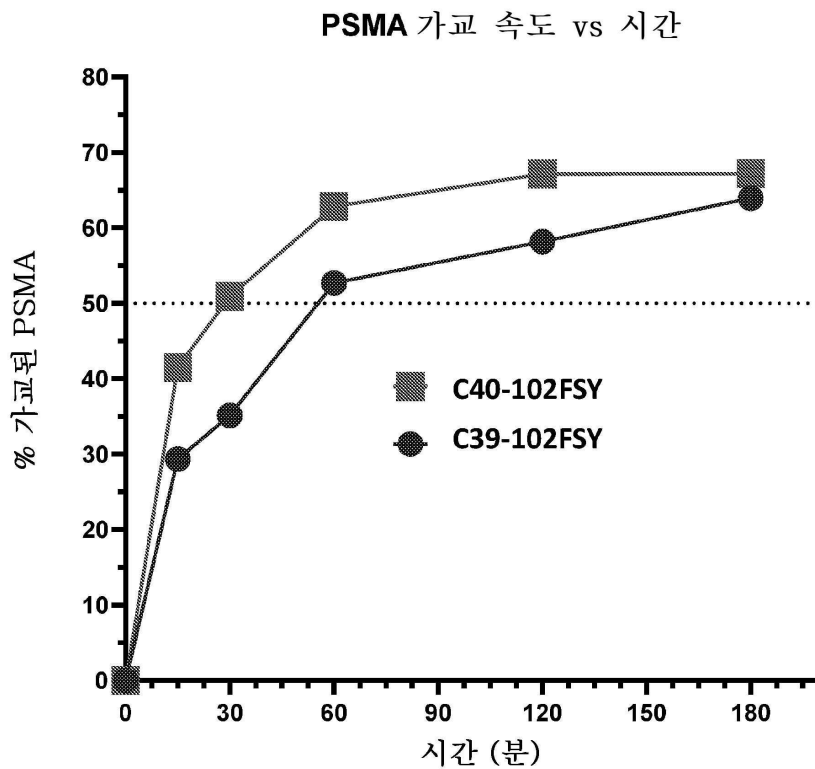


C39- 102FSY

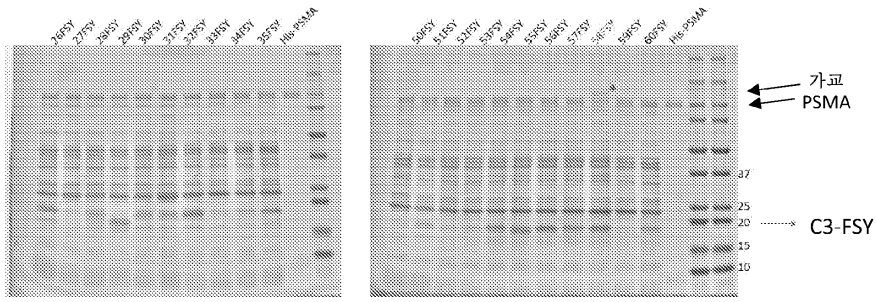
도면5a



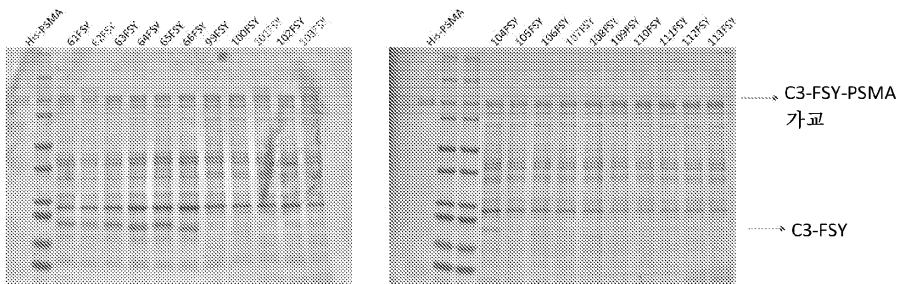
도면5b



도면6a

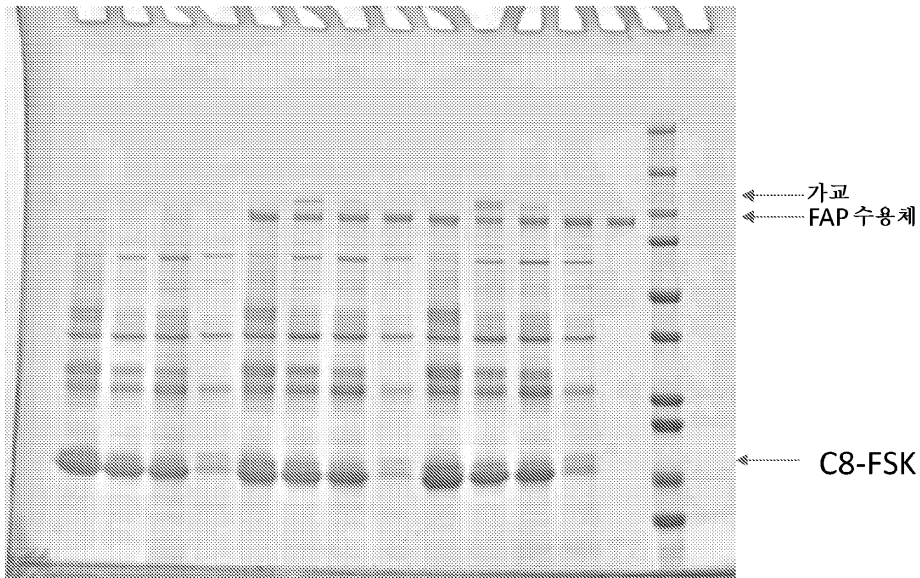


도면6b



도면7a

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

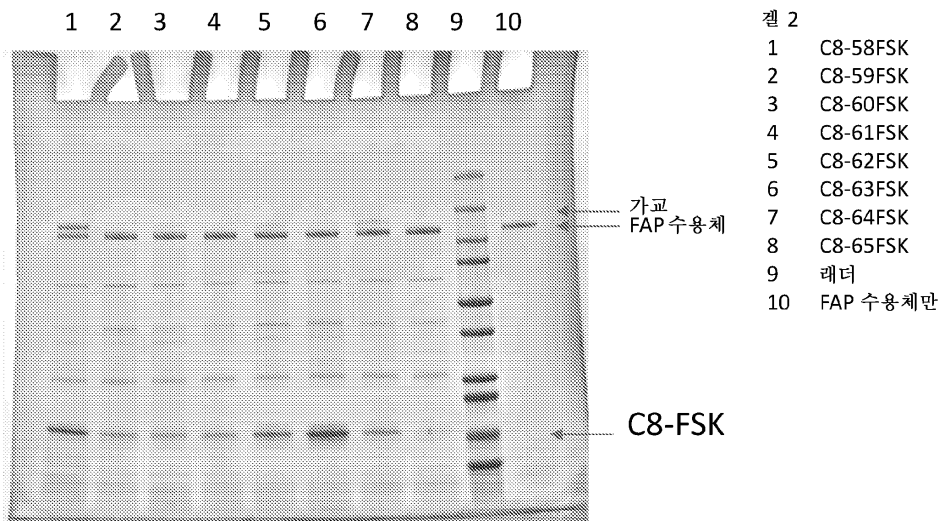
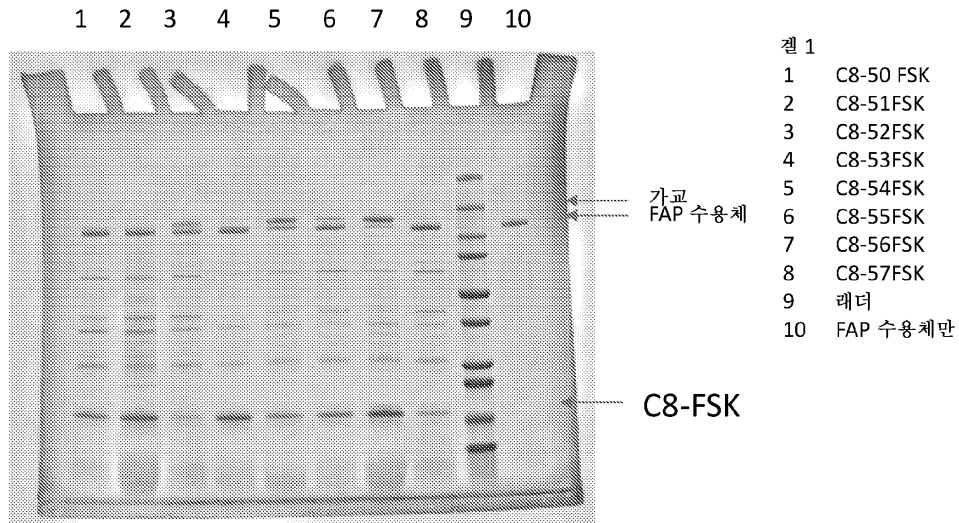


1: 풀 1
2: 풀 2
3: 풀 3
4: 풀 4

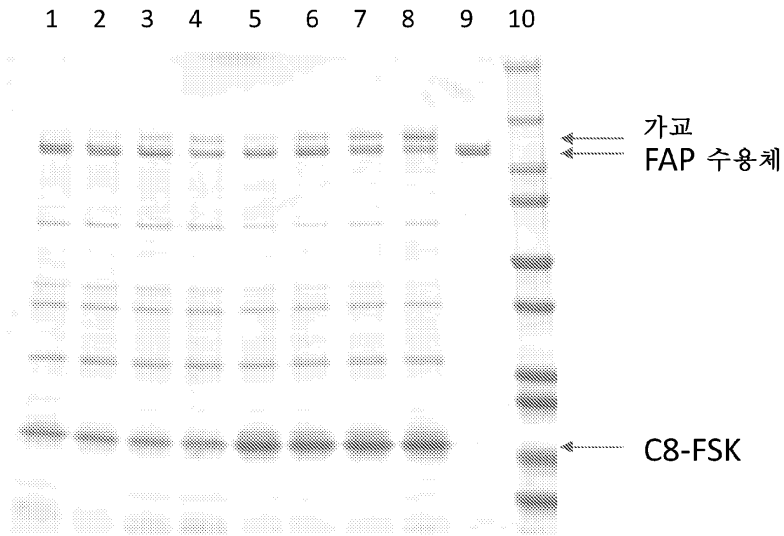
5: 풀 1+ (1hr)
6: 풀 2+ (1hr)
7: 풀 3+ (1hr)
8: 풀 4+ (1hr)

9: 풀 1+ (2hr)
10: 풀 2+ (2hr)
11: 풀 3+ (2hr)
12: 풀 4+ (2hr)
12: FAP 수용체만
14: 래더

도면7b

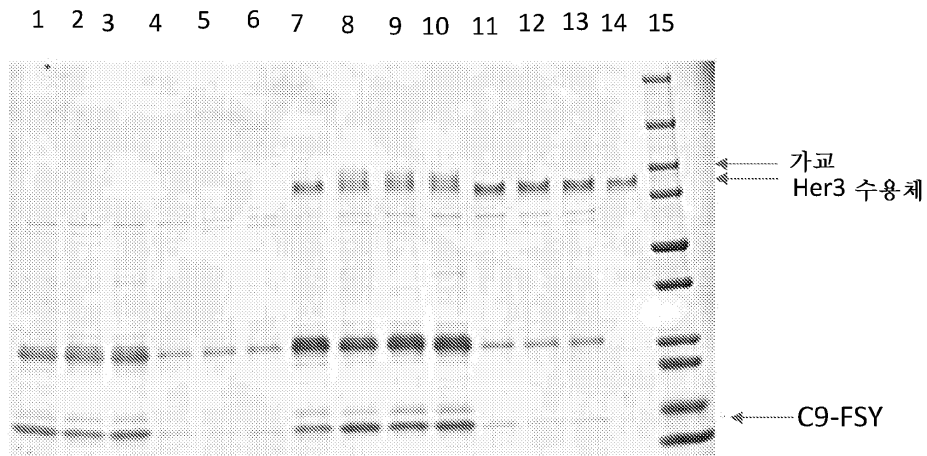


도면7c



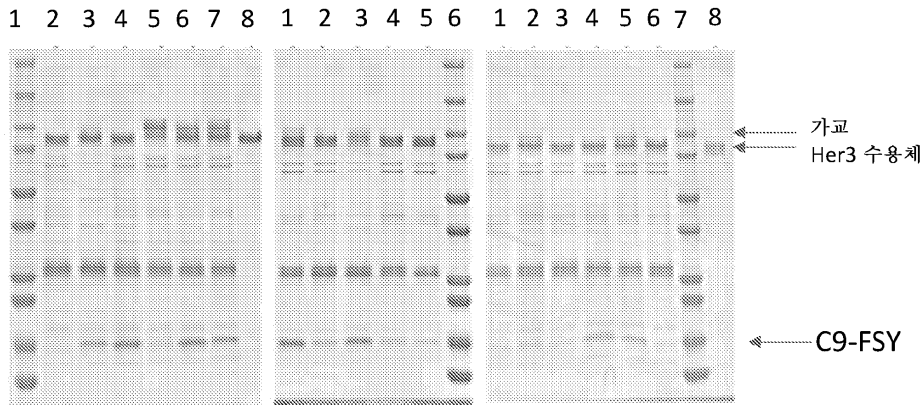
- 1 C8-54FSK 15 분
- 2 C8-54FSK 30 분
- 3 C8-54FSK 60 분
- 4 C8-54FSK 120 분
- 5 C8-56FSK 15 분
- 6 C8-56FSK 30 분
- 7 C8-56FSK 60 분
- 8 C8-56FSK 120 분
- 9 래더
- 10 FAP 수용체만

도면8a



- 1 C9-FSY 풀 2
- 2 C9-FSY 풀 3
- 3 C9-FSY 풀 4
- 4 C9-FSY 풀 5
- 5 C9-FSY 풀 6
- 6 C9-FSY 풀 7
- 7 C9-FSY 풀 1 + Her3
- 8 C9-FSY 풀 2 + Her3
- 9 C9-FSY 풀 3 + Her3
- 10 C9-FSY 풀 4 + Her3
- 11 C9-FSY 풀 5 + Her3
- 12 C9-FSY 풀 6 + Her3
- 13 C9-FSY 풀 7 + Her3
- 14 Her3 수용체만
- 15 래더

도면8b



패널 1

- 1 래더
- 2 C9-52FSY + Her3
- 3 C9-53FSY + Her3
- 4 C9-54FSY + Her3
- 5 C9-55FSY + Her3
- 6 C9-56FSY + Her3
- 7 C9-57FSY + Her3
- 8 Her3 만

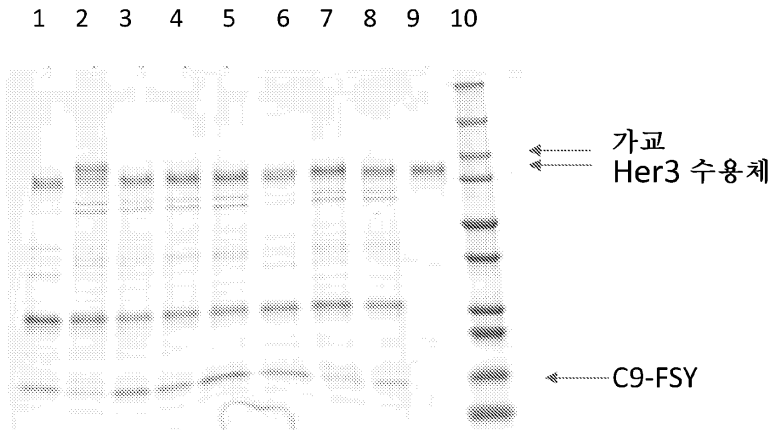
패널 2

- 1 C9-58FSY + Her3
- 2 C9-59FSY + Her3
- 3 C9-60FSY + Her3
- 4 C9-61FSY + Her3
- 5 C9-62FSY + Her3
- 6 래더

패널 3

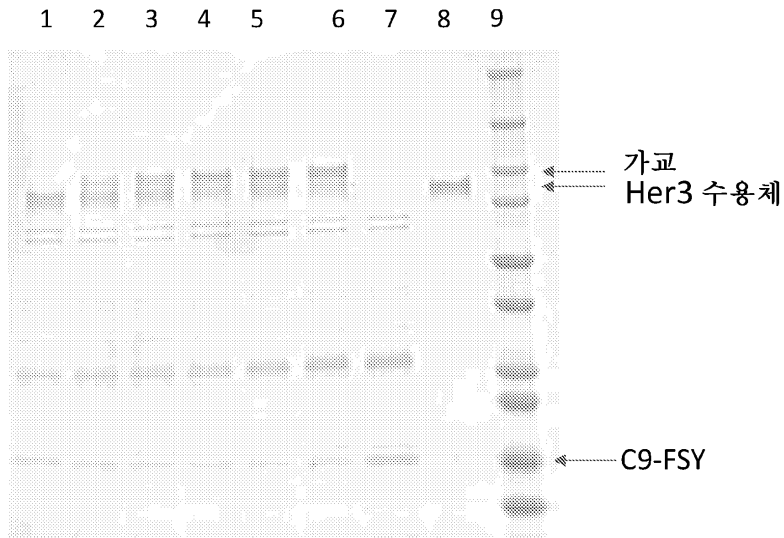
- 1 C9-63FSY + Her3
- 2 C9-64FSY + Her3
- 3 C9-65FSY + Her3
- 4 C9-66FSY + Her3
- 5 C9-67FSY + Her3
- 6 C9-68FSY + Her3
- 7 래더
- 8 Her3 만

도면8c



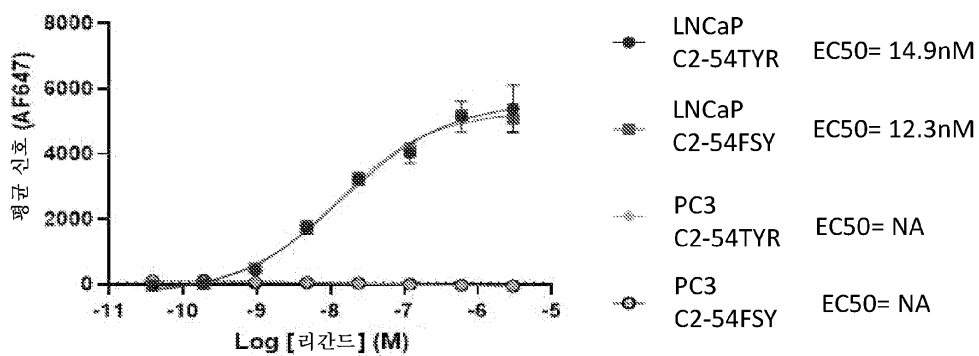
- 1 C9-53FSY + Her3
- 2 C9-55FSY + Her3
- 3 C9-56FSY + Her3
- 4 C9-57FSY + Her3
- 5 C9-58FSY + Her3
- 6 C9-60FSY + Her3
- 7 C9-64FSY + Her3
- 8 C9-67FSY + Her3
- 9 Her3만
- 10 래더

도면8d

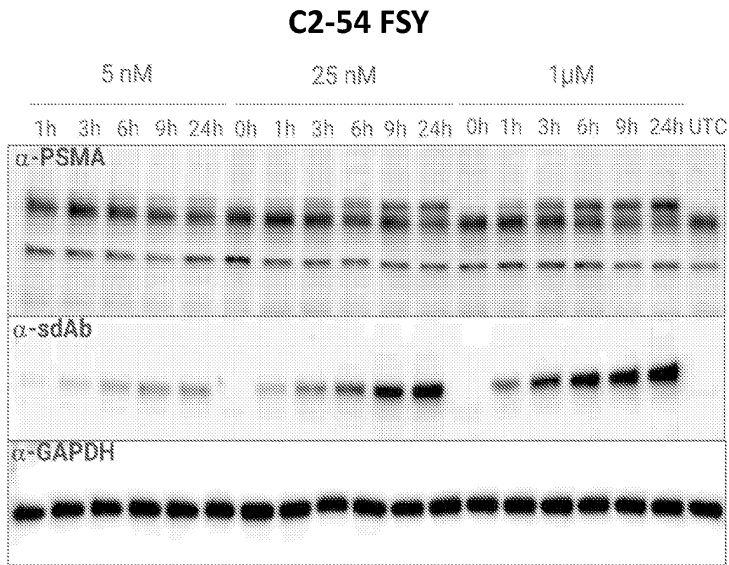


- 1 C9-55FSY + Her3 0 분
- 2 C9-55FSY + Her3 15 분
- 3 C9-55FSY + Her3 30 분
- 4 C9-55FSY + Her3 60 분
- 5 C9-55FSY + Her3 120 분
- 6 C9-55FSY + Her3 180 분
- 7 C9-55FSY 만
- 8 Her3 수용체만
- 9 래더

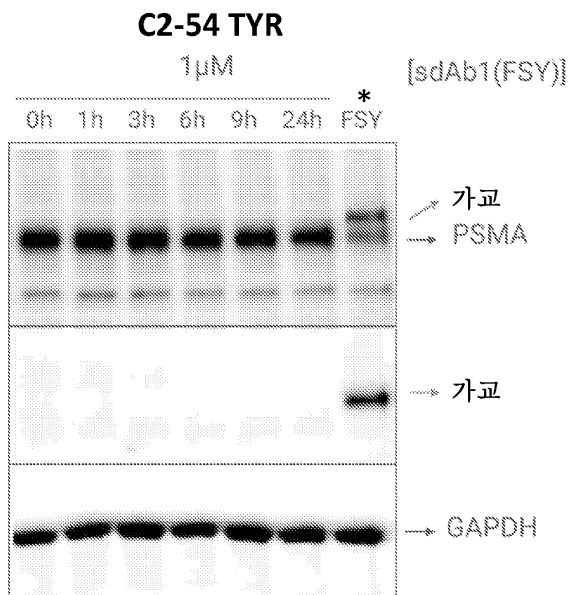
도면9



도면10a

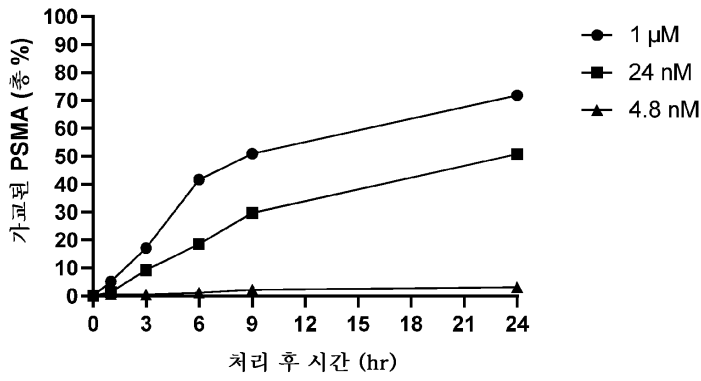


도면10b

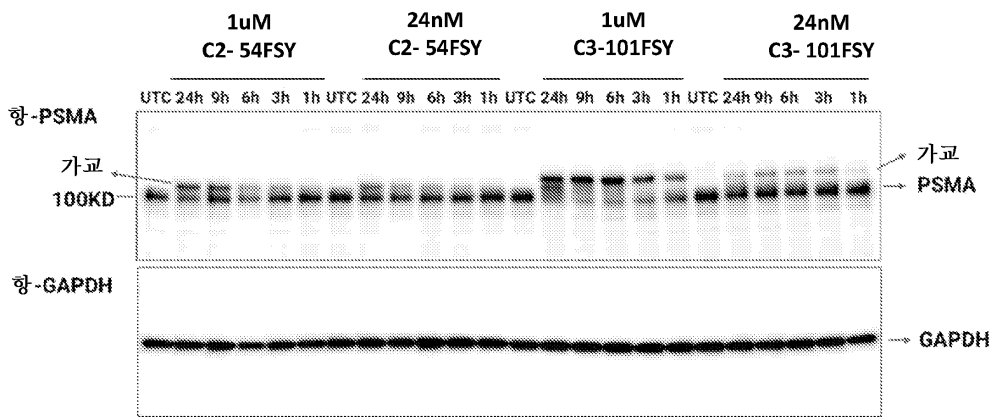


* 9시간 동안 1 μ M C2 54 FSY로 처리된 LnCAP 세포

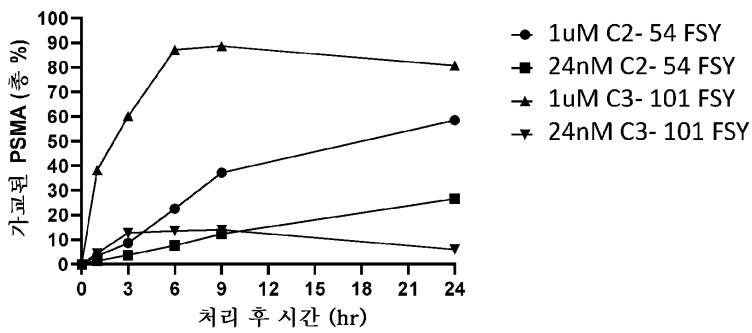
도면10c



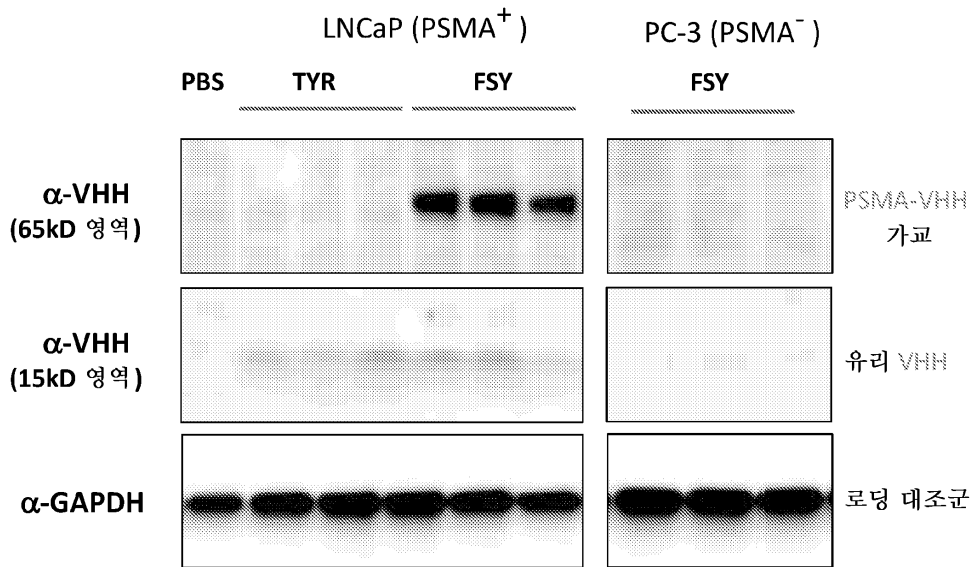
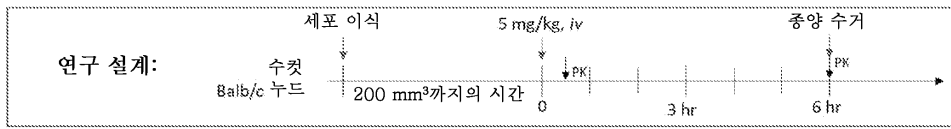
도면11a



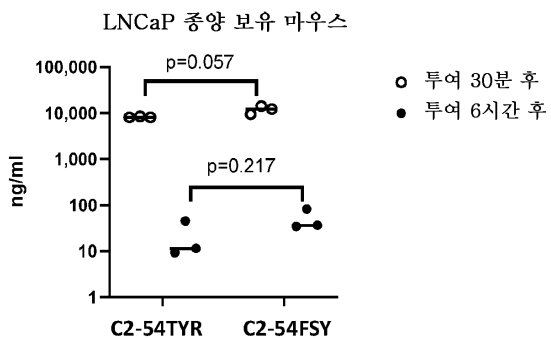
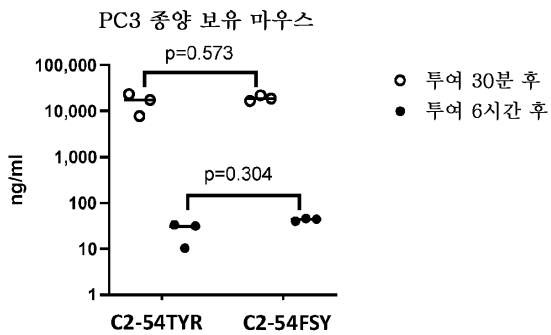
도면11b



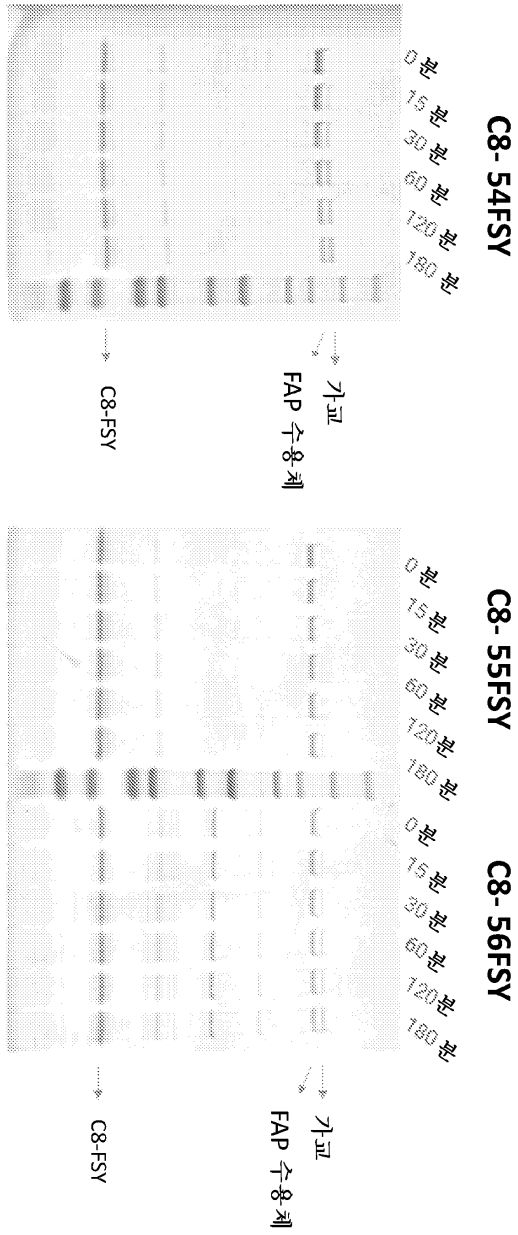
도면12a



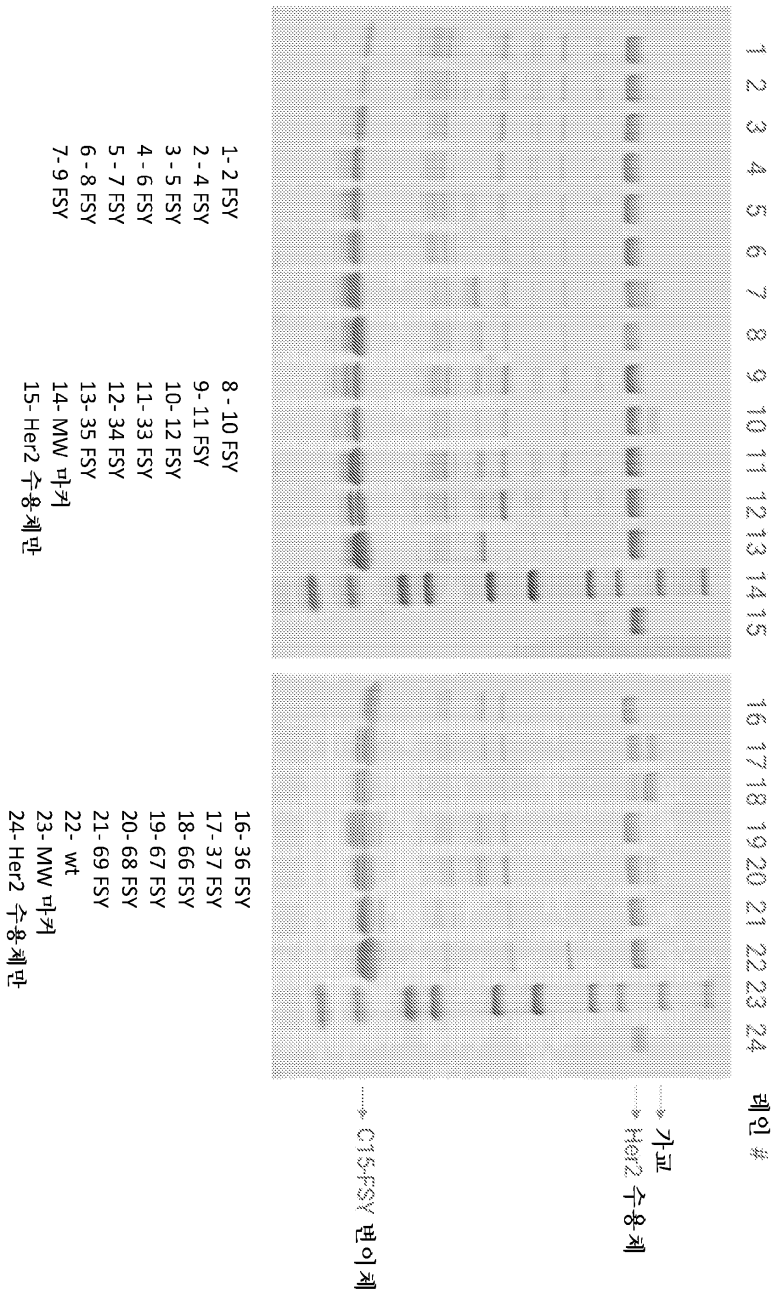
도면12b



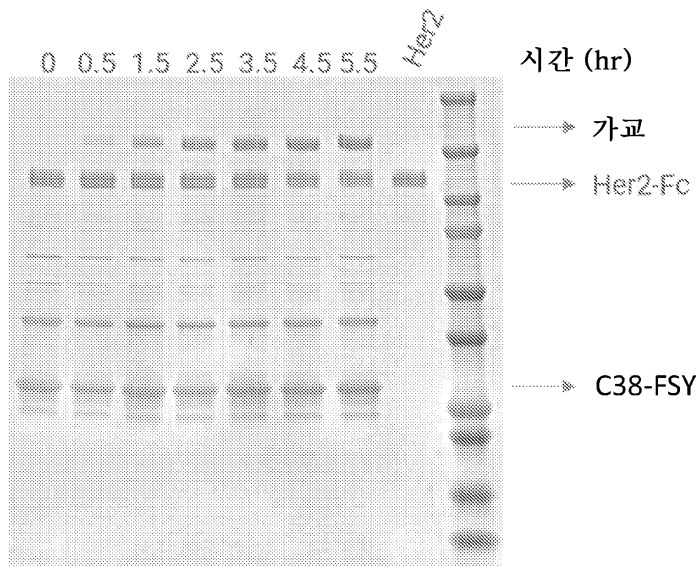
도면13



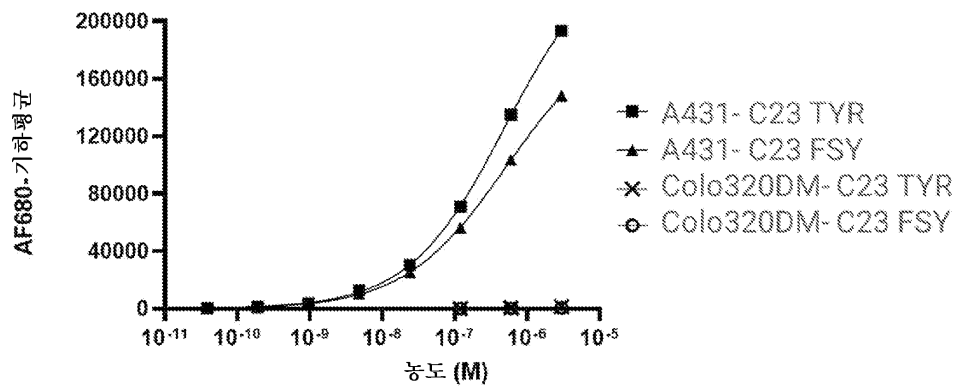
도면14



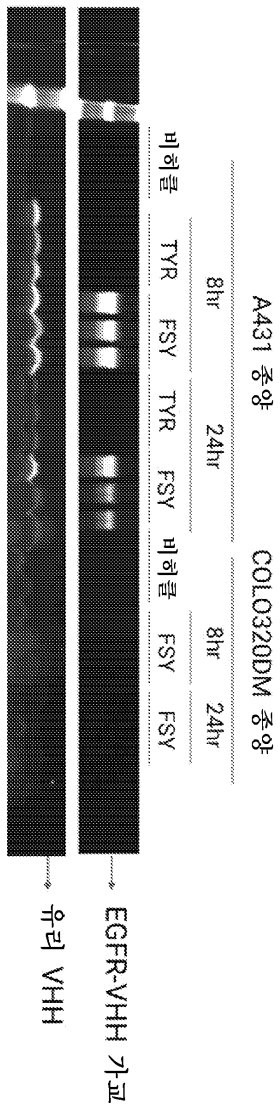
도면15



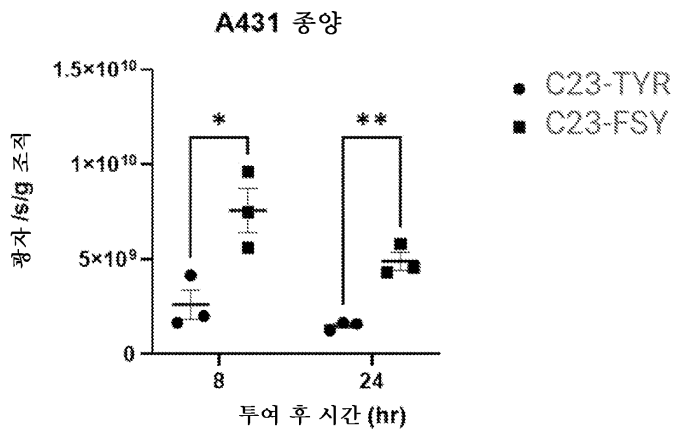
도면16



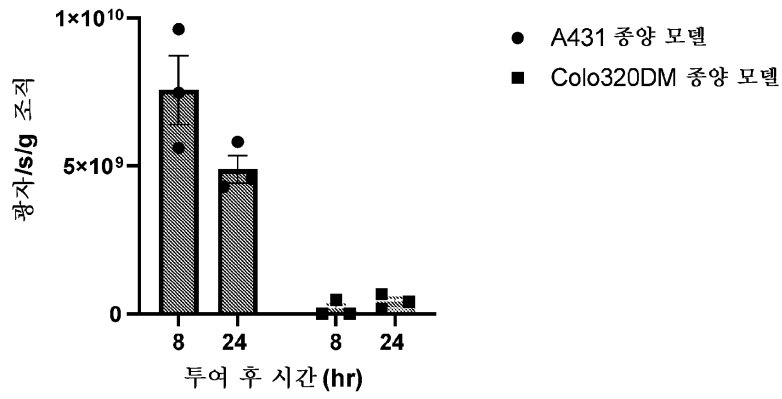
도면17



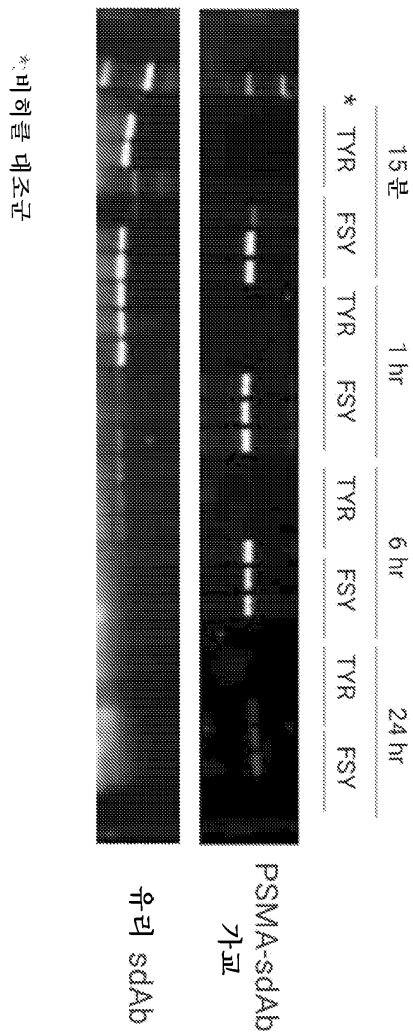
도면18a



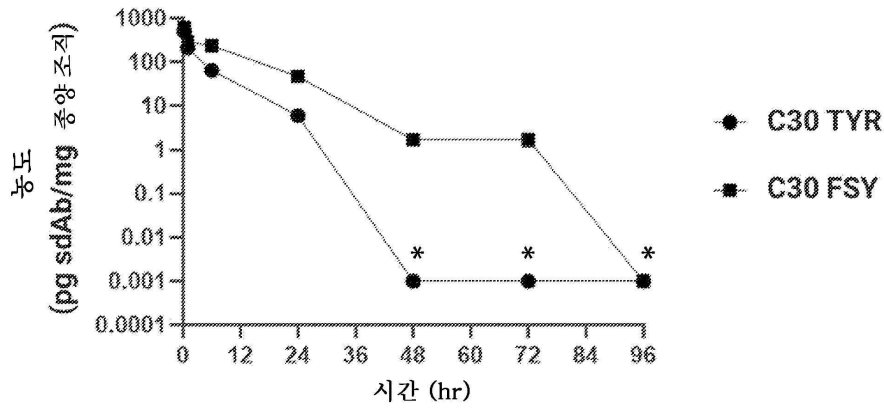
도면18b



도면19

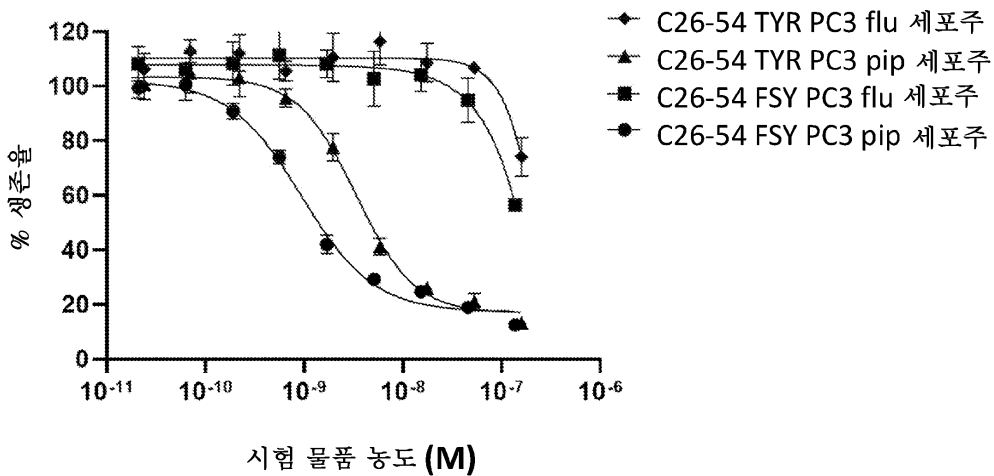


도면20

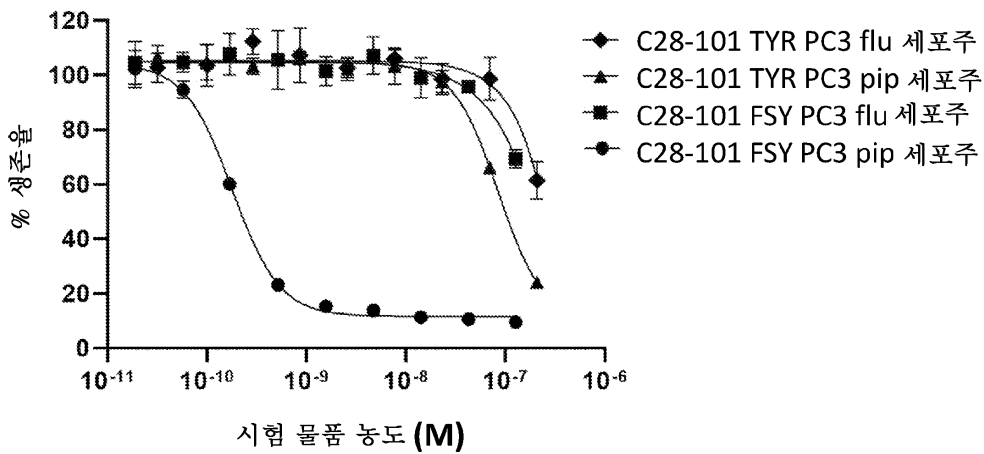


* LLOQ 미만 포인트

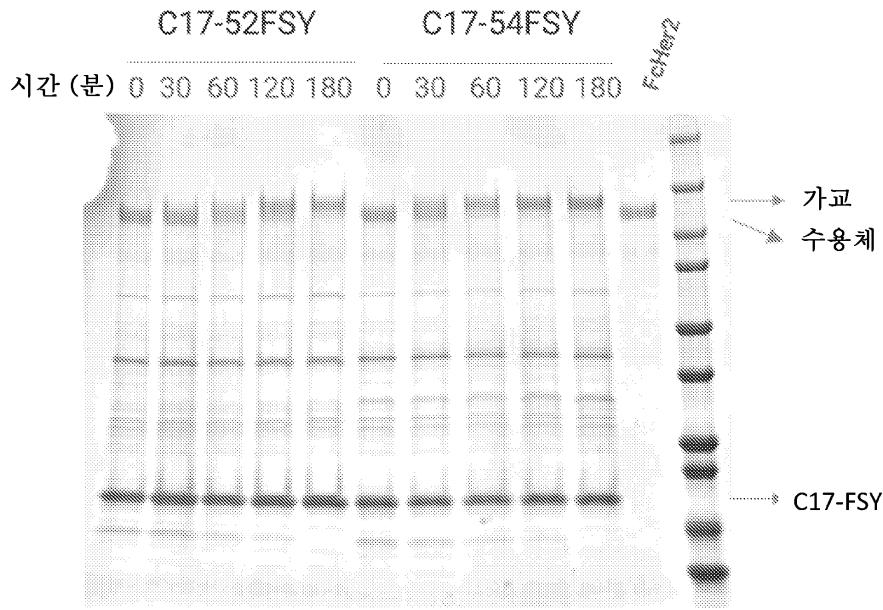
도면21a



도면21b

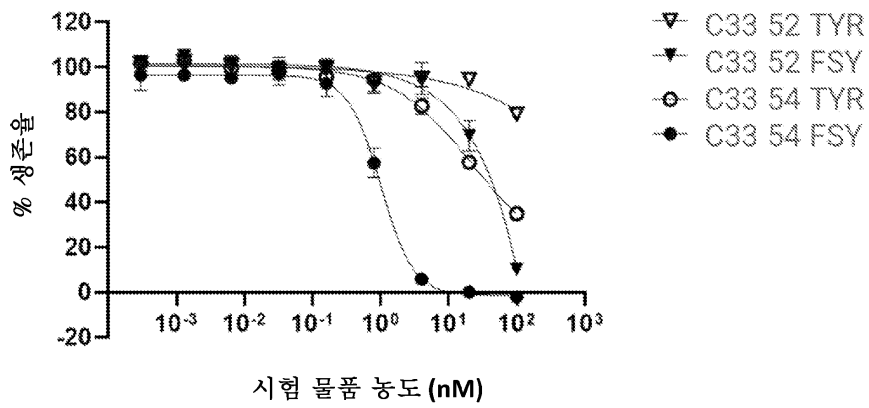


도면22



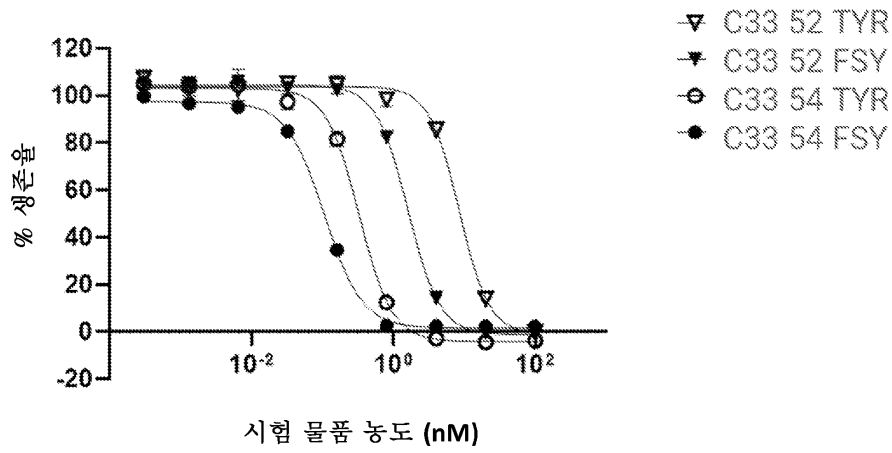
도면23a

5hr 휴약



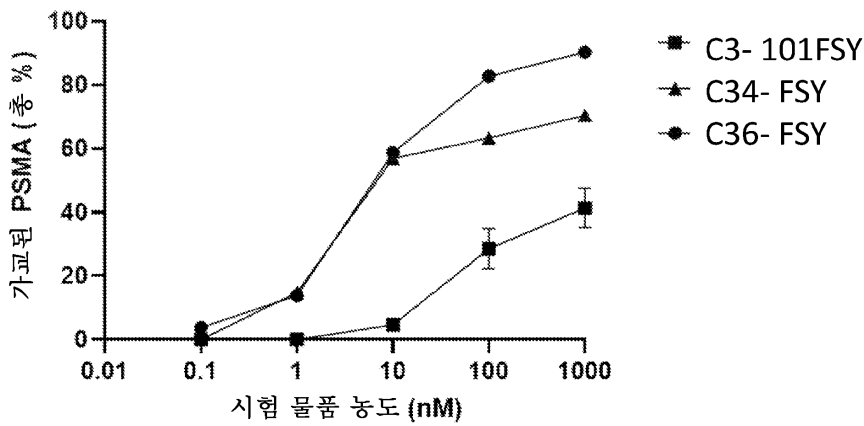
도면23b

6일 검정



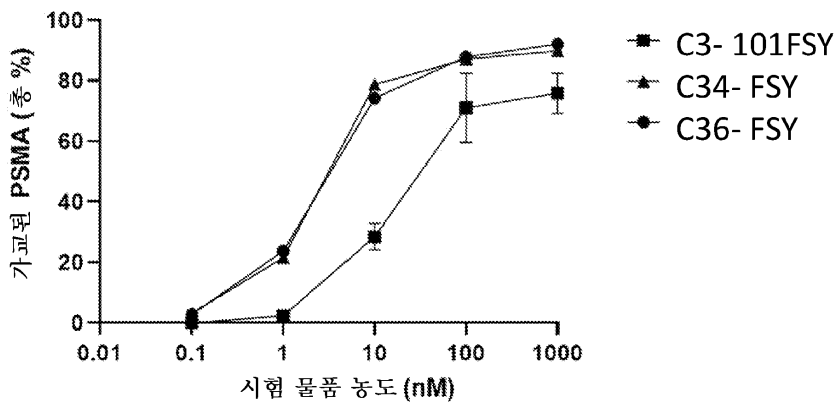
도면24a

1시간

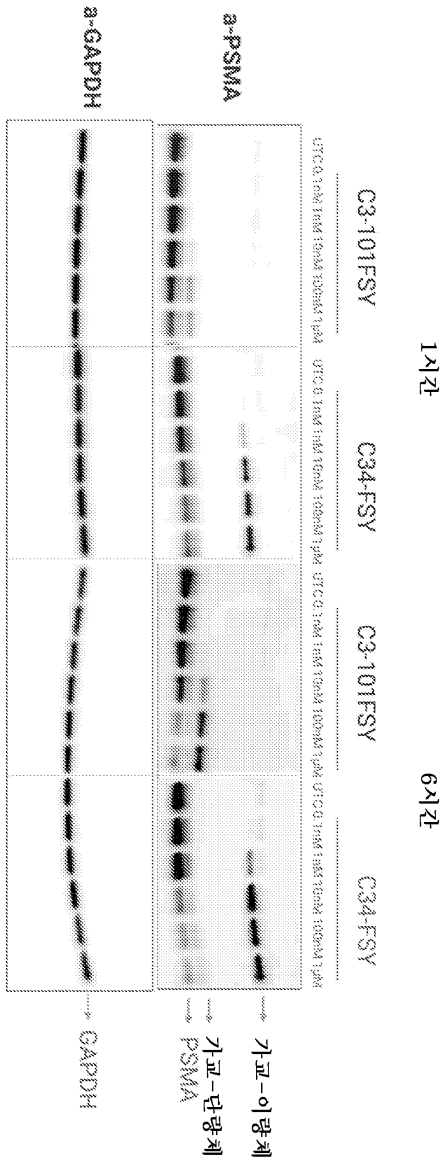


도면24b

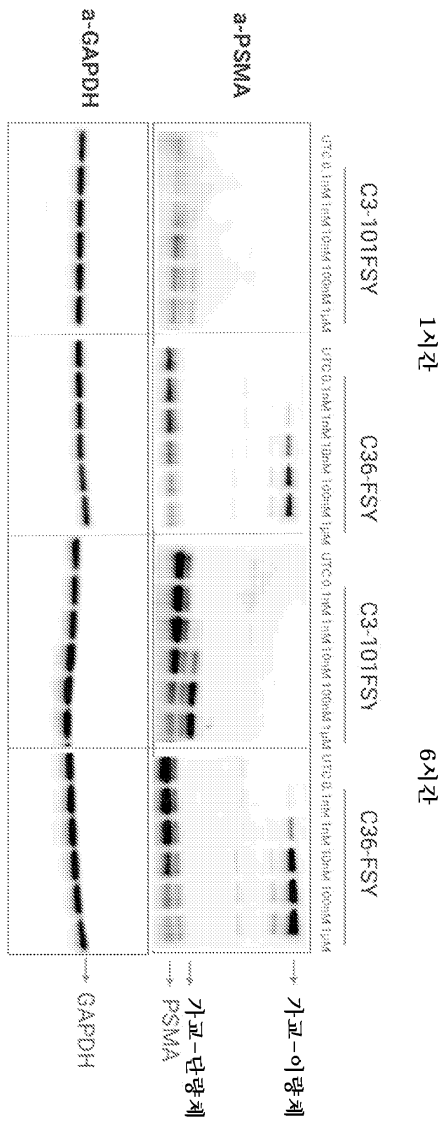
6시간



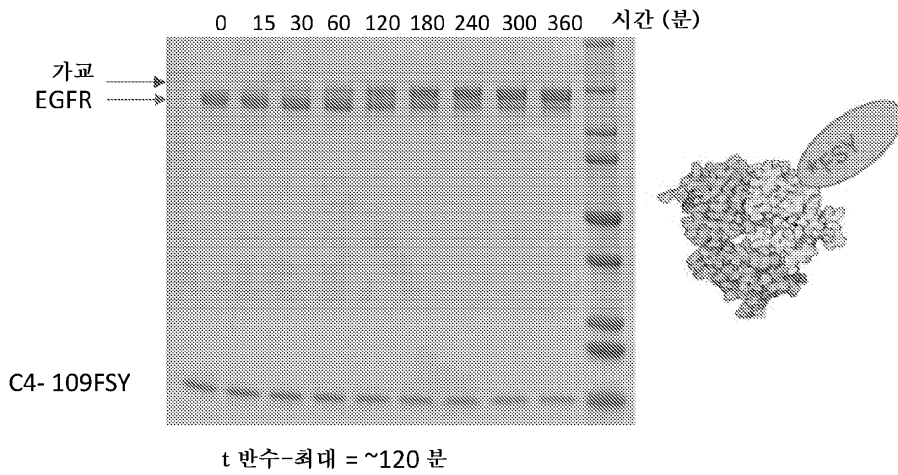
도면25a



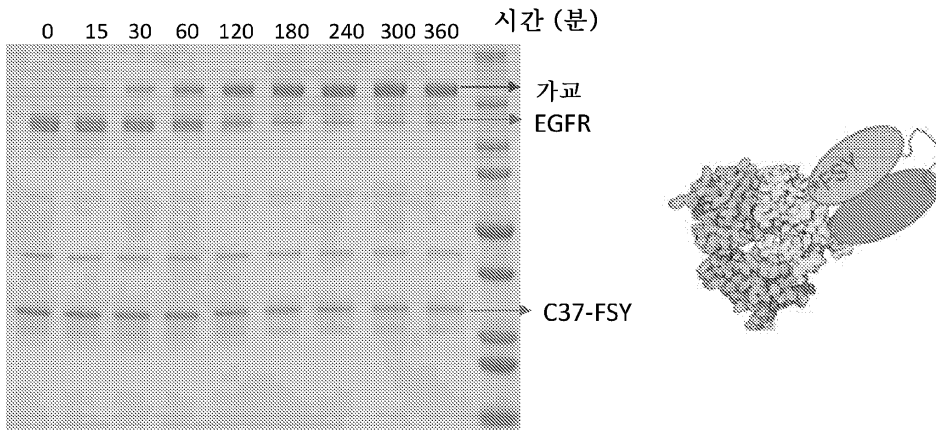
도면25b



도면26a

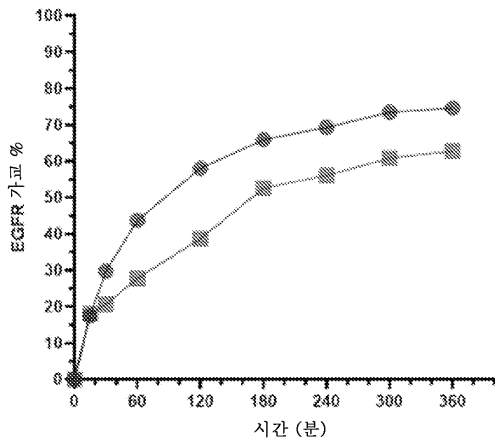


도면26b

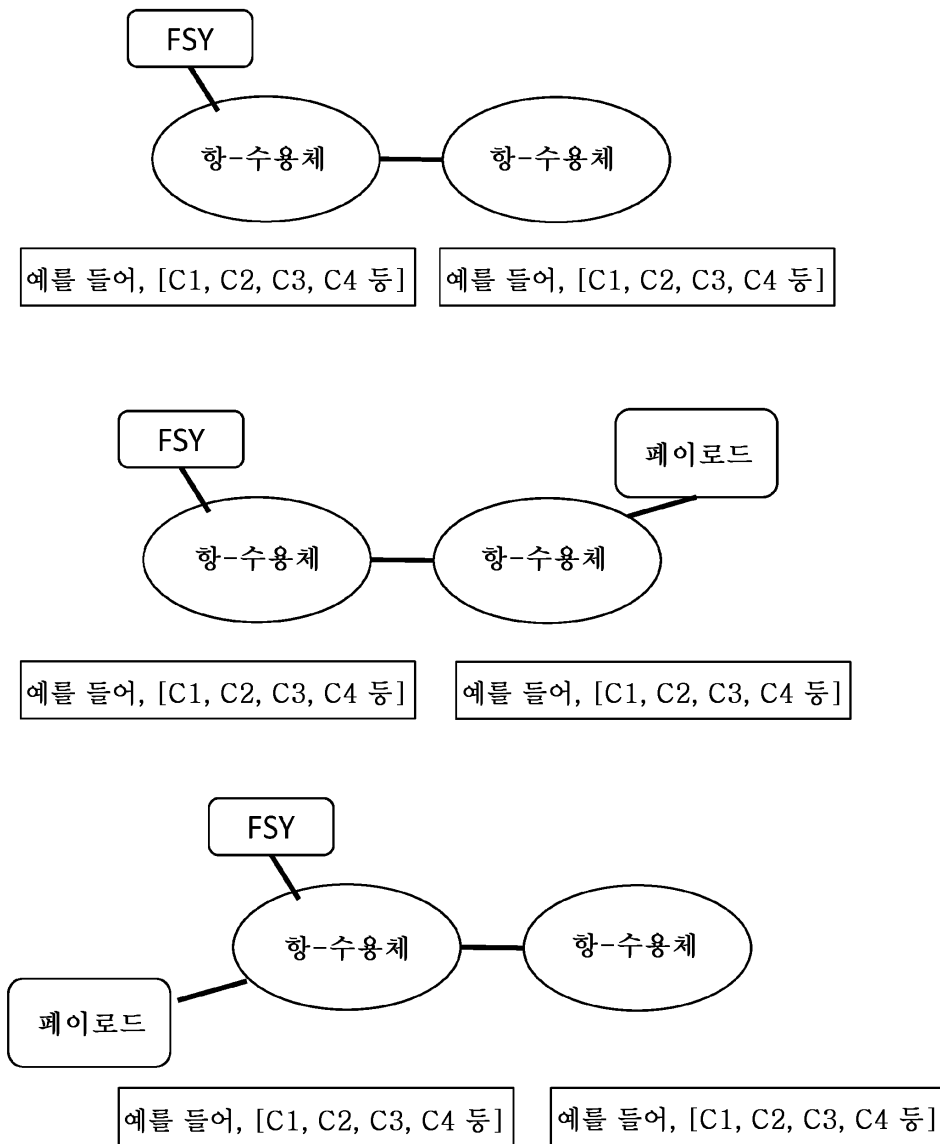


도면27

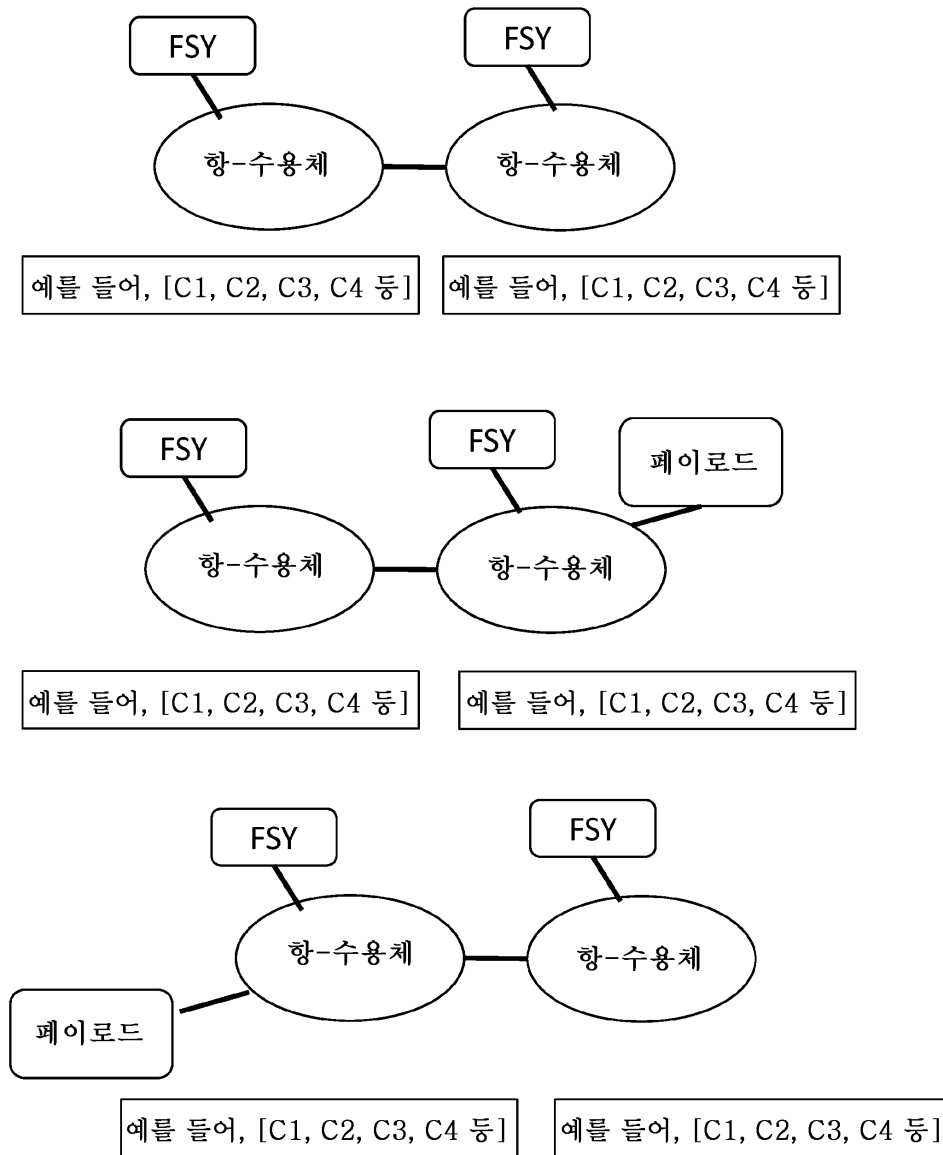
- C4- 109 FSY
- ◆ C37-FSY



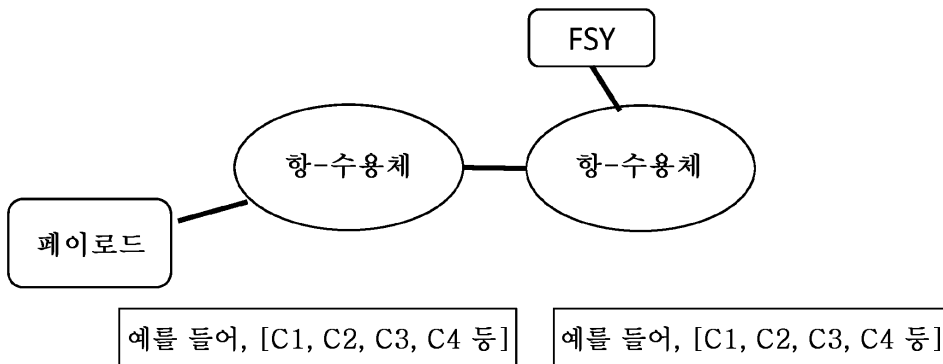
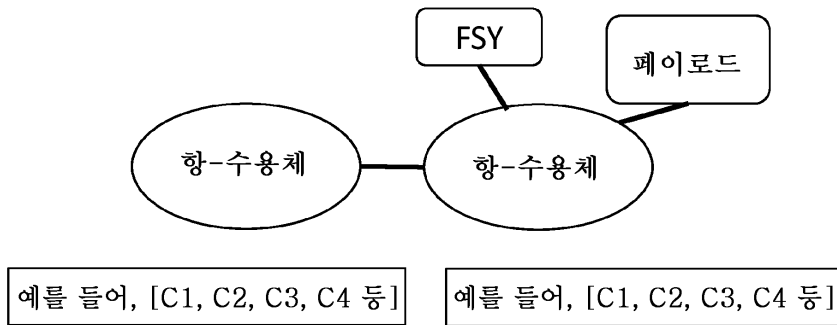
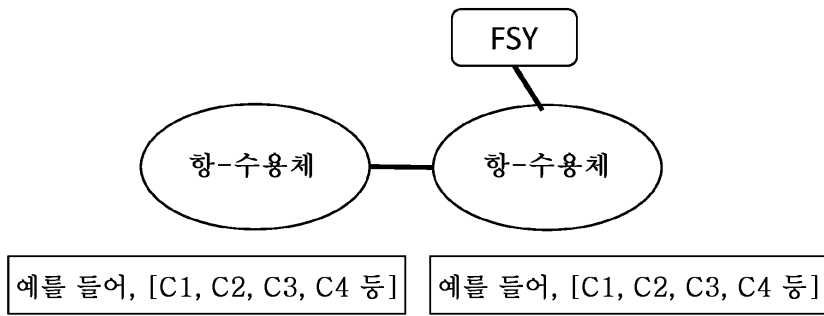
도면28a



도면28b



도면28c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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