



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0069211
(43) 공개일자 2023년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/68 (2017.01) A61P 29/00 (2023.01)
A61P 31/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/6889 (2017.08)
A61K 47/6817 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2023-7012934

(22) 출원일자(국제) 2021년09월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년04월17일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/075831

(87) 국제공개번호 WO 2022/058594

국제공개일자 2022년03월24일

(30) 우선권주장

20197056.3 2020년09월18일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

아라리스 바이오테크 아게

스위스, 씨에이치-8804 에이유 취리히, 리트호프 스트라세 11

(72) 발명자

버트런드, 로맹

스위스, 8093 취리히, 오토-슈테른-베그 7, 에이 치피엘 디16.2, 아라리스 바이오테크 아게 내

아팅거-톨러, 이사벨

스위스, 8093 취리히, 오토-슈테른-베그 7, 에이 치피엘 디16.2, 아라리스 바이오테크 아게 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인더웨이브

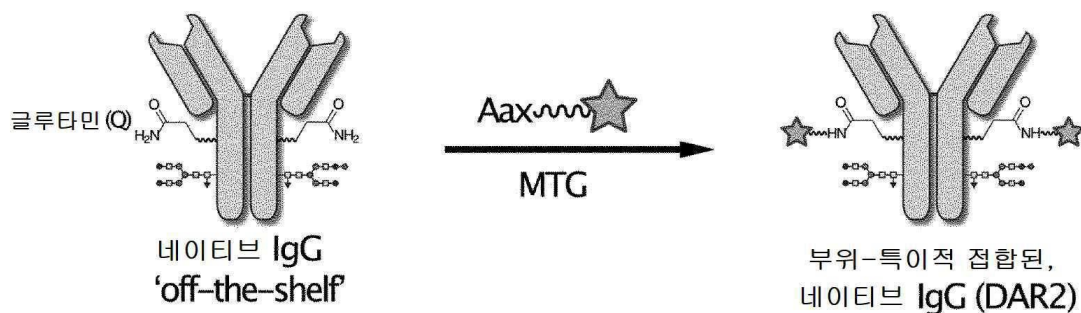
전체 청구항 수 : 총 72 항

(54) 발명의 명칭 아미노산-기반 링커를 사용한 트란스글루타미나제 접합 방법

(57) 요약

본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의한 항체-페이로드 접합체를 생성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 구조 (N → C 방향으로 표시됨) Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)를 포함하거나 또는 갖는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하며, 상기 Aax는 구조 NH₂-Y-COOH를 갖는 아미노산이고, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하고; (Sp₁)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며; (Sp₂)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고; B₁는 연결 모이어티 또는 페이로드이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 항체-링커 접합체 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

(72) 발명자

그라부로브스키, 드라간

스위스, 8093 취리히, 오토-슈테른-베그 7, 에이치
피엘 디16.2, 아라리스 바이오테크 아게 내

스파이처, 필립

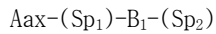
스위스, 8093 취리히, 오토-슈테른-베그 7, 에이치
피엘 디16.2, 아라리스 바이오테크 아게 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조 ($N \rightarrow C$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하는, 미생물 트랜스글루타미나제 (microbial transglutaminase: MTG)에 의한 항체-링커 접합체 (antibody-linker conjugate)를 생성하는 방법:



상기에서

 Aax는 구조 $NH_2-Y-COOH$ 를 갖는 아미노산이고, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하며;

- (Sp₁)은 화학적 스페이서 (chemical spacer)이거나 또는 부재하며;
- (Sp₂)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- B₁은 연결 모이어티 (linking moiety) 또는 페이로드 (payload)이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 1 내지 20의 정수인 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, n은 2 내지 20의 정수인 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 C_H2 도메인의 위치 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된 것인 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 스페이서 (Sp₁) 및 (Sp₂)는 각각 0 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함하는 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6개 이하의 아미노산 잔기를 포함하는 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 링커의 순전하 (net charge)는 중성 또는 양성인 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 적어도 하나의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 제2 연결 모이어티 또는 페이로드 B₂를 포함하고, 구체적으로 상기 B₂는 링커에 화학적 스페이서 (Sp₂)를 통해 연결되는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, B₁ 및 B₂는 서로 동일하거나 또는 상이한 것인 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, B₁ 및/또는 B₂는 연결 모이어티인 것인 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나는



생물직교 마커 기 (bioorthogonal marker group), 또는



가교를 위한 비-생물-직교 엔티티 (non-bio-orthogonal entity)를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 생물직교 마커 기 또는 비-생물-직교 엔티티는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자 또는 모이어티로 구성되거나 또는 이를 포함하는 방법:



-N-N≡N, 또는 -N₃;



Lys(N₃);



테트라진;



알킨;



스트레인드 사이클로옥틴 (strained cyclooctyne);



BCN;



스트레인드 알켄 (strained alkene);



광반응성 기 (photoreactive group);



-RCOH (알데히드);



아실트리플루오로보레이트;



단백질 분해제 ('PROTAC');



사이클로펜타디엔/스피로로사이클로펜타디엔;



티오-선택적 친전자체 (thio-selective electrophile);



-SH; 및

- 시스템인.

청구항 15

청구항 12 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 페이로드를 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나에 연결하는 추가 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 클릭-반응 (click-reaction)을 통해 연결되는 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, B₁ 및/또는 B₂는 페이로드인 방법.

청구항 18

청구항 15 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 하기 중 적어도 하나를 포함하는 방법:

- 독소;
- 사이토카인;
- 성장 인자;
- 방사성핵종 (radionuclide);
- 호르몬;
- 항-바이러스제;
- 항-박테리아제;
-  형광 염료;
- 면역조절제/면역자극제;
- 반감기 증가 모이어티 (half-life increasing moiety);
- 용해도 증가 모이어티 (solubility increasing moiety);
- 폴리머-독소 접합체;
-  핵산;
- 바이오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티;
- 비타민;
- 단백질 분해제 ('PROTAC');
- 표적 결합 모이어티; 및/또는

- 항-염증제.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 독소는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나인 것인 방법:

- 피롤로벤조디아제핀 (pyrrolobenzodiazepines: PBD);
- 아우리스타틴 (auristatins) (예: MMAE, MMAF);
- 메이탄시노이드 (maytansinoids) (메이탄신, DM1, DM4, DM21);
- 두오카르마이신 (duocarmycins);
- 니코틴아미드 포스포리보실트랜스퍼라제 (nicotinamide phosphoribosyltransferase: NAMPT) 억제제;
- 튜불리신 (tubulysins);
- 엔디이엔 (enediyene) (예: 칼리케아미신 (calicheamicin));
- PNUs, 독소루비신 (doxorubicins);
- 피롤계 키네신 스핀들 단백질 (kinesin spindle protein: KSP) 억제제;
- 약물 유출 펌프 억제제 (drug efflux pump inhibitors);
- 산드라마이신 (sandramycins);
- 크립토피신 (cryptophycins);
- 아마니틴 (amanitins) (예: α -아마니틴); 및
- 캄프토테신 (camptothecins) (예: 엑사테칸, 데록스테칸).

청구항 20

청구항 15 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티 (cleavable or self-immolative moiety)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티는 카텝신 (cathepsin) 및/또는 p-아미노벤질 카바모일 (p-aminobenzyl carbamoyl: PABC) 모이어티에 의해 절단 가능한 모티프 (motif)를 포함하는 방법.

청구항 22

청구항 15 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 페이로드를 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)에 또는 링커에 포함된 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 에 연결하기 위한 반응성 기 (reactive group)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 항체, 또는 이의 단편 또는 재조합 변이체이고, 상기 이의 단편 또는 재조합 변이체는 표적 결합 특성을 보유하고, C_H2 도메인을 포함하는 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 항체는 IgG 항체인 방법.

청구항 25

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 항체의 Fc 도메인 내의 Gln 잔기에 접합되거나, 또는 링커는 분자 공학 (molecular engineering)에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기에 접합되는 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 항체의 Fc 도메인 내의 Gln 잔기는 IgG 항체의 C_H2 도메인의 Gln 잔기 Q295 (EU numbering)인 방법.

청구항 27

청구항 25에 있어서, 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 (a) 항체의 중쇄 또는 경쇄에 통합되거나 또는 (b) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단 단부에 융합된 펩티드에 포함되는 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, Gln 잔기를 포함하는 펩티드는 항체의 중쇄의 C-말단 단부에 융합된 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 Gln 잔기의 아미드 측쇄에 접합되는 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 링커는 글리코실화 항체에 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 접합 효율로 접합하기에 적합한 방법.

청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 미생물 트란스글루타미나제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 중, 구체적으로 스트렙토마이세스 모바라엔시스 (*Streptomyces mobaraensis*)로부터 유래되는 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 5 - 50 몰 당량 (molar equivalents)의 링커와 접촉되는 방법.

청구항 33

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 미생물 트란스글루타미나제는 항체 1 mg 당 1 - 10 U/mg 범위의 농도로 접합 반응에 부가되는 것인 방법.

청구항 34

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 1 - 10 mg/mL 범위의 농도로 접합 반응에 부가되는 것인 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 링커의 항체로의 접합은 pH 6 내지 8.5 범위의 pH에서 달성되는 것인 방법.

청구항 36

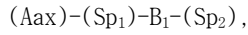
청구항 1 내지 35 중 어느 한 항에 따른 방법으로 생성된 항체-링커 접합체.

청구항 37

a) 항체; 및

b) 하기 구조 ($N \rightarrow C$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 포함하며,

상기 링커는 잔기 Aax 내의 1차 아민을 통해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기의 아미드 측쇄에 접합되는, 항체-링커 접합체 (antibody-linker conjugate):



상기에서

- Aax는 구조 $NH_2-Y-COOH$ 를 갖는 아미노산이고, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하며;

- (Sp_1) 은 화학적 스페이서이고;

- (Sp_2) 는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;

- B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이다.

청구항 38

청구항 37에 있어서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 1 내지 20의 정수인 접합체.

청구항 39

청구항 38에 있어서, n은 2 내지 20의 정수인 접합체.

청구항 40

청구항 37 내지 39 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 C_H2 도메인의 위치 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된 접합체.

청구항 41

청구항 37 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)는 0 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함하는 접합체.

청구항 42

청구항 37 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6개 이하의 아미노산 잔기를 포함하는 접합체.

청구항 43

청구항 37 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 링커의 순전하는 중성 또는 양성인 접합체.

청구항 44

청구항 37 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것인 접합체.

청구항 45

청구항 37 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 적어도 하나의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 접합체.

청구항 46

청구항 37 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 제2 연결 모이어티 또는 페이로드 B₂를 포함하고, 구체적으로 상기 B₂는 링커에 화학적 스페이서 (Sp₂)를 통해 연결되는 집합체.

청구항 47

청구항 46에 있어서, B₁ 및 B₂는 서로 동일하거나 또는 상이한 것인 집합체.

청구항 48

청구항 37 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, B₁ 및/또는 B₂는 연결 모이어티인 집합체.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나는

- 생물직교 마커 기, 또는
- 가교를 위한 비-생물-직교 엔티티를 포함하는 집합체.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 생물직교 마커 기 또는 비-생물-직교 엔티티는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자 또는 모이어티로 구성되거나 또는 이를 포함하는 집합체:

- -N-N≡N, 또는 -N₃;
- Lys(N₃);
- 테트라진;
- 알킨;
- 스트레인드 사이클로옥틴;
- BCN;
- 스트레인드 알켄;
- 광반응성 기;
- -RCOH (알데히드);
- 아실트리플루오로보레이트;
- 단백질 분해제 ('PROTAC');
- 사이클로펜타디엔/스피롤로사이클로펜타디엔;
- 티오-선택적 친전자체;
- -SH; 및

- 시스템인.

청구항 51

청구항 48 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 중 적어도 하나가 하나 이상의 페이로드에 연결되는 집합체.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 에 클릭-반응을 통해 연결되는 집합체.

청구항 53

청구항 37 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, B_1 및/또는 B_2 는 페이로드인 집합체.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 하기 중 적어도 하나를 포함하는 집합체:

- 독소;
- 사이토카인;
- 성장 인자;
- 방사성핵종;
- 호르몬;
- 항-바이러스제;
- 항-박테리아제;
- 형광 염료;
- 면역조절제/면역자극제;
- 반감기 증가 모이어티;
- 용해도 증가 모이어티;
- 폴리머-독소 집합체;
- 핵산;
- 바이오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티;
- 비타민;
- 단백질 분해제 ('PROTAC');
- 표적 결합 모이어티; 및/또는

- 항-염증제.

청구항 55

청구항 54에 있어서, 독소는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나인 접합체:

- 피롤로벤조디아제핀 (PBD);
- 아우리스타틴 (예: MMAE, MMAF);
- 메이탄시노이드 (메이탄신, DM1, DM4, DM21);
- 두오카르마이신;
- 니코틴아미드 포스포리보실트랜스퍼라제 (NAMPT) 억제제;
- 튜불리신;
- 엔디이엔 (예: 칼리케아미신);
- PNUs, 독소루비신;
- 피롤계 키네신 스핀들 단백질 (KSP) 억제제;
- 크립토피신;
- 약물 유출 펌프 억제제;
- 산드라마이신;
- 아마니틴 (예: α -아마니틴); 및
- 캄프토테신 (예: 엑사테칸, 테루스테칸).

청구항 56

청구항 51 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티를 추가로 포함하는 접합체.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티는 모티프 발린-시트룰린 (valine-citrulline: VC) 및/또는 p-아미노벤질 카바모일 (PABC) 모이어티를 포함하는 접합체.

청구항 58

청구항 37 내지 57 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 항체, 또는 이의 단편 또는 재조합 변이체이고, 상기 이의 단편 또는 재조합 변이체는 표적 결합 특성을 보유하고, C_H2 도메인을 포함하는 항체-링커 접합체.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 항체는 IgG 항체인 항체-링커 접합체.

청구항 60

청구항 37 내지 59 중 어느 한 항에 있어서, 링커가 접합된 Gln 잔기는 항체의 Fc 도메인에 포함되거나 또는 분

자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 항체-링커 접합체.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 항체의 Fc 도메인에 포함된 Gln 잔기는 IgG 항체의 C_H2 도메인의 Gln 잔기 Q295 (EU numbering)인 항체-링커 접합체.

청구항 62

청구항 60에 있어서, 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 (a) 항체의 중쇄 또는 경쇄에 통합되거나 또는 (b) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단 단부에 융합된 펩티드에 포함되는 항체-링커 접합체.

청구항 63

청구항 62에 있어서, Gln 잔기를 포함하는 펩티드는 항체의 중쇄의 C-말단 단부에 융합된 항체-링커 접합체.

청구항 64

청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체를 포함하며, 구체적으로 항체-링커 접합체는 적어도 하나의 페이로드를 포함하는, 약학 조성물.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 적어도 하나의 추가적인 약학적으로 허용 가능한 성분을 포함하는 약학 조성물.

청구항 66

요법 (therapy) 및/또는 진단 (diagnostics)에 사용하기 위한, 청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체 또는 청구항 64 또는 65에 따른 약학 조성물.

청구항 67

신생물 질환 (neoplastic disease), 신경계 질환 (neurological disease), 자가면역 질환 (autoimmune disease), 염증성 질환 (inflammatory disease) 또는 감염성 질환 (infectious disease)을

- 앓고 있고,
- 발병 위험이 있으며, 및/또는
- 진단받은

환자의 치료에 사용하기 위한, 청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체 또는 청구항 64 또는 65에 따른 약학 조성물.

청구항 68

신생물 질환을 앓고 있는 환자의 치료에 사용하기 위한, 청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체 또는 청구항 64 또는 65에 따른 약학 조성물.

청구항 69

수술 전, 수술 중 또는 수술 후 영상화에 사용하기 위한, 청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체 또는 청구항 64 또는 65에 따른 약학 조성물.

청구항 70

수술 중 영상-가이드 암 수술 (intraoperative imaging-guided cancer surgery)에 사용하기 위한, 청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체 또는 청구항 64 또는 65에 따른 약학 조성물.

청구항 71

신생물 질환, 신경계 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환을

- 앓고 있고,
- 발병 위험이 있으며, 및/또는
- 진단받은

환자의 치료용 약제의 제조를 위한, 청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체 또는 청구항 64 또는 65에 따른 약학 조성물의 용도.

청구항 72

청구항 37 내지 63 중 어느 한 항에 따른 항체-링커 접합체 또는 청구항 64 또는 65에 따른 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 신생물 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물 트랜스글루타미나제 (transglutaminase)에 의해 항체-링커 접합체 (antibody-linker conjugate)를 생성하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 항체-링커 접합체, 본 발명의 항체-링커 접합체를 포함하는 약학 조성물, 및 이의 용도를 제공한다.

배경 기술

[0002] 매우 효능이 있는 페이로드 (payloads)를 항체에 부착함으로써 암 또는 염증성 질환의 표적 치료에 대한 관심이 높아지는 것을 발견하였다. 이러한 부착으로부터 생성된 구조체를 항체-링커 접합체, 또는 링커가 약물을 포함하는 경우 항체-약물 접합체 (antibody-drug conjugates: ADC)라고 한다.

[0003] 현재, 10개의 ADC (Adcetris, Kadcyca, Besponsa, Mylotarg, Polivy, Padcev, Enhertu, Trodelvy, Blenrep 및 Zynlonta)가 FDA 승인을 받았으며, 이들 모두는 이들의 페이로드가 비-부위 특이적 방식으로 항체에 화학적으로 부착되어 있다. 그러므로, 수득된 생성물은 항체 및 페이로드 사이의 화학양론적 상관관계 (페이로드-항체 비율, 또는 약물-대-항체 비율, DAR (drug-to-antibody ratio)) 및 항체 상의 접합 부위와 관련하여 매우 이질적 (heterogeneous)이다. 각 생성된 종은 동일한 의약품 내에서도, 구별되는 특성을 가질 수 있어서, 잠재적으로 광범위하게 다양한 인 비보 (*in vivo*) 약동학적 특성 및 활성을 유도할 수 있다.

[0004] 이전 인 비보 연구 (Lhospice et al., Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-Cd30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models, Mol Pharm 12 (6), 1863-1871. 2015)에서, 부위-특이적 약물 부착은 FDA-승인된 ADC와 비교하여 유의미하게 더 높은 종양 흡수 (~2x) 및 비-표적 조직에서 감소된 흡수를 유도하였고, 또한 최대 내약 용량 (maximal tolerated dose)이 적어도 3x 더 높은 것으로 밝혀졌다. 이들 데이터는 화학양론적으로 잘 정의된 ADC가 화학적으로 변형된 ADC와 비교하여 개선된 약동학 및 더 양호한 치료 지수 (therapeutic indexes)를 나타내는 것을 시사한다.

[0005] 부위-특이적 기술로서, 효소적 접합 (enzymatic conjugation)은 이들 접합 반응이 전형적으로 빠르고 생리학적 조건하에 수행될 수 있기 때문에 큰 관심을 받았다. 이용 가능한 효소 중에서, 스트렙토마이세스 모바라엔시스 (*Streptomyces mobaraensis*) 종 유래의 미생물 트랜스글루타미나제 (microbial transglutaminase: MTG)는 항체를 포함한 기능적 모이어티 (moieties)의 기존 화학적 단백질 접합 (chemical protein conjugation)에 대한 매력적인 대안으로 점점 더 많은 관심을 받고 있다. MTG는 생리학적 조건하에 단백질 또는 펩티드의 '반응성' 글루타민, 및 단백질 또는 펩티드의 '반응성' 리신 잔기 사이의 트랜스아미드화 반응 (transamidation reaction)을 촉매하며, 반면 후자는 또한 5-아미노펜틸기와 같은 간단한, 저분자량 1차 아민일 수 있다 (Jeger et al., Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. Angew Chem Int Ed Engl. 2010 Dec 17;49(51):9995-7, Strop et al., Versatility of Microbial Transglutaminase. Bioconjugate Chemistry 2014, 25 (5), 855-862).

- [0006] 형성된 결합은 이소펩티드 결합으로, 이는 각각의 폴리펩티드 또는 단백질의 펩티드-결합 백본의 일부를 형성하지 않는 아미드 결합이다. 이는 아실 글루타민-함유 아미노산 공여체 서열의 글루타밀 잔기의 γ -카복사미드 및 아미노 공여체-포함 기질의 1차 (1°) 아민 사이에 형성된다.
- [0007] 발명자의 경험과 다른 사람들의 경험으로부터, MTG는 전형적으로 소수의 글루타민만을 표적으로 하므로, 따라서 MTG는 부위-특이적 및 화학양론적 단백질 변형을 위한 매력적인 수단 (tool)인 것으로 보인다.
- [0008] 이전에, 글루타민 295 (Q295)는 저분자량 1차 아민 기질과 MTG에 의해 특이적으로 표적화될 상이한 IgG 타입의 중쇄 상에 유일한 반응성 글루타민으로 확인되었다 (Jeger et al. Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. Angew Chem Int Ed Engl. 2010 Dec 17;49(51):9995-7).
- [0009] 그러나, Q295에 대한 정량적 접합 (quantitative conjugation)은 PNGase F로 아스파라긴 잔기 297 (N297)에서 글리칸 모이어티를 제거하는 경우에만 가능하였고, 글리코실화 항체는 효율적으로 접합될 수 없었다 (접합 효율 <20%). 이러한 발견은 또한 Mindt et al. (Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase. Bioconjugate chemistry 2008, 19 (1), 271-8) 및 Jeger et al. (Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. Angew Chem Int Ed Engl. 2010 Dec 17;49(51):9995-7), Strop et al. (Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates, 20, 161-167, 2013) 및 Dickgiesser et al. (Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases. Bioconjug Chem. 2020 Mar 12. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00061)의 연구에 의해 뒷받침된다.
- [0010] 데글리코실화 (deglycosylation)를 방지하기 위해, 잔기 N297에 점 돌연변이 (point mutation)를 삽입하여 아글리코실화 (aglycosylation)로 불리는 글리코실화를 제거하는 것이 또한 가능하다.
- [0011] 그러나, 이러한 접근법은 모두 상당한 단점이 있다. 효소적 데글리코실화 단계는 GMP 측면에서 바람직하지 않으며, 이는 고순도 생성물을 보장하기 위해 절단된 글리칸 뿐만 아니라 데글리코실화 효소 (예: PNGase F)가 모두 배지로부터 제거되는지 확인해야 하기 때문이다.
- [0012] 다른 아미노산에 대한 N297의 치환은 또한 원치 않는 효과를 가지며, 이는 C_H2 도메인의 전체 안정성 및 결과적으로 전체 접합체의 효능에 영향을 미칠 수 있기 때문이다. 또한, N297에 존재하는 글리칸은 중요한 면역조절 효과를 가지며, 이는 항체 의존성 세포 세포독성 (antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC) 등을 유발하기 때문이다. 이러한 면역조절 효과는 다른 아미노산에 대한 N297의 치환 또는 데글리코실화 시에 소실될 것이다.
- [0013] 또한, 페이로드 부착을 위한 항체의 유전자 조작은 서열 삽입으로 면역원성을 증가시키고 항체의 전반적인 안정성을 감소시킬 수 있다는 단점을 가질 수 있다.
- [0014] Spycher 등은 항체의 사전 데글리코실화를 필요로 하지 않는 트랜스글루타미나제-기반 접합 접근법을 개시하였다 (Spycher et al., WO2019057772). 보다 상세하게는 Spycher 등은 글리코실화 항체의 Q295에 대한 부위-특이적 접합이 실제로 리신-함유 펩티드를 사용하여 효율적으로 가능하다는 것을 보여줄 수 있었다. 그러나, 글리코실화 항체에 대한 비-리신-함유 펩티드의 MTG-매개 접합 (MTG-mediated conjugation)은 당해 기술 분야에 개시되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 그러므로, 본 발명의 일 목적은 트랜스글루타미나제 기반 단백질 접합 접근법을 제공하는 것이다. 구체적으로, 본 발명의 목적은 구체적으로 N297의 항체의 사전 데글리코실화를 필요로 하지 않는 트랜스글루타미나제 기반 항체 접합 접근법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 C_H2 도메인에서 N297의 치환 또는 변형을 필요로 하지 않는 트랜스글루타미나제 기반 항체 접합 접근법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 추가의 목적은 접합의 부위-특이성 뿐만 아니라 화학량론에 있어서 고도로 균일한 접합 생성물의 제

조를 가능하게 하는 항체 접합 기술을 제공하는 것이다.

[0018] 이들 및 추가 목적은 본 발명의 독립항에 따른 방법 및 수단으로 충족된다. 종속항은 특정 구체예와 관련이 있다.

과제의 해결 수단

[0019] 발명의 요약

[0020] 즉, 본 발명은 하기 구체예에 관한 것이다:

[0021] 1. 하기 구조 (N → C 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 단백질에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하는, 미생물 트란스글루타미나제 (microbial transglutaminase: MTG)에 의한 단백질-링커 접합체를 생성하는 방법:

[0022] $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$

[0023] 상기에서

[0024]  Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고;

[0025]  (Sp_1) 은 화학적 스페이서 (chemical spacer)이거나 또는 부재하며;

[0026]  (Sp_2) 는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;

[0027]  B_1 은 연결 모이어티 (linking moiety) 또는 페이로드 (payload)이다.

[0028] 2. 구체예 1에 있어서, 단백질은 항체이고, Gln 잔기는 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함되는 방법.

[0029] 3. 구체예 1 또는 2에 있어서, 잔기 Aax는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산, 또는 이의 아미노산 모방체 또는 유도체인 방법.

[0030] 4. 구체예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2) 는 각각 0 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함하는 방법.

[0031] 5. 구체예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 링커는 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6개 이하의 아미노산 잔기를 포함하는 방법.

[0032] 6. 구체예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 링커의 순전하 (net charge)는 중성 또는 양성인 방법.

[0033] 7. 구체예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 링커는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것인 방법.

[0034] 8. 구체예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 링커는 적어도 하나의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 것인 방법.

[0035] 9. 구체예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 링커는 제2 연결 모이어티 또는 페이로드 B_2 를 포함하고, 구체적으로 상기 B_2 는 링커에 화학적 스페이서 (Sp_2) 를 통해 연결되는 것인 방법.

[0036] 10. 구체예 9에 있어서, B_1 및 B_2 는 서로 동일하거나 또는 상이한 것인 방법.

[0037] 11. 구체예 1 내지 8 또는 9 내지 10 중 어느 하나에 있어서, B_1 및/또는 B_2 는 연결 모이어티인 것인 방법.

[0038] 12. 구체예 11에 있어서, 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 중 적어도 하나는

[0039]  생물직교 마커 기 (bioorthogonal marker group), 또는

[0040]  가교를 위한 비-생물-직교 엔티티 (non-bio-orthogonal entity)를 포함하는 것인 방법.

- [0041] 13. 구체예 12에 있어서, 생물직교 마커 기 또는 비-생물-직교 엔티티는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자 또는 모이어티로 구성되거나 또는 이를 포함하는 방법:
- [0042] $\text{-N-N}\equiv\text{N}$, 또는 -N_3 ;
- [0043] $\text{Lys(N}_3\text{)}$;
- [0044] 테트라진;
- [0045] 알킨;
- [0046] 스트레인드 사이클로옥틴 (strained cyclooctyne);
- [0047] BCN;
- [0048] 스트레인드 알켄 (strained alkene);
- [0049] 광반응성 기 (photoreactive group);
- [0050] -RCOH (알데히드);
- [0051] 아실트리플루오로보레이트;
- [0052] 단백질 분해제 ('PROTAC');
- [0053] 사이클로펜타디엔/스피롤로사이클로펜타디엔;
- [0054] 티오-선택적 친전자체 (thio-selective electrophile);
- [0055] -SH ; 및
- [0056] 시스테인.
- [0057] 14. 구체예 11 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 페이로드를 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 중 적어도 하나에 연결하는 추가 단계를 포함하는 방법.
- [0058] 15. 구체예 14에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 에 클릭-반응 (click-reaction)을 통해 연결되는 방법.
- [0059] 16. 구체예 1 내지 8 또는 9 내지 10 중 어느 하나에 있어서, B_1 및/또는 B_2 는 페이로드인 것인 방법.
- [0060] 17. 구체예 14 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 하기 중 적어도 하나를 포함하는 방법:
- [0061] 독소;
- [0062] 사이토카인;
- [0063] 성장 인자;
- [0064] 방사성핵종 (radionuclide);
- [0065] 호르몬;

- [0066] ● 항-바이러스제;
- [0067] ● 항-박테리아제;
- [0068] ■ 형광 염료;
- [0069] ● 면역조절제/면역자극제;
- [0070] ● 반감기 증가 모이어티 (half-life increasing moiety);
- [0071] ■ 용해도 증가 모이어티 (solubility increasing moiety);
- [0072] ■ 폴리머-독소 접합체;
- [0073] ● 핵산;
- [0074] ● 바이오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티;
- [0075] ■ 비타민;
- [0076] ● 단백질 분해제 ('PROTAC');
- [0077] ● 표적 결합 모이어티; 및/또는
- [0078] ■ 항-염증제.
- [0079] 18. 구체예 17에 있어서, 독소는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나인 것인 방법:
- [0080] ● 피롤로벤조디아제핀 (pyrrolobenzodiazepines: PBD);
- [0081] ● 아우리스타틴 (auristatins) (예: MMAE, MMAF);
- [0082] ■ 메이탄시노이드 (maytansinoids) (메이탄신, DM1, DM4, DM21);
- [0083] ● 두오카르마이신 (duocarmycins);
- [0084] ● 니코틴아미드 포스포리보실트랜스퍼라제 (nicotinamide phosphoribosyltransferase: NAMPT) 억제제;
- [0085] ■ 튜불리신 (tubulysins);
- [0086] ● 엔디이엔 (enediyene) (예: 칼리케아미신 (calicheamicin));
- [0087] ● PNUs, 독소루비신 (doxorubicins);
- [0088]  피롤계 키네신 스핀들 단백질 (kinesin spindle protein: KSP) 억제제;
- [0089] ■ 약물 유출 펌프 억제제 (drug efflux pump inhibitors);
- [0090] ● 산드라마이신 (sandramycins);
- [0091] ● 크립토피신 (cryptophycins);
- [0092] ■ 아마니틴 (amanitins) (예: α-아마니틴); 및

- [0093] ● 캄프토테신 (camptothecins) (예: 엑사테칸, 데루스테칸).
- [0094] 19. 구체예 14 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티 (cleavable or self-immolative moiety)를 추가로 포함하는 방법.
- [0095] 20. 구체예 19에 있어서, 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티는 카텝신 (cathepsin) 및/또는 p-아미노벤질 카바모일 (p-aminobenzyl carbamoyl: PABC) 모이어티에 의해 절단 가능한 모티프 (motif)를 포함하는 방법.
- [0096] 21. 구체예 14 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 페이로드를 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)에 또는 링커에 포함된 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 에 연결하기 위한 반응성 기 (reactive group)를 추가로 포함하는 방법.
- [0097] 22. 구체예 2 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 항체는 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 항체, 또는 이의 단편 또는 재조합 변이체이고, 상기 이의 단편 또는 재조합 변이체는 표적 결합 특성을 보유하고, C_H2 도메인을 포함하는 방법.
- [0098] 23. 구체예 22에 있어서, 항체는 IgG 항체인 것인 방법.
- [0099] 24. 구체예 22 또는 23에 있어서, 항체는 글리코실화 항체 (glycosylated antibody), 데글리코실화 항체 (deglycosylated antibody) 또는 아글리코실화 항체 (aglycosylated antibody)인 것인 방법.
- [0100] 25. 구체예 24에 있어서, 글리코실화 항체는 C_H2 도메인의 잔기 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된 IgG 항체인 것인 방법.
- [0101] 26. 구체예 2 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 링커는 항체의 Fc 도메인 내의 Gln 잔기에 접합되거나, 또는 링커는 분자 공학 (molecular engineering)에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기에 접합되는 방법.
- [0102] 27. 구체예 26에 있어서, 항체의 Fc 도메인 내의 Gln 잔기는 IgG 항체의 C_H2 도메인의 Gln 잔기 Q295 (EU numbering)인 방법.
- [0103] 28. 구체예 26에 있어서, 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 아글리코실화 IgG 항체의 C_H2 도메인의 N297Q (EU numbering)인 방법.
- [0104] 29. 구체예 26에 있어서, 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 (a) 항체의 중쇄 또는 경쇄에 통합되거나 또는 (b) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단 단부에 융합된 펩티드에 포함되는 방법.
- [0105] 30. 구체예 29에 있어서, Gln 잔기를 포함하는 펩티드는 항체의 중쇄의 C-말단 단부에 융합된 방법.
- [0106] 31. 구체예 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 링커는 Gln 잔기의 아미드 측쇄에 접합되는 방법.
- [0107] 32. 구체예 31에 있어서, 링커는 글리코실화 항체에 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 접합 효율로 접합하기에 적합한 것인 방법.
- [0108] 33. 구체예 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 미생물 트랜스글루타미나제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 중, 구체적으로 스트렙토마이세스 모바라엔시스 (*Streptomyces mobaraensis*)로부터 유래되는 방법.
- [0109] 34. 구체예 1 내지 32 중 어느 하나에 따른 방법으로 생성된 단백질-링커 접합체 (protein-linker conjugate).
- [0110] 35. a) 단백질; 및
- [0111] b) 하기 구조 ($N \rightarrow C$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 포함하며, 상기 링커는 잔기 Aax 내의 1차 아민을 통해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기의 아미드 측쇄에 접합되는, 단백질-링커 접합체 (protein-linker conjugate):
- [0112] $(Aax)-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$,
- [0113] 상기에서
- [0114] ● Aax는 아미노산 또는 아미노산 유도체이고;

- [0115]  (Sp₁)은 화학적 스페이서이며;
- [0116]  (Sp₂)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0117]  B₁은 연결 모이어티 또는 페이로드이다.
- [0118] 36. 구체예 35에 있어서, 단백질은 항체이고, Gln 잔기는 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함되는 집합체.
- [0119] 37. 구체예 35 또는 36에 있어서, 잔기 Aax는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산, 또는 이의 아미노산 모방체 또는 유도체인 집합체.
- [0120] 38. 구체예 35 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 화학적 스페이서 (Sp₁) 및 (Sp₂)는 0 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함하는 집합체.
- [0121] 39. 구체예 35 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 링커는 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6개 이하의 아미노산 잔기를 포함하는 집합체.
- [0122] 40. 구체예 35 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 링커의 순전하는 중성 또는 양성인 집합체.
- [0123] 41. 구체예 35 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 링커는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것인 집합체.
- [0124] 42. 구체예 35 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 링커는 적어도 하나의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하는 것인 집합체.
- [0125] 43. 구체예 35 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 링커는 제2 연결 모이어티 또는 페이로드 B₂를 포함하고, 구체적으로 상기 B₂는 링커에 화학적 스페이서 (Sp₂)를 통해 연결되는 것인 집합체.
- [0126] 44. 구체예 43에 있어서, B₁ 및 B₂는 서로 동일하거나 또는 상이한 것인 집합체.
- [0127] 45. 구체예 35 내지 42 또는 43 내지 44 중 어느 하나에 있어서, B₁ 및/또는 B₂는 연결 모이어티인 것인 집합체.
- [0128] 46. 구체예 45에 있어서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나는
- [0129]  생물직교 마커 기, 또는
- [0130]  가교를 위한 비-생물-직교 엔티티를 포함하는 집합체.
- [0131] 47. 구체예 46에 있어서, 생물직교 마커 기 또는 비-생물-직교 엔티티는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자 또는 모이어티로 구성되거나 또는 이를 포함하는 집합체:
- [0132]  -N=N≡N, 또는 -N₃;
- [0133]  Lys(N₃);
- [0134]  테트라진;
- [0135]  알킨;
- [0136]  스트레인드 사이클로옥틴;
- [0137]  BCN;

- [0138]  스트레인드 알켄;
- [0139]  광반응성 기;
- [0140]  -RCOH (알데히드);
- [0141]  아실트리플루오로보레이트;
- [0142]  단백질 분해제 ('PROTAC');
- [0143]  사이클로펜타디엔/스피롤로사이클로펜타디엔;
- [0144]  티오-선택적 친전자체;
- [0145]  -SH; 및
- [0146]  시스테인.
- [0147] 48. 구체예 45 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나가 하나 이상의 페이로드에 연결되는 접합체.
- [0148] 49. 구체예 48에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 클릭-반응을 통해 연결되는 접합체.
- [0149] 50. 구체예 36 내지 42 또는 43 내지 44 중 어느 하나에 있어서, B₁ 및/또는 B₂는 페이로드인 접합체.
- [0150] 51. 구체예 48 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 하기 중 적어도 하나를 포함하는 접합체:
- [0151]  독소;
- [0152]  사이토카인;
- [0153]  성장 인자;
- [0154]  방사성핵종;
- [0155]  호르몬;
- [0156]  항-바이러스제;
- [0157]  항-박테리아제;
- [0158]  형광 염료;
- [0159]  면역조절제/면역자극제;
- [0160]  반감기 증가 모이어티;
- [0161]  용해도 증가 모이어티;
- [0162]  폴리머-독소 접합체;
- [0163]  핵산;

- [0164]  바이오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티;
- [0165]  비타민;
- [0166]  단백질 분해제 ('PROTAC');
- [0167]  표적 결합 모이어티; 및/또는
- [0168]  항-염증제.
- [0169] 52. 구체예 51에 있어서, 독소는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나인 것인 접합체:
- [0170]  피롤로벤조디아제핀 (PBD);
- [0171]  아우리스타틴 (예: MMAE, MMAF);
- [0172]  메이탄시노이드 (메이탄신, DM1, DM4, DM21);
- [0173]  두오카르마이신;
- [0174]  니코틴아미드 포스포리보실트랜스퍼라제 (NAMPT) 억제제;
- [0175]  튜불리신;
- [0176]  엔디이엔 (예: 칼리케아미신);
- [0177]  PNUs, 독소루비신;
- [0178]  피롤계 키네신 스핀들 단백질 (KSP) 억제제;
- [0179]  크립토피신;
- [0180]  약물 유출 펌프 억제제;
- [0181]  산드라마이신;
- [0182]  아마니틴 (예: α -아마니틴); 및
- [0183]  캄프토테신 (예: 엑사테칸, 테록스테칸).
- [0184] 53. 구체예 48 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 페이로드는 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티를 추가로 포함하는 접합체.
- [0185] 54. 구체예 53에 있어서, 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티는 모티프 발린-시트룰린 (valine-citrulline: VC) 및/또는 p-아미노벤질 카바모일 (PABC) 모이어티를 포함하는 접합체.
- [0186] 55. 구체예 36 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 항체는 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 항체, 또는 이의 단편 또는 재조합 변이체이고, 상기 이의 단편 또는 재조합 변이체는 표적 결합 특성을 보유하고, C_H2 도메인을 포함하는 항체-링커 접합체.
- [0187] 56. 구체예 55에 있어서, 항체는 IgG 항체인 것인 항체-링커 접합체.
- [0188] 57. 구체예 55 또는 56에 있어서, 항체는 글리코실화 항체, 테글리코실화 항체 또는 아글리코실화 항체인 것인 항체-링커 접합체.
- [0189] 58. 구체예 57에 있어서, 글리코실화 항체는 C_H2 도메인의 잔기 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된 IgG 항

체인 것인 항체-링커 접합체.

- [0190] 59. 구체예 36 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 링커가 접합된 Gln 잔기는 항체의 Fc 도메인에 포함되거나 또는 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 것인 항체-링커 접합체.
- [0191] 60. 구체예 59에 있어서, 항체의 Fc 도메인에 포함된 Gln 잔기는 IgG 항체의 C_H2 도메인의 Gln 잔기 Q295 (EU numbering)인 항체-링커 접합체.
- [0192] 61. 구체예 59에 있어서, 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 아글리코실화 IgG 항체의 C_H2 도메인의 N297Q (EU numbering)인 항체-링커 접합체.
- [0193] 62. 구체예 59에 있어서, 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 (a) 항체의 중쇄 또는 경쇄에 통합되거나 또는 (b) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단 단부에 융합된 펩티드에 포함되는 항체-링커 접합체.
- [0194] 63. 구체예 62에 있어서, Gln 잔기를 포함하는 펩티드는 항체의 중쇄의 C-말단 단부에 융합된 것인 항체-링커 접합체.
- [0195] 64. 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체를 포함하며, 구체적으로 항체-링커 접합체는 적어도 하나의 페이로드를 포함하는, 약학 조성물.
- [0196] 65. 구체예 64에 있어서, 적어도 하나의 추가적인 약학적으로 허용 가능한 성분을 포함하는 약학 조성물.
- [0197] 66. 요법 (therapy) 및/또는 진단 (diagnostics)에 사용하기 위한, 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체 또는 구체예 64 또는 65에 따른 약학 조성물.
- [0198] 67. 신생물 질환 (neoplastic disease), 신경계 질환 (neurological disease), 자가면역 질환 (autoimmune disease), 염증성 질환 (inflammatory disease) 또는 감염성 질환 (infectious disease)을
- [0199] ● 앓고 있고,
- [0200] ■ 발병 위험이 있으며, 및/또는
- [0201] ■ 진단받은
- [0202] 환자의 치료에 사용하기 위한, 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체 또는 구체예 64 또는 65에 따른 약학 조성물.
- [0203] 68. 신생물 질환을 앓고 있는 환자의 치료에 사용하기 위한, 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체 또는 구체예 64 또는 65에 따른 약학 조성물.
- [0204] 69. 수술 전, 수술 중 또는 수술 후 영상화에 사용하기 위한, 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체 또는 구체예 64 또는 65에 따른 약학 조성물.
- [0205] 70. 수술 중 영상-가이드 암 수술 (intraoperative imaging-guided cancer surgery)에 사용하기 위한, 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체 또는 구체예 64 또는 65에 따른 약학 조성물.
- [0206] 71. 신생물 질환, 신경계 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환을
- [0207] ● 앓고 있고,
- [0208] ■ 발병 위험이 있으며, 및/또는
- [0209] ■ 진단받은
- [0210] 환자의 치료용 약제의 제조를 위한, 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체 또는 구체예 64 또는 65에 따른 약학 조성물의 용도.
- [0211] 72. 구체예 36 내지 63 중 어느 하나에 따른 항체-링커 접합체 또는 구체예 64 또는 65에 따른 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 신생물 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

- [0212] 본 발명을 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 장치 및 방법이 다양할 수 있으므로 기재된 방법의 공정 단계 또는 특정 구성요소에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 특정 구체예를 설명하기 위한 목적일 뿐, 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 달리 명백하게 지시하지 않는 한, 단수 및/또는 복수의 지시대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다. 더욱이, 수치 (numeric values)로 구분되는 파라미터 범위가 제공되는 경우에, 해당 범위는 이들 제한 값을 포함하는 것으로 사료되는 것으로 이해해야 한다.
- [0213] 본원에 개시된 구체예는 서로 관련되지 않는 개별 구체예로서 이해되는 것을 의미하지 않는다는 것을 또한 이해해야 한다. 일 구체예에서 논의된 특징들은 본원에 개시된 다른 구체예들과 관련하여 또한 개시되는 것을 의미한다. 한 경우에 특정 특징이 하나의 구체예에는 개시되지 않고 다른 구체예에 개시되는 경우, 당업자는 상기 특징이 상기 다른 구체예에 개시되는 것을 의미하지 않는다는 것을 반드시 의미하지 않는다는 것을 이해할 것이다. 당업자는 다른 구체예에 대해서도 상기 특징을 개시하는 것이 본 출원의 요지이지만, 명료함을 목적으로 하고 명세서를 관리 가능한 양으로 유지하기 위해 이를 수행하지 않았다는 것을 이해할 것이다.
- [0214] 더욱이, 본원에 언급된 문헌의 내용은 참조로 통합된다. 이는 특히 표준 또는 일상적인 방법을 개시하는 문헌을 지칭한다. 해당 경우에, 참조에 의한 통합은 주로 가능하게 하는 충분한 개시를 제공하고 긴 반복을 회피하기 위한 목적을 갖는다.
- [0215] 특정 구체예에서, 본 발명은 하기 구조 ($N \rightarrow C$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 단백질에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하는, 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 단백질-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것이다:
- [0216] $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$
- [0217] 상기에서
- [0218]  Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이며;
- [0219]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0220]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0221]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이다.
- [0222] 즉, 본 발명의 방법은 미생물 트란스글루타미나제를 사용하여 아미노산-기반 링커를 단백질의 글루타민 잔기에 아미노산-기반 링커의 N-말단 아미노산내 1차 아민을 통해 효율적으로 접합시킬 수 있다는 놀라운 발견에 기반한다. 단백질의 글루타민 잔기에 대한 펩티드의 효율적인 MTG-매개 접합이 펩티드의 리신 모이어티의 ϵ -아미노기를 통해서만 가능하다는 것이 당해 기술 분야에서 광범위하게 받아들여졌다 (WO 2019/057772). 그러나, 본 발명자들은 단백질에 대한 아미노산-기반 링커의 효율적인 접합이 또한 아미노산-기반 링커의 N-말단 아미노산 잔기에 포함된 다른 1차 아민을 통해서도 달성될 수 있다는 것을 본원에서 예기치 않게 발견하였다.
- [0223] 본 발명자들은 청구된 방법이 매우 비용 효율적으로, 신속하게 부위-특이적 항체-링커 접합체를 생성하는데 적합하고 (예를 들어, 24-48시간), 따라서 이러한 분자들의 큰 라이브러리의 생성, 및 고처리량 스크리닝 시스템에서 이의 후속하는 스크리닝이 가능하다는 것을 밝혀냈다.
- [0224] 본 발명 내에서, 상기 단백질은 미생물 트란스글루타미나제에 의해 접합에 접근 가능한 글루타민 잔기를 포함하는 임의의 단백질일 수 있다. 또한, 미생물 트란스글루타미나제에 의해 접합에 접근 가능한 하나 이상의 글루타민 잔기를 포함하는 단백질 태그 (protein tags)가 당해 기술 분야에 알려져 있고, 본원에 개시되어 있다 (서열 번호: 5-38). 따라서, 본 발명의 방법의 표적 단백질은 글루타민-포함 태그, 예컨대 서열 번호: 5-38에 제시된 태그에 융합된 단백질을 포함하는 융합 단백질 (fusion protein)일 수 있다.
- [0225] 소정의 구체예에서, 상기 단백질은 치료 단백질 (therapeutic protein)일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "치료 단백질 (therapeutic protein)"은 생물학적 활성을 나타내고, 허용 가능한 투여 경로로 이를 필요로 하는 환자에게 전달함으로써 질병 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있는 단백질을 지칭한다. 치료 단백질의 생물학적 활성은 인 비트로 또는 인 비보에서 입증될 수 있으며, 단백질과 수용체 및/또는 다른 세포내 또는 세포외 성분과의 상호작용으로 인해 생물학적 효과를 유도한다. 치료 단백질의 예는 분자 가령 예를 들어 레닌

(renin), 성장 호르몬, 인간 (human) 성장 호르몬; 소 (bovine) 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지질단백질; 1-안티트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 트롬보포이에틴 (thrombopoietin); 난포 자극 호르몬; 칼시토닌 (calcitonin); 황체형성 호르몬; 글루카곤 (glucagon); 응고 인자 (clotting factors) 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 및 폰 빌레브란트 인자 (von Willebrands factor); 항-응고 인자 (anti-clotting factors) 예컨대 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자 (atrial natriuretic factor); 폐 계면활성제 (lung surfactant); 플라스미노겐 활성화인자 (plasminogen activator) 예컨대 우로키나제 (urokinase) 또는 인간 소변 또는 조직-타입 플라스미노겐 활성화인자 (t-PA); 봄베신 (bombesin); 트롬빈 (thrombin); 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파; 종양 괴사 인자-베타; 엔케팔리나제 (enkephalinase); 혈청 알부민 (serum albumin) 예컨대 인간 혈청 알부민; 뮐러관-억제 물질 (mullerian-inhibiting substance); 릴랙신 A-사슬 (relaxin A-chain); 릴랙신 B-사슬 (relaxin B-chain); 프로릴랙신 (prorelaxin); 마우스 고나도트로핀-관련 펩티드 (mouse gonadotropin-associated peptide); 미생물 단백질 예컨대 베타-락타마제; DNase; 인히빈 (inhibin); 액티빈 (activin); 혈관 내피 성장 인자 (vascular endothelial growth factor: VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린 (integrin); 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자 (neurotrophic factor) 예컨대 뇌-유래 신경영양 인자 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자 (nerve growth factor) 예컨대 NGF-β; 카디오토로핀 (cardiotrophins) (심장 비대 인자) 예컨대 카디오토로핀-1 (cardiotrophin-1: CT-1); 혈소판-유래 성장 인자 (platelet-derived growth factor: PDGF); 섬유아 세포 성장 인자 (fibroblast growth factor) 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (epidermal growth factor: EGF); 전환 성장 인자 (transforming growth factor: TGF) 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타 (TGF-β I, TGF-p2, TGF-p3, TGF-p4, 또는 TGF-5 포함); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질 예컨대 CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19; 에리트로포이에틴 (erythropoietin); 골유도 인자 (osteoinductive factors); 면역독소 (immunotoxins); 골 형태형성 단백질 (bone morphogenetic protein: BMP); 인터페론 (interferon) 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (colony stimulating factors: CSFs), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF, 및 GCSF; 인터루킨 (interleukins: ILs), 예를 들어 IL-1 내지 IL-13; 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (superoxide dismutase); T-세포 수용체; 표면 막 단백질 (surface membrane proteins); 붕괴 촉진 인자 (decay accelerating factor); 바이러스 항원 (viral antigen) 가령 예를 들어 AIDS 외피의 일부; 수송 단백질 (transport proteins); 귀소 수용체 (homing receptors); 어드레신 (addressins); 및 조절 단백질 (regulatory proteins)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0226] 소정의 구체예에서, 상기 단백질은 백신에 접합될 수 있는 운반 단백질 (carrier protein), 예컨대 운반 단백질 CRM197일 수 있다.

[0227] 바람직하게는, 본 발명의 단백질은 링커에 포함된 페이로드를 표적 세포 또는 조직으로 전달하는데 사용될 수 있는 항원-결합 단백질일 수 있다. 소정의 구체예에서, 상기 항원-결합 단백질은 디자인된 안키린 반복 단백질 (designed ankyrin repeat protein: DARPIN), 또는 다른 항체 모방체, 예컨대 아피바디 분자 (affibody molecules), 아필린 (affilins), 아피머 (affimers), 아피틴 (affitins), 알파바디 (alphabodies), 안티칼린 (anticalins), 아비머 (avimers), 피노머 (fynomers), 쿠니츠도메인 펩티드 (kunitzdomain peptides), 모노바디 (monobodies)일 수 있다.

[0228] 가장 바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용되는 단백질은 항체이다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 하기 구조 (N → C 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하는, 미생물 트랜스글루타미나제 (MTG)에 의한 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것이다:

[0229] Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)

[0230] 상기에서

[0231]  Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고;

[0232]  (Sp₁)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;

- [0233]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0234]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이다.
- [0235] 즉, 본 발명의 방법은 미생물 트랜스글루타미나제를 사용하여 아미노산-기반 링커를 항체의 글루타민 잔기에 아미노산-기반 링커의 N-말단 아미노산내 1차 아민을 통해 효율적으로 접합시킬 수 있다는 놀라운 발견에 기반한다. 항체의 글루타민 잔기에 대한 펩티드의 효율적인 MTG-매개 접합이 펩티드의 리신 모이어티의 ϵ -아미노기를 통해서만 가능하다는 것이 당해 기술 분야에서 광범위하게 받아들여졌다 (WO 2019/057772). 그러나, 본 발명자들은 항체에 대한 아미노산-기반 링커의 효율적인 접합이 또한 아미노산-기반 링커의 N-말단 아미노산 잔기에 포함된 다른 1차 아민을 통해서도 달성될 수 있다는 것을 본원에서 예기치 않게 발견하였다.
- [0236] 본 발명자들은 청구된 방법이 매우 비용 효율적으로, 신속하게 부위-특이적 항체-링커 접합체를 생성하는데 적합하고 (예를 들어, 24-48시간), 따라서 이러한 분자들의 큰 라이브러리의 생성, 및 고처리량 스크리닝 시스템에서 이의 후속하는 스크리닝이 가능하다는 것을 밝혀냈다.
- [0237] 이에 대조적으로, 페이로드가 항체에 유전자 (분자적으로) 조작된 Cys 잔기를 통해 접합되는 경우 항체-페이로드 접합체가 생성되는 Cys 조작 공정 (Cys engineering process)은 적어도 약 3-4주를 필요로 한다.
- [0238] 일반적으로, 상기 방법은 항체에 대한 다수의 페이로드의 접합을 가능하게 한다. 각 페이로드에 대해, 최적의 임상 및 비-임상 특성을 전달하는데 적합한 아미노산-기반 링커 구조를 큰 링커 풀 (linker pool)로부터 확인할 수 있다. 이는 링커 구조가 고정된 다른 방법에서는 가능하지 않다. 또한, 본 발명에 따른 방법은 2개 이상의 상이한 페이로드를 포함하는 항체-페이로드 접합체를 생성할 수 있게 하며, 여기서 각 페이로드는 항체에 부위-특이적 방식으로 접합된다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은 신규 및/또는 우수한 치료 또는 진단 능력을 가진 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0239] 본 발명의 방법에 사용되는 아미노산-기반 링커는 구조 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$ 를 갖는다. 상기 링커는 항체의 글루타민 잔기에 링커의 N-말단 아미노산 잔기 Aax에 포함된 1차 아민을 통해 접합되는 것으로 이해해야 한다.
- [0240] Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체일 수 있다. 용어 아미노산 (amino acid)은 α -아미노산 뿐만 아니라, 다른 아미노산 예컨대 β -, γ - 또는 δ -아미노산 등을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 구체예에서, Aax가 키랄 α -아미노산인 경우, Aax는 이의 L- 또는 D-형태로 존재할 수 있다. 구체예에서, Aax가 키랄 β -, γ - 또는 δ -아미노산인 경우, Aax는 이의 S- 또는 R-형태로 존재할 수 있다. 따라서, 이의 광의적 의미에서, 본원에서 사용된, 용어 "아미노산 (amino acid)"은 아미노기 ($-NH_2$) 및 카복실기 ($-COOH$)를 함유하는 임의의 유기 화합물을 지칭할 수 있다. 따라서, 잔기 Aax가 본 개시내용 전반에 걸쳐 아미노산 잔기로서 언급될 때마다, 용어 아미노산 잔기는 또한 아미노산 모방체 또는 유도체를 포함할 수 있는 것으로 이해해야 한다.
- [0241] 또한, 용어 아미노산 (amino acid)은 알려진 단백질생성 아미노산 (proteinogenic amino acids)의 세트, 즉 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린을 포함하고, 또한 비-정준 및 비-천연 아미노산을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본원에서 사용된, "비-정준 아미노산 (non-canonical amino acid)"은 단백질생성 아미노산 세트의 일부는 아니지만, 천연 공급원으로부터 수득될 수 있는 임의의 아미노산일 수 있다. 그러나, 일부 비-정준 아미노산은 또한 자연 발생 펩티드 및/또는 단백질에서 발견될 수 있다는 점에 유의해야 한다.
- [0242] 본원에서 사용된, "비-천연 아미노산 (non-natural amino acid)" 또는 "합성 아미노산 (synthetic amino acid)"은 아미노기 및 카복실기를 포함하는 아미노산의 일반적인 정의에는 속하지만, 자연에서는 발견되지 않는 임의의 분자일 수 있다. 따라서, 비-천연 아미노산은 바람직하게는 화학적 합성에 의해 수득된다. 비-정준 아미노산 및 비-천연 아미노산 간의 차이는 어떤 경우에는 불확실할 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 비-천연 아미노산으로 정의된 아미노산은 이후에 자연에서 확인되어, 비-정준 아미노산으로 재분류될 수 있다.
- [0243] 소정의 구체예에서, 잔기 Aax는 아미노산 모방체일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "아미노산 모방체 (amino acid mimetic)"는 특정 아미노산과 상이한 구조를 갖지만 상기 특정 아미노산과 유사한 방식으로 기능하여 상기 특정 아미노산을 대체하기 위해 사용될 수 있는 화합물을 지칭한다. 아미노산 모방체는 이것이 모방하는 아미노산과 유사한 구조적 및/또는 기능적 특징을 적어도 어느 정도 충족하는 경우, 아미노산 모방체는 특정 아미노산과 유사한 방식으로 기능한다고 한다.

- [0244] 소정의 구체예에서, 잔기 Aax는 아미노산 유도체일 수 있다. 용어 "아미노산 유도체 (amino acid derivative)"는 아미노산에 포함된 하나 이상의 관능기가 변형되거나 또는 치환된, 본원에 정의된 아미노산을 지칭한다. 아미노산 유도체는 바람직하게는 단백질생성 또는 비-정준 아미노산의 유도체일 수 있다. 아미노산 유도체에서, 임의의 관능기는 치환되거나 또는 변형될 수 있다. 그러나, 본 발명의 아미노산 유도체는 화학적 스페이서 (Sp_1) 또는 페이로드 B_1 에 대한 결합을 가능하게 하는 유리 카복실 기, 및 항체의 글루타민 잔기에 대한 접합을 가능하게 하는 유리 1차 아민, 바람직하게는 아미노 기를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0245] 상기 아미노산-기반 링커는 항체의 글루타민 잔기에 상기 링커의 N-말단 아미노산 잔기 Aax에 포함된 임의의 1차 아민을 통해 접합될 수 있다. 그러나, 아미노산-기반 링커는 항체의 글루타민 잔기에 상기 링커의 N-말단 아미노산 잔기 Aax에 포함된 N-말단 아미노 기를 통해 접합되는 것이 바람직하다. 즉, 위치 Aax에서 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체가 α -아미노산인 구체예에서, 아미노산-기반 링커는 항체의 글루타민 잔기에 Aax의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 위치 Aax에서의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체가 β -아미노산인 구체예에서, 아미노산-기반 링커는 항체의 글루타민 잔기에 Aax의 β -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 위치 Aax에서의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체가 γ -아미노산인 구체예에서, 아미노산-기반 링커는 항체의 글루타민 잔기에 Aax의 γ -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 위치 Aax에서의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체가 δ -아미노산인 구체예에서, 아미노산-기반 링커는 항체의 글루타민 잔기에 Aax의 δ -아미노 기를 통해 접합될 수 있다.
- [0246] 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 N-말단 잔기 Aax의 1차 아민은 N-말단 잔기 Aax의 N-말단 아미노 기이다.
- [0247] 따라서, Aax의 N-말단은 보호되거나, 변형되거나 또는 치환되지 않는 것이 바람직하다.
- [0248] 그러나, 소정의 구체예에서, 링커가 항체의 글루타민 잔기에 접합되는데 경유하는 1차 아민은 N-말단 잔기 Aax의 N-말단 아미노 기가 아닌 1차 아민일 수 있다. 예를 들어, 소정의 구체예에서, Aax는 아미노산 유도체일 수 있으며, 여기서 N-말단 아미노 기는 변형되거나 또는 치환되어, MTG에 대한 기질로서 이용 가능하지 않다. 이러한 구체예에서, Aax는 링커가 항체의 글루타민 잔기에 접합될 수 있는데 경유하는 추가의 1차 아민을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax는 프롤린 모방체일 수 있다. 프롤린은 1차 아민을 포함하지 않으므로, MTG를 통해 항체내 글루타민 잔기에 접합될 수 없다. 그러나, 프롤린 모방체가 본 발명의 방법에 사용될 수 있으며, 단 상기 프롤린 모방체는 1차 아민을 포함해야 한다.
- [0249] 상기 기재된 바와 같이, 아미노산 잔기 Aax는 아미노 기 (NH_2) 및 카복실 기 ($COOH$)를 포함하는 분자로 광범위하게 정의될 수 있다. 즉, 아미노산 잔기 Aax는 구조 $NH_2-Y-COOH$ 를 갖는 것으로 정의될 수 있다.
- [0250] 소정의 구체예에서, Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함할 수 있다. 즉, 특정 구체예에서, 본 발명은 하기 구조 ($N \rightarrow C$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하는, 미생물 트랜스글루타미나제 (MTG)에 의한 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것이다:
- [0251] $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$
- [0252] 상기에서
- [0253]  Aax는 구조 $NH_2-Y-COOH$ 를 갖는 아미노산이고, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하며;
- [0254]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0255]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0256]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이다.
- [0257] 본원에서 사용된, 용어 "알킬 (alkyl)"은 1 내지 20개의 탄소 원자 (예를 들어, 2 내지 20개의 탄소 원자, 2 내지 10개의 탄소 원자, 또는 2 내지 6개의 탄소 원자)의 분지쇄 또는 직쇄 1가 포화 지방족 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 본원에서 사용된, 용어 "헤테로알킬 (heteroalkyl)"은 구성요소 탄소 원자 중 하나 이상이 질소, 산

소 또는 황으로 대체된, 본원에 정의된 바와 같은 알킬 기를 지칭한다. (헤테로)알킬 사슬은 직쇄 (헤테로)알킬 사슬 또는 분지쇄 (헤테로)알킬 사슬일 수 있다. 소정의 구체예에서, (헤테로)알킬 사슬은 직쇄 (헤테로)알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, 직쇄 헤테로알킬 사슬은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 사슬일 수 있다.

[0258] 치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬은 하나 이상의 수소 원자가 다른 원자 또는 원자 그룹에 의해 치환된 알킬 또는 헤테로알킬이다. 예를 들어, 알킬 또는 헤테로알킬 사슬의 수소 원자는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나의 치환기로 치환될 수 있다: 시아노, 니트로, 푸릴, 하이드록실, 알콕시, 알킬티오, 알킬설퍼닐, 알킬설포닐, 알킬카보닐, 알콕시카보닐, 알킬카보닐옥시, 모노- 또는 디-알킬아미노카보닐, 티올, 알킬-C(O)S-, 아민, 알킬아민, 아마이드 및 알킬아מיד. 소정의 구체예에서, (헤테로)알킬 사슬은 단백질생성 아미노산의 측쇄로 치환된다.

[0259] Y는 임의의 크기를 가질 수 있다. 그러나, Y는 2-200개의 원자, 바람직하게는 2-100개의 원자, 더 바람직하게는 2-40개의 원자의 크기를 갖는 것이 바람직하다.

[0260] 소정의 구체예에서, Y는 상기 정의된 바와 같은 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 즉, 특정 구체예에서, 본 발명은 하기 구조 ($N \rightarrow C$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하는, 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의한 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것이다:

[0261] $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$

[0262] 상기에서

[0263]  Aax는 구조 $NH_2-Y-COOH$ 를 갖는 아미노산이고, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이며;

[0264]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;

[0265]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;

[0266]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이다.

[0267] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 10의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 2 내지 20의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 2 내지 10의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 2 내지 6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 3 내지 20의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 3 내지 10의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함할 수 있으며, 여기서 n은 3 내지 6의 정수이다.

[0268] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 10의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 2 내지 20의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 2 내지 10의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 2 내지 6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 3 내지 20의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 3 내지 10의 정수이다. 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 3 내지 6의 정수이다.

- [0269] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 1이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 글리신일 수 있다.
- [0270] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 2이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 β -알라닌일 수 있다.
- [0271] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 3이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 4-아미노부티르산일 수 있다.
- [0272] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 4이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 5-아미노펜타노산일 수 있다.
- [0273] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 5이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 6-아미노헥사노산일 수 있다.
- [0274] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 6이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 7-아미노헵타노산일 수 있다.
- [0275] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 7이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 8-아미노옥타노산일 수 있다.
- [0276] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 8이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 9-아미노노나노산일 수 있다.
- [0277] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 9이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 10-아미노데카노산일 수 있다.
- [0278] 소정의 구체예에서, Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 가질 수 있으며, 여기서 n은 10이다. 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 11-아미노운데카노산일 수 있다.
- [0279] 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 0-20, 0-10 또는 0-6의 정수이다.
- [0280] 즉, 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_n-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-Y-(CH_2)_n-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다.
- [0281] 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_1-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_2-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_3-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_4-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_5-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_6-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_7-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_8-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_9-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $NH_2-(CH_2)_{10}-Y-COOH$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는

는 헤테로알킬 사슬이다.

[0282] 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_9-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{Y}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이고, n은 1-20, 1-10 또는 1-6의 정수이다.

[0283] 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다. 소정의 구체예에서, Aax는 구조 $\text{NH}_2-\text{Y}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬이다.

[0284] 바람직한 일 구체예에서, 잔기 Aax는 적어도 하나의 메틸렌 기 (CH_2)를 포함한다. 더 바람직하게는, 적어도 하나의 메틸렌 기는 1차 아민에 직접 커플링된다. 즉, Aax는 바람직하게는 구조 NH_2-CH_2- 를 포함한다.

[0285] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 잔기 Aax는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산: 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린, 또는 이의 아미노산 모방체 또는 유도체이다.

[0286] 본 발명의 일 구체예에서, 잔기 Aax는 알라닌 (alanine), 알라닌 모방체 또는 알라닌 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 알라닌일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 알라닌, 알라닌 모방체 또는 알라닌 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 알라닌 모방체는 알라닌 측쇄의 조성이 알라닌과 상이할 수 있다. 즉, 알라닌 모방체는 알라닌 측쇄의 길이 또는 조성이 알라닌과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 알라닌 모방체는 메틸렌 기 자체가 알라닌과 상이할 수 있다. 알라닌

유도체는 바람직하게는 알라닌 또는 알라닌 모방체일 수 있으며, 여기서 메틸렌 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Ala}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Ala는 알라닌, 알라닌 모방체 또는 알라닌 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 알라닌 유도체는 β -치환된 알라닌, 예컨대 β -사이클로프로필알라닌, 페닐글리신, β -시아노알라닌, β -(3-피리딜)-알라닌, β -(1,2,4-트리아졸-1-일)-알라닌 또는 β -(1-피페라지닐)-알라닌일 수 있다. 소정의 구체예에서, 알라닌 모방체는 데하이드로알라닌일 수 있다.

[0287] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 아르기닌 (arginine), 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 아르기닌일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 아르기닌 모방체는 구아니디노 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 아르기닌과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 아르기닌 모방체는 구아니디노 기 자체가 아르기닌과 상이할 수 있다. 즉, 아르기닌 모방체는 구아니디노 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 아르기닌 유도체는 바람직하게는 아르기닌 또는 아르기닌 모방체일 수 있으며, 여기서 구아니디노 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Arg}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 아르기닌 모방체는 호모아르기닌 또는 β -우레이도알라닌일 수 있다. 소정의 구체예에서, 아르기닌 유도체는 ω -메틸아르기닌일 수 있다.

[0288] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 아스파라긴 (asparagine), 아스파라긴 모방체 또는 아스파라긴 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 아스파라긴일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 아스파라긴, 아스파라긴 모방체 또는 아스파라긴 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 아스파라긴 모방체는 카복사미드 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 아스파라긴과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 아스파라긴 모방체는 카복사미드 기 자체가 아스파라긴과 상이할 수 있다. 즉, 아스파라긴 모방체는 카복사미드 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 아스파라긴 유도체는 바람직하게는 아스파라긴 또는 아스파라긴 모방체일 수 있으며, 여기서 카복사미드 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Asn}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Asn은 아스파라긴, 아스파라긴 모방체 또는 아스파라긴 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 아스파라긴 모방체는 L-트레오-3-하이드록시아스파라긴, L-2-아미노-2-카복시에탄설폰아미드 또는 5-디아조-4-옥소-L-노르발린일 수 있다. 소정의 구체예에서, 아스파라긴 유도체는 N,N-디메틸-L-아스파라긴일 수 있다.

[0289] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 아스파르트산 (aspartic acid), 아스파르트산 모방체 또는 아스파르트산 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 아스파르트산일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 아스파르트산, 아스파르트산 모방체 또는 아스파르트산 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 아스파르트산 모방체는 측쇄내 카복실산 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 아스파르트산과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 아스파르트산 모방체는 카복실산 기 자체가 아스파르트산과 상이할 수 있다. 즉, 아스파르트산 모방체는 카복실산 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 아스파르트산 유도체는 바람직하게는 아스파르트산 또는 아스파르트산 모방체일 수 있으며, 여기서 카복실산 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Asp}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Asp는 아스파르트산, 아스파르트산 모방체 또는 아스파르트산 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 아스파르트산 모방체는 α -아미노아디프산, DL-트레오- β -하이드록시아스파르트산 또는 L-2-아미노헵탄디오산일 수 있다. 소정의 구체예에서, 아스파르트산 유도체는 L-아스파르트산 β -메틸 에스테르일 수 있다.

[0290] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 시스테인 (cysteine), 시스테인 모방체 또는 시스테인 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 시스테인일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 시스테인, 시스테인 모방체 또는 시스테인 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 시스테인 모방체는 측쇄내 티올 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 시스테인과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 시스테인 모방체는 티올 기 자체가 시스테인과 상이할 수 있다. 즉, 시스테인 모방체는 티올 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 시스테인 유도체는 바람직하게는 시스테인 또는 시스테인 모방체일 수 있으며, 여기서 티올 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Cys}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Cys는 시스테인, 시스테인 모방체

또는 시스테인 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 시스테인 모방체는 호모시스테인, 페니실라민 또는 셀레노시스테인일 수 있다. 소정의 구체예에서, 시스테인 유도체는 부티오닌-설펍시민일 수 있다.

[0291] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 글루탐산 (glutamic acid), 글루탐산 모방체 또는 글루탐산 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 글루탐산일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 글루탐산, 글루탐산 모방체 또는 글루탐산 유도체의 α -아미노기를 통해 접합될 수 있다. 글루탐산 모방체는 측쇄내 카복실산 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 글루탐산과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 글루탐산 모방체는 카복실산 기 자체가 글루탐산과 상이할 수 있다. 즉, 글루탐산 모방체는 카복실산 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 글루탐산 유도체는 바람직하게는 글루탐산 또는 글루탐산 모방체일 수 있으며, 여기서 카복실산 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Glu}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Glu는 글루탐산, 글루탐산 모방체 또는 글루탐산 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 글루탐산 모방체는 α -아미노아디프산, γ -메틸렌글루탐산, γ -카복시글루탐산, γ -하이드록시글루탐산 또는 2-아미노헵타디오산일 수 있다. 소정의 구체예에서, 글루탐산 유도체는 글루탐산-5-메틸 에스테르일 수 있다.

[0292] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 글루타민 (glutamine), 글루타민 모방체 또는 글루타민 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 글루타민일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 글루타민, 글루타민 모방체 또는 글루타민 유도체의 α -아미노기를 통해 접합될 수 있다. 글루타민 모방체는 카복사미드 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 글루타민과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 글루타민 모방체는 카복사미드 기 자체가 글루타민과 상이할 수 있다. 즉, 글루타민 모방체는 카복사미드 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 글루타민 유도체는 바람직하게는 글루타민 또는 글루타민 모방체일 수 있으며, 여기서 카복사미드 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Gln}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Gln은 글루타민, 글루타민 모방체 또는 글루타민 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 글루타민 모방체는 4-F-(2S,4R)-플루오로글루타민일 수 있다. 소정의 구체예에서, 글루타민 유도체는 γ -글루타밀메틸아미드, 테아닌, L-글루탐산 γ -모노하이드록사메이트일 수 있다.

[0293] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 글리신 (glycine), 글리신 모방체 또는 글리신 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 글리신일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 글리신, 글리신 모방체 또는 글리신 유도체의 α -아미노기를 통해 접합될 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Gly}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Gly는 글리신, 글리신 모방체 또는 글리신 유도체를 나타낸다.

[0294] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 히스티딘 (histidine), 히스티딘 모방체 또는 히스티딘 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 히스티딘일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 히스티딘, 히스티딘 모방체 또는 히스티딘 유도체의 α -아미노기를 통해 접합될 수 있다. 히스티딘 모방체는 이미다졸 고리 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 히스티딘과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 히스티딘 모방체는 이미다졸 고리 자체가 히스티딘과 상이할 수 있다. 즉, 히스티딘 모방체는 이미다졸 고리와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 대체 고리 구조를 포함할 수 있다. 히스티딘 유도체는 바람직하게는 히스티딘 또는 히스티딘 모방체일 수 있으며, 여기서 이미다졸 고리는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{His}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 His는 히스티딘, 히스티딘 모방체 또는 히스티딘 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 히스티딘 유도체는 이미다졸 고리에서 치환될 수 있다. 예를 들어, 히스티딘 유도체는 2,5-디-요오도히스티딘 또는 1-메틸히스티딘일 수 있다.

[0295] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 이소류신 (isoleucine), 이소류신 모방체 또는 이소류신 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 이소류신일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 이소류신, 이소류신 모방체 또는 이소류신 유도체의 α -아미노기를 통해 접합될 수 있다. 이소류신 모방체는 이소류신 측쇄의 조성이 이소류신과 상이할 수 있다. 즉, 이소류신 모방체는 화학적 조성은 상이하지만 이소류신 측쇄와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 측쇄를 포함할 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Ile}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Ile는 이소류신, 이소류신 모방체 또는 이소류신 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 이소류신 모방체는 알로-이소류신 또는 (4S)-4-하이드록시-L-이소류신

일 수 있다.

[0296] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 류신 (leucine), 류신 모방체 또는 류신 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 류신일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 류신, 류신 모방체 또는 류신 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 류신 모방체는 류신 측쇄의 구성이 류신과 상이할 수 있다. 즉, 류신 모방체는 화학적 조성은 상이하지만 류신 측쇄와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 측쇄를 포함할 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Leu}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Leu는 류신, 류신 모방체 또는 류신 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 류신 모방체는 노르류신 또는 4,5-데하이드로류신일 수 있다.

[0297] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 리신 (lysine), 리신 모방체 또는 리신 유도체일 수 있다. 리신은 2개의 1차 아민, 즉 α -아미노 기에 포함된 1차 아민 및 리신 측쇄에 포함된 1차 아민을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 리신 측쇄에 포함된 1차 아민을 통한 항체의 글루타민 잔기에 대한 펩티드의 접합이 당해 기술 분야에 보고된 이래로, 리신은 소정의 구체예에서 잔기 Aax로서 배제될 수 있다. 그러나, 잔기 Aax는 리신 모방체일 수 있음을 이해해야 한다. 구체적으로, 리신 모방체는 이의 측쇄에 ϵ -아미노 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖지만, MTG에 의해 기질로서 인식될 수 없는 관능기를 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 리신 모방체는 이의 N-말단 아미노 기를 통해 글루타민 잔기에 독점적으로 접합될 것이다. 대안적으로, 위치 Aax에서의 아미노산은 리신 유도체일 수 있다. 이러한 구체예에서, 리신 유도체는 바람직하게는 리신 또는 리신 모방체일 수 있으며, 여기서 ϵ -아미노 기는 MTG에 의해 기질로서 인식될 수 없도록 치환되거나 또는 변형된다. 다시, 이러한 구체예에서, 리신 유도체는 이의 N-말단 아미노 기를 통해 글루타민 잔기에 독점적으로 접합될 것이다. 따라서, 본 발명의 소정의 구체예에서, 잔기 Aax는 리신 모방체 또는 리신 유도체일 수 있으며, 여기서 리신 모방체 또는 리신 유도체는 이의 아미노산 측쇄에 1차 아민을 포함하지 않는다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Lys}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Lys는 리신 모방체 또는 리신 유도체를 나타내고, 바람직하게는 리신 모방체 또는 리신 유도체는 이의 아미노산 측쇄에 1차 아민을 포함하지 않는다. 소정의 구체예에서, 리신 유도체는 (3-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)프로프아미노)카보닐-L-리신, $\text{N}\epsilon, \text{N}\epsilon, \text{N}\epsilon$ -트리메틸리신, 시트룰린, 또는 시트룰린의 모방체 또는 유도체 예컨대 티오시트룰린 또는 호모 시트룰린일 수 있다.

[0298] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 메티오닌 (methionine), 메티오닌 모방체 또는 메티오닌 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 메티오닌일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 메티오닌, 메티오닌 모방체 또는 메티오닌 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 메티오닌 모방체는 티오에테르 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 구성이 메티오닌과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 메티오닌 모방체는 티오에테르 기 자체가 메티오닌과 상이할 수 있다. 즉, 메티오닌 모방체는 티오에테르 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 메티오닌 유도체는 바람직하게는 메티오닌 또는 메티오닌 모방체일 수 있으며, 여기서 티오에테르 기는 메티오닌의 경우와 다르게 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Met}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Met는 메티오닌, 메티오닌 모방체 또는 메티오닌 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 메티오닌 모방체는 S-메틸메티오닌, L-메티오닌 설펜, L-메티오닌 설펜사이드, L-메티오닌 설펜시민 또는 셀레노메티오닌일 수 있다.

[0299] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 페닐알라닌 (phenylalanine), 페닐알라닌 모방체 또는 페닐알라닌 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 페닐알라닌일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 페닐알라닌, 페닐알라닌 모방체 또는 페닐알라닌 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 페닐알라닌 모방체는 페닐 고리 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 구성이 페닐알라닌과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 페닐알라닌 모방체는 페닐 고리 자체가 페닐알라닌과 상이할 수 있다. 즉, 페닐알라닌 모방체는 페닐 고리와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 대체 고리 구조를 포함할 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Phe}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Phe는 페닐알라닌, 페닐알라닌 모방체 또는 페닐알라닌 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 페닐알라닌 유도체는 페닐 고리에서 치환될 수 있다. 예를 들어, 페닐알라닌 유도체는 4-요오도페닐알라닌, 펜타플루오로-페닐알라닌, 나프틸-알라닌 또는 4-아미노페닐알라닌일 수 있다.

[0300] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 프롤린 (proline), 프롤린 모방체 또는 프롤린 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 프롤린일 수 있다. 프롤린은 1차 아민이 없기 때문에 MTG에 대한 기질이 될 수 없음을 이해해야 한다. 따라서, 프롤린은 소정의 구체예에서 잔기 Aax로서 배제될 수 있다. 그러나, 위치 Aax에

서의 아미노산은 프롤린 모방체일 수 있으며, 바람직하게는 상기 프롤린 모방체는 1차 아민을 포함한다. 예를 들어, 프롤린 모방체는 이의 피롤리딘 고리에 하나 이상의 1차 아민-포함 치환기를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 소정의 구체예에서, 잔기 Aax는 프롤린 모방체일 수 있으며, 구체적으로 상기 프롤린 모방체는 1차 아민을 포함한다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Pro}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Pro는 프롤린 모방체를 나타내고, 구체적으로 상기 프롤린 모방체는 1차 아민을 포함한다. 소정의 구체예에서, 프롤린 모방체는 트랜스-4-아미노-L-프롤린일 수 있다.

[0301] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 세린 (serine), 세린 모방체 또는 세린 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 세린일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 세린, 세린 모방체 또는 세린 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 세린 모방체는 측쇄내 하이드록실 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 세린과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 세린 모방체는 하이드록실 기 자체가 세린과 상이할 수 있다. 즉, 세린 모방체는 하이드록실 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 세린 유도체는 바람직하게는 세린 또는 세린 모방체일 수 있으며, 여기서 하이드록실 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Ser}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Ser은 세린, 세린 모방체 또는 세린 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 세린 모방체는 호모세린, β -(2-티에닐)-세린 또는 β -(3,4-디하이드록시페닐)-세린일 수 있다. 소정의 구체예에서, 세린 유도체는 O-포스포세린일 수 있다.

[0302] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 트레오닌 (threonine), 트레오닌 모방체 또는 트레오닌 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 트레오닌일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 트레오닌, 트레오닌 모방체 또는 트레오닌 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 트레오닌 모방체는 측쇄내 하이드록실 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 트레오닌과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 트레오닌 모방체는 하이드록실 기 자체가 트레오닌과 상이할 수 있다. 즉, 트레오닌 모방체는 하이드록실 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 트레오닌 유도체는 바람직하게는 트레오닌 또는 트레오닌 모방체일 수 있으며, 여기서 하이드록실 기는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Thr}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Thr은 트레오닌, 트레오닌 모방체 또는 트레오닌 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 트레오닌 모방체는 알로-트레오닌일 수 있다. 소정의 구체예에서, 트레오닌 유도체는 O-포스포트레오닌일 수 있다.

[0303] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 트립토판 (tryptophan), 트립토판 모방체 또는 트립토판 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 트립토판일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 트립토판, 트립토판 모방체 또는 트립토판 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 트립토판 모방체는 인돌 고리 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 트립토판과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 트립토판 모방체는 인돌 고리 자체가 트립토판과 상이할 수 있다. 즉, 트립토판 모방체는 인돌 고리와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 대체 고리 구조를 포함할 수 있다. 트립토판 유도체는 바람직하게는 트립토판 또는 트립토판 모방체일 수 있으며, 상기 인돌 고리는 치환되거나 또는 변형된다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Trp}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Trp는 트립토판, 트립토판 모방체 또는 트립토판 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 트립토판 유도체는 인돌 고리에서 치환될 수 있다. 예를 들어, 트립토판 유도체는 5-하이드록시트립토판 또는 1-메틸트립토판일 수 있다.

[0304] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 티로신 (tyrosine), 티로신 모방체 또는 티로신 유도체일 수 있다. 특정 구체예에서, 잔기 Aax는 티로신일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 티로신, 티로신 모방체 또는 티로신 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 티로신 모방체는 페놀 기 및 α -탄소 원자를 연결하는 지방족 사슬의 길이 또는 조성이 티로신과 상이할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 티로신 모방체는 페놀 기 자체가 티로신과 상이할 수 있다. 즉, 티로신 모방체는 페닐 고리와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 대체 고리 구조 또는 페닐 고리의 하이드록실 기와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 관능기를 포함할 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{Tyr}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 Tyr은 티로신, 티로신 모방체 또는 티로신 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 티로신 유도체는 페놀 고리에서 치환될 수 있다. 예를 들어, 티로신 유도체는 3-아미노티로신, 티로닌, 3,5-디니트로티로신, 3-하이드록시메틸티로신 또는 O-포스포-L-티로신일 수 있다.

[0305] 본 발명의 다른 구체예에서, 잔기 Aax는 발린 (valine), 발린 모방체 또는 발린 유도체일 수 있다. 특정 구체

예에서, 잔기 Aax는 발린일 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 항체의 글루타민 잔기에 발린, 발린 모방체 또는 발린 유도체의 α -아미노 기를 통해 접합될 수 있다. 발린 모방체는 발린 측쇄의 조성이 발린과 상이할 수 있다. 즉, 발린 모방체는 화학 조성은 상이하지만 발린 측쇄와 유사한 물리화학적 특성을 갖는 측쇄를 포함할 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 Val-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)를 가질 수 있으며, 여기서 Val은 발린, 발린 모방체 또는 발린 유도체를 나타낸다. 소정의 구체예에서, 발린 모방체는 노르발린 또는 4,5-데하이드로류신 또는 γ -하이드록시발린일 수 있다.

[0306] 소정의 구체예에서, 잔기 Aax는 고리형 모이어티를 포함하는 아미노산, 예컨대 4-아미노피페리딘-4-카복실산 또는 1-아미노사이클로펜탄카복실산일 수 있다. 소정의 구체예에서, 잔기 Aax는 생물직교 모이어티, 바람직하게는 클릭-반응에서 사용될 수 있는 생물직교 모이어티를 포함하는 아미노산, 예컨대 프로파르길글리신, α -알릴글리신, L-아지도-호모알라닌, p-벤조일-1-페닐알라닌, p-2-플루오로아세틸-1-페닐알라닌 또는 (S)-2-아미노-3-(4-(6-메틸-1,2,4,5-테트라진-3-일)페닐)프로파노산일 수 있다.

[0307] 소정의 구체예에서, 잔기 Aax는 알파-메틸 아미노산 예컨대 α -메틸-히스티딘 또는 α -아미노이소부티르산일 수 있다.

[0308] 소정의 구체예에서, Aax는 베타-아미노산 예컨대 β -알라닌, D-3-아미노이소부티르산 또는 L- β -호모알라닌, 또는 γ -아미노산 예컨대 γ -아미노부티르산, 또는 δ -아미노산 예컨대 5-아미노펜타노산, 또는 ϵ -아미노산 예컨대 6-아미노헥사노산일 수 있다.

[0309] 또한, 링커는 하나 또는 2개의 화학적 스페이서 (Sp₁) 및/또는 (Sp₂)를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "화학적 스페이서 (chemical spacer)"는 공유적으로 부착되어, 링커의 2개의 화학적 잔기 사이, 구체적으로 잔기 Aax 및 연결 모이어티 또는 페이로드 B₁ 사이 및/또는 연결 모이어티 또는 페이로드 B₁ 및 B₂ 사이에 개재되고, 이에 의해 각 잔기들 사이에 가교-유사 구조 (bridge-like structure)를 형성하는 화학적 모이어티를 설명한다.

[0310] 본원에서 화학적 스페이서 (Sp₁) 및 (Sp₂)는 아미노산 잔기를 포함하거나 또는 이로 구성되는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는, (Sp₁) 및 (Sp₂) 각각은 0 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 화학적 스페이서 (Sp₁) 및 (Sp₂)는 각각 0 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0311] 소정의 구체예에서, (Sp₁) 및/또는 (Sp₂)는 부재할 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 링커는 구조 Aax-(Sp₁)-B₁, Aax-B₁-(Sp₂) 또는 Aax-B₂를 가질 수 있다.

[0312] 화학적 스페이서 (Sp₁) 및 (Sp₂)는 α -, β -, γ -, δ - 및 ϵ -아미노산을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 본원에 정의된 바와 같은 임의의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체를 포함할 수 있다. α -아미노산의 경우, 화학적 스페이서는 임의의 자연 발생 L- 또는 D-아미노산을 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁) 및/또는 (Sp₂)는 전적으로 α -아미노산, 구체적으로 α -L-아미노산으로 구성될 수 있다.

[0313] 또한, 화학적 스페이서 (Sp₁) 및/또는 (Sp₂)는 아미노산 유도체 및/또는 아미노산 모방체를 포함할 수 있다. (Sp₁) 및/또는 (Sp₂)가 하나 이상의 아미노산 유도체를 포함하는 구체예에서, 아미노산 유도체가 펩티드 또는 이소펩티드 결합을 형성할 수 있도록, 아미노산 유도체는 유리 아미노 및 카복실 기를 갖는 것이 바람직하다. (Sp₁) 및/또는 (Sp₂)가 하나 이상의 아미노산 모방체를 포함하는 구체예에서, 아미노산 모방체가 펩티드 또는 이소펩티드 결합을 형성할 수 있도록, 아미노산 모방체는 유리 아미노 및 카복실 기를 가질 수 있다. 그러나, 소정의 구체예에서, 아미노산 모방체 또는 유도체는 펩티드 결합의 형성을 방해하지 않는 치환된 아미노 기를 가질 수 있다. 이러한 아미노산 모방체 또는 유도체의 예는 N-메틸화 아미노산 예컨대 사르코신 또는 N-Me-류신일 수 있다. 또한, 아미노산 모방체 또는 유도체는 유도체화 아미노 기를 포함하는 아미노산 예컨대 프롤린의 모방체 또는 유도체 또는 다른 고리형 아미노산 예컨대 아제티딘-2-카복실산, 피페콜산 또는 스피나신일 수 있다. 또한, 아미노산 모방체는 또한 표준 아미노산의 아미노 및/또는 카복실 기를 대체하는 다른 관능기를 포함할 수 있으며, 이는 아미노산 모방체가 인접한 아미노산, 아미노산 유도체 및/또는 아미노산 모방체와 대체 결합을 형성하고 펩티도모방체 (peptidomimetic)를 형성하도록 한다.

[0314] 또한, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하나 이상의 비-정준 아미노산을 포함할 수 있다. 비-정준 아미노산은 정준 아미노산의 아미노산 모방체 또는 유도체일 수 있거나, 또는 임의의 정준 아미노산과 구조적으로 관련이 없을 수 있다. 비-정준 아미노산은 제한 없이, D-아미노산 (예컨대 D-알라닌, D-메티오닌), 호모-아미노산 (예컨대 호모세린, 호모아르기닌, 호모시스테인, α -아미노아디프산), N-메틸화 아미노산 (예컨대 사르코신, N-Me-류신), α -메틸 아미노산 (예컨대 α -메틸-히스티딘, α -아미노이소부티르산), β -아미노산 (예컨대 β -알라닌, D-3-아미노이소부티르산, L- β -호모알라닌), γ -아미노산 (예컨대 γ -아미노부티르산), 알라닌 모방체 또는 유도체 (예컨대 β -사이클로프로필알라닌, 페닐글리신, 테하이드로-알라닌, β -시아노알라닌, β -(3-피리딜)-알라닌, β -(1,2,4-트리아졸-1-일)-알라닌, β -(1-피페라지닐)-알라닌), 페닐알라닌 모방체 또는 유도체 (예컨대 4-요오도페닐알라닌, 펜타플루오로-페닐알라닌, 나프틸-알라닌, 4-아미노페닐알라닌), 아르기닌 모방체 또는 유도체 (예컨대 β -우레이도알라닌, ω -메틸아르기닌), 리신 모방체 또는 유도체 (예컨대 (3-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)프로파미노)카보닐-1- 리신, $N\epsilon, N\epsilon, N\epsilon$ -트리메틸리신), 히스티딘 모방체 또는 유도체 (예컨대 2,5-디요오도히스티딘, 1-메틸히스티딘), 티로신 모방체 또는 유도체 (예컨대 3-아미노티로신, 티로닌, 3,5-디니트로티로신, 3-하이드록시메틸티로신, O-포스포-L-티로신), 트립토판 모방체 또는 유도체 (예컨대 5-하이드록시트립토판, 1-메틸트립토판), 세린 모방체 또는 유도체 (예컨대 β -(2-티에닐)-세린, β -(3,4-디하이드록시페닐)-세린, O-포스포세린), 트레오닌 모방체 또는 유도체 (예컨대 알로-트레오닌, O-포스포트레오닌), 프롤린 모방체 또는 유도체 (예컨대 하이드록시프롤린, 3,4-테하이드로-프롤린, 피로글루탐산, 티아프롤린, 시스-옥타하이드로인돌-2-카복실산), 류신 및 이소류신 모방체 또는 유도체 (예컨대 알로-이소류신, 노르류신, 4,5-테하이드로류신, (4S)-4-하이드록시-L-이소류신), 발린 모방체 또는 유도체 (예컨대 노르발린, γ -하이드록시발린), 시트룰린 모방체 또는 유도체 (예컨대 티오시트룰린, 호모시트룰린), 시스테인 모방체 또는 유도체 (예컨대 페니실라민, 셀레노시스테인, 부티오닌-설포시민), 메티오닌 모방체 또는 유도체 (예컨대 S-메틸메티오닌, L-메티오닌 설포, L-메티오닌 설포사이드, L-메티오닌 설포시민, 셀레노메티오닌), 아스파르트산 모방체 또는 유도체 (예컨대 DL-트레오- β -하이드록시아스파르트산, L-아스파르트산 β -메틸 에스테르), 글루탐산 모방체 또는 유도체 (예컨대 γ -메틸렌글루탐산, γ -카복시글루탐산, γ -하이드록시글루탐산, L-글루탐산 5-메틸 에스테르, L-2-아미노헵타디오산), 아스파라긴 모방체 또는 유도체 (예컨대 L-트레오-3-하이드록시아스파라긴, N,N-디메틸-L-아스파라긴, L-2-아미노-2-카복시에탄설포아미드, 5-디아조-4-옥소-L-노르발린), 글루타민 모방체 또는 유도체 (예컨대 4-F-(2S,4R)-플루오로글루타민, γ -글루타미메틸아미드, 테아닌, L-글루탐산 γ -모노하이드록사메이트), 고리형 모이어티를 포함하는 아미노산 (예컨대 4-아미노피페리딘-4-카복실산, 아제티딘-2-카복실산, 피페롤산, 1-아미노사이클로펜탄카복실산, 스피나신), 또는 생물-직교 모이어티를 포함하는 아미노산 (예컨대 프로파르길글리신, α -알릴글리신, L-아지도-호모알라닌, p-벤조일-1-페닐알라닌, p-2-플루오로아세틸-1-페닐알라닌, (S)-2-아미노-3-(4-(6-메틸-1,2,4,5-테트라진-3-일)페닐)프로파노산)일 수 있다.

[0315] 전술한 알파-아미노산 이외에, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 또한 하나 이상의 β -, γ -, δ - 또는 ϵ -아미노산을 포함할 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 링커는 펩티도모방체일 수 있다. 펩티도모방체는 2개의 α -아미노산들 사이에 형성된 고전적인 펩티드 결합을 전적으로 함유하지 않을 수 있지만, 추가로 또는 대신에 알파 아미노산 및 β -, γ -, δ - 또는 ϵ -아미노산 사이에, 또는 2개의 β -, γ -, δ - 또는 ϵ -아미노산 사이에 형성된 하나 이상의 아미드 결합을 포함할 수 있다. 따라서, 링커가 펩티드로 기재된 본 발명의 임의의 경우에서, 링커는 또한 펩티도모방체일 수 있고, 따라서 전적으로 α -아미노산으로 구성되지 않고, 대신에 하나 이상의 β -, γ -, δ - 또는 ϵ -아미노산, 또는 아미노산으로 분류되지 않는 분자를 포함할 수 있음을 이해해야 한다. 본 발명의 링커에 포함될 수 있는 β -, γ -, δ - 또는 ϵ -아미노산의 예는 β -알라닌, γ -아미노부티르산, 4-아미노-3-하이드록시-5-페닐헵타노산, 4-아미노-3-하이드록시-6-메틸헵타노산, 6-아미노헥사노산 및 스타틴을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0316] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)는 아미노산 유도체 및 아미노산 모방체를 포함하는 아미노산 잔기를 0 내지 12개 포함할 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, (Sp_1)은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, (Sp_2)는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, (Sp_1)은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, (Sp_2)는 부재할 수 있다. 구체적으로, B_1 이 페이로드인 경우 (Sp_2)는 부재한 것이 바람직하다. B_1 이 연결 모이어티인 구체예에서, (Sp_2)가 존재할 수 있고, 선택적으로 추가 페이로드

또는 연결 모이어티 (B_2)에 연결될 수 있다.

- [0317] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 전적으로 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체로 구성되지 않을 수 있다. 즉, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 비-아미노산 성분을 포함할 수 있거나, 또는 전적으로 비-아미노산 성분으로 구성될 수 있다. 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 아미노산 및 비-아미노산 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 그러나 제한 없이, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하나 이상의 원자에서 치환된, 예를 들어 1 내지 200개 원자의 탄소 포함 프레임워크 (carbon comprising framework), 선택적으로 적어도 10개 원자, 예를 들어 10 내지 100개 원자 또는 20 내지 100개 원자의 탄소 포함 프레임워크를 포함할 수 있으며, 선택적으로 상기 탄소 포함 프레임워크는 선형 탄화수소이거나 또는 고리형 기, 대칭 또는 비대칭 분지형 탄화수소, 모노사카라이드, 디사카라이드, 선형 또는 분지형 올리고사카라이드 (비대칭 분지형 또는 대칭 분지형), 다른 천연 선형 또는 분지형 올리고머 (비대칭 분지형 또는 대칭 분지형), 또는 더 일반적으로 임의의 사슬-성장 또는 단계-성장 중합 공정으로부터 생성되는 임의의 이량체, 삼량체 또는 고급 올리고머 (선형, 비대칭 분지형 또는 대칭 분지형)를 포함한다.
- [0318] 즉, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 임의의 직쇄형, 분지형 및/또는 고리형 C_{2-30} 알킬, C_{2-30} 알케닐, C_{2-30} 알키닐, C_{2-30} 헤테로알킬, C_{2-30} 헤테로알케닐, C_{2-30} 헤테로알키닐일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있고, 선택적으로 하나 이상의 호모사이클릭 방향족 화합물 라디칼 또는 헤테로사이클릭 화합물 라디칼이 삽입될 수 있고; 특히, 임의의 직쇄형 또는 분지형 C_{2-5} 알킬, C_{5-10} 알킬, C_{11-20} 알킬, $-O-C_{1-5}$ 알킬, $-O-C_{5-10}$ 알킬, $-O-C_{11-20}$ 알킬, 또는 $(CH_2-CH_2-O-)_1-24$ 또는 $(CH_2)_{x1}-(CH_2-O-CH_2)_{1-24}-(CH_2)_{x2}-$ 기 (여기서, $x1$ 및 $x2$ 는 독립적으로 0 내지 20 범위에서 선택된 정수임), 아미노산, 올리고펩티드, 글리칸, 설페이트, 포스페이트, 또는 카복실레이트일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 C_{2-6} 알킬 기를 포함할 수 있다.
- [0319] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티 또는 유사한 축합 폴리머, 예컨대 폴리(카복시메타인 메타크릴레이트) (pCBMA), 폴리옥사졸린, 폴리글리세롤, 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리(하이드록시에틸메타크릴레이트) (pHEMA)를 포함할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)은 산업적 제조에서 의약품에 이르기까지 다양한 용도로 사용되는 폴리에테르 화합물이다. PEG는 또한 이의 분자량에 따라 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO) 또는 폴리옥시에틸렌 (POE)으로 알려져 있다. PEG의 구조는 일반적으로 $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ 로 표시된다.
- [0320] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 덱스트란을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "덱스트란 (dextran)"은 3 내지 2000 kDa 범위의 중량을 가질 수 있는, 다양한 길이의 사슬로 이루어진 복합 분지형 글루칸을 지칭한다. 직쇄는 전형적으로 글루코스 분자들 사이의 알파-1,6 글리코시드 연결로 구성되는 반면에, 분지쇄는 알파-1,3 연결로부터 시작한다. 덱스트란은 예를 들어 락트산 박테리아에 의해 수크로스로부터 합성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 담체로 사용되는 덱스트란은 바람직하게는 약 15 내지 1500 kDa의 분자량을 가질 수 있다.
- [0321] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "올리고뉴클레오티드 (oligonucleotide)"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머 뿐만 아니라, 비-자연 발생 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 더 높은 안정성으로 인해, 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 DNA의 폴리머이다.
- [0322] 본 발명의 방법에 사용되는 링커는 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)를 포함할 수 있다. 이들 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)는 동일하거나 또는 동일하지 않을 수 있다. 일부 구체예에서, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하나 이상의 자기-희생 모이어티 (self-immolative moieties)를 포함하는 자기-제거 스페이서 (self-elimination spacers)일 수 있다. (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 분지형 또는 비-분지형일 수 있고, B_1 및/또는 B_2 에 대한 하나 이상의 부착 부위를 포함할 수 있다. 본 발명에 따르면, 단일 모이어티만을 방출할 수 있는 자기-제거 스페이서는 '단일 방출 스페이서 (single release spacers)'라고 한다. 2개 이상의 모이어티를 방출할 수 있는 자기-제거 스페이서는 '다중 방출 스페이서 (multiple release spacers)'라고 한다. 스페이서는 분지형 또는 비-분지형일 수 있으며, $1, 2+2n$ -제거 ($n \geq 1$)를 통해 자기-제거할 수 있으며, 이는 "전자 캐스케이드 스페이서

(electronic cascade spacers)"라고 한다. 스페이서는 고리형 우레아 유도체의 형성하에 고리화 과정을 통해 제거될 수 있으며, 이는 " ω -아미노 아미노카보닐 고리화 스페이서 (ω -amino aminocarbonyl cyclization spacers)"로 지칭된다.

[0323] 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 자기-제거 또는 비-자기-제거일 수 있다. "자기-제거 (self-eliminating)" 스페이서 유닛은 별도의 가수분해 단계 없이 페이로드를 방출할 수 있다. 자기-제거 스페이서가 사용되는 경우, 내장된 트리거 시스템 (in-built trigger system) (예컨대, p-아미노벤질 유닛이 있는 절단 가능한 서열)의 절단 또는 전환 후에, 이는 결국 링커로부터 하나 이상의 모이어티 B_1 및/또는 B_2 를 방출할 것이다. 자기-제거 스페이서는 예를 들어 WO 2002/083180 및 WO 2004/043493 (이들의 전문은 본원에 참조로 통합됨)에 기재된 것 중 하나 뿐만 아니라, 당업자에게 알려진 다른 자기-제거 스페이서일 수 있다. 소정의 구체예에서, 링커의 스페이서 유닛은 p-아미노벤질 유닛을 포함할 수 있다. 이러한 일 구체예에서, p-아미노벤질 알코올은 아미노산 유닛에 아미드 결합을 통해 부착될 수 있고, 카바메이트, 메틸카바메이트, 또는 카보네이트가 벤질 알코올 및 페이로드 사이에서 만들어진다. 일 구체예에서, 스페이서 유닛은 p-아미노벤질옥시카보닐 (PAB)일 수 있다. 자기-제거 스페이서의 예는 p-아미노벤질 알코올 (예를 들어, US 2005/0256030 A1 참조)과 전자적으로 유사한 방향족 화합물, 예컨대 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세트알을 추가로 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 스페이서는 아미드 결합 가수분해 시에 고리화를 수행할 수 있으며, 예컨대 치환 및 비치환 4-아미노부티르산 아미드 (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223) 및 2-아미노페닐프로피온산 아미드 (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)일 수 있다. 글리신의 α -위치에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)가 또한 자기-희생 스페이서의 예이다.

[0324] 또한, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하나 이상의 자기-희생 기를 포함할 수 있다. 용어 "자기-희생 기 (self-immolative group)"는 2개의 이격된 화학적 모이어티 (즉, Aax 및 (Sp_1), (Sp_1) 및 B_1), B_1 및 (Sp_2), (Sp_2) 및 B_2 또는 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2) 내의 2개의 아미노산 잔기)를 함께 안정한 분자로 공유결합으로 연결할 수 있는 이-관능성 화학적 모이어티를 지칭한다. 자기-희생 기의 예가 본원에 제공된다.

[0325] 상기 화학적 스페이서 (Sp_1)는 Aax에 공유결합으로 연결될 수 있다. 바람직하게는 Aax는 (Sp_1)에 Aax에 포함된 카복실 기를 통해 연결될 수 있다. 더 바람직하게는 Aax는 (Sp_1)에 포함된 아미노산 잔기에 펩티드 또는 이소펩티드 결합을 통해 연결될 수 있으며, 여기서 Aax는 형성된 펩티드의 N-말단 아미노산이다.

[0326] 또한, 화학적 스페이서 (Sp_1) 또는 Aax는 B_1 에 공유결합으로 연결될 수 있다. 소정의 구체예에서, (Sp_1) 또는 Aax는 B_1 에 카복실 기를 통해 연결될 수 있으며, 바람직하게는 카복실 기는 (Sp_1)의 C-말단 아미노산에 포함된다. B_1 이 아미노산, 아미노산 유도체 또는 아미노산 모방체인 구체예에서, B_1 은 Aax 또는 (Sp_1)에 포함된 카복실 기 및 B_1 에 포함된 아미노 기 사이에 형성된 펩티드 또는 이소펩티드 결합을 통해 (Sp_1) 또는 Aax에 연결될 수 있다. 소정의 구체예에서, Aax 또는 (Sp_1)에 포함된 카복실 기는 α -아미노산의 α -카복실 기일 수 있고 및/또는 B_1 에 포함된 아미노 기는 α -아미노산의 α -아미노 기일 수 있다. 다른 구체예에서, B_1 은 (Sp_1)에 포함된 아미노산 측쇄에 연결될 수 있다. 즉, B_1 은 (Sp_1)에 포함된 아미노산 측쇄의 관능기에 적합한 관능기를 통해 연결될 수 있다.

[0327] 또한, 화학적 스페이서 (Sp_2)는 B_1 에 공유결합으로 연결될 수 있다. 소정의 구체예에서, (Sp_2)는 B_1 에 아미노 기를 통해 연결될 수 있으며, 바람직하게는 아미노 기는 (Sp_2)의 N-말단 아미노산에 포함된다. B_1 이 아미노산, 아미노산 유도체 또는 아미노산 모방체인 구체예에서, B_1 은 (Sp_2)에 B_1 에 포함된 카복실 기 및 (Sp_2)에 포함된 아미노 기 사이에 형성된 펩티드 또는 이소펩티드 결합을 통해 연결될 수 있다. 소정의 구체예에서, B_1 에 포함된 카복실 기는 α -아미노산의 α -카복실 기일 수 있고 및/또는 (Sp_2)에 포함된 아미노 기는 (Sp_2)에 포함된 N-말단 α -아미노산의 α -아미노 기일 수 있다.

[0328] (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)가 아미노산, 아미노산 모방체 및/또는 아미노산 유도체를 포함하거나 또는 이로 구성된 구체예에서, C-말단 잔기는 보호된 C-말단 카복실 기를 포함할 수 있다.

- [0329] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커는 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6개 이하의 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0330] 즉, 소정의 구체예에서, 링커는 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체를 포함한다. 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 링커에 포함된 아미노산 잔기는 바람직하게는 Aax에, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)에, 소정의 구체예에서 또한 B_1 에 포함된 아미노산 잔기인 것으로 이해해야 하며, 여기서 B_1 은 아미노산-기반 연결 모이어티 또는 페이로드이다. 링커가 단일 아미노산 잔기만을 포함하는 구체예에서, 상기 단일 아미노산 잔기는 바람직하게는 위치 Aax에서의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이다. 이러한 구체예에서, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 부재하거나 또는 임의의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체를 포함하지 않는다. 소정의 구체예에서, 단일 아미노산 잔기를 포함하는 링커는 구조 Aax- B_1 을 가질 수 있다.
- [0331] 소정의 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2) 및 선택적으로 B_2 를 포함하는 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 2 내지 25개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2) 및 선택적으로 B_2 를 포함하는 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는 아미노산 잔기를 2 내지 20개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2) 및 선택적으로 B_2 를 포함하는 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는 아미노산 잔기를 2 내지 15개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2) 및 선택적으로 B_2 를 포함하는 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는 아미노산 잔기를 2 내지 10개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2) 및 선택적으로 B_2 를 포함하는 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는 아미노산 잔기를 3 내지 10개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2) 및 선택적으로 B_2 를 포함하는 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는 아미노산 잔기를 3 내지 8개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2) 및 선택적으로 B_2 를 포함하는 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는 아미노산 잔기를 4 내지 8개 포함할 수 있다.
- [0332] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커의 순전하는 중성 또는 양성이다.
- [0333] 소정의 구체예에서, 상기 링커는 펩티드 링커 (또는 본원에 개시된 펩티도모방체)이다. 즉, 모이어티 Aax, (Sp_1) 및 (Sp_2)는 전적으로 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체로 구성된다. 펩티드의 순전하는 통상 중성 pH (7.0)에서 계산된다. 가장 간단한 접근법에서, 순전하는 양으로 하전된 아미노산 잔기 (Arg 및 Lys 및 선택적으로 His)의 수와 음으로 하전된 아미노산 잔기 (Asp 및 Glu)의 수를 더하여 결정하고, 두 그룹의 차이를 계산한다. 링커가 비-정준 아미노산 또는 아미노산 유도체 (여기서 하전된 관능기가 변형되거나 또는 치환됨)를 포함하는 경우에, 당업자는 중성 pH에서 비-정준 아미노산 또는 아미노산 유도체의 전하를 결정하는 방법을 알고 있다.
- [0334] 소정의 구체예에서, 상기 페이로드 또는 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 및 (Sp_1) 및 (Sp_2)에 포함된 임의의 비-아미노산 모이어티는 또한 링커의 순전하에 기여할 수 있다. 그러나, 당업자는 바람직하게는 중성 pH (7.0)에서 임의의 비-아미노산 모이어티를 포함하는, 전체 링커의 순전하를 계산하는 방법을 알고 있다.
- [0335] 소정의 구체예에서, 링커의 순전하는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 링커에 포함된 아미노산 잔기에 기반하여 단독으로 계산된다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커에 포함된 아미노산 잔기의 순전하는 중성 또는 양성이다.
- [0336] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.
- [0337] 즉, 링커는 음으로 하전된 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체가 부재할 수 있다. 음으로 하전된 아미노산 잔기는 중성 pH (7.0)에서 음전하를 운반하는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이다. 음으로 하전된 정준 아미노산은 글루탐산 및 아스파르트산이다. 그러나, 음으로 하전된 비-정준 아미노산, 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체가 당해 기술 분야에 알려져 있다. 소정의 구체예에서, 링커는 위치 Aax에

글루탐산, 아스파르트산 또는 다른 음으로 하전된 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체를 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커에 포함된 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.

[0338] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커는 적어도 하나의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함한다.

[0339] 즉, 상기 링커는 바람직하게는 모이어티 Aax, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2) 중 적어도 하나에 양으로 하전된 아미노산 잔기를 적어도 1개, 적어도 2개 또는 적어도 3개 포함할 수 있다. 양으로 하전된 아미노산 잔기는 중성 pH (7.0)에서 양전하를 운반하는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이다. 양으로 하전된 정준 아미노산은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이다. 그러나, 양으로 하전된 비-정준 아미노산, 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체가 당해 기술 분야에 알려져 있다.

[0340] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 링커 및, 구체적으로 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기를 적어도 1개, 적어도 2개 또는 적어도 3개 포함한다:

[0341] ■ 리신,

[0342] ■ 아르기닌,

[0343] ■ 히스티딘, 및/또는

[0344] ■ 이의 임의의 양으로 하전된 모방체 또는 유도체.

[0345] 리신의 아미노산 측쇄에 포함된 1차 아민으로 인해, 상기 링커는 바람직하게는 리신이 부재하고, 대신에 1차 아민을 포함하지 않는 리신 모방체 또는 리신 유도체를 포함하며, 상기 1차 아민은 예를 들어 아세틸화될 수 있다.

[0346] 따라서, 소정의 구체예에서, 링커 및, 구체적으로 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기를 적어도 1개, 적어도 2개 또는 적어도 3개 포함한다:

[0347] ■ 아르기닌,

[0348] ■ 히스티딘, 및/또는

[0349] ■ 이의 임의의 양으로 하전된 모방체 또는 유도체.

[0350] 소정의 구체예에서, 링커 및, 구체적으로 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 적어도 하나의 아르기닌 잔기 및/또는 이의 양으로 하전된 아미노산 모방체 또는 유도체를 포함한다.

[0351] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 중성 또는 양성 순전하를 갖는다. 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 중성 또는 양성 순전하를 가지며, 적어도 하나의 아르기닌 및/또는 히스티딘 잔기를 포함한다. 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 중성 또는 양성 순전하를 가지며, 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 포함한다. 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 리신 잔기를 포함하지 않는다. 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 중성 또는 양성 순전하를 가지며, 리신 잔기를 포함하지 않는다.

[0352] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $NH_2-(CH_2)_n-CONH-(Sp_1)-B_1$ 을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 CONH는 잔기 $NH_2-(CH_2)_n-COOH$ 의 카복실 기 및 N-말단 Aax 잔기의 아미노 기 사이에 형성된 아마이드 결합이고; n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다. 즉, 링커는 항체에 N-말단 아미노산 잔기 $NH_2-(CH_2)_n-COOH$ 에 포함된 1차 아민을 통해 접합될 수 있다.

[0353] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)는 아미노산으로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다.

[0354] 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

- [0355] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,
- [0356] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고, o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0357] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 양으로 하전된 아미노산 잔기는 아르기닌, 아르기닌 유도체 또는 아르기닌 모방체일 수 있다.
- [0358] 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0359] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,
- [0360] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이며; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0361] 소정의 구체예에서, 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 C-말단 아미노산 잔기일 수 있다. 소정의 구체예에서, C-말단 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 펩티드 B_1 에 공유 결합될 수 있다.
- [0362] 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0363] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{Arg}-\text{B}_1$,
- [0364] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0365] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Thr}-\text{Arg}-\text{B}_1$, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Ile}-\text{Arg}-\text{B}_1$, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Asp}-\text{Arg}-\text{B}_1$, 또는 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Trp}-\text{Arg}-\text{B}_1$ 을 가질 수 있다.
- [0366] 소정의 구체예에서, B_1 은 연결 모이어티 6-아지도-L-리신 ($\text{Lys}(\text{N}_3)$)일 수 있다. 소정의 구체예에서, $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 는 (Sp_1)의 C-말단 Arg 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있다.
- [0367] 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0368] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{Arg}-\text{Lys}(\text{N}_3)$,
- [0369] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 는 6-아지도-L-리신이다.
- [0370] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 N-말단 아미노산은 알라닌 또는 글리신일 수 있다.
- [0371] 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0372] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Ala}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,
- [0373] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0374] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0375] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Ala}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,
- [0376] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0377] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0378] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Ala}-(\text{Aax})_o-\text{Arg}-\text{B}_1$,
- [0379] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다

작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0380] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0381] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Ala}-(\text{Aax})_o-\text{Arg-Lys}(\text{N}_3)$,

[0382] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.

[0383] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Ala-Arg-Lys}(\text{N}_3)$ 을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0384] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0385] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Gly}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0386] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0387] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0388] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Gly}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0389] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0390] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0391] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Gly}-(\text{Aax})_o-\text{Arg-B}_1$,

[0392] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0393] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0394] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Gly}-(\text{Aax})_o-\text{Arg-Lys}(\text{N}_3)$,

[0395] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; n은 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.

[0396] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Gly-Arg-Lys}(\text{N}_3)$ 을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0397] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 모티프 Val-Aax를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0398] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Val}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0399] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0400] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Val-Cit-B}_1$ 을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0401] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH-Val-Arg-B}_1$ 을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0402] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 Gly-(Sp₁)-B₁을 갖거나 또는 포함할 수 있다. 즉, 링커는 항체에 N-말단 글리신 잔기를 통해 접합될 수 있다.

[0403] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 아미노산으로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다. 즉, 본 발

명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0404] Gly-(Aax)_o-B₁,

[0405] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고, o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0406] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 양으로 하전된 아미노산 잔기는 아르기닌, 아르기닌 유도체 또는 아르기닌 모방체일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0407] Gly-(Aax)_o-B₁,

[0408] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0409] 소정의 구체예에서, 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 화학적 스페이서 (Sp₁)에 포함된 C-말단 아미노산 잔기일 수 있다. 소정의 구체예에서, C-말단 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 페이로드 B₁에 공유 결합될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0410] Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0411] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0412] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 Gly-Thr-Arg-B₁ (서열 번호: 63), Gly-Ile-Arg-B₁ (서열 번호: 64), Gly-Asp-Arg-B₁ (서열 번호: 65) 또는 Gly-Trp-Arg-B₁ (서열 번호: 66)를 가질 수 있다.

[0413] 소정의 구체예에서, B₁은 연결 모이어티 6-아지도-L-리신 (Lys(N₃))일 수 있다. 소정의 구체예에서, Lys(N₃)는 (Sp₁)의 C-말단 Arg 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0414] Gly-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0415] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.

[0416] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)에 포함된 N-말단 아미노산은 알라닌 또는 글리신일 수 있다.

[0417] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0418] Gly-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0419] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0420] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0421] Gly-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0422] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0423] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0424] Gly-Ala-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0425] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

- [0426] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0427] Gly-Ala-(Aax)_o-Arg- Lys(N₃),
- [0428] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.
- [0429] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: Gly-Ala-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 39).
- [0430] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0431] Gly-Gly-(Aax)_o-B₁,
- [0432] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; n은 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0433] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0434] Gly- Gly -(Aax)_o-B₁,
- [0435] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0436] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0437] Gly- Gly -(Aax)_o-Arg-B₁,
- [0438] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0439] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0440] Gly- Gly -(Aax)_o-Arg- Lys(N₃),
- [0441] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.
- [0442] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: Gly-Gly-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 40).
- [0443] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 모티프 Val-Aax를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0444] Gly-Val-(Aax)_o-B₁,
- [0445] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0446] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 Gly-Val-Cit-B₁ (서열 번호: 51)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0447] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 Gly-Val-Arg-B₁ (서열 번호: 52)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0448] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 β-Ala-(Sp₁)-B₁을 갖거나 또는 포함할 수 있다. 즉, 링커는 항체에 이의 N-말단 β-알라닌 잔기를 통해 접합될 수 있다.
- [0449] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 아미노산으로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0450] β-Ala-(Aax)_o-B₁,

- [0451] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고, o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0452] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 양으로 하전된 아미노산 잔기는 아르기닌, 아르기닌 유도체 또는 아르기닌 모방체일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0453] β -Ala-(Aax)_o-B₁,
- [0454] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0455] 소정의 구체예에서, 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 C-말단 아미노산 잔기일 수 있다. 소정의 구체예에서, C-말단 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 페이로드 B₁에 공유 결합될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0456] β -Ala-(Aax)_o-Arg-B₁,
- [0457] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0458] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 β -Ala-Thr-Arg-B₁ (서열 번호: 67), β -Ala-Ile-Arg-B₁ (서열 번호: 68), β -Ala-Asp-Arg-B₁ (서열 번호: 69) 또는 β -Ala-Trp-Arg-B₁ (서열 번호: 70)을 가질 수 있다.
- [0459] 소정의 구체예에서, B₁은 연결 모이어티 6-아지도-L-리신 (Lys(N₃))일 수 있다. 소정의 구체예에서, Lys(N₃)는 (Sp_1)의 C-말단 Arg 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0460] β -Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),
- [0461] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.
- [0462] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 N-말단 아미노산은 알라닌 또는 글리신일 수 있다.
- [0463] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0464] β -Ala-Ala-(Aax)_o-B₁,
- [0465] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0466] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0467] β -Ala-Ala-(Aax)_o-B₁,
- [0468] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0469] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0470] β -Ala-Ala-(Aax)_o-Arg-B₁,
- [0471] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0472] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0473] β -Ala-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

- [0474] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.
- [0475] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: β -Ala-Ala-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 41).
- [0476] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0477] β -Ala-Gly-(Aax)_o-B₁,
- [0478] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0479] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0480] β -Ala-Gly-(Aax)_o-B₁,
- [0481] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0482] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0483] β -Ala-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,
- [0484] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0485] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0486] β -Ala-Gly-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),
- [0487] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.
- [0488] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: β -Ala-Gly-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 42).
- [0489] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 모티프 Val-Aax를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0490] β -Ala-Val-(Aax)_o-B₁,
- [0491] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0492] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 β -Ala-Val-Cit-B₁ (서열 번호: 53)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0493] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 β -Ala-Val-Arg-B₁ (서열 번호: 54)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0494] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 GABA-(Sp₁)-B₁을 갖거나 또는 포함할 수 있다. 즉, 링커는 항체에 이의 N-말단 GABA (γ -aminobutyric acid) 잔기를 통해 접합될 수 있다.
- [0495] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 아미노산으로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0496] GABA-(Aax)_o-B₁,
- [0497] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고, o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다

작은 정수이다.

- [0498] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 양으로 하전된 아미노산 잔기는 아르기닌, 아르기닌 유도체 또는 아르기닌 모방체일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0499] $GABA-(Aax)_o-B_1$,
- [0500] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0501] 소정의 구체예에서, 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 C-말단 아미노산 잔기일 수 있다. 소정의 구체예에서, C-말단 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 페이로드 B_1 에 공유 결합될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0502] $GABA-(Aax)_o-Arg-B_1$,
- [0503] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0504] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $GABA-Thr-Arg-B_1$ (서열 번호: 71), $GABA-Ile-Arg-B_1$ (서열 번호: 72), $GABA-Asp-Arg-B_1$ (서열 번호: 73) 또는 $GABA-Trp-Arg-B_1$ (서열 번호: 74)을 가질 수 있다.
- [0505] 소정의 구체예에서, B_1 은 연결 모이어티 6-아지도-L-리신 ($Lys(N_3)$)일 수 있다. 소정의 구체예에서, $Lys(N_3)$ 는 (Sp_1)의 C-말단 Arg 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0506] $GABA-(Aax)_o-Arg-Lys(N_3)$,
- [0507] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; $Lys(N_3)$ 는 6-아지도-L-리신이다.
- [0508] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 N-말단 아미노산은 알라닌 또는 글리신일 수 있다.
- [0509] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0510] $GABA-Ala-(Aax)_o-B_1$,
- [0511] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0512] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0513] $GABA-Ala-(Aax)_o-B_1$,
- [0514] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0515] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0516] $GABA-Ala-(Aax)_o-Arg-B_1$,
- [0517] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0518] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0519] $GABA-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N_3)$,
- [0520] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다

작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.

[0521] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: GABA-Ala-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 43).

[0522] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0523] GABA-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0524] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0525] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0526] GABA-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0527] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0528] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0529] GABA-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0530] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0531] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0532] GABA-Gly-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0533] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.

[0534] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: GABA-Gly-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 44).

[0535] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 모티프 Val-Aax를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0536] GABA-Val-(Aax)_o-B₁,

[0537] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0538] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 GABA-Val-Cit-B₁ (서열 번호: 55)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0539] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 GABA-Val-Arg-B₁ (서열 번호: 56)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0540] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 5-AVA-(Sp₁)-B₁을 갖거나 또는 포함할 수 있다. 즉, 링커는 항체에 이의 N-말단 5-아미노페나톤산 (5-아미노발레르산 (5-AVA)) 잔기를 통해 접합될 수 있다.

[0541] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 아미노산으로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0542] 5-AVA-(Aax)_o-B₁,

[0543] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고, o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0544] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에

서, 양으로 하전된 아미노산 잔기는 아르기닌, 아르기닌 유도체 또는 아르기닌 모방체일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

- [0545] $5\text{-AVA-(Aax)}_o\text{-B}_1$,
- [0546] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0547] 소정의 구체예에서, 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 C-말단 아미노산 잔기일 수 있다. 소정의 구체예에서, C-말단 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 펩티드 B_1 에 공유 결합될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0548] $5\text{-AVA-(Aax)}_o\text{-Arg-B}_1$,
- [0549] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0550] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 5-AVA-Thr-Arg- B_1 (서열 번호: 75), 5-AVA-Ile-Arg- B_1 (서열 번호: 76), 5-AVA-Asp-Arg- B_1 (서열 번호: 77) 또는 5-AVA-Trp-Arg- B_1 (서열 번호: 78)을 가질 수 있다.
- [0551] 소정의 구체예에서, B_1 은 연결 모이어티 6-아지도-L-리신 ($\text{Lys}(\text{N}_3)$)일 수 있다. 소정의 구체예에서, $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 는 (Sp_1)의 C-말단 Arg 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0552] $5\text{-AVA-(Aax)}_o\text{-Arg-Lys}(\text{N}_3)$,
- [0553] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 는 6-아지도-L-리신이다.
- [0554] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 N-말단 아미노산은 알라닌 또는 글리신일 수 있다.
- [0555] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0556] $5\text{-AVA-Ala-(Aax)}_o\text{-B}_1$,
- [0557] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0558] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0559] $5\text{-AVA-Ala-(Aax)}_o\text{-B}_1$,
- [0560] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0561] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0562] $5\text{-AVA-Ala-(Aax)}_o\text{-Arg-B}_1$,
- [0563] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0564] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0565] $5\text{-AVA-Ala-(Aax)}_o\text{-Arg-Lys}(\text{N}_3)$,
- [0566] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 는 6-아지도-L-리신이다.

- [0567] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: 5-AVA-Ala-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 45).
- [0568] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0569] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-B₁,
- [0570] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0571] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0572] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-B₁,
- [0573] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0574] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0575] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,
- [0576] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0577] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0578] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-Arg- Lys(N₃),
- [0579] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.
- [0580] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: 5-AVA-Gly-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 46).
- [0581] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 모티프 Val-Aax를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0582] 5-AVA-Val-(Aax)_o-B₁,
- [0583] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0584] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 5-AVA-Val-Cit-B₁ (서열 번호: 57)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0585] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 5-AVA-Val-Arg-B₁ (서열 번호: 58)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0586] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 EACA-(Sp₁)-B₁을 갖거나 또는 포함할 수 있다. 즉, 링커는 항체에 이의 N-말단 6-아미노헥사노산 (ε-아미노카프로산 (EACA)) 잔기를 통해 접합될 수 있다.
- [0587] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 아미노산으로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0588] EACA-(Aax)_o-B₁,
- [0589] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고, o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0590] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 양으로 하전된 아미노산 잔기는 아르기닌, 아르기닌 유도체 또는 아르기닌 모방체일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

- [0591] $EACA-(Aax)_o-B_1$,
- [0592] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0593] 소정의 구체예에서, 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 C-말단 아미노산 잔기일 수 있다. 소정의 구체예에서, C-말단 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 펩티드 B_1 에 공유 결합될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0594] $EACA-(Aax)_o-Arg-B_1$,
- [0595] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0596] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 $EACA-Thr-Arg-B_1$ (서열 번호: 79), $EACA-Ile-Arg-B_1$ (서열 번호: 80), $EACA-Asp-Arg-B_1$ (서열 번호: 81) 또는 $EACA-Trp-Arg-B_1$ (서열 번호: 82)을 가질 수 있다.
- [0597] 소정의 구체예에서, B_1 은 연결 모이어티 6-아지도-L-리신 ($Lys(N_3)$)일 수 있다. 소정의 구체예에서, $Lys(N_3)$ 는 (Sp_1)의 C-말단 Arg 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0598] $EACA-(Aax)_o-Arg-Lys(N_3)$,
- [0599] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; $Lys(N_3)$ 는 6-아지도-L-리신이다.
- [0600] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 N-말단 아미노산은 알라닌 또는 글리신일 수 있다.
- [0601] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0602] $EACA-Ala-(Aax)_o-B_1$,
- [0603] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0604] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0605] $EACA-Ala-(Aax)_o-B_1$,
- [0606] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0607] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0608] $EACA-Ala-(Aax)_o-Arg-B_1$,
- [0609] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0610] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0611] $EACA-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N_3)$,
- [0612] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; $Lys(N_3)$ 는 6-아지도-L-리신이다.
- [0613] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: $EACA-Ala-Arg-Lys(N_3)$ (서열 번호: 47).
- [0614] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

- [0615] EACA-Gly-(Aax)_o-B₁,
- [0616] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0617] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0618] EACA-Gly-(Aax)_o-B₁,
- [0619] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0620] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0621] EACA-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,
- [0622] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [0623] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0624] EACA-Gly-(Aax)_o-Arg- Lys(N₃),
- [0625] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.
- [0626] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: EACA-Gly-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 48).
- [0627] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 모티프 Val-Aax를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0628] EACA-Val-(Aax)_o-B₁,
- [0629] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0630] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 EACA-Val-Cit-B₁ (서열 번호: 59)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0631] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 EACA-Val-Arg-B₁ (서열 번호: 60)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.
- [0632] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 7-AHA-(Sp₁)-B₁을 갖거나 또는 포함할 수 있다. 즉, 링커는 항체에 이의 N-말단 7-아미노헵타노산 잔기를 통해 접합될 수 있다.
- [0633] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 아미노산으로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0634] 7-AHA-(Aax)_o-B₁,
- [0635] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고, o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.
- [0636] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 양으로 하전된 아미노산 잔기는 아르기닌, 아르기닌 유도체 또는 아르기닌 모방체일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:
- [0637] 7-AHA-(Aax)_o-B₁,
- [0638] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다

작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0639] 소정의 구체예에서, 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 C-말단 아미노산 잔기일 수 있다. 소정의 구체예에서, C-말단 아르기닌 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)는 펩티드 B_1 에 공유 결합될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0640] 7-AHA-(Aax)_o-Arg- B_1 ,

[0641] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0642] 소정의 구체예에서, 링커는 구조 7-AHA-Thr-Arg- B_1 (서열 번호: 83), 7-AHA-Ile-Arg- B_1 (서열 번호: 84), 7-AHA-Asp-Arg- B_1 (서열 번호: 85) 또는 7-AHA-Trp-Arg- B_1 (서열 번호: 86)을 가질 수 있다.

[0643] 소정의 구체예에서, B_1 은 연결 모이어티 6-아지도-L-리신 (Lys(N_3))일 수 있다. 소정의 구체예에서, Lys(N_3)는 (Sp_1)의 C-말단 Arg 잔기에 공유결합으로 연결될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0644] 7-AHA-(Aax)_o-Arg-Lys(N_3),

[0645] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N_3)는 6-아지도-L-리신이다.

[0646] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1)에 포함된 N-말단 아미노산은 알라닌 또는 글리신일 수 있다.

[0647] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0648] 7-AHA-Ala-(Aax)_o- B_1 ,

[0649] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0650] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0651] 7-AHA-Ala-(Aax)_o- B_1 ,

[0652] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0653] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0654] 7-AHA-Ala-(Aax)_o-Arg- B_1 ,

[0655] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0656] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0657] 7-AHA-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N_3),

[0658] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N_3)는 6-아지도-L-리신이다.

[0659] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: 7-AHA-Ala-Arg-Lys(N_3) (서열 번호: 49).

[0660] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0661] 7-AHA-Gly-(Aax)_o- B_1 ,

[0662] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다

작은 정수이다.

[0663] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0664] 7-AHA-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0665] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; 적어도 하나의 Aax는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0666] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0667] 7-AHA-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0668] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.

[0669] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0670] 7-AHA-Gly-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0671] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이고; Arg는 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이고; Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신이다.

[0672] 소정의 구체예에서, 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다: 7-AHA-Gly-Arg-Lys(N₃) (서열 번호: 50).

[0673] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp₁)는 모티프 Val-Aax를 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 하기 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다:

[0674] 7-AHA-Val-(Aax)_o-B₁,

[0675] 여기서 Aax는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고; o는 24, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5보다 작은 정수이다.

[0676] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 7-AHA-Val-Cit-B₁ (서열 번호: 61)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0677] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 구조 7-AHA-Val-Arg-B₁ (서열 번호: 62)을 갖거나 또는 포함할 수 있으며, 여기서 n은 1 내지 20, 바람직하게는 1 내지 10, 더 바람직하게는 1 내지 6의 정수이다.

[0678] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커는 제2 연결 모이어티 또는 페이로드 B₂를 포함하고, 구체적으로 B₂는 링커에 화학적 스페이서 (Sp₂)를 통해 연결된다.

[0679] 즉, 본 발명의 링커는 제2 페이로드 또는 연결 모이어티 B₂를 포함할 수 있다. 페이로드 또는 연결 모이어티 B₂는 화학적 스페이서 (Sp₂)에 연결될 수 있거나 또는 페이로드 또는 연결 모이어티 B₁에 직접 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 방법에 사용되는 링커는 하기 구조를 포함할 수 있다: Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂, Aax-B₁-(Sp₂)-B₂, Aax-(Sp₁)-B₁-B₂ 또는 Aax-B₁-B₂. 페이로드 또는 연결 모이어티 B₂는 B₂를 B₁ 또는 (Sp₂)에 포함된 관능기에 연결하기에 적합한 임의의 관능기를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 페이로드 또는 연결 모이어티 B₂는 B₂가 B₁ 또는 (Sp₂)에 연결되는 사용되는 아미노 기를 포함한다. 즉, B₂는 B₁ 또는 (Sp₂)에 포함된 카복실 기에 상기 아미노 기를 통해 연결될 수 있다. 소정의 구체예에서, (Sp₂)에 포함된 카복실 기는 화학적 스페이서 (Sp₂)의 C-말단 아미노산 잔기에 포함된 카복실 기일 수 있다. 소정의 구체예에서, B₂에 포함된 카복실 기는 아미노산-기반 페이로드 또는 연결 모이어티의 α-카복실 기일 수 있다. 소정의 구체예에서, 페이로드 또는 연결 모이어티 B₂는 (Sp₂)에 포함된 아미노산 측쇄에 연결될 수 있다. 즉, B₂는 (Sp₂)에 포함된 아미노산 측쇄의 관능기에 적합한 관능기를 통해 연결될 수 있다.

[0680] 소정의 구체예에서, Aax, (Sp₁) 및 (Sp₂)는 전적으로 아미노산, 아미노산 모방체 및/또는 아미노산 유도체로 구성된다. 소정의 구체예에서, 또한 B₁ 및/또는 B₂는 아미노산 구조를 포함한다. 이러한 구체예에서, 링커는 선

형 펩티드 또는 펩티도모방체일 수 있다. B_1 이 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체인 구체예에서, 링커는 구조 $Aax-(Sp_1)-B_1$ 을 가질 수 있으며, 여기서 $Aax-(Sp_1)-B_1$ 은 선형 펩티드 또는 펩티도모방체를 형성한다. B_1 이 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체인 구체예에서, 링커는 구조 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$ 를 가질 수 있으며, 여기서 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$ 는 선형 펩티드 또는 펩티도모방체를 형성한다. B_1 및 B_2 가 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체인 구체예에서, 링커는 구조 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-B_2$ 를 가질 수 있으며, 여기서 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-B_2$ 는 선형 펩티드 또는 펩티도모방체를 형성한다. B_1 이 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체가 아닌 구체예에서, 링커는 구조 $Aax-(Sp_1)-B_1$ 을 가질 수 있으며, 여기서 $Aax-(Sp_1)$ 은 선형 펩티드 또는 펩티도모방체를 형성하고 B_1 은 (Sp_1) 에 포함된 C-말단 카복실 기에 연결된다. B_1 이 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이고 B_2 가 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체가 아닌 구체예에서, 링커는 구조 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-B_2$ 를 가질 수 있고, 여기서 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$ 는 선형 펩티드 또는 펩티도모방체를 형성하고 B_2 는 (Sp_2) 에 포함된 C-말단 카복실 기에 연결된다.

[0681] 이러한 구체예에서, 항체-페이로드 접합체는 예를 들어 페이로드에 대한 항체의 비율이 2 또는 4로 생성될 수 있으며, 예를 들어 1개 또는 2개의 페이로드가 각 Q295 잔기에 접합된다.

[0682] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 B_1 및 B_2 는 서로 동일하거나 또는 상이하다.

[0683] 즉, 페이로드 또는 연결 모이어티 B_1 및 B_2 는 동일할 수 있으며, 즉 동일한 화학적 구조를 갖거나, 또는 구조적으로 상이할 수 있다. 소정의 구체예에서, B_1 및 B_2 는 둘 다 페이로드이거나, 또는 둘 다 연결 모이어티이다. B_1 및 B_2 가 둘 다 페이로드인 구체예에서, 위치 B_1 및 B_2 에서의 페이로드는 동일하거나 또는 상이한 페이로드일 수 있다. B_1 및 B_2 가 둘 다 연결 모이어티인 구체예에서, 위치 B_1 및 B_2 에서의 연결 모이어티는 동일하거나 또는 상이한 연결 모이어티일 수 있다. 소정의 구체예에서, B_1 은 연결 모이어티일 수 있고, B_2 는 페이로드일 수 있거나, 또는 그 반대의 경우일 수 있다.

[0684] 모든 페이로드 또는 연결 모이어티가 위치 B_1 에서 사슬내 (intrachain) 페이로드 또는 연결 모이어티로 기능할 수 있는 것은 아님을 이해해야 하며, 예를 들어 이는 한쪽에서 (Sp_1) 또는 Aax , 및 다른 쪽에서 (Sp_2) 또는 B_2 와 공유 결합을 형성하는 관능기를 갖지 않기 때문이다. 따라서, B_1 이 사슬내 페이로드 또는 연결 모이어티인 구체예에서, B_1 은 2가 또는 다가 분자인 것이 바람직하다. 예를 들어, B_1 은 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체일 수 있다. 이러한 구체예에서, B_1 은 이의 아미노 기를 통해 (Sp_1) 또는 Aax 의 C-말단 카복실 기와 연결될 수 있고, 이의 카복실 기를 통해 B_2 또는 (Sp_2) 의 N-말단 아미노 기와 연결될 수 있다.

[0685] 본 발명의 방법은 항체-링커 접합체 또는 ADC의 생성에 1-단계 접합 공정 또는 2-단계 접합 공정으로 사용될 수 있다. 하기 표 1에서는 본원에서 사용된 두 용어를 명확히 설명한다.

표 1

1-단계 및 2-단계 접합

[0686]

링커 펩티드 (예시)	공정 타입	단계
$Aax-(Sp_1)$ -페이로드	1-단계 접합	단계 1: 항체내 Gln 잔기에 대한 페이로드를 포함하는 링커의 접합
$Aax-(Sp_1)$ -연결 모이어티	2-단계 접합	단계 1: 항체내 Gln 잔기에 대한 연결 모이어티를 포함하는 링커의 접합 단계 2: 연결 모이어티에 대한 페이로드의 접합

[0687] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 B_1 및/또는 B_2 는 연결 모이어티이다.

- [0688] 즉, 본 발명의 링커에 포함된 모이어티 B₁ 및 B₂ 중 적어도 하나는 연결 모이어티일 수 있다. 본원에서 사용된, "연결 모이어티 (linking moiety)"는 일반적으로 적어도 이-관능성 분자 (bi-functional molecule)를 지칭한다. 본 발명 내에서, 연결 모이어티는 상기 연결 모이어티를 본 발명의 링커에 커플링시키는 제1 관능기, 및 링커가 항체에 접합되기 전 또는 후에 추가 분자를 링커에 커플링하는데 사용될 수 있는 제2 관능기를 포함한다. 소정의 구체예에서, 본 발명의 연결 모이어티는 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이다. 이러한 구체예에서, 연결 모이어티는 바람직하게는 링커에 이의 아미노기를 통해 연결되는 반면에, 아미노산 측쇄에 포함된 관능기는 추가 분자를 링커에 커플링하는데 사용될 수 있다.
- [0689] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나는 하기를 포함한다:
- [0690]  생물직교 마커 기, 또는
- [0691]  가교를 위한 비-생물-직교 엔티티.
- [0692] 용어 "생물직교 마커 기 (bioorthogonal marker group)"는 Sletten 및 Bertozzi (A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation. J Am Chem Soc 2011, 133 (44), 17570-17573)에 의해 네이티브 생화학적 과정을 방해하지 않고 생명체 시스템 내부에서 화학 반응을 일으킬 수 있는 반응성 기를 지정하기 위해 수립되었다. "가교를 위한 비-생물-직교 엔티티 (non-bio-orthogonal entity for crosslinking)"는 제1 관능기를 포함하거나 또는 이로 구성된 임의의 분자일 수 있으며, 여기서 제1 관능기는 적합한 제2 관능기를 포함하는 페이로드에 화학적으로 또는 효소적으로 가교될 수 있다. 가교 반응이 비-생물-직교 반응인 경우에도, 상기 반응이 페이로드를 링커에 가교시키는 것 이외에 항체에 추가적인 변형을 도입하지 않는 것이 바람직하다. 상기 관점에서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 "생물직교 마커 기" 또는 "비-생물-직교 엔티티"로 구성될 수 있거나, 또는 "생물직교 마커 기" 또는 "비-생물-직교 엔티티"를 포함할 수 있다. 예를 들어, 연결 모이어티 Lys(N₃)의 경우, 전체 Lys(N₃) 및 아지드 기 단독은 본 발명 내에서 생물직교 마커 기로 볼 수 있다. Lys(N₃)는 6-아지도-L-리신을 지칭하며, 이는 또한 K(N₃)으로 약칭될 수 있다.
- [0693] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 생물직교 마커 기 또는 비-생물-직교 엔티티는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자 또는 모이어티로 구성되거나 또는 이를 포함한다:
- [0694]  -N≡N, 또는 -N₃;
- [0695]  Lys(N₃);
- [0696]  테트라진;
- [0697]  알킨;
- [0698]  스트레인드 사이클로옥틴;
- [0699]  BCN;
- [0700]  스트레인드 알킨;
- [0701]  광반응성 기;
- [0702]  -RCOH (알데히드);
- [0703]  아실트리플루오로보레이트;
- [0704]  사이클로펜타디엔/스피롤로사이클로펜타디엔;

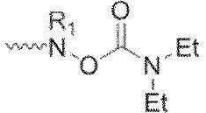
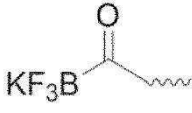
[0705]  티오-선택적 친전자체;

[0706]  -SH; 및

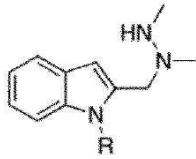
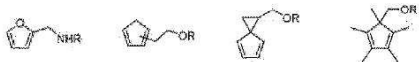
[0707]  시스테인.

[0708] 이들 그룹은 예를 들어 하기 표 2에 개시된 임의의 결합 반응에 관여할 수 있다:

[0709] [표 2]

결합 파트너 1	결합 파트너 2	반응 타입
-N-N≡N	사이클로옥틴 유도체 (예: DIFO, BCN, DIBAC, DIBO, ADIBO/DBCO)	SPAAC
-N-N≡N	알킨	CuAAC
-N-N≡N	트리아릴포스핀	Staudinger 결합
테트라진	사이클로프로펜 노르보렌 트랜스-사이클로옥텐 사이클로옥텐 (BCN)	테트라진 결합
-SH, 예를 들어, Cys 잔기의 -SH	말레이미드	티올-말레이미드 접합
아민	N-하이드록시숙신이미드	
-O- 카바모일하이드록실아민 	아실트리플루오로보레이트 	KAT- 결합 (포타슘 아실- 트리플루오로보레이트)

[0710]

$R_x-S-S-R_y$	$R_z-SH +$ 환원제 (예: TCEP, DTT)	직접 디설파이드 바이오접합
-CHO (알데히드)	HIPS-프로브 	HIPS (Hydrazino-iso-Pictet-Spengler)
-CHO (알데히드)	N-피롤릴 알라닌 유도체	PAPS (pyrrolyl alanine Pictet-Spengler)
-CHO (알데히드)	$R_1-N-N-R_2$ $HO-N-R_1$ $H_2N-CHR_1-CH_2-SH$	하이드라존-결찰 옥심-결찰 티아졸리딘-결찰
말레이미드	-SH, 예를 들어, Cys 잔기의 -SH	티올-말레이미드 결찰
말레이미드		티올-사이클로펜타디엔 접합 (Diels-Alder 반응)
바이오틴	스트렙타비딘	바이오틴-스트렙타비딘 상호작용

[0711]

[0712]

연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 는 상기 표 2에서 "결합 파트너 1" 또는 "결합 파트너 2"로 지칭되는 것이거나 또는 이를 포함할 수 있다.

[0713]

소정의 구체예에서, 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 는 유리 설프하이드릴 기를 갖는 시스테인, 시스테인 모방체 또는 시스테인 유도체이다.

[0714]

이러한 Cys 잔기 (또는 모방체 또는 유도체)의 유리 설프하이드릴 기는 티오-선택적 친전자체 예컨대 말레이미드를 포함하는 독소 구조체에 접합될 수 있다. 말레이미드 모이어티를 포함하는 독소 구조체가 자주 사용되었으며, 또한 애드세트리스 (Adcetris)가 의료 당국의 승인을 받았다. 따라서, MMAE 독소를 포함하는 독소 구조체는 본 발명의 링커내 Cys 잔기의 유리 설프하이드릴 기에 커플링될 수 있다.

[0715]

다른 티오-선택적 친전자체 예컨대 3-아릴프로피오니트릴 (APN) 또는 포스포아미데이트가 본 발명의 방법에서 말레이미드 대신에 사용될 수 있음을 주목해야 한다.

[0716]

그러므로 본 발명에 따른 링커에 Cys-잔기를 제공하는 것은 기성품 (off-the-shelf) 독소-말레이미드 구조체를 사용하여 항체-페이로드 접합체를 형성하거나, 보다 일반적으로 Cys-말레이미드 결합 화학의 이점을 충분히 활용할 수 있도록 하는데 이점을 갖는다. 동시에, 기성품 항체 (off-the-shelf antibodies)를 사용할 수 있으며, 이는 테글리코실화될 필요가 없다. 특정 구체예에서, Cys 잔기는 아미노산-기반 링커에서 사슬내 또는 C-말단에 존재할 수 있다.

[0717]

다른 구체예에서, 연결 모이어티 B_1 및/또는 B_2 는 아지드 기를 포함한다. 당업자는 본 발명에 따른 링커에 혼입될 수 있는 아지드 기를 포함하는 분자, 예컨대 6-아지도-리신 ($Lys(N_3)$) 또는 4-아지도-호모알라닌 ($Xaa(N_3)$)을 알고 있다. 아지드 기를 포함하는 연결 모이어티는 다양한 생물-직교 반응 (bio-orthogonal reactions), 예컨대 SPAAC (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition), CuAAC (copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) 또는 Staudinger 결찰에서 기질로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구체예에서, 사이클로

옥틴 유도체를 포함하는 페이로드, 예컨대 DBCO, DIBO, BCN 또는 BARAC는 아지드 기를 포함하는 링커에 SPAAC에 의해 커플링될 수 있다.

[0718] 또 다른 구체예에서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 테트라진 기를 포함한다. 당업자는 본 발명에 따른 링커에 혼입될 수 있는 테트라진-포함 분자, 바람직하게는 테트라진 기를 포함하는 아미노산 유도체를 알고 있다. 테트라진을 포함하는 연결 모이어티는 생물-직교 테트라진 결합에서 기질로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구체예에서, 사이클로프로펜, 노르보렌, 노르보렌 유도체 또는 사이클로옥틴 기, 예컨대 비사이클로[6.1.0]노난 (BCN)을 포함하는 페이로드가 테트라진 기를 포함하는 링커에 커플링될 수 있다.

[0719] 소정의 구체예에서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 고리형 디엔, 예컨대 사이클로헥사디엔 유도체를 포함할 수 있다. 말레이미드-포함 페이로드 분자에 연결될 수 있는 잠재적인 사이클로헥사디엔 유도체는 Amant et al., Tuning the Diels-Alder Reaction for Bioconjugation to Maleimide Drug-Linkers; Bioconjugate Chem. 2018, 29, 7, 2406-2414 and Amant et al., A Reactive Antibody Platform for One-Step Production of Antibody-Drug Conjugates through a Diels-Alder Reaction with Maleimide; Bioconjugate Chem. 2019, 30, 9, 2340-2348에 기재되어 있다.

[0720] 소정의 구체예에서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 광반응성 기를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "광반응성 기 (photoreactive group)"는 활성 종 (active species) 생성을 수행하기 위해 적용된 외부 에너지원에 반응하여 인접한 화학 구조 (예를 들어, 추출 가능한 수소)에 대한 공유 결합을 초래하는 화학기 (chemical group)를 지칭한다. 광반응성 기의 예는 아릴 아지드 예컨대 페닐 아지드, o-하이드록시페닐 아지드, m-하이드록시페닐아지드, 테트라플루오로페닐 아지드, o-니트로페닐 아지드, m-니트로페닐 아지드, 또는 아지도-메틸쿠마린, 디아지린, 소랄렌 (psoralen) 또는 벤조페논이 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0721] 본 발명은 2개의 상이한 생물-직교 마커 기 및/또는 비-생물-직교 엔티티를 포함하는 링커를 추가로 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 링커는 아지드-포함 연결 모이어티 예컨대 Lys(N₃) 또는 Xaa(N₃), 및 설포하이드릴-포함 연결 모이어티, 예컨대 시스테인을 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 아지드-포함 연결 모이어티 예컨대 Lys(N₃) 또는 Xaa(N₃), 및 테트라진-포함 연결 모이어티, 예컨대 테트라진-변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 링커는 설포하이드릴-포함 연결 모이어티 예컨대 시스테인, 및 테트라진-포함 연결 모이어티 예컨대 테트라진-변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 2개의 상이한 생물-직교 마커 기 및/또는 비-생물-직교 엔티티를 포함하는 링커는 이들이 2개의 별개의 페이로드를 수용할 수 있고 따라서 하나 초과와 페이로드를 포함하는 항체-페이로드 접합체를 생성할 수 있다는 이점을 갖는다.

[0722] 이러한 방식으로, 2+2의 항체 페이로드 비율을 획득할 수 있다. 제2 페이로드를 사용하면 효능 (efficacy) 및 잠재력 (potency)과 관련하여 현재의 치료적 접근법을 넘어서는 완전히 새로운 부류의 항체 페이로드 접합체를 개발할 수 있다.

[0723] 이러한 구체예는 특히 세포 내의 2개의 상이한 구조, 가령 예를 들어 DNA 및 미세소관을 표적화할 수 있다. 일부 암은 예를 들어 미세소관 독소 (microtubule toxin)와 같은 한 가지 약물에 대한 저항성이 있을 수 있기 때문에, DNA-독소는 여전히 암 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0724] 다른 구체예에 따르면, 2개의 약물이 사용될 수 있으며, 이는 이들이 동일한 조직에서 동시에 방출되는 경우 완전한 효능을 갖는다. 이는 건강한 조직에서 항체가 일부 분해되거나 또는 하나의 약물이 조기에 손실되는 경우 오프-타겟 독성 (off-target toxicity)을 감소시킬 수 있다.

[0725] 또한, 이중-표지된 프로브 (dual-labeled probes)는 비-침습적 영상화 (non-invasive imaging) 및 요법 (therapy) 또는 수술 중/수술 후 영상화 (intra/post-operative imaging)/수술 (surgery)에 사용될 수 있다. 이러한 구체예에서, 종양 환자는 비-침습적 영상화에 의해 선별될 수 있다. 그 다음에, 외과 의사 또는 로봇이 수술 중에 모든 양성 조직을 식별하는데 도움이 되는 다른 영상화제 (예컨대, 형광 염료)를 사용하여, 종양은 외과적으로 제거될 수 있다.

[0726] 페이로드가 연결 모이어티에 공유 결합을 통해 연결되는 것이 바람직하다. 그러나, 소정의 구체예에서, 페이로드는 연결 모이어티에 강한 비-공유 결합을 통해 연결될 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 바이오틴 모이어티, 예컨대 비-제한적으로 리신 유도체 바이오시틴 (biocytin)을 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 스트렙타비딘 모이어티를 포함하는 페이로드는 바이오틴 모이어티를 포함하는 링커에 연결

될 수 있다.

[0727] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하나 이상의 페이로드를 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나에 연결하는 추가 단계를 포함한다.

[0728] 1-단계 공정으로 하나 이상의 페이로드를 포함하는 링커를 항체에 직접 접합시키는 대신에, 본 발명은 소정의 구체예에서 또한 2-단계 공정을 지칭하며, 여기서 제1 단계에서 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂를 포함하는 링커가 항체에 접합되고, 후속하여 제2 단계에서 하나 이상의 페이로드가 링커의 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 커플링 될 수 있다.

[0729] 본원에서 사용된, 용어 "페이로드 (payload)"는 화학적으로 합성될 수 있는 화학적 엔티티 또는 소분자량 분자, 및 숙주 세포의 발효에 의해 생성될 수 있거나 또는 화학적으로 합성되어 항체에 신규한 기능을 부여할 수 있는 생물학적 엔티티 또는 더 큰 분자를 포함하는, 임의의 자연 발생 또는 합성 생성 분자를 나타낸다. 페이로드는 링커에 포함된 연결 모이어티 또는 링커의 다른 부분 예컨대 화학적 스페이서 (Sp₁) 및/또는 (Sp₂), 또는 소정의 구체예에서 Aax 또는 B₁에 대한 페이로드의 커플링을 허용하는 추가 구조 또는 관능기를 포함할 수 있음을 이해 해야 한다.

[0730] 2-단계 접합 공정에서, 페이로드는 당해 기술 분야에 알려진 임의의 적합한 방법에 의해 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 연결될 수 있다. 바람직하게는, 페이로드는 본원에 개시된 임의의 생물직교 마커 기 또는 가교를 위한 비-생물-직교 엔티티에 연결될 수 있다. 즉, 페이로드는 바람직하게는 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 포함된 생물직교 마커 기 또는 가교를 위한 비-생물-직교 엔티티와 적합할 수 있는 관능기를 포함한다.

[0731] 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 포함된 생물직교 마커 기에 페이로드를 연결하는데 사용될 수 있는 여러 생물직 교 반응이 당해 기술 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 생물직교성의 요건을 충족시키는 다수의 화학적 결합 전략이 개발되었으며, 이는 하기를 포함한다: 아지드 및 사이클로옥틴 사이의 1,3-쌍극자 고리화 첨가반응 (1,3-dipolar cycloaddition) (또한, 무-구리 클릭 화학 (copper-free click chemistry)이라 함, Baskin et al ("Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging". Proceedings of the National Academy of Sciences. 104 (43): 16793-7)), 니트론 (nitrones) 및 사이클로옥틴 (cyclooctynes) 사이의 1,3-쌍극자 고리 화 첨가반응 (Ning et al ("Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition". Angewandte Chemie International Edition. 49 (17): 3065)), 알데히드 및 케톤으로부터의 옥심/하이드라존 형 성 (Yarema, et al ("Metabolic Delivery of Ketone Groups to Sialic Acid Residues. Application To Cell Surface Glycoform Engineering". Journal of Biological Chemistry. 273 (47): 31168-79)), 테트라진 결합 (Blackman et al ("The Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation based on Inverse-electron-demand Diels-Alder Reactivity". Journal of the American Chemical Society. 130 (41): 13518-9)), 이소니트릴-기반 클릭 반응 (Stockmann et al ("Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules". Organic & Biomolecular Chemistry. 9 (21): 7303)), 및 가장 최근에, 쿼드라이사이클란 결합 (quadricyclane ligation) (Sletten & Bertozzi (JACS, A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation. J Am Chem Soc 2011, 133 (44), 17570-17573)), 구리(I)-촉매화 아지드-알킨 고리화 첨가반응 (Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) (CuAAC, Kolb & Sharpless ("The growing impact of click chemistry on drug discovery". Drug Discov Today. 8 (24): 1128-1137)), 스트레인-촉진된 아지드-알킨 고리화 첨가반응 (Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) (SPAAC, Agard et al ("A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides". ACS Chem. Biol. 1: 644-648)), 또는 스트레인-촉진된 알킨-니트론 고리화 첨가반응 (Strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition) (SPANAC, MacKenzie et al ("Strain-promoted cycloadditions involving nitrones and alkynes—rapid tunable reactions for bioorthogonal labeling". Curr Opin Chem Biol. 21: 81-8)). 이러한 모든 문헌은 충분한 권능을 부여하는 개시내용을 제공하고, 긴 반복을 피하기 위해 본원에 참조에 의해 통합된다.

[0732] 링커가 항체의 Gln 잔기에 미생물 트랜스글루타미나제에 의해 접합된 후에 페이로드가 바람직하게는 본 발명에 따른 링커에 포함된 가교를 위한 비-생물-직교 엔티티 또는 생물-직교 마커 기에 커플링되는 것으로 이해해야 한다. 그러나, 본 발명은 또한 제1 단계에서 하나 이상의 페이로드가 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂를 포함하는 링커에 커플링되고 제2 단계에서 생성된 링커-페이로드 구조체가 항체에 미생물 트랜스글루타미나제에 의해 접

합되는 항체-링커 접합체를 포함한다.

- [0733] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 하나 이상의 페이로드는 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 클릭 반응을 통해 연결된다.
- [0734] 즉, 하나 이상의 페이로드는 클릭 반응, 구체적으로 본원에 개시된 임의의 클릭 반응에서 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 연결될 수 있다.
- [0735] 특히 바람직한 구체예에서, 적어도 하나의 페이로드는 링커에 포함된 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 티올-말레이미드 접합을 통해 접합될 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 페이로드는 말레이미드 기를 포함할 수 있고, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 티올 기를 포함하는 분자 예컨대 이에 한정되는 것은 아니지만 시스테인 잔기 또는 시스테인 모방체 예컨대 호모시스테인일 수 있다. 그러나, B₁ 및/또는 B₂는 또한 유리 티올 기를 포함하는 비-아미노산 분자일 수 있다. 다른 구체예에서, 페이로드는 유리 티올 기를 포함할 수 있고, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 말레이미드 기를 포함할 수 있다.
- [0736] 또 다른 특히 바람직한 구체예에서, 적어도 하나의 페이로드는 링커에 포함된 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 SPAAC (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition)를 통해 접합될 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 페이로드는 알킨 기, 예를 들어 제한 없이 사이클로옥틴 (cyclooctyne) 기를 포함할 수 있고, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 아지드 기를 포함하는 분자 예컨대 제한 없이 본원에 개시된 리신 유도체 Lys(N₃)일 수 있다. 그러나, B₁ 및/또는 B₂는 또한 유리 아지드 기를 포함하는 비-아미노산 분자일 수 있다. 다른 구체예에서, 페이로드는 알킨 기 예컨대 사이클로옥틴 기를 포함할 수 있고, 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂는 아지드 기를 포함할 수 있다.
- [0737] 소정의 구체예에서, B₁ 및 B₂ 중 하나는 티올 기를 포함하는 연결 모이어티 예컨대 시스테인일 수 있고, B₁ 및 B₂ 중 다른 하나는 아지드 모이어티를 포함하는 연결 모이어티 예컨대 Lys(N₃)일 수 있다. 이러한 구체예에서, 2개의 구별되는 페이로드가 링커에 커플링될 수 있으며, 하나는 티올-말레이미드 접합을 통해 그리고 다른 하나는 SPAAC 반응을 통해 커플링될 수 있다.
- [0738] 링커내 연결 모이어티 및 페이로드 사이의 클릭 반응 이외에, 페이로드는 링커에 당해 기술 분야에 알려진 임의의 효소적 또는 비-효소적 반응에 의해 공유 결합될 수 있다. 이를 위해, 페이로드는 예를 들어 링커의 C-말단 또는 링커의 아미노산 측쇄에 결합될 수 있다.
- [0739] 소정의 구체예에서, 페이로드는 링커에 화학적 합성에 의해 커플링될 수 있다. 당업자는 페이로드를 아미노산-기반 링커에 화학적 합성에 의해 커플링하는 방법을 알고 있다. 예를 들어, 아민-포함 페이로드, 또는 티올-포함 페이로드 (예: 메이탄신 유사체), 또는 하이드록실-함유 페이로드 (예: SN-38 유사체)는 아미노산-기반 링커의 C-말단에 화학적 합성에 의해 부착될 수 있다. 그러나, 당업자는 페이로드를 아미노산 또는 아미노산 유도체의 C-말단 또는 측쇄에 화학적 합성에 의해 커플링하는데 사용될 수 있는 추가 반응 및 반응성 기를 알고 있다. 페이로드를 아미노산-기반 링커에 화학적 합성에 의해 커플링하는데 사용될 수 있는 전형적인 반응에는 펩티드 커플링, 활성화된 에스테르 커플링 (NHS 에스테르, PFP 에스테르), 클릭 반응 (CuAAC, SPAAC), michael 첨가반응 (티올 말레이미드 접합)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 펩티드에 대한 페이로드의 커플링은 선행 기술, 예를 들어 Costoplus et al. (Peptide-Cleavable Self-immolative Maytansinoid Antibody-Drug Conjugates Designed To Provide Improved Bystander Killing. ACS Med Chem Lett. 2019 Sep 27;10(10):1393-1399), Sonzini et al. (Improved Physical Stability of an Antibody-Drug Conjugate Using Host-Guest Chemistry. Bioconjug Chem. 2020 Jan 15;31(1):123-129), Boderio et al. (Synthesis and biological evaluation of RGD and isoDGR peptidomimetic- α -amanitin conjugates for tumor-targeting. Beilstein J. Org. Chem. 2018, 14, 407-415), Nunes et al. (Use of a next generation maleimide in combination with THIOMAB™ antibody technology delivers a highly stable, potent and near homogeneous THIOMAB™ antibody-drug conjugate (TDC). RSC Adv., 2017,7, 24828-24832), Doronina et al. (Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjug Chem. 2006 Jan-Feb;17(1):114-24), Nakada et al. (Novel antibody drug

conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. Bioorg Med Chem Lett. 2016 Mar 15;26(6):1542-1545) 및 Dickgiesser et al. (Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases. Bioconjug Chem. 2020 Mar 12. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00061)에 광범위하게 기재되어 있다.

[0740] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 B₁ 및/또는 B₂는 페이로드이다.

[0741] 소정의 구체예에서, 링커는 단일 페이로드 B₁만을 포함할 수 있고 추가적인 연결 모이어티를 포함하지 않을 수 있다. 즉, 링커는 구조 Aax-B₁, Aax-(Sp₁)-B₁ 또는 Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)를 가질 수 있으며, 여기서 B₁은 페이로드이다. 다른 구체예에서, 링커는 2개의 페이로드 B₁ 및 B₂를 포함할 수 있지만, 추가적인 연결 모이어티는 포함하지 않을 수 있고, 링커는 구조 Aax-B₁-B₂, Aax-(Sp₁)-B₁-B₂, Aax-B₁-(Sp₂)-B₂ 또는 Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂, Aax-B₁-B₂-(Sp₁)를 가질 수 있으며, 여기서 B₁ 및 B₂는 페이로드이다. 페이로드만을 포함하는 링커는 1-단계 공정으로 항체에 접합될 수 있다.

[0742] B₁ 및 B₂가 모두 페이로드인 구체예에서, B₁ 및 B₂는 구조가 동일하거나 또는 상이할 수 있음을 이해해야 한다. 소정의 구체예에서, 하나 이상의 페이로드를 포함하는 전체 링커는 화학적으로 합성될 수 있다. 대안적으로, 링커가 항체에 접합되기 전에 하나 이상의 페이로드는 링커에 포함된 연결 모이어티에 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 커플링될 수 있다.

[0743] 소정의 구체예에서, 본 발명의 링커는 2개의 상이한 페이로드를 항체의 C_H2 도메인의 잔기 Q295에 접합되도록 할 수 있다. 제2 페이로드를 사용하면 효능 및 잠재력과 관련하여 현재의 치료적 접근법을 넘어서는 완전히 새로운 부류의 항체-페이로드 접합체를 개발할 수 있다. 또한 새로운 적용 분야, 예를 들어 영상화 및 요법 또는 수술 중/수술 후 수술을 위한 이중-타입 영상화 (dual-type imaging)가 구상된다 (cf. Azhdarinia A. et al., Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. Mol Imaging Biol. 2012 Jun; 14(3): 261-276). 예를 들어, 수술전 양전자 방출 단층 촬영 (positron emission tomography: PET)을 위한 분자 영상화제 (molecular imaging agent) 및 수술 절제면의 묘사를 가이드하기 위한 근적외선 형광 (near-infrared fluorescent: NIRF)-염료를 포함하는 이중-표지된 항체 (dual-labeled antibodies)는 암의 진단, 병기 결정 및 절제를 크게 증진시킬 수 있다 (cf. Houghton JL. et al., Site-specifically labeled CA19.9-targeted immunoconjugates for the PET, NIRF, and multimodal PET/NIRF imaging of pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 29;112(52):15850-5). PET 및 NIRF 광학 영상화는 보완적인 임상 적용을 제공하여 비-침습적 전신 영상화를 통해 수술 중 질병을 국재화하고 종양 절제면을 식별할 수 있도록 한다. 그러나, 최근까지 이러한 이중-표지된 프로브의 생성은 적절한 부위-특이적 방법의 부족으로 인해 어려웠으며; 2개의 상이한 프로브를 화학적 수단에 의해 부착하면 프로브의 무작위 접합으로 인해 분석 및 재현이 거의 불가능하다. 또한, Levengood M. et al., (Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody-Drug Conjugates. Angewandte Chemie, Volume56, Issue3, January 16, 2017)의 연구에서, 2가지 상이한 아우리스타틴 (auristatin) 독소 (서로 다른 물리화학적 특성을 갖고 보완적인 항암 활성을 발휘함)가 부착된 이중-약물 표지된 항체는 개별 아우리스타틴 성분으로 이루어진 ADC에 대해 불응성인 이중이식 모델 (xenograft models) 및 세포주에 활성을 부여하였다. 이는 이중-표지된 ADC가 단일 기존 ADC 단독보다 더 효과적으로 암 이질성 (heterogeneity) 및 저항성 (resistance)을 해결할 수 있음을 시사한다. ADC에 대한 하나의 저항성 기전은 암 세포로부터 세포독성 모이어티의 능동적 펌핑-아웃 (active pumping-out)을 포함하기 때문에, 또 다른 이중-약물 적용은 세포독성 약물의 유출 기전을 특이적으로 차단하는 약물의 추가적 및 동시 전달을 포함할 수 있다. 따라서 이러한 이중-표지된 ADC는 기존 ADC보다 더 효과적으로 ADC에 대한 암 저항성을 극복하는데 도움이 될 수 있다.

[0744] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 하나 이상의 페이로드는 하기 중 적어도 하나를 포함한다:

[0745]  독소

[0746]  사이토카인

[0747]  성장 인자

- [0748]  방사성핵종
- [0749]  호르몬
- [0750]  항-바이러스제
- [0751]  항-박테리아제
- [0752]  형광 염료
- [0753]  면역조절제/면역자극제
- [0754]  반감기 증가 모이어티
- [0755]  용해도 증가 모이어티
- [0756]  폴리머-독소 접합체
- [0757]  핵산
- [0758]  바이오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티
- [0759]  비타민
- [0760]  단백질 분해제 ('PROTAC')
- [0761]  표적 결합 모이어티, 및/또는
- [0762]  항-염증제.
- [0763] 본원에 개시된 페이로드 중 어느 하나는 본원에 개시된 1-단계 접합 공정에 사용하기 위해 링커에 직접 커플링 될 수 있거나, 또는 본원에 개시된 2-단계 공정으로 생성된 항체-링커 접합체에 포함된 연결 모이어티에 연결될 수 있다.
- [0764] 소정의 구체예에서, 페이로드는 사이토카인일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "사이토카인 (cytokine)"은 다른 세포의 기능에 영향을 미치고, 면역 또는 염증 반응에서 세포들 간의 상호작용을 조절하는 임의의 분비된 폴리펩티드를 의미한다. 사이토카인은 모노카인 (monokines), 림포카인 (lymphokines) 및 케모카인 (chemokines)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이는 세포가 상기를 생성하는 것과 관계 없다. 예를 들어, 모노카인은 일반적으로 단핵구에 의해 생성되고 분비되는 것으로 언급되지만, 자연 살해 세포, 섬유아세포, 호염기구, 호중구, 내피 세포, 뇌 성상세포, 골수 간질 세포, 표피 각질형성세포 및 B-림프구와 같은 많은 다른 세포가 모노카인을 생성한다. 림포카인은 일반적으로 림프구 세포에 의해 생성되는 것으로 언급된다. 사이토카인의 예는 인터루킨-1 (IL-1), 인터루킨-6 (IL-6), 종양 괴사 인자 알파 (TNF α) 및 종양 괴사 인자 베타 (TNF β)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0765] 소정의 구체예에서, 페이로드는 항염증제일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "항염증제 (anti-inflammatory agent)"는 주요 작용 방식 및 사용 방식이 염증 치료 영역에 있는 항염증제 부류 및 또한 유용한 항염증 효과를 갖는 다른 치료제 부류로부터의 임의의 다른 약제를 의미한다. 이러한 항염증제는 비-스테로이드성 항염증 약물 (non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs), 질병 조절 항-류마티스 약물 (disease modifying anti-rheumatic drugs: DMARDs), 매크로라이드 항생제 (macrolide antibiotics) 및 스타틴 (statins)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, NSAID는 살리실레이트 (예: 아스피린), 아릴프로피온산 (예: 이부프로펜), 안트라닐산 (예: 메페남산), 피라졸 (예: 페닐부타존), 사이클릭 아세트산 (인도메티신) 및 옥시캄 (예: 피록시캄)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항염증제는 설린단, 디클로페낙, 테녹시캄, 케토롤락, 나프록센, 나부메톤, 디플루나살, 케토프로펜, 아릴프로피온

산 (arlypropionic acid), 테니답, 하이드록시클로로퀸, 설파살라진, 셀레콕시브, 로페콕시브, 멜록시캄, 에토 리콕시브, 발데콕시브, 메토티렉세이트, 에타네르셉트, 인플릭시맵, 아달리무맵, 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 클라리트로마이신, 아지트로마이신, 록시트로마이신, 에 리트로마이신, 이부프로펜, 텍시부프로펜, 플루르비프로펜, 페노프로펜, 펜부펜, 베녹사프로펜, 텍스케토프로펜, 툴페남산, 니메실리드 (nimesulide) 및 옥사프로진을 포함한다.

[0766] 소정의 구체예에서, 항염증제는 표적 특이적 항체에 접합되는 경우, 예를 들어 자가면역 질환에 의해 유발된 염 증을 완화할 수 있는 항-염증성 사이토카인일 수 있다. 항염증 활성을 갖는 사이토카인은 제한 없이 IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 또는 TGF- β 일 수 있다.

[0767] 소정의 구체예에서, 페이로드는 성장 인자일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "성장 인자 (growth factor)"는 세포 성장, 증식, 세포 분화 및/또는 세포 성숙을 자극할 수 있는 자연 발생 물질을 지칭한다. 성장 인자는 단 백질 또는 스테로이드 호르몬의 형태로 존재한다. 성장 인자는 다양한 세포 과정을 조절하는데 중요하다. 성 장 인자는 전형적으로 세포들 간의 신호전달 분자 (signaling molecules)로서 역할을 한다. 그러나, 세포 성장, 증식, 세포 분화 및 세포 성숙을 촉진하는 능력은 성장 인자들 간에 다양하다. 성장 인자의 예의 비-제 한적인 목록은 하기를 포함한다: 염기성 섬유아세포 성장 인자 (basic fibroblast growth factor), 아드레노메 둘린, 안지오펜이오티, 자가분비 운동성 인자 (autocrine motility factor), 골 형태형성 단백질, 뇌-유래 신경 영양 인자, 표피 성장 인자, 상피 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 아교 세포주-유래 신경영양 인자, 과립구 콜로니-자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자, 성장 분화 인자-9, 간세포 성장 인자, 간암-유래 성장 인자, 인슐린 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자, 이동-자극 인자 (migration-stimulating factor), 마이오스 타틴, 신경 성장 인자, 및 다른 뉴로트로핀 (neurotrophins), 혈소판-유래 성장 인자, 전환 성장 인자 알파, 전 환 성장 인자 베타, 종양-괴사-인자-알파, 혈관 내피 성장 인자, 태반 성장 인자, 우태아 소마토포트로핀 (fetal bovine somatotrophin), 및 사이토카인 (예: IL-3 및 IL-6에 대한 IL-1-보조인자, IL-2-t-세포 성장 인자, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, 및 IL-7).

[0768] 소정의 구체예에서, 페이로드는 호르몬일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "호르몬 (hormone)"은 신체의 한 부 분에 있는 세포 (cell) 또는 샘 (gland)에 의해 방출되는 화학 물질이 유기체의 다른 부분에 있는 세포에 영항 을 미치는 메시지를 보내는 화학물질을 지칭한다. 본 발명에 유용한 호르몬의 예로는 제한 없이 멜라토닌 (MT), 세로토닌 (5-HT), 티록신 (T4), 트리요오도티로닌 (T3), 에피네프린 또는 아드레날린 (EPI), 노르에피네프린 또는 노르아드레날린 (NRE), 도파민 (DPM 또는 DA), 항뮐러관 호르몬 (antimullerian hormone) 또는 뮐러 관 억제 호르몬 (mullerian inhibiting hormone) (AMH), 아디포넥틴 (Acrp30), 부신피질 자극 호르몬 또는 코 르티코트로핀 (ACTH), 안지오펜시노젠 및 안지오펜신 (AGT), 항이노 호르몬 또는 바소프레신 (ADH), 심방 나트 른이노 펩티드 또는 아트리오펜틴 (ANP), 칼시토닌 (CT), 콜레시스토키닌 (CCK), 코르티코트로핀-방출 호르몬 (CRH), 에리트로포이에틴 (EPO), 난포-자극 호르몬 (FSH), 가스트린 (GRP), 그렐린 (ghrelin), 글루카곤 (GCG), 성선자극호르몬-방출 호르몬 (GnRH), 성장 호르몬-방출 호르몬 (GHRH), 인간 융모막 성선자극호르몬 (hCG), 인간 태반 락토젠 (HPL), 성장 호르몬 (GH 또는 hGH), 인히빈, 인슐린 (INS), 인슐린-유사 성장 인자 또 는 소마토메딘 (IGF), 렙틴 (LEP), 황체형성 호르몬 (LH), 멜라닌 세포 자극 호르몬 (MSH 또는 α -MSH), 옥렉신, 옥시토신 (OXT), 부갑상선 호르몬 (PTH), 프로락틴 (PRL), 릴렉신 (RLN), 세크레틴 (SCT), 소마토스타 틸 (SRIF), 트롬보포이에틴 (TPO), 갑상선-자극 호르몬 또는 티로트로핀 (TSH), 티로트로핀-방출 호르몬 (TRH), 코르티솔, 알도스테론, 테스토스테론, 데하이드로에피안드로스테론 (DHEA), 안드로스텐디온, 디하이드로테스토 스테론 (DHT), 에스트론, 에스트리올 (E3), 프로게스테론, 칼시트리올, 칼시디올, 프로스타글란딘 (PG), 류코트 리엔 (LT), 프로스타사이클린 (PGI2), 트롬복산 (TXA2), 프로락틴 방출 호르몬 (PRH), 리포트로핀 (PRH), 뇌 나 트륨이노 펩티드 (BNP), 신경펩티드 Y (NPY), 히스타민, 엔도텔린, 체장 폴리펩티드, 레닌 및 엔케팔린이 있다.

[0769] 소정의 구체예에서, 페이로드는 항바이러스제일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "항바이러스제 (antiviral agent)"는 포유동물에서 바이러스의 형성 및/또는 복제를 억제하는데 효과적인 제제 (화합물 또는 생물학적 제 제)를 의미한다. 이는 포유동물에서 바이러스의 형성 및/또는 복제에 필요한 숙주 또는 바이러스 기전을 방해 하는 제제를 포함한다. 항바이러스제는 예를 들어 리바비린, 아만타딘, VX-497 (merimepodib, Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (Vertex Pharmaceuticals), 레보비린, 비라미딘, 세플렌 (Ceplene) (maxamine), XTL-001 및 XTL-002 (XTL Biopharmaceuticals)를 포함한다.

[0770] 소정의 구체예에서, 페이로드는 항박테리아제일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "항박테리아제 (antibacterial agent)"는 하기를 수행할 수 있는 임의의 물질, 화합물, 물질들의 조합 또는 화합물들의 조합을 지칭한다: (i) 박테리아 성장의 억제, 감소 또는 방지; (ii) 대상체에서 감염을 일으키는 박테리아 능력의 억제

또는 감소; 또는 (iii) 박테리아가 환경에서 번식하거나 또는 감염성을 유지하는 능력의 억제 또는 감소. 용어 "항박테리아제 (antibacterial agent)"는 또한 박테리아의 감염성 또는 병독성을 감소시킬 수 있는 화합물을 지칭한다.

[0771] 소정의 구체예에서, 페이로드는 면역조절제일 수 있다. 병용 요법을 위해 본원에서 사용된 용어 "면역조절제 (immunoregulatory agent)"는 숙주의 면역계를 억제, 차폐 또는 강화시키는 작용을 하는 물질을 지칭한다. 면역조절제의 예로는 단백질성 제제 (proteinaceous agents) 예컨대 사이토카인, 펩티드 모방체 및 항체 (예컨대, 인간, 인간화, 키메라, 모노클로날, 폴리클로날, Fvs, ScFvs, Fab 또는 F(ab)2 단편 또는 에피토프 결합 단편), 핵산 분자 (예컨대, 안티센스 핵산 분자, iRNA 및 삼중 나선), 소분자, 유기 화합물 및 무기 화합물을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 면역조절제는 메토크렉세이트, 레플루노마이드, 사이클로포스파미드, 사이토산 (cytoxan), 임무란 (Immuran), 사이클로스포린 A, 미노사이클린, 아자티오프린, 항생제 (예컨대, FK506 (타크롤리무스)), 메틸프레드니솔론 (MP), 코르티코스테로이드, 스테로이드, 마이코페놀레이트, 모페틸, 라파마이신 (시롤리무스), 미조리빈, 데옥시시페르구알린, 브레퀴나르, 말로노니트릴로아민데스 (malononitriloamindes) (예: 레플루아미드), T 세포 수용체 조절제 및 사이토카인 수용체 조절제를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0772] 소정의 구체예에서, 면역조절제는 면역자극제일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "면역자극제 (immunostimulatory agent)"는 바람직하게는 면역 반응 (예를 들어, 특정 병원체에 대한 면역 반응)을 유발할 수 있는 임의의 물질 또는 물질들을 지칭한다. 면역 세포 활성화 화합물은 Toll-유사 수용체 (Toll-like receptor: TLR) 효능제를 포함한다. 이러한 효능제는 병원체 관련 분자 패턴 (pathogen associated molecular patterns: PAMPs), 예컨대 감염-모방 조성물 (infection-mimicking composition) 예컨대 박테리아-유래 면역조절제 (일명 위험 신호 (danger signal)) 및 손상 관련 분자 패턴 (damage associated molecular pattern: DAMPs), 예컨대 스트레스를 받거나 또는 손상된 세포를 모방하는 조성물을 포함한다. TLR 효능제는 핵산 또는 지질 조성물 (예를 들어, 모노포스포릴 지질 A (monophosphoryl lipid A: MPLA))을 포함한다. 일례에서, TLR 효능제는 TLR9 효능제 예컨대 시토신-구아노신 올리고뉴클레오타이드 (CpG-ODN), 폴리(에틸렌이민) (PEI)-축합 올리고뉴클레오타이드 (ODN) 예컨대 PEI-CpG-ODN, 또는 이중 가닥 데옥시리보핵산 (DNA)을 포함한다. 다른 예에서, TLR 효능제는 TLR3 효능제 예컨대 폴리이노신-폴리시티딜산 (폴리 (I:C)), PEI-폴리 (I:C), 폴리아데닐산-폴리우리딜산 (폴리 (A:U)), PEI-폴리 (A:U), 또는 이중 가닥 리보핵산 (RNA)을 포함한다. 다른 예시되는 백신 면역자극 화합물은 리포폴리사카라이드 (LPS), 케모카인/사이토카인, 진균성 베타-글루칸 (예컨대 렌티난), 이미퀴모드, CRX-527 및 OM-174를 포함한다.

[0773] 소정의 구체예에서, 페이로드는 반감기 증가 모이어티 (half-life increasing moiety) 또는 용해도 증가 모이어티 (solubility increasing moiety)일 수 있다. 반감기 증가 모이어티는 예를 들어 PEG-모이어티 (폴리에틸렌 글리콜 모이어티; PEGylation), 다른 폴리머 모이어티, PAS 모이어티 (프롤린, 알라닌 및 세린을 포함하는 올리고펩티드; PASylation), 또는 혈청 알부민 결합제이다. 용해도 증가 모이어티는 예를 들어 PEG-모이어티 (PEGylation) 또는 PAS 모이어티 (PASylation)이다.

[0774] 소정의 구체예에서, 페이로드는 폴리머-독소 접합체 (polymer-toxin conjugate)일 수 있다. 폴리머-독소 접합체는 많은 페이로드 분자를 운반할 수 있는 폴리머이다. 이러한 접합체는 때때로 플렉시머 (fleximers)라고 지칭되며, 예를 들어 Mersana therapeutics에 의해 판매된다. 폴리머-독소 접합체는 본원에 개시된 임의의 독소를 포함할 수 있다.

[0775] 소정의 구체예에서, 페이로드는 뉴클레오타이드일 수 있다. 핵산 페이로드의 일례는 MCT-485이며, 이는 MultiCell Technologies, Inc.에서 개발한, 종양 용해 및 면역 활성화 특성을 갖는 매우 작은 비-코딩 이중 가닥 RNA이다.

[0776] 소정의 구체예에서, 페이로드는 형광 염료일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "형광 염료 (fluorescent dye)"는 제1 파장의 광을 흡수하고 제1 파장보다 긴 제2 파장을 방출하는 염료를 지칭한다. 소정의 구체예에서, 형광 염료는 근적외선 형광 염료로, 이는 650 내지 900 nm 파장의 광을 방출한다. 이 영역에서는 조직 자가형광이 더 낮고, 형광 소광이 적어 배경 간섭 (background interference)을 최소화하면서 심층 조직 침투를 증진시킨다. 따라서, 근적외선 형광 영상화를 사용하여 본 발명의 항체-페이로드 접합체에 의해 결합된 조직을 수술 중에 시각화할 수 있다. "근적외선 형광 염료 (near-infrared fluorescent dyes)"는 당해 기술 분야에 알려져 있고 상업적으로 입수 가능하다. 소정의 구체예에서, 근적외선 형광 염료는 IRDye 800CW, Cy7, Cy7.5, NIR CF750/770/790, DyLight 800 또는 Alexa Fluor 750일 수 있다.

- [0777] 소정의 구체예에서, 페이로드는 방사성핵종을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "방사성핵종 (radionuclide)"은 예를 들어 Y, In, Tb, Ac, Cu, Lu, Tc, Re, Co, Fe 등과 같은 방사성금속 (radiometals)의 양으로 하전된 이온, 예컨대 ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ⁶⁷Cu, ⁷⁷Lu, ⁹⁹Tc, ¹⁶¹Tb, ²²⁵Ac 등을 포함하는, 의학적으로 유용한 방사성핵종에 관한 것이다. 방사성핵종은 킬레이트제 예컨대 DOTA 또는 NODA-GA에 포함될 수 있다. 또한, 방사성핵종은 치료용 방사성핵종 또는 하기에서 논의되는 영상화 기술에서 조영제로서 사용될 수 있는 방사성핵종일 수 있다. 방사성핵종 또는 방사성핵종을 포함하는 분자는 당해 기술 분야에 알려져 있고, 상업적으로 입수 가능하다.
- [0778] 소정의 구체예에서, 페이로드는 비타민 (vitamin)일 수 있다. 비타민은 엽산, 폴라신 및 비타민 B9를 포함하는 폴레이트로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0779] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 독소는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나이다:
- [0780]  피롤로벤조디아제핀 (PBD);
- [0781]  아우리스타틴 (예: MMAE, MMAF);
- [0782]  메이탄시노이드 (메이탄신, DM1, DM4, DM21);
- [0783]  두오카르마이신;
- [0784]  니코틴아미드 포스포리보실트랜스퍼라제 (NAMPT) 억제제;
- [0785]  튜블리신;
- [0786]  엔디이엔 (예: 칼리케아미신);
- [0787]  PNUs, 독소루비신;
- [0788]  피롤계 키네신 스핀들 단백질 (KSP) 억제제;
- [0789]  크립토피신;
- [0790]  약물 유출 펌프 억제제;
- [0791]  산드라마이신;
- [0792]  아마톡신 (amatoxins) (예: α-아마니틴); 및
- [0793]  캄프토테신 (예: 엑사테칸, 테록스테칸).
- [0794] 즉, 본 발명의 방법으로 제조된 항체-링커 접합체는 바람직하게는 독소 페이로드를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "독소 (toxin)"는 살아있는 세포 또는 유기체에 의해 생성되고 세포 또는 유기체에 유독한 임의의 화합물에 관한 것이다. 따라서, 독소는 예를 들어 소분자, 펩티드 또는 단백질일 수 있다. 특정 예는 신경독소 (neurotoxins), 괴사독소 (necrotoxins), 혈액독소 (hemotoxins) 및 세포독소 (cytotoxins)이다. 소정의 구체예에서, 독소는 신생물 질환의 치료에 사용되는 독소이다. 즉, 독소는 본 발명의 방법으로 항체에 접합될 수 있고 항체의 표적 특이성으로 인해 악성 세포로 또는 악성 세포 내로 전달될 수 있다.
- [0795] 소정의 구체예에서, 독소는 아우리스타틴일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "아우리스타틴 (auristatin)"은 항-유사분열제 (anti-mitotic agents)의 계열을 지칭한다. 아우리스타틴 유도체는 또한 용어 "아우리스타틴 (auristatin)"의 정의 내에 포함된다. 아우리스타틴의 예는 아우리스타틴 E (AE), 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF) 및 둘라스타틴의 합성 유사체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0796] 소정의 구체예에서, 독소는 메이탄시노이드일 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "메이탄시노이드

(maytansinoid)"는 원래 아프리카 관목 *마이테누스 오바투스* (*Maytenus ovatus*)로부터 단리된 고도로 세포독성인 약물 부류 및 추가로 메이탄시놀 (Maytansinol) 및 천연 메이탄시놀의 C-3 에스테르 (미국 특허 제4,151,042호); 합성 메이탄시놀의 C-3 에스테르 유도체 (Kupchan et al., J. Med. Chem. 21: 31-37, 1978; Higashide et al., Nature 270: 721-722, 1977; Kawai et al., Chem. Farm. Bull. 32: 3441-3451; 및 미국 특허 제5,416,064호); 간단한 카복실산의 C-3 에스테르 (미국 특허 제4,248,870호; 제4,265,814호; 제4,308,268호; 제4,308,269호; 제4,309,428호; 제4,317,821호; 제4,322,348호; 및 제4,331,598호); 및 N-메틸-L-알라닌의 유도체와의 C-3 에스테르 (미국 특허 제4,137,230호; 제4,260,608호; 및 Kawai et al., Chem. Pharm. Bull. 12: 3441, 1984)를 지칭한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있거나 또는 본 발명의 항체-페이로드 접합체에 포함될 수 있는 예시되는 메이탄시노이드는 DM1, DM3, DM4 및/또는 DM21이다.

[0797] 소정의 구체예에서, 독소는 두오카르마이신 (duocarmycin)일 수 있다. 적합한 두오카르마이신은 예컨대 두오카르마이신 A, 두오카르마이신 B1, 두오카르마이신 B2, 두오카르마이신 CI, 두오카르마이신 C2, 두오카르마이신 D, 두오카르마이신 SA, 두오카르마이신 MA 및 CC-1065일 수 있다. 용어 "두오카르마이신 (duocarmycin)"은 또한 두오카르마이신의 합성 유사체, 예컨대 아도젤레신, 비젤레신, 카르젤레신, KW-2189 및 CBI-TMI를 지칭하는 것으로 이해해야 한다.

[0798] 소정의 구체예에서, 독소는 NAMPT 억제제일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "NAMPT 억제제" 및 "니코틴아미드 포스포리보실 트랜스퍼라제 억제제 (nicotinamide phosphoribosyl transferase inhibitor)"는 NAMPT의 활성을 감소시키는 억제제를 지칭한다. 용어 "NAMPT 억제제"는 또한 NAMPT 억제제의 프로드러그를 포함할 수 있다. NAMPT 억제제의 예로는 제한 없이, FK866 (또한, APO866이라 함), GPP 78 염산염, ST 118804, STF31, 피리딜 시아노구아니딘 (또한, CH-828이라 함), GMX-1778 및 P7C3을 포함한다. 추가적인 NAMPT 억제제는 당해 기술 분야에 알려져 있고 본원에 기재된 조성물 및 방법에 사용하기에 적합할 수 있다. 예를 들어, PCT 공개 WO 2015/054060, 미국 특허 제8,211,912호, 및 제9,676,721호를 참조하며, 이들의 전문이 본원에 참조로 통합된다. 일부 구체예에서, NAMPT 억제제는 FK866이다. 일부 구체예에서, NAMPT 억제제는 GMX-1778이다.

[0799] 소정의 구체예에서, 독소는 튜블리신 (tubulysin)일 수 있다. 튜블리신은 세포독성 펩티드이며, 이는 9개의 구성원 (A-I)을 포함한다. 튜블리신 A는 항암제로서의 잠재적 적용 가능성을 가지고 있다. 이는 G2/M 단계에서 세포를 정지시킨다. 튜블리신 A는 빈블라스틴 (vinblastine)보다 더 효과적으로 중합을 억제하고, 단리된 미세소관의 해중합 (depolymerization)을 유도한다. 튜블리신 A는 피코몰 (picomolar) 범위의 IC50으로 다양한 종양 세포주에 대한 강력한 세포증식억제 효과 (cytostatic effects)를 갖는다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 다른 튜블리신은 튜블리신 E일 수 있다.

[0800] 소정의 구체예에서, 독소는 엔디엔일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "엔디엔 (enediynes)"은 이중 결합에 의해 분리된 2개의 삼중 결합을 함유하는 9원 및 10원 고리를 특징으로 하는 박테리아 천연물의 부류를 지칭한다 (예를 들어, K. C. Nicolaou; A. L. Smith; E. W. Yue (1993). "Chemistry and biology of natural and designed enediynes". PNAS 90 (13): 5881-5888을 참조하며; 이의 전체 내용은 본원에 참조로 통합됨). 일부 엔디엔은 Bergman 고리화를 수행할 수 있고, 생성된 디라디칼 (diradical)인 1,4-데하이드로벤젠 유도체는 DNA 가닥 절단을 초래하는 DNA의 당 백본으로부터 수소 원자를 추출할 수 있다 (예를 들어, S. Walker; R. Landovitz; W. D. Ding; G. A. Ellestad; D. Kahne (1992). "Cleavage behavior of calicheamicin gamma 1 and calicheamicin T". Proc Natl Acad Sci U.S.A. 89 (10): 4608-12를 참조하며; 이의 전체 내용은 본원에 참조로 통합됨). 이의 DNA와의 반응성은 많은 엔디엔에 항생제 특성을 부여하고, 일부 엔디엔은 임상적으로 항암 항생제로서 연구되었다. 엔디엔의 비-제한적 예는 다이네마이신 (dynemicin), 네오카르지노스타틴 (neocarzinostatin), 칼리케아미신 (calicheamicin), 에스페라마이신 (esperamicin)이 있다 (예를 들어, Adrian L. Smith and K. C. Nicolaou, "The Eneidyne Antibiotics" J. Med. Chem., 1996, 39 (11), pp 2103-2117; 및 Donald Borders, "Eneidyne antibiotics as antitumor agents," Informa Healthcare; 1st edition (Nov. 23, 1994, ISBN-10: 0824789385를 참조하며, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 통합됨). 특정 구체예에서, 독소는 칼리케아미신일 수 있다.

[0801] 소정의 구체예에서, 독소는 독소루비신일 수 있다. 본원에서 사용된 "독소루비신 (doxorubicin)"은 스트렙토마이세스 박테리아 (*Streptomyces bacterium*)인 스트렙토마이세스 페우세티우스 변종 캐시우스 (*Streptomyces peucetius* var. *caesius*)로부터 유래된 안트라사이클린 패밀리의 구성원을 지칭하며, 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신 및 이다루비신을 포함한다.

[0802] 소정의 구체예에서, 독소는 키네신 스핀들 단백질 억제제일 수 있다. 용어 "키네신 스핀들 단백질 억제제

(kinesin spindle protein inhibitor)"는 세포 분열 중에 양극성 스피들의 조립에 관여하는, 키네신 스피들 단백질의 억제하는 화합물을 지칭한다. 암 치료를 위해 키네신 스피들 단백질 억제제가 연구되고 있다. 키네신 스피들 단백질 억제제의 예는 이스피네시 (ispinesib)을 포함한다. 또한, 용어 "키네신 스피들 단백질 억제제"는 GlaxoSmithKline의 SB715992 또는 SB743921 및 CombinatoRx의 펜타미딘/클로르프로마린을 포함한다.

[0803] 소정의 구체예에서, 독소는 US20180078656A1 (참조로 통합됨)에 기재된 바와 같은 크립토피신 (cryptophycin)일 수 있다.

[0804] 소정의 구체예에서, 독소는 산드라마이신 (sandramycin)일 수 있다. 산드라마이신은 처음 노카르디오이데스 종 (*Nocardioide* sp.) (ATCC 39419)으로부터 단리된 펩티드 (peptide)이고, 세포독성 및 항종양 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0805] 소정의 구체예에서, 독소는 아마톡신 (amatoxin)일 수 있다. 아마톡신 (알파-아마니틴, 베타-아마니틴 및 아마니틴 포함)은 8개의 아미노산으로 이루어진 고리형 펩티드이다. 이들은 아마니타 팔로이데스 (*Amanita phalloides*) 버섯으로부터 단리되거나, 또는 합성에 의해 빌딩 블록으로부터 제조될 수 있다. 아마톡신은 특히 포유동물 세포의 DNA-의존성 RNA 폴리머라제 II를 억제하고 세포의 전사 및 단백질 생합성에 의해 영향을 받는다. 세포에서 전사 억제는 성장 및 증식을 정지시킬 수 있다. 공유 결합되지는 않았지만, 아마니틴 및 RNA-폴리머라제 II 사이의 복합체는 매우 단단하다 (KD=3 nM). 효소로부터 아마니틴의 해리는 영향을 받은 세포의 회복 가능성을 낮추는 매우 느린 과정이다. 세포에서 전사 억제가 너무 길게 지속되면 세포는 프로그램된 세포 사멸 (아포토시스)을 겪는다. 바람직한 일 구체예에서, 본원에서 사용된 용어 "아마톡신"은 예를 들어 WO2010/115630, WO2010/115629, WO2012/119787, WO2012/041504, 및 WO2014/135282에 기재된 바와 같은 알파-아마니틴 또는 이의 변이체를 지칭한다.

[0806] 소정의 구체예에서, 독소는 캄프토테신일 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "캄프토테신 (camptothecin)"은 토포이소머라제 I 억제제로서 기능하는 캄프토테신 또는 캄프토테신 유도체를 의미하는 것으로 의도된다. 예시되는 캄프토테신은 예를 들어 토포테칸, 엑사테칸, 데루스테칸, 이리노테칸, DX-8951f, SN38, BN 80915, 루르토테칸, 9-니트로캄프토테신 및 아미노캄프토테신을 포함한다. 인간 암 환자를 치료하는데 사용되는 캄프토테신을 포함하는, 다양한 캄프토테신이 기재되었다. 몇몇 캄프토테신은 예를 들어 Kehrer et al., *Anticancer Drugs*, 12 (2): 89-105, (2001)에 기재되어 있다.

[0807] 본 발명의 의미에서, 독소는 또한 약물 유출 수송체 (drug efflux transporter)의 억제제일 수 있다. 독소 및 약물 유출 수송체의 억제제를 포함하는 항체-페이로드 접합체는 세포 내로 내재되는 경우 약물 유출 수송체의 억제제가 세포 밖으로 독소의 유출을 방지한다는 이점을 가질 수 있다. 본 발명 내에서, 약물 유출 수송체는 P-당단백질일 수 있다. P-당단백질의 일부 통상적인 약리학적 억제제에는 하기를 포함한다: 아미오다론 (amiodarone), 클라리트로마이신 (clarithromycin), 시클로스포린 (cyclosporin), 콜키신 (colchicine), 딜티아젠펜 (diltiazem), 에리트로마이신 (erythromycin), 펠로디핀 (felodipine), 케토코나졸 (ketoconazole), 란소프라졸 (lansoprazole), 오메프라졸 (omeprazole) 및 다른 양성자-펌프 억제제 (proton-pump inhibitors), 니페디핀 (nifedipine), 파록세틴 (paroxetine), 레세르핀 (reserpine), 사퀴나비르 (saquinavir), 세르트랄린 (sertraline), 퀴니딘 (quinidine), 타목시펜 (tamoxifen), 베라파밀 (verapamil), 및 둘록세틴 (duloxetine). 엘라크리다르 (elacridar) 및 CP 100356은 다른 통상적인 P-gp 억제제이다. 조수퀴다르 (zosuquidar) 및 타리퀴다르 (tarividar)가 또한 이를 염두에 두고 개발되었다. 마지막으로, 발스포다르 (valspodar) 및 레베르산 (reversan)은 이러한 제제의 다른 예이다.

[0808] 소정의 구체예에서, 실제 페이로드는 본 발명의 링커에 연결된 페이로드 분자에 포함될 수 있다. 페이로드 분자는 하기 구조를 가질 수 있다:

[0809] X-(스페이서)-페이로드,

[0810] 여기서 페이로드는 실제 페이로드, 예컨대 본원에 개시된 화합물 중 하나를 나타내고, X는 페이로드 분자를 연결 모이어티 (2-단계 공정) 또는 링커의 잔기 Aax, (Sp₁), B₁ 또는 (Sp₂) (1-단계 공정)내 적합한 관능기에 부착 시키기에 적합한 반응성 기를 나타내며, 여기서 (스페이서)는 반응성 기 X로부터 실제 페이로드를 공간적으로 분리시키는 화학적 스페이서를 나타낸다. 그러나, 소정의 구체예에서, 반응성 기 X는 스페이서 또는 실제 페이로드의 일부일 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 스페이서는 펩티드 또는 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며, 여기서 반응성 기 X는 스페이서에 포함된 N-말단 아미노산 잔기의 아미노 기일 수 있다. 다른 구체예에서, 스페이서는 부재할 수 있다. 구체예에서, 스페이서가 부재한 경우, 관능기는 실제 페이로드에 포함될 수 있다.

소정의 구체예에서, 스페이서는 관심 관능기, 즉 연결 모이어티에 포함된 관능기에 적합한 관능기를 실제 페이로드에 부착시키는데 사용될 수 있다. 소정의 구체예에서, 반응성 기 X는 말레이미드 기 또는 사이클로옥틴 기, 예컨대 제한 없이, DBCO 또는 BCN 기일 수 있다.

[0811] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 하나 이상의 페이로드는 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티를 추가로 포함한다.

[0812] 즉, 소정의 구체예에서, 페이로드 분자, 보다 구체적으로 페이로드 분자에 포함된 스페이서는 항체-링커 접합체로부터 페이로드를 효과적으로 방출할 수 있는 절단 가능한 또는 자기 희생 모이어티를 포함할 수 있다.

[0813] 본원에 개시된 많은 링커는 펩티드-기반이기 때문에, 본 발명의 항체-링커 접합체가 표적 세포로 내재화되면 숙주 세포 펩티다제에 의해 가수분해될 가능성이 있다. 그러나, 소정의 구체예에서, 페이로드 분자의 일부인 스페이서는 절단 가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 "절단 가능한 모이어티 (cleavable moiety)"는 효소적 또는 비-효소적 가수분해에 의해 실제 페이로드로부터 분리될 수 있는 화학적 유닛 (chemical unit)이다.

[0814] 소정의 구체예에서, 절단 가능한 모이어티는 펩티다제 절단 부위일 수 있다. 따라서, 절단 가능한 모이어티는 특정 펩티다제 또는 프로테아제에 의해 인식 및 절단될 수 있는 임의의 아미노산 모티프일 수 있다. 소정의 구체예에서, 절단 가능한 모이어티는 카텝신에 의해 절단 가능한 모티프일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "카텝신 (cathepsin)"은 프로테아제의 패밀리를 지칭한다. 용어 카텝신은 카텝신 A, 카텝신 B, 카텝신 C, 카텝신 D, 카텝신 E, 카텝신 F, 카텝신 G, 카텝신 H, 카텝신 K, 카텝신 L1, 카텝신 L2, 카텝신 O, 카텝신 S, 카텝신 W 및 카텝신 Z를 포함한다. 특정 구체예에서, 절단 가능한 모이어티는 카텝신 B에 의해 특이적으로 가수분해되는 모티프, 예컨대 발린-알라닌, 발린-시트룰린 또는 알라닌-알라닌일 수 있다. 펩티다제에 의해 특이적으로 가수분해될 수 있는 추가 모티프는 Salomon et al., Optimizing Lysosomal Activation of Antibody-Drug Conjugates (ADCs) by Incorporation of Novel Cleavable Dipeptide Linkers, Mol Pharm. 2019, **16**(12), p.4817-4825에 개시되어 있다.

[0815] ADC 링커에 사용되는 하나의 전형적인 디펩티드 구조는 발린-시트룰린 모티프로, 예를 들어 브렌투시맙 베도틴 (Brentuximab Vedotin)으로 제공되고, Dubowchik and Firestone; Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity; Bioconjug Chem; 2002; **13**(4); p.855-69에서 논의된 바와 같다. 이러한 링커는 카텝신 B에 의해 절단되어 실제 페이로드를 질병 부위에 방출할 수 있다. 예를 들어 SGN-CD33A로 제공되는, 발린-알라닌 모티프에도 동일하게 적용된다.

[0816] 대안적으로, 또는 추가로, 페이로드 분자에 포함된 스페이서는 자기-희생 모이어티를 포함할 수 있다. 용어 "자기-희생 모이어티 (self-immolative moiety)"는 2개의 화학적 모이어티를 통상적으로 안정한 3부분 분자 (tripartate molecule)로 공유결합으로 연결할 수 있는 이관능성 화학적 모이어티를 지칭한다. 자기-희생 스페이서 (self-immolative spacer)는 제1 모이어티에 대한 결합이 절단되는 경우 제2 모이어티로부터 자발적으로 분리될 수 있다. 소정의 구체예에서, 페이로드 분자는 자기-희생 파라-아미노벤질옥시카보닐 기를 포함할 수 있다.

[0817] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티는 p-아미노벤질옥시카바모일 (PABC) 모이어티 및/또는 카텝신에 의해 절단 가능한 모티프를 포함한다.

[0818] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티는 모티프 발린-시트룰린 (VC) 및/또는 p-아미노벤질옥시카바모일 (PABC) 모이어티를 포함한다.

[0819] 즉, 페이로드 분자에 포함된 스페이서는 카텝신 B-절단 가능한 모티프 발린-시트룰린, 자기-희생 모이어티 PABC, 또는 이들 모두를 포함할 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, 페이로드 분자는 구조 X-Val-Cit-PABC를 포함할 수 있으며, 여기서 X는 반응성 기를 포함하는 분자이다. 소정의 구체예에서, X는 말레이미드 기 (예: 말레이미도카프로일) 또는 알킨 (예: DBCO 또는 BCN)을 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, PABC 모이어티는 실제 페이로드에 직접 부착될 수 있거나 또는 실제 페이로드에 추가 링커, 예컨대 제한 없이 p-니트로페놀 (PNP) 기를 통해 부착될 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 페이로드 분자는 구조 X-Val-Cit-PABC-PNP-페이로드를 가질 수 있다. 소정의 구체예에서, 페이로드 분자는 구조 X-Val-Cit-PABC-PNP-MMAE, X-Val-Cit-PABC-PNP-MMAF 또는 X-Val-Cit-PABC-PNP- α -아마니틴을 가질 수 있다.

[0820] 절단 가능한 모이어티는 또한 다른 펩티다제 예컨대 Caspase 3, Legumain 또는 호중구 엘라스타제 (Neutrophil

elastase)에 의해 절단 가능한 모티프, 또는 Dal Corso et al., Innovative Linker Strategies for Tumor-Targeted Drug Conjugates; Chemistry;25(65); p.14740-14757에 의해 기재된 바와 같은 모티프일 수 있다.

[0821] 다른 구체예에서, 페이로드 분자에 포함된 스페이서는 탄수화물 모이어티를 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 절단 가능한 모이어티는 글루코시다제에 의해 절단 가능한 모티프일 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 절단 가능한 모이어티는 베타-글루쿠로니다제 또는 베타-갈락토시다제에 의해 절단 가능한 모티프일 수 있다.

[0822] 다른 구체예에서, 페이로드 분자에 포함된 스페이서는 하나 이상의 포스페이트 모이어티를 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 절단 가능한 모이어티는 포스파타제에 의해 절단 가능한 모티프일 수 있다. 따라서, 소정의 구체예에서, 절단 가능한 모이어티는 베타 리소좀 산성 피로포스파타제 또는 산성 포스파타제에 의해 절단 가능한 모티프일 수 있다.

[0823] 링커 분자로부터 페이로드를 방출하기 위해 사용될 수 있는 추가의 절단 가능한 모이어티의 예는 Bargh et al., Cleavable linkers in antibody-drug conjugates; Chem Soc Rev. 2019 Aug 12;48(16):4361-4374에 기재되어 있다.

[0824] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 하나 이상의 페이로드는 페이로드를 링커에 포함된 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 또는 화학적 스페이서 (Sp₁) 및/또는 (Sp₂)에 연결하기 위한 반응성기를 추가로 포함한다.

[0825] 상기 개시된 바와 같이, 본 발명의 페이로드 분자는 페이로드 분자를 링커에 커플링하기 위한 반응성 기 X를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 페이로드 분자는 링커, 예를 들어 잔기 Aax, (Sp₁), B₁, 또는 (Sp₂) 및 구체적으로 화학적 스페이서 (Sp₁) 또는 (Sp₂)에 포함된 C-말단 카복실 기에 연결될 수 있다. 이러한 구체예에서, 페이로드 분자는 링커의 C-말단 카복실 기에 아마이드 또는 펩티드 결합을 통해 연결될 수 있다. 따라서, 페이로드 분자는 페이로드 분자를 링커의 C-말단 카복실 기에 연결하기 위한 아민 기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 아민 기는 스페이서 Val-Cit, Val-Ala 또는 Ala-Ala의 α-아미노 기일 수 있다.

[0826] 다른 구체예에서, 페이로드 분자는 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 포함된 관능기에 연결될 수 있다. 이러한 구체예에서, 페이로드 분자는 B₁ 및/또는 B₂에 포함된 관능기와 적합한 반응성 기 X를 포함할 수 있다. 예를 들어, 페이로드 분자에 포함된 반응성 기 X 및 B₁ 및/또는 B₂에 포함된 적합한 관능기는 표 2에 개시된 결합 파트너 쌍 중 어느 것일 수 있다. 바람직하게는, 페이로드 분자에 포함된 반응성 기 X는 말레이미드 기를 포함할 수 있으므로, 페이로드 분자는 티올-함유 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 연결될 수 있거나, 또는 페이로드 분자에 포함된 반응성 기 X는 알킨 기를 포함할 수 있으므로, 페이로드 분자는 아지드-함유 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 연결될 수 있다.

[0827] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체는 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 항체, 또는 이의 단편 또는 재조합 변이체이고, 상기 이의 단편 또는 재조합 변이체는 표적 결합 특성을 보유하며 CH2 도메인을 포함한다.

[0828] 본원에서 용어 "항체 (antibody)"는 광의적 의미로 사용되며, 특히 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 온전한 항체로부터 형성된 다중특이성 항체 (예: 이중특이성 항체) 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 용어 "항체 (antibody)" 및 "항체들 (antibodies)"은 광범위하게 항체의 자연-발생 형태 (예: IgG, IgA, IgM, IgE)를 포함한다.

[0829] 항체는 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 인간 기원일 수 있지만, 마찬가지로 마우스 (mouse), 래트 (rat), 염소, 당나귀, 햄스터 또는 토끼로부터 기원할 수 있다. 접합체가 치료용인 경우, 무린 (murine) 또는 토끼 항체는 선택적으로 키메라화되거나 또는 인간화될 수 있다.

[0830] CH2 도메인을 포함하는 항체의 단편 또는 재조합 변이체는 예를 들어 하기일 수 있다:

[0831]  단지 중쇄 도메인 만을 포함하는 항체 형식 (상어 (shark) 항체/IgNAR (V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}-C_{H4}-C_{H5})₂ 또는 낙타류 (camelid) 항체/hcIgG (V_H-C_{H2}-C_{H3})₂)

- [0832] ● scFv-Fc (VH-VL-CH2-CH3)₂
- [0833] ● Fc 도메인 및 하나 이상의 수용체 도메인을 포함하는 Fc 융합 펩티드.
- [0834] 항체는 또한 이중특이성 (예: DVD-IgG, crossMab, appended IgG - HC fusion) 또는 이중과라토프 (biparatopic)일 수 있다. 개요를 위해, Brinkmann and Kontermann; Bispecific antibodies; Drug Discov Today; 2015; 20(7); p.838-47을 참조한다.
- [0835] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체는 IgG 항체이다.
- [0836] 본원에서 사용된 "IgG"는 알려진 면역글로불린 감마 유전자에 의해 실질적으로 코딩되는 항체의 부류에 속하는 폴리펩티드를 의미한다. 인간에서, IgG는 서브클래스 또는 이소타입 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 마우스에서, IgG는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3을 포함한다. 전장 IgG는 2개의 면역글로불린 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 가지며, 각 경쇄는 면역글로불린 도메인 VL 및 CL을 포함하고, 각 중쇄는 면역글로불린 도메인 VH, C_γ1 (또한 CH1이라고 함), C_γ2 (또한 CH2라고 함) 및 C_γ3 (또한 CH3이라고 함)을 포함한다. 인간 IgG1의 맥락에서, Kabat에서와 같은 EU index에 따라, "CH1"은 위치 118-215를 지칭하고, CH2 도메인은 위치 231-340을 지칭하며, CH3 도메인은 위치 341-447을 지칭한다. IgG1은 또한 IgG1의 경우 위치 216-230을 지칭하는 힌지 도메인 (hinge domain)을 포함한다.
- [0837] 본 발명의 방법 또는 항체-페이로드 접합체 중 항체는 임의의 항체, 바람직하게는 임의의 IgG 타입 항체일 수 있다. 예를 들어, 항체는 브렌투시맙 (Brentuximab), 트라스투주맙 (Trastuzumab), 겐투주맙 (Gemtuzumab), 이노투주맙 (Inotuzumab), 아벨루맙 (Avelumab), 세투시맙 (Cetuximab), 리투시맙 (Rituximab), 다라투무맙 (Daratumumab), 페르투주맙 (Pertuzumab), 베돌리주맙 (Vedolizumab), 오크렐리주맙 (Ocrelizumab), 토실리주맙 (Tocilizumab), 우스테키누맙 (Ustekinumab), 골리무맙 (Golimumab), 오비누투주맙 (Obinutuzumab), 폴라투주맙 (Polatuzumab) 또는 엔포르투맙 (Enfortumab)일 수 있고 이에 한정되지 않는다.
- [0838] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체는 글리코실화 항체, 데글리코실화 항체 또는 아글리코실화 항체이다.
- [0839] 즉, 항체는 바람직하게는 잔기 N297에서 글리코실화된 IgG 항체일 수 있다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 글리코실화 항체는 CH2 도메인의 잔기 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된 IgG 항체이다.
- [0840] 본원에서 논의된 바와 같이, 잔기 N297에서 글리코실화된 IgG 항체는 비-글리코실화 항체에 비해 몇 가지 이점을 갖는다.
- [0841] 대안적으로, 항체는 데글리코실화 항체일 수 있으며, 바람직하게는 잔기 N297에서의 글리칸은 효소 PNGase F로 절단되었다. 또한, 항체는 아글리코실화 항체일 수 있으며, 바람직하게는 잔기 N297은 비-아스파라긴 잔기로 대체되었다. 항체를 데글리코실화하는 방법 및 아글리코실화 항체를 생성하는 방법은 당해 기술 분야에 알려져 있다.
- [0842] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커는 항체의 Fc 도메인 내의 Gln 잔기에 접합되거나 또는 링커는 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄로 도입된 Gln 잔기에 접합된다.
- [0843] 즉, 본 발명의 링커는 항체의 Fc 도메인 내의 내인성 Gln 잔기 또는 분자 공학에 의해 항체에 도입된 Gln 잔기에 접합될 수 있다.
- [0844] 본 발명의 링커는 미생물 트랜스글루타미나제에 대한 기질로서 제공할 수 있는 항체의 Fc 도메인 내의 임의의 Gln 잔기에 접합될 수 있다. 전형적으로, 본원에서 사용된 용어 Fc 도메인은 IgA, IgD 및 IgG의 마지막 2개의 불변 영역 면역글로불린 도메인 (C_H2 및 C_H3), 및 IgE, IgY 및 IgM의 마지막 3개의 불변 영역 도메인 (C_H2, C_H3 및 C_H4)을 지칭한다. 즉, 본 발명에 따른 링커는 항체의 C_H2, C_H3 및 적용 가능한 경우 C_H4 도메인에 접합될 수 있다.
- [0845] 소정의 구체예에서, 내인성 Gln 잔기는 IgG 항체의 CH2 도메인의 Gln 잔기 Q295 (EU numbering)일 수 있다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체의 Fc 도메인 내의 Gln 잔기는 IgG 항체의 CH2 도메인의 Gln 잔기 Q295 (EU numbering)이다.

- [0846] Q295는 IgG 타입 항체에서 극도로 보존된 아미노산 잔기라는 것을 이해하는 것이 중요하다. 이는 인간 IgG1, 2, 3, 4 뿐만 아니라 특히 토끼 및 래트 항체에 보존된다. 그러므로 Q295를 사용할 수 있다는 것은 치료용 항체-페이로드 접합체 또는 항체가 종종 비-인간 기원인 진단용 접합체를 제조하는데 상당한 이점이 있다. 그러므로 본 발명에 따른 방법은 매우 다양하고 광범위하게 적용 가능한 수단 (tool)을 제공한다. 잔기 Q295는 IgG 타입 항체 중에서 극도로 보존되지만, 일부 IgG 타입 항체 (예컨대, 마우스 및 래트 IgG2a 항체)는 이 잔기를 갖지 않는다. 따라서, 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 바람직하게는 C_H2 도메인의 잔기 Q295 (EU numbering)를 포함하는 IgG 타입 항체인 것으로 이해해야 한다.
- [0847] 또한, 페이로드 부착을 위해 Q295를 사용하는 조작된 접합체가 우수한 약동학 및 효능을 나타내고 (Lhospice et al., Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-Cd30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models, *Mol Pharm*; 2015; **12**(6), p.1863-1871), 분해되기 쉬운 불안정한 독소도 운반할 수 있다 (Dorywalska et al.; Site-Dependent Degradation of a Non-Cleavable Auristatin-Based Linker-Payload in Rodent Plasma and Its Effect on ADC Efficacy. *PLoS ONE*; 2015; **10**(7): e0132282)는 것이 밝혀졌다. 따라서 동일한 잔기가 변형되지만 글리코실화 항체이기 때문에 이러한 부위-특이적 방법으로 유사한 효과가 나타날 것으로 기대된다. 글리코실화는 전체 ADC 안정성에 추가로 기여할 수 있으며, 언급된 접근법과 같이 글리칸 모이어티를 제거하면 덜 안정적인 항체가 생성되는 것으로 밝혀졌다 (Zheng et al.; The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *Mabs-Austin*; 2011, **3**(6), p.568-576).
- [0848] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 아글리코실화 IgG 항체의 CH2 도메인의 N297Q (EU numbering)이다.
- [0849] 본원에서 사용된, 용어 "분자 공학 (molecular engineering)"은 핵산 서열을 조작하기 위한 분자 생물학 방법의 사용을 의미한다. 본 발명 내에서, 항체의 중쇄 또는 경쇄에 Gln 잔기를 도입하기 위해 분자 공학이 사용될 수 있다. 일반적으로, 항체의 중쇄 또는 경쇄에 Gln 잔기를 도입하기 위한 2가지 상이한 전략이 본 발명 내에서 고려된다. 첫째, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 단일 잔기가 Gln 잔기로 치환될 수 있다. 둘째, 2개 이상의 아미노산 잔기로 구성된 Gln-함유 펩티드 태그가 항체의 중쇄 또는 경쇄에 통합될 수 있다. 이를 위해, 펩티드 태그는 중쇄 또는 경쇄의 내부 위치, 즉 중쇄 또는 경쇄의 2개의 기존 아미노산 잔기 사이에 통합하거나 또는 이들을 대체할 수 있거나, 또는 펩티드 태그는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단 단부에 융합 (부착)될 수 있다.
- [0850] 트란스글루타미나제에 의한 C_H2 Gln 잔기에 대한 링커의 접합을 논의하는 문헌에서는 작은 저분자량 기질에 초점을 두었다. 그러나, 선행 기술 문헌에서는 이러한 접합을 달성하기 위해, 위치 N297에서의 테글리코실화 단계 또는 아글리코실화 항체의 사용이 필요하다고 항상 기재되어 있다 (WO 2015/015448; WO 2017/025179; WO 2013/092998).
- [0851] 그러나 상당히 놀랍게도, 그리고 모든 기대에 반하여, 글리코실화 항체의 Q295에 대한 부위-특이적 접합은 실제로 상기에서 논의된 링커 구조를 사용함으로써 효율적으로 가능하다.
- [0852] Q295가 네이티브 상태에서 글리코실화된 N297에 매우 가깝지만, 특정 링커를 사용하는 본 발명에 따른 방법은 여전히 이에 대한 링커 또는 페이로드의 접합을 가능하게 한다.
- [0853] 그러나, 개시된 바와 같이, 본 발명에 따른 방법은 N297의 전위 효소적 테글리코실화 (upfront enzymatic deglycosylation), 아글리코실화 항체의 사용, 다른 아미노산에 대한 N297의 치환, 또는 글리코실화를 방지하기 위한 T299A 돌연변이의 도입을 필요로 하지 않는다.
- [0854] 이러한 2가지 포인트는 제조 측면에서 상당한 이점을 제공한다. 효소적 테글리코실화 단계는 GMP 측면에서 바람직하지 않으며, 이는 테글리코실화 효소 (예: PNGase F) 및 절단된 글리칸이 모두 배지로부터 제거되어야 하기 때문이다.
- [0855] 또한, 페이로드 부착을 위한 항체의 유전 공학이 필요하지 않으므로, 면역원성을 증가시키고 항체의 전반적인 안정성을 감소시킬 수 있는 서열 삽입을 피할 수 있다.
- [0856] 다른 아미노산에 대한 N297의 치환은 또한 원치 않는 효과를 가지며, 이는 전체 Fc 도메인의 전반적인 안정성 (Subedi et al, The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure* 2015, **23** (9), 1573-1583), 및 결과적으로 항체 응집 증가 및 용해도 감소를 초래할 수 있는 전체 접합체의 효

능 (Zheng et al.; The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *Mabs-Austin* 2011, 3 (6), 568-576)에 영향을 줄 수 있기 때문이며, 이는 특히 소수성 페이로드 예컨대 PBDs에 중요하다. 또한, N297에 존재하는 글리칸은 항체 의존성 세포 세포독성 (antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC) 등을 유발하므로 중요한 면역조절 효과를 갖는다. 이러한 면역조절 효과는 아글리코실화 항체를 수득하기 위해 데글리코실화 또는 상기에서 논의된 다른 접근법 중 어느 하나에 의해 소실될 것이다. 또한, 확립된 항체의 임의의 서열 변형은 조절 문제를 야기할 수 있으며, 이는 종종 허용되고 임상적으로 검증된 항체가 ADC 접합을 위한 출발점으로 사용되기 때문에 문제가 된다.

[0857] 그러므로, 본 발명에 따른 방법은 부위 특이적 페이로드 결합을 갖는 화학량론적으로 잘-정의된 ADCs를 용이하게 그리고 단점 없이 제조할 수 있다.

[0858] 상기의 관점에서, 본 발명의 방법은 항체의 C_H2 도메인의 잔기 Q295 (EU numbering)에서 IgG 항체의 접합에 바람직하게 사용되며, 여기서 항체는 C_H2 도메인의 잔기 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된다. 그러나, 본 발명의 방법은 또한 잔기 Q295 또는 항체의 임의의 다른 적절한 Gln 잔기에서의 데글리코실화 또는 아글리코실화 항체의 접합을 포함하는 것이 명시적으로 언급되어 있으며, 여기서 Gln 잔기는 내인성 Gln 잔기 또는 분자 공학에 의해 도입된 Gln 잔기일 수 있다.

[0859] 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 (a) 항체의 중쇄 또는 경쇄에 통합되거나 또는 (b) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단에 융합된 펩티드에 포함된다.

[0860] 첫 번째 경우에, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 임의의 아미노 잔기는 Gln 잔기로 치환될 수 있으며, 단 생성된 항체는 미생물 트랜스글루타미나제에 의해 본 발명의 링커와 접합될 수 있어야 한다. 소정의 구체예에서, 항체는 IgG 항체의 C_H2 도메인의 아미노산 잔기 N297 (EU numbering)이 치환되고, 구체적으로 상기 치환이 N297Q 치환인 항체이다. N297Q 돌연변이를 포함하는 항체는 항체의 중쇄당 1개 초과인 링커에 접합될 수 있다. 예를 들어, N297Q 돌연변이를 포함하는 항체는 4개의 링커에 접합될 수 있으며, 여기서 하나의 링커는 항체의 제1 중쇄의 잔기 Q295에 접합되고, 하나의 링커는 항체의 제1 중쇄의 잔기 N297Q에 접합되며, 하나의 링커는 항체의 제2 중쇄의 잔기 Q295에 접합되고, 하나의 링커는 항체의 제2 중쇄의 잔기 N297Q에 접합된다. 당업자는 IgG 항체의 잔기 N297을 Gln 잔기로 대체하여 아글리코실화 항체를 생성하는 것을 알고 있다.

[0861] 항체의 단일 아미노산 잔기를 치환하는 대신에, 트랜스글루타미나제에 접근 가능한 Gln 잔기를 포함하는 펩티드 태그가 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입될 수 있다. 이러한 펩티드 태그는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 바람직하게는, 트랜스글루타미나제-접근 가능한 Gln 잔기를 포함하는 펩티드 태그는 항체의 중쇄의 C-말단에 융합된다. 훨씬 더 바람직하게는, 트랜스글루타미나제-접근 가능한 Gln 잔기를 포함하는 펩티드 태그는 IgG 항체의 중쇄의 C-말단에 융합된다. 항체의 중쇄의 C-말단에 융합될 수 있고 미생물 트랜스글루타미나제에 대한 기질로서 제공될 수 있는 여러 펩티드 태그가 WO 2012/059882 및 WO 2016/144608에 기재되어 있다.

[0862] 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 Gln 잔기를 포함하는 펩티드는 항체의 중쇄의 C-말단 단부에 융합된다.

[0863] 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입될 수 있고, 구체적으로 항체의 중쇄의 C-말단에 융합될 수 있는 예시되는 펩티드 태그는 LLQGG (서열 번호: 5), LLQG (서열 번호: 6), LSLSQG (서열 번호: 7), GGGLLQGG (서열 번호: 8), GLLQG (서열 번호: 9), LLQ (서열 번호: 10), GSPLAQSHGG (서열 번호: 11), GLLQGGG (서열 번호: 12), GLLQGG (서열 번호: 13), GLLQ (서열 번호: 14), LLQLLQGA (서열 번호: 15), LLQGA (서열 번호: 16), LLQYQGA (서열 번호: 17), LLQSGG (서열 번호: 18), LLQYQG (서열 번호: 19), LLQLLQG (서열 번호: 20), SLLQG (서열 번호: 21), LLQLQ (서열 번호: 22), LLQLLQ (서열 번호: 23), LLQGR (서열 번호: 24), EEQYASTY (서열 번호: 25), EEQYQSTY (서열 번호: 26), EEQYNSTY (서열 번호: 27), EEQYQS (서열 번호: 28), EEQYQST (서열 번호: 29), EQYQSTY (서열 번호: 30), QYQS (서열 번호: 31), QYQSTY (서열 번호: 32), YRYRQ (서열 번호: 33), DYALQ (서열 번호: 34), FGLQRPY (서열 번호: 35), EQKLISEEDL (서열 번호: 36), LQR (서열 번호: 37) 및 YQR (서열 번호: 38)이다.

[0864] 당업자는 예를 들어 Sambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press에 기재된 바와 같은 분자 클로닝 방법에 의해, 항체의 아

미노산 잔기를 치환하는 방법 또는 펩티드 태그를 항체에 도입하는 방법을 알고 있다.

- [0865] 일반적으로, 당업자는 링커가 접합되는 항체의 위치를 결정하는 방법을 알고 있다. 예를 들어, 접합 부위는 항체-페이로드 접합체의 단백질분해 소화 및 생성된 단편의 LC-MS 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 Glycinator (Genovis)로 사용 설명서에 따라 데글리코실화될 수 있으며, 이어서 각각 트립신 골드 (trypsin gold) (mass spectrometry grade, Promega)로 소화될 수 있다. 그러므로, 1 μ g의 단백질을 50 ng의 트립신과 37°C에서 밤새 인큐베이션할 수 있다. LC-MS 분석은 Synapt-G2 질량 분광기 (Waters)에 커플링된 nanoAcquity HPLC 시스템을 사용하여 수행할 수 있다. 이를 위해, 100 ng 펩티드 용액을 Acquity UPLC Symmetry C18 트랩 컬럼 (trap column) (Waters, part no. 186006527)에 로딩하고, 1 % 버퍼 A (물, 0.1 % 포름산) 및 99 % 버퍼 B (아세트오닐리트, 0.1 % 포름산)를 5 μ L/min의 유속으로 3분 동안 트래핑 (trapping)할 수 있다. 그 다음에 펩티드를 버퍼 B로 3%에서 65%로의 선형 구배로 25분 이내에 용출시킬 수 있다. 데이터는 포지티브 극성을 갖는 분해능 모드에서 50 내지 2000 m/z의 질량 범위에서 수집할 수 있다. 다른 기기 설정은 하기와 같을 수 있다: 모세관 전압 (capillary voltage) 3.2 kV, 샘플링 콘 (sampling cone) 40 V, 추출 콘 (extraction cone) 4.0 V, 소스 온도 (source temperature) 130 °C, 콘 기체 (cone gas) 35 L/h, 나노 유동 기체 (nano flow gas) 0.1 bar, 및 퍼지 기체 (purge gas) 150 L/h. 질량 분광계는 [Glu1]-피브리노펩티드로 보정할 수 있다.
- [0866] 또한, 당업자는 항체-페이로드 구조체의 약물-대-항체 (drug-to-antibody: DAR) 비율 또는 페이로드-대-항체 비율을 결정하는 방법을 알고 있다. 예를 들어, DAR은 소수성 상호작용 크로마토그래피 (hydrophobic interaction chromatography: HIC) 또는 LC-MS에 의해 결정될 수 있다.
- [0867] 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)의 경우, 샘플을 0.5M 황산암모늄으로 조정하고, MAB PAK HIC 부틸 컬럼 (5 μ m, 4.6 x 100 mm, Thermo Scientific)을 통해 30°C에서 20분에 걸쳐 1 mL/min으로 A (1.5 M 황산암모늄, 25 mM Tris HCl, pH 7.5)에서 B (20 % 이소프로판올, 25 mM Tris HCl, pH 7.5)로의 전체 구배를 사용하여 평가할 수 있다. 전형적으로, 40 μ g의 샘플이 사용될 수 있으며, 신호는 280 nm에서 기록될 수 있다. 상대 HIC 체류 시간 (HIC-RRT)은 ADC DAR 2 종 (species)의 절대 체류 시간을 각각의 비접합된 mAb의 체류 시간으로 나누어 계산할 수 있다.
- [0868] LC-MS DAR 결정을 위해, ADC는 NH_4HCO_3 을 사용하여 최종 농도 0.025 mg/mL로 희석할 수 있다. 후속하여, 이 용액의 40 μ L를 실온에서 5분 동안 1 μ L TCEP (500 mM)로 환원시킨 다음에, 10 μ L의 클로로아세트아미드 (200 mM)를 부가하여 알킬화한 다음에, 암실에서 37°C에서 밤새 인큐베이션할 수 있다. 역상 크로마토그래피의 경우, 소프트웨어 Chromeleon과 조합된 Dionex U3000 시스템을 사용할 수 있다. 상기 시스템에는 70°C로 가열된 RP-1000 컬럼 (1000 Å, 5 μ m, 1.0 x 100 mm, Sepax), 및 214 nm의 파장으로 설정된 UV-검출기가 장착될 수 있다. 용매 A는 물과 0.1% 포름산으로 구성될 수 있고, 용매 B는 0.1% 포름산과 함께 85% 아세트오닐리트를 포함할 수 있다. 환원되고 알킬화된 샘플을 컬럼 상에 로딩하고, 14분 동안 30 - 55%의 용매 B의 구배로 분리할 수 있다. 액체 크로마토그래피 시스템은 DAR 종의 확인을 위해 Synapt-G2 질량 분광계에 커플링될 수 있다. 질량 분광계의 모세관 전압은 3 kV로, 샘플링 콘은 30 V로 설정될 수 있고, 추출 콘은 최대 5 V의 값으로 부가될 수 있다. 소스 온도는 150°C로, 탈용매화 온도는 500°C로, 콘 기체는 20 l/h로, 탈용매화 기체는 600 l/h로 설정될 수 있으며, 수집은 질량 범위 600-5000 Da에서 1s 스캔 시간으로 포지티브 모드로 수행될 수 있다. 상기 기기는 요오드화나트륨으로 보정할 수 있다. 스펙트럼의 디컨볼루션 (deconvolution)은 MassLynx의 MaxEnt1 알고리즘을 사용하여 수렴 (convergence)될 때까지 수행할 수 있다. DAR 종을 크로마토그래피 피크에 배정한 후에, DAR은 역상 크로마토그램의 적분된 피크 면적에 기반하여 계산할 수 있다.
- [0869] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커는 Gln 잔기의 아미드 측쇄에 접합된다.
- [0870] 즉, 본 발명에 따른 링커는 바람직하게는 항체에 포함된 Gln 잔기, 바람직하게는 본원에 개시된 Gln 잔기들 중 어느 하나의 측쇄에 있는 아미드 기에 접합된다.
- [0871] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 링커는 글리코실화 항체에 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 접합 효율로 접합하기에 적합하다.
- [0872] 즉, 소정의 구체예에서, 링커는 글리코실화 항체에 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 효율로 접합될 수 있는 링커일 수 있다. 바람직하게는, 글리코실화 항체는 글리코실화 IgG 항체, 더 바람직하게는 잔기 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된 IgG 항체이다.
- [0873] 당업자는 특정 링커로 항체의 글리코실화 효율을 결정하는 방법을 알고 있다. 예를 들어, 접합 효율은 본원에

기재된 바와 같이 결정될 수 있다. 즉, 항체, 구체적으로 IgG1 항체는 1-5 mg/mL의 농도로 적절한 버퍼에서 항체 1 mg당 5-20 eq 물 당량의 링커 및 3-6 U의 미생물 트란스글루타미나제와 함께 37°C에서 20-48시간 동안 인큐베이션할 수 있다. 인큐베이션 기간 후에, 접합 효율은 환원 조건 하에 LC-MS 분석에 의해 결정될 수 있다. 미생물 트란스글루타미나제는 Zedira (Germany)로부터 입수 가능한 스트렙토마이세스 모바라엔시스 (*Streptomyces mobaraensis*) 유래의 MTG일 수 있다. 적합한 버퍼는 Tris, MOPS, HEPES, PBS 또는 BisTris 버퍼일 수 있다. 그러나, 버퍼 시스템의 선택은 다양할 수 있으며 링커의 화학적 특성에 크게 좌우된다는 것을 이해해야 한다. 그러나, 당업자는 본 발명의 개시내용에 기반하여 최적의 버퍼 조건을 확인할 수 있다. 대안적으로, 접합 효율은 Spycher et al. (Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase, ChemBioChem 2019 18(19):1923-1927)에 기재된 바와 같이 결정되고, Benjamin et al. (Thiolation of Q295: Site-Specific Conjugation of Hydrophobic Payloads without the Need for Genetic Engineering, Mol. Pharmaceutics 2019, 16: 2795-2807)에 기재된 바와 같이 분석될 수 있다.

- [0874] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 미생물 트란스글루타미나제는 스트렙토마이세스 종, 구체적으로 스트렙토마이세스 모바라엔시스로부터 유래된다.
- [0875] 즉, 본 발명의 방법에 사용되는 미생물 트란스글루타미나제는 스트렙토마이세스 종, 구체적으로 스트렙토마이세스 모바라엔시스로부터 유래될 수 있으며, 바람직하게는 네이티브 효소에 대해 80%의 서열 동일성을 갖는다. 따라서, MTG는 네이티브 효소일 수 있거나 또는 네이티브 효소의 조작된 변이체일 수 있다.
- [0876] 이러한 미생물 트란스글루타미나제 중 하나는 Zedira (Germany)에서 상업적으로 입수 가능하다. 이는 대장균 (*E. coli*)에서 재조합적으로 생산된다. 스트렙토마이세스 모바라엔시스 트란스글루타미나제는 서열 번호: 1에 개시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다. 다른 아미노산 서열을 갖는 *S. 모바라엔시스* MTG 변이체가 보고되었으며, 또한 본 발명에 포함된다 (서열 번호: 2 및 3).
- [0877] 다른 구체예에서, 미생물 트란스글루타미나제 스트렙토마이세스 라다카눔 (*Streptomyces ladakanum*) (이전에 스트렙토베르티실리움 라다카눔 (*Streptovercillium ladakanum*))이 사용될 수 있다. 스트렙토마이세스 라다카눔 트란스글루타미나제 (미국 특허 제6,660,510호 B2)는 서열 번호: 4에 개시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0878] 상기 트란스글루타미나제 모두는 서열 변형될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 서열 번호: 1 - 4와 80%, 85%, 90% 또는 95% 또는 초과 서열 동일성을 갖는 트란스글루타미나제가 사용될 수 있다.
- [0879] 다른 적합한 미생물 트란스글루타미나제는 ACTIVA TG로 불리는, Ajinomoto로부터 시판되고 있다. Zedira로부터의 트란스글루타미나제와 비교하여, ACTIVA TG는 4개의 N-말단 아미노산이 결여되어 있지만, 유사한 활성을 갖는다.
- [0880] 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 추가의 미생물 트란스글루타미나제는 Kieliszek and Misiewicz (Folia Microbiol (Praha). 2014; 59(3): 241-250), WO 2015/191883 A1, WO 2008/102007 A1 및 US 2010/0143970에 개시되어 있고, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 통합된다.
- [0881] 소정의 구체예에서, 미생물 트란스글루타미나제의 돌연변이 변이체가 항체에 대한 링커의 접합에 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 방법에 사용되는 미생물 트란스글루타미나제는 서열 번호: 1 또는 2에 제시된 바와 같은 *S. 모바라엔시스* 트란스글루타미나제의 변이체일 수 있다. 소정의 구체예에서, 서열 번호: 1에 제시된 바와 같은 재조합 *S. 모바라엔시스* 트란스글루타미나제는 돌연변이 G254D를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 서열 번호: 1에 제시된 재조합 *S. 모바라엔시스* 트란스글루타미나제는 돌연변이 G254D 및 E304D를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 서열 번호: 1에 제시된 재조합 *S. 모바라엔시스* 트란스글루타미나제는 돌연변이 D4E 및 G254D를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 서열 번호: 1에 제시된 재조합 *S. 모바라엔시스* 트란스글루타미나제는 돌연변이 E124A 및 G254D를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 서열 번호: 1에 제시된 재조합 *S. 모바라엔시스* 트란스글루타미나제는 돌연변이 A216D 및 G254D를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, 서열 번호: 1에 제시된 재조합 *S. 모바라엔시스* 트란스글루타미나제는 돌연변이 G254D 및 K331T를 포함할 수 있다.
- [0882] 미생물 트란스글루타미나제는 항체와 링커의 효율적인 접합을 가능하게 하는 임의의 농도로 접합 반응에 추가될 수 있다. 소정의 구체예에서, 접합 반응에서 미생물 트란스글루타미나제의 농도는 동일한 반응에서 사용되는 항체의 양에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들어, 미생물 트란스글루타미나제는 항체 1 mg당 100 U/mg, 90 U/mg 항체, 80 U/mg 항체, 70 U/mg 항체, 60 U/mg 항체, 50 U/mg 항체, 40 U/mg 항체, 30 U/mg 항체, 20 U/mg 항체,

10 U/mg 항체 또는 6 U/mg 항체 미만의 농도로 접합 반응에 부가될 수 있다. 소정의 구체예에서, 미생물 트란스글루타미나제는 항체 1 mg당 1, 3, 5 또는 6 U/mg의 농도로 접합 반응에 부가될 수 있다.

[0883] 즉, 소정의 구체예에서, 미생물 트란스글루타미나제는 항체 1 mg당 1 - 20 U/mg 항체, 바람직하게는 1 - 10 U/mg 항체, 더 바람직하게는 1 - 7.5 U/mg 항체, 더욱 바람직하게는 2 - 6 U/mg 항체, 더욱 더 바람직하게는 2 - 4 U/mg 항체의 범위, 가장 바람직하게는 3 U/mg 항체의 농도로 접합 반응에 부가될 수 있다.

[0884] 본 발명에 따른 방법은 미생물 트란스글루타미나제의 용도를 포함한다. 그러나, 비-미생물 기원인 트란스글루타미나제 활성을 포함하는 효소에 의해 동등한 반응이 수행될 수 있음을 주목해야 한다. 따라서, 또한 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 비-미생물 기원인 트란스글루타미나제 활성을 포함하는 효소로 생성될 수 있다.

[0885] 항체는 임의의 농도로 접합 반응에 부가될 수 있다. 그러나, 항체가 0.1 - 20 mg/ml 범위의 농도로 접합 반응에 부가되는 것이 바람직하다. 즉, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체는 0.1 - 20 mg/mL, 바람직하게는 0.25 - 15 mg/mL, 더 바람직하게는 0.5 - 12.5 mg/mL, 더욱 바람직하게는 1 - 10 mg/mL, 더욱 더 바람직하게는 2 - 7.5 mg/mL, 가장 바람직하게는 약 5 mg/mL의 농도로 접합 반응에 부가된다.

[0886] 효율적인 접합을 수득하기 위해서, 링커는 항체에 몰 과량 (molar excess)으로 부가되는 것이 바람직하다. 즉, 소정의 구체예에서, 항체는 적어도 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 몰 당량의 링커와 혼합된다.

[0887] 즉, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체는 2 - 100 몰 당량의 링커, 바람직하게는 2 - 80 몰 당량의 링커, 더 바람직하게는 2 - 70 몰 당량의 링커, 더욱 바람직하게는 2 - 60 몰 당량의 링커, 더욱 더 바람직하게는 2 - 50 몰 당량의 링커, 더욱 더 바람직하게는 2 - 40 몰 당량의 링커, 더욱 더 바람직하게는 2 - 30 몰 당량의 링커, 더욱 더 바람직하게는 5 - 30 몰 당량의 링커, 가장 바람직하게는 5 - 20 몰 당량의 링커와 접촉된다.

[0888] 대안적으로, 항체는 5 - 100 몰 당량의 링커, 바람직하게는 5 - 80 몰 당량의 링커, 더 바람직하게는 5 - 70 몰 당량의 링커, 더욱 바람직하게는 5 - 60 몰 당량의 링커, 더욱 더 바람직하게는 5 - 50 몰 당량의 링커, 더욱 더 바람직하게는 5 - 40 몰 당량의 링커, 더욱 더 바람직하게는 5 - 30 몰 당량의 링커, 가장 바람직하게는 5 - 20 몰 당량의 링커와 접촉될 수 있다.

[0889] 본 발명에 따른 방법은 바람직하게는 pH 6 내지 9 범위에서 수행된다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체에 대한 링커의 접합은 pH 6 내지 8.5의 범위, 더 바람직하게는 pH 7 내지 8 범위에서 달성된다. 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 관한 것으로서, 여기서 항체에 대한 링커의 접합은 pH 7.6에서 달성된다.

[0890] 본 발명의 방법은 링커에 대한 페이로드의 접합에 적합한 임의의 버퍼에서 수행될 수 있다. 본 발명의 방법에 적합한 버퍼는 제한 없이, Tris, MOPS, HEPES, PBS 또는 BisTris 버퍼를 포함한다. 버퍼의 농도는 무엇보다도 항체 및/또는 링커의 농도에 따라 좌우되며, 10 - 1000 mM, 10 - 500 mM, 10 - 400 mM, 10 내지 250 mM, 10 내지 150 mM 또는 10 내지 100 mM의 범위일 수 있다. 또한, 버퍼는 본 발명의 방법을 수행하기에 적합한 임의의 염 농도를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 사용되는 버퍼는 염 농도가 ≤ 150 mM, ≤ 140 mM, ≤ 130 mM, ≤ 120 mM, ≤ 110 mM, ≤ 100 mM, ≤ 90 mM, ≤ 80 mM, ≤ 70 mM, ≤ 60 mM, ≤ 50 mM, ≤ 40 mM, ≤ 30 mM, ≤ 20 mM 또는 ≤ 10 mM일 수 있거나 또는 염이 존재하지 않을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 버퍼는 염이 없는 50 mM Tris pH 7.6이다.

[0891] 최적의 반응 조건 (예컨대 pH, 버퍼, 염 농도)은 페이로드들 간에 다양할 수 있고, 링커 및/또는 페이로드의 물리화학적 특성에 따라 어느 정도는 좌우될 수 있음에 유의해야 한다. 그러나, 본 발명의 방법을 수행하기에 적합한 반응 조건을 확인하기 위해 당업자의 과도한 실험이 요구되지 않는다.

[0892] 본 출원은 상기 개시된 링커, 항체 MTG 및/또는 버퍼 농도의 임의의 조합을 포함하는 것으로 이해해야 한다.

[0893] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조 (N $\rightarrow$ C 방향으로 표시됨)

[0894] Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)

[0895] 를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계

를 포함하고,

[0896] 상기에서

[0897]  Aax는 구조 $\text{NH}_2\text{-Y-COOH}$ 를 갖는 아미노산이며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하고;

[0898]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;

[0899]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;

[0900]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;

[0901] 항체는 2 - 80 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는

[0902] 미생물 트란스글루타미나제는 1 - 20 U/mg 항체 범위의 농도로 접합 반응에 부가되고, 선택적으로 항체는 0.1 - 20 mg/mL 범위의 농도로 접합 반응에 부가된다.

[0903] 더 바람직한 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조 ($\text{N} \rightarrow \text{C}$ 방향으로 표시됨)

[0904] $\text{Aax-(Sp}_1\text{)-B}_1\text{-(Sp}_2\text{)}$

[0905] 를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하고,

[0906] 상기에서

[0907]  Aax는 구조 $\text{NH}_2\text{-Y-COOH}$ 를 갖는 아미노산이며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하고;

[0908]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;

[0909]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;

[0910]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;

[0911] 항체는 2 - 50 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는

[0912] 미생물 트란스글루타미나제는 1 - 10 U/mg 항체 범위의 농도로 접합 반응에 부가되고, 선택적으로 항체는 1 - 10 mg/mL 범위의 농도로 접합 반응에 부가된다.

[0913] 더욱 바람직한 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조 ($\text{N} \rightarrow \text{C}$ 방향으로 표시됨)

[0914] $\text{Aax-(Sp}_1\text{)-B}_1\text{-(Sp}_2\text{)}$

[0915] 를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하고,

[0916] 상기에서

[0917]  Aax는 구조 $\text{NH}_2\text{-Y-COOH}$ 를 갖는 아미노산이며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하고;

[0918]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;

[0919]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;

- [0920]  B₁은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [0921] 항체는 2 - 30 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는
- [0922] 미생물 트란스글루타미나제는 2 - 6 U/mg 항체 범위의 농도로 접합 반응에 부가되고, 선택적으로 항체는 2 - 7.5 mg/mL 범위의 농도로 접합 반응에 부가된다.
- [0923] 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조 (N → C 방향으로 표시됨)
- [0924] Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)
- [0925] 를 포함하는 링커를 N-말단 잔기 Aax내 1차 아민을 통해 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하고,
- [0926] 상기에서
- [0927]  Aax는 구조 NH₂-Y-COOH를 갖는 아미노산이며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하고;
- [0928]  (Sp₁)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0929]  (Sp₂)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0930]  B₁은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [0931] 항체는 5 - 20 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는
- [0932] 미생물 트란스글루타미나제는 약 3 U/mg 항체의 농도로 접합 반응에 부가되고, 선택적으로 항체는 약 5 mg/mL의 농도로 접합 반응에 부가된다.
- [0933] 본 발명자들은 접합 반응에서 항체에 대한 링커의 비율을 조정함으로써 글리코실화 항체의 접합 효율이 개선될 수 있음을 추가로 확인하였다. 구체적으로, 링커 대 항체 비율이 낮을수록 글리코실화 항체와의 접합 효율이 더 높아진다는 것이 본 발명자들에 의해 놀랍게도 발견되었다.
- [0934] 소정의 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조
- [0935] NH₂-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)
- [0936] 를 포함하는 링커를 1차 아민 NH₂를 통해 글리코실화 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하고,
- [0937] 상기에서
- [0938]  (Sp₁)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0939]  (Sp₂)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0940]  B₁은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [0941] 글리코실화 항체는 2 - 80 몰 당량, 바람직하게는 2 - 70 몰 당량, 더 바람직하게는 2 - 60 몰 당량, 더욱 바람직하게는 2 - 50 몰 당량, 더욱 바람직하게는 2 - 40 몰 당량, 더욱 바람직하게는 2 - 30 몰 당량, 더욱 바람직하게는 5 - 30 몰 당량, 가장 바람직하게는 5 - 20 몰 당량의 링커와 접촉된다.
- [0942] 대안적으로, 글리코실화 항체는 5 - 80 몰 당량, 바람직하게는 5 - 70 몰 당량, 더 바람직하게는 5 - 60 몰 당량, 더욱 바람직하게는 5 - 50 몰 당량, 더욱 바람직하게는 5 - 40 몰 당량, 더욱 바람직하게는 5 - 30 몰 당량, 가장 바람직하게는 5 - 20 몰 당량의 링커와 접촉될 수 있다.

- [0943] 소정의 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조
- [0944] $\text{NH}_2-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$
- [0945] 를 포함하는 링커를 1차 아민 NH_2 를 통해 글리코실화 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하고,
- [0946] 상기에서
- [0947]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0948]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0949]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [0950] 글리코실화 항체는 2 - 80 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는
- [0951] 미생물 트란스글루타미나제는 1 - 20 U/mg 항체 범위의 농도로 접합 반응에 부가되며;
- [0952] 선택적으로, 글리코실화 항체는 0.1 - 20 mg/mL 범위의 농도로 접합 반응에 부가된다.
- [0953] 소정의 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조
- [0954] $\text{NH}_2-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$
- [0955] 를 포함하는 링커를 1차 아민 NH_2 를 통해 글리코실화 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하고,
- [0956] 상기에서
- [0957]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0958]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0959]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [0960] 글리코실화 항체는 2 - 50 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는
- [0961] 미생물 트란스글루타미나제는 1 - 10 U/mg 항체 범위의 농도로 접합 반응에 부가되며;
- [0962] 선택적으로, 글리코실화 항체는 1 - 10 mg/mL 범위의 농도로 접합 반응에 부가된다.
- [0963] 소정의 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조
- [0964] $\text{NH}_2-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$
- [0965] 를 포함하는 링커를 1차 아민 NH_2 를 통해 글리코실화 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를 포함하고,
- [0966] 상기에서
- [0967]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0968]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0969]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;

- [0970] 글리코실화 항체는 2 - 30 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는
- [0971] 미생물 트란스글루타미나제는 2 - 6 U/mg 항체 범위의 농도로 접합 반응에 부가되며;
- [0972] 선택적으로, 글리코실화 항체는 2 - 7.5 mg/mL 범위의 농도로 접합 반응에 부가된다.
- [0973] 소정의 구체예에서, 본 발명은 미생물 트란스글루타미나제 (MTG)에 의해 항체-링커 접합체를 생성하는 방법과
관한 것으로서, 상기 방법은 하기 구조
- [0974] $\text{NH}_2-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$
- [0975] 를 포함하는 링커를 1차 아민 NH_2 를 통해 글리코실화 항체에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기에 접합시키는 단계를
포함하고,
- [0976] 상기에서
- [0977]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [0978]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [0979]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [0980] 글리코실화 항체는 약 5 - 20 몰 당량의 링커와 접촉되고; 및/또는
- [0981] 미생물 트란스글루타미나제는 약 3 U/mg 항체의 농도로 접합 반응에 부가되며;
- [0982] 선택적으로, 글리코실화 항체는 약 5 mg/mL의 농도로 접합 반응에 부가된다.
- [0983] 링커가 구조 $\text{NH}_2-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$ 를 갖는 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 본원에서 정의된 바
와 같은 구조를 갖거나 또는 포함할 수 있다.
- [0984] 구체적으로, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 임의의 직쇄형, 분지형 및/또는 고리형 C_{2-30} 알킬, C_{2-30} 알케닐, C_{2-30}
알키닐, C_{2-30} 헤테로알킬, C_{2-30} 헤테로알케닐, C_{2-30} 헤테로알키닐일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있고, 선택
적으로 하나 이상의 호모사이클릭 방향족 화합물 라디칼 또는 헤테로사이클릭 화합물 라디칼이 삽입될 수 있고;
특히, 임의의 직쇄형 또는 분지형 C_{2-5} 알킬, C_{5-10} 알킬, C_{11-20} 알킬, $-\text{O}-\text{C}_{1-5}$ 알킬, $-\text{O}-\text{C}_{5-10}$ 알킬, $-\text{O}-\text{C}_{11-20}$ 알킬,
또는 $(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{1-24}$ 또는 $(\text{CH}_2)_{x1}-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_{1-24}-(\text{CH}_2)_{x2}-$ 기 (여기서, $x1$ 및 $x2$ 는 독립적으로 0 내지 20 범위에
서 선택된 정수임), 아미노산, 올리고펩티드, 글리칸, 설페이트, 포스페이트, 또는 카복실레이트일 수 있거나
또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 C_{2-6} 알킬 기를 포함할 수 있다.
- [0985] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티 또
는 유사한 축합 폴리머, 예컨대 폴리(카복시메타인 메타크릴레이트) (pCBMA), 폴리옥사졸린, 폴리글리세롤, 폴
리비닐피롤리돈 또는 폴리(하이드록시에틸메타크릴레이트) (pHEMA)를 포함할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜
(PEG)은 산업적 제조에서 의약품에 이르기까지 다양한 용도로 사용되는 폴리에테르 화합물이다. PEG는 또한 이
의 분자량에 따라 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO) 또는 폴리옥시에틸렌 (POE)으로 알려져 있다. PEG의 구조는 일반
적으로 $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ 로 표시된다.
- [0986] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 텍스트란을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된, 용
어 "텍스트란 (dextran)"은 3 내지 2000 kDa 범위의 중량을 가질 수 있는, 다양한 길이의 사슬로 이루어진 복합
분지형 글루칸을 지칭한다. 직쇄 (straight chain)는 전형적으로 글루코스 분자들 사이의 알파-1,6 글리코시드
연결로 구성되는 반면에, 분지쇄는 알파-1,3 연결로부터 시작한다. 텍스트란은 예를 들어 락트산 박테리아에
의해 수크로스로부터 합성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 담체로 사용되는 텍스트란은 바람직하게는 약 15
내지 1500 kDa의 분자량을 가질 수 있다.
- [0987] 소정의 구체예에서, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본원에서
사용된, 용어 "올리고뉴클레오티드 (oligonucleotide)"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고
머 또는 폴리머 뿐만 아니라, 비-자연 발생 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 더 높은 안정성으로 인해, 올리고

뉴클레오티드는 바람직하게는 DNA의 폴리머이다.

- [0988] 소정의 구체예에서, 구조 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)$ 은 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{Z}$ 를 갖는 PEG-아민일 수 있으며, 여기서 n 은 1 내지 20의 정수이고; Z 는 PEG-아민을 페이로드 B_1 에 커플링하는데 적합한 관능기를 포함하는 분자일 수 있다. 소정의 구체예에서, 구조 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)$ 은 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{NH}_2$ 를 갖는 PEG 디아민일 수 있다.
- [0989] 소정의 구체예에서, 구조 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)$ 은 디아민일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있으며, 여기서 제1 아민은 글리코실화 항체의 글루타민 잔기에 접합되고, 제2 아민은 디아민을 페이로드 B_1 에 커플링하는데 적합하다. 소정의 구체예에서, 디아민은 구조 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ 를 가질 수 있으며, 여기서 n 은 0 내지 20, 바람직하게는 0 내지 10 범위의 정수이다. 소정의 구체예에서, 디아민은 카다베린 (cadaverine) ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$)일 수 있다. 소정의 구체예에서, 디아민은 푸트레신 (putrescine) ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$)일 수 있다.
- [0990] 링커 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)-\text{B}_1$ 에 포함된 연결 모이어티 또는 페이로드 B_1 은 본원에 개시된 임의의 연결 모이어티 또는 페이로드일 수 있음을 이해해야 한다. 추가로, B_1 은 본원에 개시된 절단 가능한 및/또는 자기-희생 모이어티 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0991] 링커 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)-\text{B}_1$ 은 제2 연결 모이어티 또는 페이로드 B_2 에 직접 또는 화학적 스페이서 (SP_2)에 의해 커플링될 수 있다. B_2 및 (SP_2)는 본원에서 보다 상세하게 정의된다.
- [0992] 또한, 본원에 제공된 링커의 정의는 본 발명에 따른 방법 및 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 모두에 적용되는 것으로 이해해야 한다.
- [0993] 특정 구체예에서, 본 발명은 임의의 전술한 단계로 생성된 항체-링커 접합체에 관한 것이다.
- [0994] 특정 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 단백질-링커 접합체에 관한 것이다:
- [0995] a) 단백질; 및
- [0996] b) 하기 구조 ($\text{N} \rightarrow \text{C}$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커:
- [0997] $\text{Aax}-(\text{SP}_1)-\text{B}_1-(\text{SP}_2)$,
- [0998] 상기에서
- [0999]  Aax는 아미노산 또는 아미노산 유도체이고;
- [1000]  (SP_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [1001]  (SP_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [1002]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [1003] 상기 링커는 잔기 Aax 내의 1차 아민을 통해 단백질에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기의 아미드 측쇄에 접합된다.
- [1004] 단백질-링커 접합체에 포함된 단백질은 본원에 개시된 단백질들 중 어느 하나일 수 있다. 그러나, 단백질은 항체인 것이 바람직하다.
- [1005] 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항체-링커 접합체에 관한 것이다:
- [1006] a) 항체; 및
- [1007] b) 하기 구조 ($\text{N} \rightarrow \text{C}$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커:
- [1008] $\text{Aax}-(\text{SP}_1)-\text{B}_1-(\text{SP}_2)$,
- [1009] 상기에서

- [1010]  Aax는 아미노산 또는 아미노산 유도체이고;
- [1011]  (Sp_1)은 화학적 스페이서이거나 또는 부재하며;
- [1012]  (Sp_2)는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [1013]  B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [1014] 상기 링커는 잔기 Aax 내의 1차 아민을 통해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기의 아미드 측쇄에 접합된다.
- [1015] 즉, 본 발명은 또한 본 발명의 방법으로 생성된 항체-링커 접합체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 글루타민 잔기에서 본원에 개시된 링커들 중 어느 하나의 링커와 접합된 항체에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 링커는 항체에 포함된 글루타민 잔기의 아미드 측쇄와 링커의 잔기 Aax에 포함된 1차 아민 사이에 형성된 아미드 결합을 통해 항체 내의 글루타민 잔기에 접합된다. 소정의 구체예에서, 잔기 Aax에 포함된 1차 아민은 Aax의 아미노 기, 구체적으로 Aax의 α -아미노 기이다.
- [1016] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 잔기 Aax는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산, 또는 이의 아미노산 모방체 또는 유도체이다.
- [1017] 링커가 항체에 접합되는데 링커에 포함된 잔기 Aax는 본원에 개시된 잔기들 중 어느 하나일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 항체-페이로드 접합체 내의 잔기 Aax는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린 잔기, 또는 이들 잔기들 중 어느 하나의 아미노산 모방체 또는 유도체일 수 있다.
- [1018] 따라서, 소정의 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체 (antibody drug conjugate)에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 알라닌, 알라닌 모방체 또는 알라닌 유도체이다.
- [1019] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 아르기닌, 아르기닌 모방체 또는 아르기닌 유도체이다.
- [1020] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 아스파라긴, 아스파라긴 모방체 또는 아스파라긴 유도체이다.
- [1021] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 아스파르트산, 아스파르트산 모방체 또는 아스파르트산 유도체이다.
- [1022] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 시스테인, 시스테인 모방체 또는 시스테인 유도체이다.
- [1023] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 글루탐산, 글루탐산 모방체 또는 글루탐산 유도체이다.
- [1024] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 글루타민, 글루타민 모방체 또는 글루타민 유도체이다.
- [1025] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 글리신, 글리신 모방체 또는 글리신 유도체이다.
- [1026] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 히스티딘, 히스티딘 모방체 또는 히스티딘 유도체이다.
- [1027] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 이소류신, 이소류신 모방체 또는 이소류신 유도체이다.

- [1028] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 류신, 류신 모방체 또는 류신 유도체이다.
- [1029] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 리신 모방체 또는 리신 유도체, 구체적으로 아미노산 측쇄내 1차 아민이 치환되거나 또는 변형된 리신 모방체 또는 리신 유도체이다.
- [1030] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 메티오닌, 메티오닌 모방체 또는 메티오닌 유도체이다.
- [1031] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 페닐알라닌, 페닐알라닌 모방체 또는 페닐알라닌 유도체이다.
- [1032] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 프롤린 모방체 또는 프롤린 유도체, 구체적으로 1차 아민을 포함하는 프롤린 유도체 또는 모방체이다.
- [1033] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 세린, 세린 모방체 또는 세린 유도체이다.
- [1034] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 트레오닌, 트레오닌 모방체 또는 트레오닌 유도체이다.
- [1035] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 트립토판, 트립토판 모방체 또는 트립토판 유도체이다.
- [1036] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 티로신, 티로신 모방체 또는 티로신 유도체이다.
- [1037] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 발린, 발린 모방체 또는 발린 유도체이다.
- [1038] 다른 구체예에서, 본 발명은 항체 약물 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Aax는 본원에 개시된 바와 같은 고리형 모이어티를 포함하는 아미노산, 생물직교 모이어티를 포함하는 아미노산, 알파-메틸 아미노산, 베타-아미노산 또는 감마-아미노산이다.
- [1039] 특정 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항체-링커 접합체에 관한 것이다:
- [1040] a) 항체; 및
- [1041] b) 하기 구조 ($N \rightarrow C$ 방향으로 표시됨)를 포함하는 링커:
- [1042] $(Aax)-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$,
- [1043] 상기에서
- [1044] Aax는 구조 $NH_2-Y-COOH$ 를 갖는 아미노산이며, 여기서 Y는 치환 또는 비치환된 알킬 또는 헤테로알킬 사슬을 포함하고;
- [1045] (Sp_1) 은 화학적 스페이서이며;
- [1046] (Sp_2) 는 화학적 스페이서이거나 또는 부재하고;
- [1047] B_1 은 연결 모이어티 또는 페이로드이며;
- [1048] 상기 링커는 잔기 Aax 내의 1차 아민을 통해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 글루타민 (Gln) 잔기의 아미드 측쇄에 접합된다.
- [1049] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 1 내지 20의 정수이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 n은

1 내지 10, 1 내지 6, 2 내지 20, 2 내지 10, 2 내지 6, 3 내지 20, 3 내지 10, 또는 3 내지 6의 정수이다.

[1050] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체 (conjugate)에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 1이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 2이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 3이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 4이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 5이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 6이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 7이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 8이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 9이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Y는 구조 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하고, n은 10이다.

[1051] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)는 각각 0 내지 12개의 아미노산 잔기를 포함한다.

[1052] 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 포함된 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)는 본 발명의 방법에 사용된 링커에 포함된 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)와 동일한 특징을 가질 수 있다.

[1053] 소정의 구체예에서, 항체-링커 페이로드에 포함된 화학적 스페이서 (Sp_1) 및 (Sp_2)는 아미노산 유도체 및 아미노산 모방체를 포함하는, 아미노산 잔기를 0 내지 12개 포함할 수 있다. 즉, 소정의 구체예에서, (Sp_1)은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, (Sp_2)는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 소정의 구체예에서, (Sp_1)은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, (Sp_2)는 부재할 수 있다. 구체적으로, B_1 이 페이로드인 경우 (Sp_2)는 부재한 것이 바람직하다. B_1 이 연결 모이어티인 구체예에서, (Sp_2)가 존재할 수 있고, 선택적으로 추가 페이로드 또는 연결 모이어티 (B_2)에 연결될 수 있다.

[1054] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 링커는 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6개 이하의 아미노산 잔기를 포함한다.

[1055] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 포함된 링커는 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체를 포함할 수 있다. 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 링커에 포함된 아미노산 잔기는 Aax, 화학적 스페이서 (Sp_1) 및/또는 (Sp_2), 소정의 구체예에서, 또한 B_1 및/또는 B_2 에 포함된 아미노산 잔기인 것으로 이해해야 하며, 여기서 B_1 및/또는 B_2 는 아미노산-기반 연결 모이어티 또는 페이로드이다. 링커가 단일 아미노산 잔기만을 포함하는 구체예에서, 단일 아미노산 잔기는 바람직하게는 위치 Aax에서의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체이다. 이러한 구체예에서, (Sp_1) 및/또는 (Sp_2)는 부재하거나 또는 임의의 아미노산, 아미노산 모방체 또는 아미노산 유도체를 포함하지 않는다. 소정의 구체예에서, 단일 아미노산 잔기를 포함하는 링커는 구조 Aax- B_1 을 가질 수 있다.

[1056] 소정의 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2), 및 선택적으로 B_2 를 포함하는, 항체-페이로드 접합체에 포함된 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 2 내지 25개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2), 및 선택적으로 B_2 를 포함하는, 항체-페이로드 접합체에 포함된 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 2 내지 20개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp_1), B_1 및 (Sp_2), 및 선택적으로 B_2 를 포함하는, 항체-페이로드 접합체에 포함된 링커는 아미노산 모방

체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 2 내지 15개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp₁), B₁ 및 (Sp₂), 및 선택적으로 B₂를 포함하는, 항체-페이로드 집합체에 포함된 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 2 내지 10개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp₁), B₁ 및 (Sp₂), 및 선택적으로 B₂를 포함하는, 항체-페이로드 집합체에 포함된 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 3 내지 10개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp₁), B₁ 및 (Sp₂), 및 선택적으로 B₂를 포함하는, 항체-페이로드 집합체에 포함된 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 3 내지 8개 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, Aax, (Sp₁), B₁ 및 (Sp₂), 및 선택적으로 B₂를 포함하는, 항체-페이로드 집합체에 포함된 링커는 아미노산 모방체 및 아미노산 유도체를 포함하는, 아미노산 잔기를 4 내지 8개 포함할 수 있다.

- [1057] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 링커의 순전하는 중성 또는 양성이다.
- [1058] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 링커는 음으로 하전된 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.
- [1059] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 링커는 적어도 하나의 양으로 하전된 아미노산 잔기를 포함한다.
- [1060] 즉, 항체-링커 집합체에 포함된 링커는 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 링커에 대해 개시된 임의의 물리화학적 특성 또는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [1061] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 링커는 제2 연결 모이어티 또는 페이로드 B₂를 포함하고, 구체적으로 B₂는 링커에 화학적 스페이서 (Sp₂)를 통해 연결된다.
- [1062] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 B₁ 및 B₂는 서로 동일하거나 또는 상이하다.
- [1063] 즉, 항체-링커 집합체는 2개의 연결 모이어티 또는 페이로드를 포함할 수 있으며, 여기서 2개의 연결 모이어티 및/또는 페이로드는 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 연결 모이어티 및 페이로드 모두는 본 발명의 방법에 대해 본원에 개시된 연결 모이어티 또는 페이로드 중 임의의 하나일 수 있다.
- [1064] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 B₁ 및/또는 B₂는 연결 모이어티이다.
- [1065] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나는 하기를 포함한다:

[1066]  생물직교 마커 기, 또는

[1067]  가교를 위한 비-생물-직교 엔티티.

[1068] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 집합체에 관한 것으로서, 여기서 생물직교 마커 기 또는 비-생물-직교 엔티티는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자 또는 모이어티로 구성되거나 또는 이를 포함한다:

[1069]  -N≡N, 또는 -N₃;

[1070]  Lys(N₃);

[1071]  테트라진;

[1072]  알킨;

- [1073]  스트레인드 사이클로옥틴;
- [1074]  BCN;
- [1075]  스트레인드 알켄;
- [1076]  광반응성 기;
- [1077]  -RCOH (알데히드);
- [1078]  아실트리플루오로보레이트;
- [1079]  사이클로펜타디엔/스피롤로사이클로펜타디엔;
- [1080]  티오-선택적 친전자체;
- [1081]  -SH; 및
- [1082]  시스테인.
- [1083] 즉, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 포함된 하나 이상의 연결 모이어티는 본 발명의 방법에 사용되는 링커에 포함된 연결 모이어티와 동일한 특징을 가질 수 있다.
- [1084] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂ 중 적어도 하나는 하나 이상의 페이로드에 연결된다.
- [1085] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 하나 이상의 페이로드는 연결 모이어티 B₁ 및/또는 B₂에 클릭-반응을 통해 연결된다.
- [1086] 즉, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 본 발명에 따른 방법에 대해 본원에 개시된 임의의 반응에 의해 링커에 포함된 하나 이상의 연결 모이어티에 연결된 하나 이상의 페이로드를 포함할 수 있다.
- [1087] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 B₁ 및/또는 B₂는 페이로드이다.
- [1088] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 하나 이상의 페이로드는 하기 중 적어도 하나를 포함한다:
- [1089]  독소
- [1090]  사이토카인
- [1091]  성장 인자
- [1092]  방사성핵종
- [1093]  호르몬
- [1094]  항-바이러스제
- [1095]  항-박테리아제
- [1096]  형광 염료

- [1097]  면역조절제/면역자극제
- [1098]  반감기 증가 모이어티
- [1099]  용해도 증가 모이어티
- [1100]  폴리머-독소 접합체
- [1101]  핵산
- [1102]  바이오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티
- [1103]  비타민
- [1104]  단백질 분해제 ('PROTAC')
- [1105]  표적 결합 모이어티, 및/또는
- [1106]  항-염증제.
- [1107] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 독소는 하기로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나이다:
- [1108]  피롤로벤조디아제핀 (PBD);
- [1109]  아우리스타틴 (예: MMAE, MMAF);
- [1110]  메이탄시노이드 (메이탄신, DM1, DM4, DM21);
- [1111]  두오카르마이신;
- [1112]  니코틴아미드 포스포리보실트랜스퍼라제 (NAMPT) 억제제;
- [1113]  튜불리신;
- [1114]  엔디이엔 (enediynes) (예: 칼리케아미신);
- [1115]  PNUs, 독소루비신;
- [1116]  피롤계 키네신 스핀들 단백질 (KSP) 억제제;
- [1117]  크립토피신;
- [1118]  약물 유출 펌프 억제제;
- [1119]  산드라마이신;
- [1120]  아마니틴 (예: α -아마니틴); 및
- [1121]  캄프토테신 (예: 엑사테칸, 데룩스테칸).
- [1122] 즉, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 포함된 하나 이상의 페이로드는 본 발명의 방법에 대해 본원에 개시된 페이로드들 중 어느 하나일 수 있다.

- [1123] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 하나 이상의 페이로드 는 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티를 추가로 포함한다.
- [1124] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티는 모티프 발린-시트룰린 (VC) 및/또는 p-아미노벤질 카바모일 (PABC) 모이어티를 포함한다.
- [1125] 또한, 항체-링커 접합체에 포함된 링커는 본 발명에 따른 방법에 사용하기 위해 개시된 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 대안적으로, 링커에 연결되거나 또는 링커에 포함된 페이로드 분자는 본 발명에 따른 방법에 사용하기 위해 개시된 절단 가능한 또는 자기-희생 모이어티 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [1126] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 항체, 또는 이의 단편 또는 재조합 변이체이며, 상기 이의 단편 또는 재조합 변이체는 표적 결합 특성을 보유하고 CH2 도메인을 포함한다.
- [1127] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 IgG 항체이다.
- [1128] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 글리코실화 항체, 데글리코실화 항체 또는 아글리코실화 항체이다.
- [1129] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 글리코실화 항체는 CH2 도메인의 잔기 N297 (EU numbering)에서 글리코실화된 IgG 항체이다.
- [1130] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 링커가 접합된 Gln 잔기는 항체의 Fc 도메인에 포함되거나 또는 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된다.
- [1131] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체의 Fc 도메인에 포함된 Gln 잔기는 IgG 항체의 CH2 도메인의 Gln 잔기 Q295 (EU numbering)이다.
- [1132] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 아글리코실화 IgG 항체의 CH2 도메인의 N297Q (EU numbering)이다.
- [1133] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 분자 공학에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기는 (a) 항체의 중쇄 또는 경쇄로 통합되거나 또는 (b) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N- 또는 C-말단 단부에 융합된 펩티드에 포함된다.
- [1134] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 Gln 잔기를 포함하는 펩티드는 항체의 중쇄의 C-말단 단부에 융합된다.
- [1135] 즉, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 본원에 개시된 항체들 중 어느 하나, 구체적으로 본 발명의 방법에 대해 개시된 항체들 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 포함된 항체는 바람직하게는 IgG 항체, 더 바람직하게는 인간 IgG 항체, 더욱 바람직하게는 인간 IgG1 항체이다.
- [1136] 따라서, 본 발명의 항체-링커 접합체에 포함된 항체는 임의의 항체, 바람직하게는 임의의 IgG 타입 항체일 수 있다. 예를 들어, 항체는 브렌투스맵, 트라스투주맵, 겐투주맵, 이노투주맵, 아벨루맵, 세톡시맵, 리톡시맵, 다라투무맵, 페르투주맵, 베돌리주맵, 오크렐리주맵, 토실리주맵, 우스테키누맵, 골리루맵, 오비누투주맵, 플라투주맵 또는 엔포르투맵일 수 있고 이에 한정되지 않는다.
- [1137] 즉, 소정의 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 브렌투스맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 트라스투주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 겐투주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 이노투주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 아벨루맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 세톡시맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 리톡시맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 다라투무맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 페르투주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 베돌리주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로

서, 여기서 항체는 오크렐리주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 토실리주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 우스테키주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 올리무맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 오비누주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 폴라투주맵이다. 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체는 엔포르투맵이다.

[1138] 또한, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 포함된 항체는 항체의 중쇄의 아미노산 잔기 Q295 (EU numbering)를 포함하고 링커에 상기 아미노산 잔기를 통해 접합되는 것이 바람직하다. 또한, 항체-링커 접합체에 포함된 항체는 바람직하게는 항체의 중쇄의 위치 N297 (EU numbering)에서 글리코실화되는 것이 바람직하다.

[1139] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 항체-링커 접합체는 적어도 하나의 페이로드를 포함한다.

[1140] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 적어도 하나의 독소를 포함한다.

[1141] 즉, 본 발명의 항체-링커 접합체는 적어도 하나의 링커에 접합된 항체를 포함하며, 여기서 하나의 링커는 적어도 하나의 독소를 포함한다. 소정의 구체예에서, 항체-링커 접합체는 2개의 링커를 포함하며, 여기서 항체의 각 중쇄는 하나의 링커에 각각 접합된다. 소정의 구체예에서, 항체-링커 접합체는 4개의 링커를 포함하며, 여기서 항체의 각 중쇄는 2개의 링커에 각각 접합된다. 이러한 경우에, 각 링커는 하나 이상의 페이로드, 예컨대 독소를 함유할 수 있다.

[1142] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 2개의 링커를 포함하며, 여기서 각 링커는 하나의 페이로드, 예를 들어 독소를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 2개의 링커를 포함하며, 여기서 각 링커는 2개의 페이로드, 예를 들어 하나의 독소 및 하나의 다른 페이로드 또는 2개의 동일하거나 또는 상이한 독소를 포함한다. 항체-링커 접합체가 2개의 링커를 포함하는 구체예에서, 링커는 IgG 항체의 2개의 중쇄의 잔기 Q295에 접합되는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 항체는 잔기 N297에서 글리코실화된 IgG 항체이다.

[1143] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 4개의 링커를 포함하며, 여기서 각 링커는 하나의 페이로드, 예를 들어 독소를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 4개의 링커를 포함하며, 여기서 각 링커는 2개의 페이로드, 예를 들어 하나의 독소 및 하나의 다른 페이로드 또는 2개의 동일하거나 또는 상이한 독소를 포함한다. 항체-링커 접합체가 4개의 링커를 포함하는 구체예에서, 링커는 IgG 항체의 2개의 중쇄의 잔기 Q295 및 N297Q에 접합되는 것이 바람직하다.

[1144] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 2개의 상이한 독소를 포함한다.

[1145] 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 2개의 상이한 독소를 포함한다. 즉, 소정의 구체예에서, 항체-링커 접합체는 2개의 링커를 포함할 수 있으며, 여기서 각 링커는 2개의 상이한 독소를 포함한다. 2개의 상이한 독소를 포함하는 항체-링커 접합체는 증가된 세포독성 활성을 가질 수 있다는 이점을 갖는다. 이러한 세포독성 활성 증가는 2개의 상이한 세포 기전을 표적으로 하는 2개의 독소들을 조합함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 세포 분열을 억제하는 제1 독소 및 DNA의 복제 및/또는 전사를 방해하는 독소인 제2 독소를 포함할 수 있다.

[1146] 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 제1 독소는 세포 분열을 억제하는 독소이고, 제2 독소는 DNA의 복제 및/또는 전사를 방해하는 독소이다.

[1147] 세포 분열을 억제하는 독소, 예컨대 항-유사분열제 (anti-mitotic agent) 또는 스핀들 독 (spindle poison)은 세포의 유사분열을 억제하거나 또는 방지할 수 있는 잠재력을 가진 제제이다. 스핀들 독은 스핀들 (spindles)로 알려진 염색체의 중심체 영역을 연결하는 단백질 실 (protein threads)에 영향을 주어 세포 분열을 방해하는 독이다. 스핀들 독은 스핀들 조립 체크포인트 (spindle assembly checkpoint: SAC)에서 세포 분열의 유사분열 단계를 방해하여 새로운 세포의 생산을 효과적으로 중단시킨다. 유사분열 스핀들은 조절 단백질과 함께 도움을 주는 미세소관 (중합된 튜불린)으로 이루어지며; 서로 복제된 염색체를 적절하게 분리하는 활성을 갖는다. 유사분열 스핀들에 영향을 미치는 소정의 화합물은 고형 종양 및 혈액 악성 종양에 대해 매우 효과적인 것으로 입

증되었다.

- [1148] 항유사분열제의 2가지 특정 계열인 빈카 알칼로이드 (vinca alkaloids) 및 타산 (taxanes)은 미세소관 동역학의 교란에 의해 세포 분열을 방해한다. 빈카 알칼로이드는 튜불린의 미세소관으로의 중합 억제를 유발하는 작용을 하여, 세포 주기 내에서 G2/M 정지 및 결국 세포 사멸을 초래한다. 대조적으로, 타산은 해중합에 대해 미세소관을 안정화시킴으로써 유사분열 세포 주기를 정지시킨다. 신규한 화학요법의 표적이 될 수 있는 수많은 다른 스핀들 단백질이 존재하지만, 튜불린-결합제는 임상에서 사용되는 유일한 타입이다. 운동 단백질 키네신 (motor protein kinesin)에 영향을 주는 제제가 임상 시험에 진입하기 시작하였다. 또 다른 타입인 파클리탁셀은 기존 미세소관 내의 튜불린에 부착하여 작용한다. 본 발명 내에서 세포 분열을 억제하는 바람직한 독소는 아우리스타틴 예컨대 MMAE 및 MMAF, 및 메이탄시노이드, 예컨대 DM1, DM3, DM4 및/또는 DM21이다.
- [1149] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 독소 중 적어도 하나는 아우리스타틴 또는 메이탄시노이드이다.
- [1150] DNA 분자의 정확한 복제 및/또는 전사를 방지하고 암 치료에 적합한 것으로 밝혀진 몇몇 제제가 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 새롭게 형성된 DNA 및/또는 RNA 분자에 잘못 혼입된 (misincorporated) 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유사체와 같은 항대사물질 (antimetabolites)이 당해 기술 분야에 알려져 있으며, Tsesmetzis et al, Cancers (Basel), 2018, 10(7): 240에 요약되어 있다. DNA의 복제 및/또는 전사를 방해하는 것으로 알려진 다른 독소로는 두오카르마이신 (duromycins)이 있다.
- [1151] 따라서, 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 2개의 상이한 독소를 포함하며, 여기서 제1 독소는 두오카르마이신이고, 제2 페이로드는 아우리스타틴 또는 메이탄시노이드이다.
- [1152] 소정의 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 2개의 상이한 아우리스타틴을 포함한다.
- [1153] 2개의 상이한 독소를 포함하는 항체-링커 접합체의 주요 이점 중 하나는 항체-링커 접합체가 독소들 중 하나의 작용 기전을 회피한 표적 세포에 대해 여전히 작용할 수 있고 및/또는 항체-페이로드 접합체가 이중 종양에 대한 더 높은 효능을 가질 수 있다는 점이다.
- [1154] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 독소 및 약물 유출 수송체의 억제제를 포함한다.
- [1155] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 독소 및 용해도 증가 모이어티를 포함한다.
- [1156] 즉, 항체-링커 접합체는 2개의 페이로드를 포함할 수 있으며, 여기서 제1 페이로드는 독소이고, 제2 페이로드는 용해도 증가 모이어티이다. 대안적으로, 항체-링커 접합체는 링커의 아지드-포함 연결 모이어티에 독소를 클릭하고 동일한 링커의 시스템인 측쇄에 말레이미드-포함 용해도 증가 모이어티를 클릭함으로써 수득될 수 있다. 대안적으로, 독소 및/또는 용해도 증가 모이어티는 링커에 화학적 합성에 의해 부착될 수 있다.
- [1157] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 독소 및 면역자극제를 포함한다.
- [1158] 본원에서 사용된 바와 같이 문맥에 따라, 용어 "면역자극제 (immunostimulatory agent)"는 항원에 대한 대상체의 면역 반응을 증가시키는 화합물을 포함한다. 면역자극제의 예로는 면역 자극제 (immune stimulants) 및 면역 세포 활성화 화합물을 포함한다. 본 발명의 항체-링커 접합체는 면역 세포가 리간드를 인식하고 항원 제시를 증진하도록 프로그래밍하는 것을 보조하는 면역자극제를 함유할 수 있다. 면역 세포 활성화 화합물은 Toll-유사 수용체 (TLR) 효능제를 포함한다. 이러한 효능제는 병원체 관련 분자 패턴 (PAMPs), 예컨대 감염-모방 조성물 예컨대 박테리아-유래 면역조절제 (일명 위험 신호) 및 손상 관련 분자 패턴 (DAMPs), 예컨대 스트레스를 받거나 또는 손상된 세포를 모방하는 조성물을 포함한다. TLR 효능제는 핵산 또는 지질 조성물 (예를 들어, 모노포스포릴 지질 A (MPLA))을 포함한다. 일례에서, TLR 효능제는 TLR9 효능제 예컨대 시토신-구아노신 올리고뉴클레오티드 (CpG-ODN), 폴리(에틸렌이민) (PEI)-축합 올리고뉴클레오티드 (ODN) 예컨대 PEI-CpG-ODN, 또는 이중 가닥 데옥시리보핵산 (DNA)을 포함한다. 다른 예에서, TLR 효능제는 TLR3 효능제 예컨대 폴리이노신-폴리시티딜산 (폴리 (I:C)), PEI-폴리 (I:C), 폴리아데닐산-폴리우리딜산 (폴리 (A:U)), PEI-폴리 (A:U), 또는 이중 가닥 리보핵산 (RNA)을 포함한다. 다른 예시되는 백신 면역자극 화합물은 리포폴리사카라이드 (LPS), 케모카인/사이토카인, 진균성 베타-글루칸 (예컨대 렌티난), 이미퀴모드, CRX-527 및 OM-174를 포함한다.

- [1159] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 2개의 상이한 면역자극제를 포함한다.
- [1160] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 적어도 하나의 면역자극제는 TLR 효능제이다.
- [1161] 본원에서 사용된, 용어 "TLR 효능제 (TLR agonist)"는 직접적인 리간드로서 또는 간접적으로 내인성 또는 외인성의 생성을 통해, TLR 신호전달 경로를 통해 신호전달 반응을 유발할 수 있는 분자를 지칭한다. TLR 수용체의 효능적 리간드 (agonistic ligands)는 (i) 실제 TLR 수용체의 천연 리간드, 또는 TLR 수용체에 결합하여 이에 공동-자극 신호를 유도하는 능력을 보존하는 이의 기능적으로 동등한 변이체, 또는 (ii) TLR 수용체에 대한 효능제 항체, 또는 TLR 수용체, 더 구체적으로 상기 수용체의 세포외 도메인에 특이적으로 결합할 수 있고 이러한 수용체 및 관련 단백질에 의해 제어되는 면역 신호의 일부를 유도할 수 있는 이의 기능적으로 동등한 변이체이다. 결합 특이성은 인간 TLR 수용체 또는 상이한 종들 중 인간의 것과 상동인 TLR 수용체에 대한 것일 수 있다.
- [1162] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 항체-링커 접합체는 방사성핵종 및 형광 염료를 포함한다.
- [1163] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체에 관한 것으로서, 여기서 방사성핵종은 단층 촬영, 구체적으로 단일-광자 방출 컴퓨터 단층 촬영 (single-photon emission computed tomography: SPECT) 또는 양전자 방출 단층 촬영 (positron emission tomography: PET)에 사용하기에 적합한 방사성핵종이고, 상기 형광 염료는 근적외선 형광 염료이다.
- [1164] 본원에서 사용된 용어 "방사성핵종 (radionuclide)"은 방사성 핵종 (radioactive nuclide), 방사성동위원소 (radioisotope) 또는 방사성 동위원소 (radioactive isotope)와 동일한 의미를 갖는다.
- [1165] 방사성핵종은 바람직하게는 핵의학 분자 영상화 기술(들), 예컨대 양전자 방출 단층 촬영 (PET), 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영 (SPECT), SPECT 및/또는 PET의 하이브리드 또는 이들의 조합에 의해 검출 가능하다. 본원에서 SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)는 PS (planar scintigraphy)를 포함한다.
- [1166] SPECT 및/또는 PET의 하이브리드는 예를 들어 SPECT/CT, PET/CT, PET/IRM 또는 SPECT/IRM이다.
- [1167] SPECT 및 PET는 대상체의 신체에 도입된 방사성핵종의 농도 (또는 흡수)에 대한 정보를 수집한다. PET는 양전자-방출 방사성핵종에 의해 간접적으로 방출되는 감마선 쌍을 감지하여 영상을 생성한다. PET 분석은 관심 영역 (예를 들어, 뇌, 유방, 간 등)에 대해 신체의 일련의 얇은 슬라이스 영상 (slice images)을 생성한다. 이러한 얇은 슬라이스 영상은 검사 영역의 3차원 표시로 조립될 수 있다. SPECT는 PET와 유사하지만, SPECT에 사용되는 방사성 물질은 PET에 사용되는 것보다 붕괴 시간이 더 길고, 이중 감마선 대신 단일 감마선을 방출한다. SPECT 영상은 PET 영상보다 감도가 더 낮고 상세하지 않지만, SPECT 기술은 PET보다 훨씬 저렴하고, 입자 가속기에 근접할 필요가 없다는 이점을 제공한다. 실제 임상 PET는 SPECT보다 더 높은 감도 및 더 양호한 공간 분해능을 나타내며, 높은 광자 에너지로 인해 정확한 감쇠 보정의 이점을 제시하며; 따라서 PET는 SPECT보다 더 정확한 정량적 데이터를 제공한다. PS (planar scintigraphy)는 동일한 방사성핵종을 사용한다는 점에서 SPECT와 유사하다. 그러나, PS는 2D-정보만을 생성한다.
- [1168] SPECT는 국소 방사성추적자 흡수 (local radiotracer uptake)에 대한 컴퓨터-생성 영상을 생성하는 반면에, CT는 인체의 X선 밀도에 대한 3D 해부학적 영상을 생성한다. 조합된 SPECT/CT 영상화는 단일 검사 중에 취득된, SPECT로부터의 기능적 정보 및 CT로부터의 해부학적 정보를 순차적으로 제공한다. CT 데이터는 또한 단일 광자 방출 데이터의 신속하고 최적의 감쇠 보정에 사용된다. 비정상적 및/또는 생리학적 추적자 흡수 영역을 정확하게 국소화함으로써, SPECT/CT는 감도 및 특이성을 개선할 뿐만 아니라, 정확한 선량 측정을 달성하고 중재 절차를 가이드하거나 또는 외부 빔 방사선 요법을 위한 표적 체적을 더 잘 정의하는데 보조할 수 있다. 단일 광자 방출 방사성추적자를 사용한 감마 카메라 영상화 (gamma camera imaging)가 대부분의 절차를 나타낸다.
- [1169] 상기 방사성핵종은 테크네튬 (technetium)-99m (^{99m}Tc), 갈륨 (gallium)-67 (^{67}Ga), 갈륨 (gallium)-68 (^{68}Ga), 이트륨 (yttrium)-90 (^{90}Y), 인듐 (indium)-111 (^{111}In), 레늄 (rhenium)-186 (^{186}Re), 불소 (fluorine)-18 (^{18}F), 구리 (copper)-64 (^{64}Cu), 테르븀 (terbium)-149 (^{149}Tb) 또는 탈륨 (thallium)-201 (^{201}Tl)로 구성된 그룹에서 선택될 수 있다. 방사성핵종은 분자 내에 포함되거나 또는 킬레이트제에 결합될 수 있다.

- [1170] 특정 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 추가의 약학적으로 허용 가능한 성분을 포함하는 본 발명에 따른 약학 조성물에 관한 것이다.
- [1171] 즉, 본 발명은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것으로서, 바람직하게는 항체-링커 접합체는 페이로드를 포함한다.
- [1172] 약학적으로 허용 가능한 성분은 활성 성분 이외에, 대상체에게 무독성인, 약학적 제제 중의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 성분은 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [1173] 본원에 기재된 항체-링커 접합체의 약학적 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 이러한 접합체를 하나 이상의 선택적 약학적으로 허용 가능한 성분과 혼합하여 (Flemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)), 동결건조 제제 또는 수성 용액의 형태로 제조된다. 약학적으로 허용 가능한 성분은 일반적으로 사용된 투여량 및 농도에서 수혜자에게 무독성이며, 하기를 포함하지만 이에 한정되지 않는다: 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 핵사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물; 킬레이트제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예컨대 Zn 단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 본원에서 예시되는 약학적으로 허용 가능한 성분은 간질 약물 분산제 (interstitial drug dispersion agents) 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는, 특정한 예시되는 sHASEGPs 및 사용 방법이 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 개시되어 있다. 일 양상에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제 예컨대 콘드로이티나제 (chondroitinases)와 조합된다.
- [1174] 특정 구체예에서, 본 발명은 치료 및/또는 진단에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 또는 본 발명에 따른 약학 조성물에 관한 것이다.
- [1175] 즉, 본 발명의 항체-링커 접합체는 대상체의 치료 또는 대상체의 질병 또는 병태를 진단하는데 사용될 수 있다. 개체 또는 대상체는 포유동물이다. 포유동물에는 가축 (예컨대, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예컨대, 인간 및 비-인간 영장류 예컨대 마카크 (macaques)), 토끼, 및 설치류 (예컨대, 마우스 및 래트)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 소정의 구체예에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [1176] 특정 구체예에서, 본 발명은 신생물 질환, 신경계 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환을
- [1177] 앓고 있고,
- [1178] 발병 위험이 있으며, 및/또는
- [1179] 진단받은
- [1180] 환자의 치료에 사용하기 위한, 또는 이러한 병태의 예방을 위한, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 또는 본 발명에 따른 약학 조성물에 관한 것이다.
- [1181] 특정 구체예에서, 본 발명은 신생물 질환을 앓고 있는 환자의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 또는 본 발명에 따른 약학 조성물에 관한 것이다.
- [1182] 본원에서 사용된 용어 "신생물 질환 (neoplastic disease)"은 세포 성장이 제어되지 않고 비정상적인 것을 특징으로 하는 병태를 지칭한다. 신생물 질환에는 암을 포함한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 암의 보다 구체적인 예는 유방암, 전립선암, 결장암, 편평세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 난소암, 자궁경부암 (cervical cancer), 위장관암, 췌장암, 교모세포종, 간암, 방광암, 간암, 결장직장암, 자궁 경부암 (uterine cervical cancer), 자궁내막 암종, 침샘 암종, 신장암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 피부암, 흑색종, 뇌암, 난소암, 신경아세포종, 골수종, 다양한 타입의 두경부암,

급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 유잉 육종 (Ewing sarcoma) 및 말초 신경상피종을 포함한다. 바람직한 암은 간암, 림프종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 유잉 육종 및 말초 신경상피종을 포함한다.

- [1183] 즉, 본 발명의 항체-링커 접합체는 바람직하게는 암 치료에 사용된다. 이와 같이, 소정의 구체예에서, 항체-링커 접합체는 종양 세포 상에 존재하는 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 소정의 구체예에서, 항원은 종양 세포 표면 상의 항원일 수 있다. 소정의 구체예에서, 종양 세포 표면 상의 항원은 항체-링커 접합체가 항원에 결합할 때 항체-링커 접합체와 함께 세포 내로 내재화될 수 있다.
- [1184] 항체-링커 접합체가 암 치료에 사용되는 경우, 항체-링커 접합체가 결합하는 종양 세포를 사멸시키거나 또는 증식을 억제할 가능성이 있는 적어도 하나의 페이로드를 상기 항체-링커 접합체가 포함하는 것이 바람직하다. 소정의 구체예에서, 적어도 하나의 페이로드는 항체-링커 접합체가 종양 세포 내로 내재화된 후에 이의 세포독성 활성을 나타낸다. 소정의 구체예에서, 적어도 하나의 페이로드는 독소이다.
- [1185] 본 발명의 다른 양상에 따르면, 신생물 질환을 치료 또는 예방하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 상기 설명에 따른 항체-링커 접합체, 상기 설명에 따른 약학 조성물, 또는 상기 설명에 따른 생성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1186] 염증성 질환은 자가면역 질환일 수 있다. 감염성 질환은 박테리아 감염 또는 바이러스 감염일 수 있다.
- [1187] 특정 구체예에서, 본 발명은 수술 전, 수술 중 또는 수술 후 영상화에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 또는 본 발명에 따른 약학 조성물에 관한 것이다.
- [1188] 즉, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 영상화에 사용될 수 있다. 이를 위해, 항체-링커 접합체는 특정 표적 분자, 세포 또는 조직에 결합하면서 시각화될 수 있다. 특정 페이로드를 시각화하기 위한 다양한 기술이 당해 기술 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 페이로드가 방사성핵종인 경우, 항체-링커 접합체가 결합하는 분자, 세포 또는 조직을 PET 또는 SPECT로 시각화할 수 있다. 페이로드가 형광 염료인 경우, 항체-링커 접합체가 결합하는 분자, 세포 또는 조직은 형광 영상화로 시각화될 수 있다. 소정의 구체예에서, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체는 2개의 상이한 페이로드, 예를 들어 방사성핵종 및 형광 염료를 포함한다. 이러한 경우에, 항체-링커 접합체가 결합하는 분자, 세포 또는 조직은 2가지의 상이하고 및/또는 보완적인 영상화 기술, 예를 들어 PET/SPECT 및 형광 영상화를 사용하여 시각화될 수 있다.
- [1189] 항체-링커 접합체는 수술 전, 수술 중 및/또는 수술 후 영상화에 사용될 수 있다.
- [1190] 수술 전 영상화 (pre-operative imaging)는 특정 질병 또는 병태를 진단하는 경우 특정 표적 분자, 세포 또는 조직을 시각화하여 선택적으로 수술을 위한 가이드를 제공하기 위해, 수술 전에 수행할 수 있는 모든 영상화 기술을 포함한다. 수술 전 영상화는 종양 상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하고 방사성핵종을 포함하는 페이로드에 결합된 항체-링커 접합체를 사용하여 수술이 수행되기 전에 PET 또는 SPECT로 종양을 시각화하는 단계를 포함할 수 있다.
- [1191] 수술 중 영상화 (intra-operative imaging)는 특정 표적 분자, 세포 또는 조직을 시각화하여 수술에 대한 가이드를 제공하기 위해 수술 중에 수행될 수 있는 모든 영상화 기술을 포함한다. 소정의 구체예에서, 근적외선 형광 염료를 포함하는 항체-링커 접합체는 근적외선 형광 영상화에 의해 수술 중에 종양을 시각화하는데 사용될 수 있다. 수술 중 영상화를 통해 외과의는 수술 중 특정 조직, 예를 들어 종양 조직을 확인할 수 있으므로, 종양 조직을 완전히 제거할 수 있다.
- [1192] 수술 후 영상화 (post-operative imaging)는 특정 표적 분자, 세포 또는 조직을 시각화하고 수술 결과를 평가하기 위해 수술 후 수행될 수 있는 모든 영상화 기술을 포함한다. 수술 후 영상화는 수술 전 수술과 유사하게 수행될 수 있다.
- [1193] 소정의 구체예에서, 본 발명은 2개 이상의 상이한 페이로드를 포함하는 항체-링커 접합체에 관한 것이다. 예를 들어, 항체-링커 접합체는 방사성핵종 및 근적외선 형광 염료를 포함할 수 있다. 이러한 항체-페이로드 접합체는 PET/SPECT에 의한 영상화 및 근적외선 형광 영상화에 사용될 수 있다. 이러한 항체의 이점은 수술 전후에 PET 또는 SPECT에 의해 표적 조직, 예를 들어 종양을 시각화하는데 사용될 수 있다는 것이다. 동시에, 수술 중에 근적외선 형광 영상화에 의해 종양을 시각화할 수 있다.
- [1194] 특정 구체예에서, 본 발명은 수술 중 영상-가이드 암 수술 (intraoperative imaging-guided cancer surgery)에

사용하기 위한 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 또는 본 발명에 따른 약학 조성물에 관한 것이다.

- [1195] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 항체-링커 접합체는 표적 분자, 세포 또는 조직을 시각화하고 수술 중에 외과의 또는 로봇을 가이드하는데 사용될 수 있다. 즉, 항체-링커 접합체를 사용하여 수술 중에 예를 들어 근적외선 영상화에 의해 종양 조직을 시각화하고 종양 조직의 완전한 제거를 가능하게 할 수 있다.
- [1196] 특정 구체예에서, 본 발명은 신생물 질환, 신경계 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환을
- [1197]  앓고 있고,
- [1198]  발병 위험이 있으며, 및/또는
- [1199]  진단받은
- [1200] 환자의 치료용 약제의 제조를 위한, 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 또는 본 발명에 따른 약학 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [1201] 특정 구체예에서, 본 발명은 신생물 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 항체-링커 접합체 또는 본 발명에 따른 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1202] 상기 접합체 또는 생성물은 인간 또는 동물 대상체에게 상기 질환을 효율적으로 치료하는 양 또는 투여량으로 투여된다. 대안적으로, 해당하는 치료 방법이 제공된다.
- [1203] 본 발명의 항체-링커 접합체는 비경구, 폐내 및 비강내를 포함하는 임의의 적절한 수단에 의해 투여될 수 있고, 국소 치료를 목적하는 경우, 병변내 (intralesional), 자궁내 (intrauterine) 또는 방광내 (intravesical) 투여를 포함할 수 있다. 비경구 주입 (parenteral infusions)은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투약 (dosing)은 부분적으로 투여가 단기적 또는 장기적인지에 따라, 임의의 적절한 경로, 예를 들어 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행될 수 있다. 다양한 시점에 걸친 단일 또는 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 투약 일정이 본원에서 고려된다.
- [1204] 본 발명의 항체-링커 접합체는 본 발명의 방식이 우수한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제제화, 투약 및 투여될 수 있는 것과 같이 제제화, 투약 및 투여될 것이다. 이러한 맥락에서 고려해야 할 요인에는 치료할 특정 장애, 치료할 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 실무자에게 알려진 다른 요인을 포함한다. 항체-링커 접합체는 그럴 필요는 없지만, 선택적으로 해당 장애를 예방 또는 치료하기 위해 현재 사용되는 하나 이상의 제제와 제제화된다. 이러한 다른 제제의 유효량은 제제에 존재하는 항체-링커 접합체의 양, 장애 또는 치료의 타입, 및 상기에서 논의된 다른 요인에 따라 좌우된다. 이들은 일반적으로 본원에 기재된 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%, 또는 실증적으로/임상적으로 적절하다고 결정되는 임의의 투여량 및 임의의 경로로 사용된다.
- [1205] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체-링커 접합체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가 치료제와 조합하여 사용되는 경우)은 치료할 질병의 타입, 항체-페이로드 접합체의 타입, 질병의 중증도 및 경과, 항체-링커 접합체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전 요법, 환자의 임상 병력 및 항체-링커 접합체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 좌우될 것이다. 항체-링커 접합체는 환자에게 한 번에 또는 일련의 치료로 적절하게 투여된다.

도면의 간단한 설명

- [1206] 도 1은 본 발명의 일 양상의 예시를 보여준다. MTG = 미생물 트랜스글루타미나제. 별 (star) 기호는 페이로드 또는 연결 모이어티 B를 나타낸다. 펩티드내 N-말단에 있는 Aax 잔기는 MTG에 대한 기질이다. 이러한 과정을 통해 N297에서 글리코실화를 유지할 수 있음에 유의한다. B/star가 연결 모이어티인 경우, 실제 페이로드가 여전히 이러한 모이어티에 접합되어야 함에 유의한다.

도 2는 실시예 2-5에서 글리코실화 항체에 접합된 링커를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [1207] 실시예

[1208] 본 발명이 도면 및 전술한 설명에서 상세하게 예시 및 설명되었지만, 이러한 예시 및 설명은 제한적이 아닌 예시적이거나 또는 실증적인 것으로 간주되어야 하며; 본 발명은 개시된 구체예에 제한되지 않는다. 청구된 발명을 실시함에 있어서, 도면, 개시내용, 및 첨부된 청구범위의 연구로부터, 개시된 구체예에 대한 다른 변형이 당업자에 의해 이해되고 수행될 수 있다. 청구범위에서, 단어 "포함하는 (comprising)"은 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않으며, 부정관사 "a" 또는 "an"은 복수를 배제하지 않는다. 특정한 조치가 서로 다른 종속항에 인용되어 있다는 단순한 사실은 이러한 조치들의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것을 나타내지는 않는다. 청구범위에서의 임의의 참조 기호는 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[1209] **실시예 1: 접합 효율**

[1210] 링커는 제조자의 지시에 따라 수득하고 적절한 스톱 농도 (예: 25 mM)로 용해하여 사용하고, 분취액을 준비하여, -20℃에서 보관하였다. 2개의 IgG-서브클래스 항체 (항체 1: 항 Her2 IgG1, 항체 2: 항 CD38 IgG1)는 하기와 같이 변형된다: 5 mg/mL의 비-데글리코실화 항체 (~33.33 μM)를 20 몰 당량의 아미노산-기반 링커 (즉, ~667 μM), 3 U/mg의 항체 및 적절한 버퍼와 혼합하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 20시간 동안 인큐베이션한 다음에, 환원 조건하에 LC-MS 분석을 수행하였다. 해당 실시예에 나타난 바와 같이 다른 반응 조건을 사용하였다.

[1211] **실시예 2: N-말단 (변형된) 아미노산의 1차 아민을 통한 네이티브, 비-조작된 글리코실화 항체 (항 Her2 IgG)에 대한 펩티드 링커의 접합**

[1212] 서열의 시작 부분 (N-말단)에 다양한 아미노산 유도체를 갖는 링커를 접합에 사용하였다.

[1213] **방법**

[1214] 항체 트라스투주맙 (Herceptin®, Roche, 약국에서 구입) 뿐만 아니라 모든 펩티드 링커 (LifeTein LLC로부터 구입)는 상업적으로 입수 가능하였다.

[1215] 펩티드 링커 (구조에 대해서는 도 2 참조)의 접합을 위해, 50 mM Tris pH 7.6 중 5 mg/mL의 네이티브, 글리코실화 모노클로날 항체, 50 mM Tris pH 7.6 또는 물 중 3 U/mg 농도의 미생물 트란스글루타미나제 (MTG, Zedira), 및 표시된 펩티드 링커의 20 몰 당량을 사용하고, 회전 열혼합기 (rotating thermomixer)에서 37℃로 24시간 동안 인큐베이션하였다. 접합 효율은 DTT 환원 조건하에 LC-MS에 의해 평가하였다. 50 mM DTT (최종) 및 50 mM Tris 버퍼에서 37℃에서 15분 동안 항체-링커-접합체 (ALCs)를 인큐베이션하여 샘플의 환원을 달성하였다. Acquity UPLC H-Class System (Waters) 및 ACQUITY UPLC BEH C18 컬럼에 커플링된 Xevo G2-XS QTOF (Waters)에서 프로브를 분석하였다. 접합 효율 (conjugation efficiency: CE)은 디컨볼루션된 스펙트럼 (deconvoluted spectra)으로부터 계산하였고, %로 표시하였다. 하기 식에 따라, 2개의 글리코형 (glycoforms) (G1F 및 G0F)으로부터 생성된 세기를 계산에 고려하였다.

$$CE \% = \frac{\sum((\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{cj})}{\sum(\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{cj,ncj}}$$

[1216]

[1217] 여기서 cj = 접합됨 및 ncj = 비-접합됨

[1218] **결과**

[1219] 놀랍게도, 1차 아민 및 제1 아미노산 (즉, N-말단 아미노산)의 카복실 기 사이에 알킬 (예: 메틸) 스페이서를 갖는 모든 펩티드는 유의미한 접합 효율을 제공하였다. 주목할만한 점은, 메틸 기의 길이나, 펩티드의 다음 (제2) 아미노산의 특성이 접합 효율에 유의미한 영향을 미치지 않았다는 것이다. 그러므로, 놀랍게도 1차 아민 및 제1 (N-말단) 아미노산의 카복시 기 사이에 알킬 스페이서를 갖는 임의의 펩티드가 네이티브, 글리코실화 항체를 접합시키는데 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다 (표 3). 1차 아민 및 C-알과 및/또는 카복시 기 사이에 알킬 (예: 메틸) 스페이서가 없는 펩티드는 글리코실화 항체에 접합될 수 없었다.

[1220] [표 3]

펩티드 링커의 접합 효율

펩티드 링커	명칭	항체에 대한 접합 효율 (%)
NH ₂ -C1-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 40)	NT24	99%
NH ₂ -C1-ARK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 39)	NT28	89%
NH ₂ -C2-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 42)	NT37	70%
NH ₂ -C3-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 44)	NT38	53%
NH ₂ -C4-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 46)	NT41	99%
NH ₂ -C5-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 48)	NT36	84%
NH ₂ -C6-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 50)	NT42	67%
NH ₂ -C4-ValCit-NH ₂ (서열 번호: 57)	NT39	67%
NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 58)	NT40	96%
NH ₂ -C5-ValCit-NH ₂ (서열 번호: 59)	NT43	83%
NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 60)	NT44	100%
NH ₂ -C6-ThrArg-NH ₂ (서열 번호: 83)	NT64	95%
NH ₂ -C6-IleArg-NH ₂ (서열 번호: 84)	NT65	96%
NH ₂ -C6-AspArg-NH ₂ (서열 번호: 85)	NT66	64%
NH ₂ -C6-TrpArg-NH ₂ (서열 번호: 86)	NT67	82%
AARK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 87)	-	0%
LGRC-NH ₂ (서열 번호: 88)	-	0%
VGRC-NH ₂ (서열 번호: 89)	-	0%
RGRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 90)	-	0%
SAGRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 91)	-	0%

[1221]

[1222] 사용된 명명법 C1, C2, C3, C4, C5 또는 C6에서, 번호 (1 내지 6)는 1차 아민 및 카복실 기 사이의 스페이스의 메틸렌 유닛의 수를 나타낸다. 즉, C1은 글리신의 스페이스에 해당하고, C2는 β-알라닌의 스페이스에 해당하며, C3은 4-아미노부티르산의 스페이스에 해당하고, C4는 5-아미노프토프온산의 스페이스에 해당하며, C5는 6-아미노헥사노산의 스페이스에 해당하고, C6은 7-아미노헵타노산의 스페이스에 해당한다.

[1223] **실시예 3: N-말단 (변형된) 아미노산의 1차 아민을 통한 네이티브, 비-조작된 글리코실화 항체 (항 CD38 IgG)에 대한 펩티드 링커의 접합**

[1224] 서열의 시작 부분 (N-말단)에 다양한 아미노산 유도체를 갖는 링커를 접합에 사용하였다.

[1225] 방법

[1226] 항체 다라투무맙 (Darzalex®, Janssen, 약국에서 구입) 뿐만 아니라 모든 펩티드 링커 (LifeTein LLC로부터 구입)는 상업적으로 입수 가능하였다.

[1227] 펩티드 링커 (구조에 대해서는 도 2 참조)의 접합을 위해, 50 mM Tris pH 7.6 중 5 mg/mL의 네이티브, 글리코실화 모노클로날 항체, 50 mM Tris pH 7.6 또는 물 중 3 U/mg 농도의 미생물 트란스글루타미나제 (MTG, Zedira), 및 표시된 펩티드 링커의 20 μl 당량을 사용하고, 회전 열혼합기에서 37°C로 24시간 동안 인큐베이션하였다. 접합 효율은 DTT 환원 조건하에 LC-MS에 의해 평가하였다. 50 mM DTT (최종) 및 50 mM Tris 버퍼에서 37°C에서 15분 동안 항체-링커-접합체 (ALCs)를 인큐베이션하여 샘플의 환원을 달성하였다. Acquity UPLC H-Class

System (Waters) 및 ACQUITY UPLC BEH C18 컬럼에 커플링된 Xevo G2-XS QTOF (Waters)에서 프로브를 분석하였다. 접합 효율 (CE)은 디컨볼루션된 스펙트럼으로부터 계산하였고, %로 표시하였다. 하기 식에 따라, 2개의 글리코형 (G1F 및 G0F)으로부터 생성된 세기를 계산에 고려하였다.

$$CE \% = \frac{\sum((Int(G0F + G1F))_{cj})}{\sum(Int(G0F + G1F))_{cj,ncj}}$$

여기서 cj = 접합됨 및 ncj = 비-접합됨

결과

놀랍게도, 1차 아민 및 제1 아미노산 (즉, N-말단 아미노산)의 카복실 기 사이에 알킬 (예: 메틸) 스페이서를 갖는 모든 펩티드는 유의미한 접합 효율을 제공하였다. 주목할만한 점은, 메틸 기의 길이나, 펩티드의 다음 (제2) 아미노산의 특성이 접합 효율에 유의미한 영향을 미치지 않았다는 것이다. 그러므로, 놀랍게도 1차 아민 및 제1 (N-말단) 아미노산의 카복시 기 사이에 알킬 스페이서를 갖는 임의의 펩티드가 네이티브, 글리코실화 항체를 접합시키는데 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다 (표 4).

[표 4]

펩티드 링커의 접합 효율

펩티드 링커	명칭	항체에 대한 접합 효율 (%)
NH ₂ -C1-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 40)	NT24	95%
NH ₂ -C4-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 46)	NT41	98%
NH ₂ -C5-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 48)	NT36	93%
NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 58)	NT40	89%
NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 60)	NT44	95%
NH ₂ -C6-ThrArg-NH ₂ (서열 번호: 83)	NT64	93%
NH ₂ -C6-IleArg-NH ₂ (서열 번호: 84)	NT65	95%
NH ₂ -C6-AspArg-NH ₂ (서열 번호: 85)	NT66	66%
NH ₂ -C6-TrpArg-NH ₂ (서열 번호: 86)	NT67	83%

사용된 명명법 C1, C2, C3, C4, C5 또는 C6에서, 번호 (1 내지 6)는 1차 아민 및 카복실 기 사이의 스페이서의 메틸렌 유닛의 수를 나타낸다. 즉, C1은 글리신의 스페이서에 해당하고, C2는 β-알라닌의 스페이서에 해당하며, C3은 4-아미노부티르산의 스페이서에 해당하고, C4는 5-아미노프로피온산의 스페이서에 해당하며, C5는 6-아미노헥사노산의 스페이서에 해당하고, C6은 7-아미노헵타노산의 스페이서에 해당한다.

실시예 4: 다른 반응 조건 (조건 2)을 사용한 펩티드 링커의 접합

링커와의 접합이 반응 조건의 변화를 견딜 수 있음을 입증하기 위해, 일부 파라미터 (링커 당량, MTG 양, 항체 농도, 반응 시간)를 변경하였다.

방법

항체 트라스투주맙 (Herceptin®, Roche, 약국에서 구입) 뿐만 아니라 모든 펩티드 링커 (LifeTein LLC로부터 구입)는 상업적으로 입수 가능하였다.

펩티드 링커 (구조에 대해서는 도 2 참조)의 접합을 위해, 50 mM Tris pH 7.6 중 1 mg/mL의 네이티브, 글리코실화 모노클로날 항체, 50 mM Tris pH 7.6 또는 물 중 6 U/mg 농도의 미생물 트란스글루타미나제 (MTG, Zedira), 및 표시된 펩티드 링커의 80 몰 당량을 사용하고, 회전 열혼합기에서 37°C로 20시간 동안 인큐베이션하였다.

이는 "조건 2"로 정의한다. 접합 효율은 DTT 환원 조건하에 LC-MS에 의해 평가하였다. 50 mM DTT (최종) 및 50 mM Tris 버퍼에서 37℃에서 15분 동안 항체-링커-접합체 (ALCs)를 인큐베이션하여 샘플의 환원을 달성하였다. Acquity UPLC H-Class System (Waters) 및 ACQUITY UPLC BEH C18 컬럼에 커플링된 Xevo G2-XS QTOF (Waters)에서 프로브를 분석하였다. 접합 효율 (CE)은 디컨볼루션된 스펙트럼으로부터 계산하였고, %로 표시하였다. 하기 식에 따라, 2개의 글리코형 (G1F 및 G0F)으로부터 생성된 세기를 계산에 고려하였다.

$$CE \% = \frac{\sum (Int(G0F + G1F))_{cj}}{\sum (Int(G0F + G1F))_{cj,ncj}}$$

여기서 cj = 접합됨 및 ncj = 비-접합됨

결과

모든 펩티드 링커는 유의미한 접합 효율로 접합되었고 (표 5), 이는 링커가 광범위한 반응 조건을 견딜 수 있음을 시사한다. 전반적으로, 실시예 3에서의 조건은 더 높은 접합 효율을 수득하였다 (즉, 6 U/mg 미만의 효소, 1 mg/ml 초과 항체 농도 및 80 μl 당량 미만의 펩티드 링커를 사용하여 더 우수한 결과를 수득하였다).

[표 5]

조건 2를 사용한 펩티드 링커의 접합 효율

펩티드 링커	명칭	조건 2를 사용한 항체에 대한 접합 효율 (%)
NH ₂ -C1-GRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 40)	NT24	78%
NH ₂ -C2-GRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 42)	NT37	38%
NH ₂ -C3-GRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 44)	NT38	36%
NH ₂ -C4-GRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 46)	NT41	70%
NH ₂ -C5-GRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 48)	NT36	56%
NH ₂ -C6-GRK(N ₃)-NH ₂ (서열 번호: 50)	NT42	38%
NH ₂ -C4-ValCit-NH ₂ (서열 번호: 57)	NT39	63%
NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 58)	NT40	83%
NH ₂ -C5-ValCit-NH ₂ (서열 번호: 59)	NT43	79%
NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 60)	NT44	88%

사용된 명명법 C1, C2, C3, C4, C5 또는 C6에서, 번호 (1 내지 6)는 1차 아민 및 카복실 기 사이의 스페이스의 메틸렌 유닛의 수를 나타낸다. 즉, C1은 글리신의 스페이스에 해당하고, C2는 β-알라닌의 스페이스에 해당하며, C3은 4-아미노부티르산의 스페이스에 해당하고, C4는 5-아미노프로피온산의 스페이스에 해당하며, C5는 6-아미노헥사노산의 스페이스에 해당하고, C6은 7-아미노헵타노산의 스페이스에 해당한다.

실시예 5: 다른 반응 조건 (조건 3)을 사용한 펩티드 링커의 접합

링커와의 접합이 반응 조건의 변화를 견딜 수 있음을 입증하기 위해, 일부 파라미터 (링커 당량, MTG 양, 항체 농도, 반응 시간)를 변경하였다.

방법

항체 트라스투주맙 및 다라투무맙 (Herceptin®, Roche, 및 Darzalex®, Janssen, 약국에서 구입) 뿐만 아니라 모든 펩티드 링커 (LifeTein LLC로부터 구입)는 상업적으로 입수 가능하였다.

펩티드 링커 (구조에 대해서는 도 2 참조)의 접합을 위해, 50 mM Tris pH 7.6 중 5 mg/mL의 네이티브, 글리코실화 모노클로날 항체, 50 mM Tris pH 7.6 또는 물 중 3 U/mg 농도의 미생물 트란스글루타미나제 (MTG, Zedira),

및 표시된 펩티드 링커의 5 몰 당량을 사용하고, 회전 열혼합기에서 37℃로 24시간 동안 인큐베이션하였다. 이는 "조건 3"으로 정의한다. 접합 효율은 DTT 환원 조건하에 LC-MS에 의해 평가하였다. 50 mM DTT (최종) 및 50 mM Tris 버퍼에서 37℃에서 15분 동안 항체-링커-접합체 (ALCs)를 인큐베이션하여 샘플의 환원을 달성하였다. Acquity UPLC H-Class System (Waters) 및 ACQUITY UPLC BEH C18 컬럼에 커플링된 Xevo G2-XS QTOF (Waters)에서 프로브를 분석하였다. 접합 효율 (CE)은 디킨블루선된 스펙트럼으로부터 계산하였고, %로 표시하였다. 하기 식에 따라, 2개의 글리코형 (G1F 및 G0F)으로부터 생성된 세기를 계산에 고려하였다.

$$CE \% = \frac{\sum (Int(G0F + G1F))_{cj}}{\sum (Int(G0F + G1F))_{cj,ncj}}$$

여기서 cj = 접합됨 및 ncj = 비-접합됨

결과

5 eq의 낮은 펩티드 링커만 사용하는 경우에도, 모든 펩티드 링커는 유의미한 접합 효율로 접합되었다 (표 6).

[표 6]

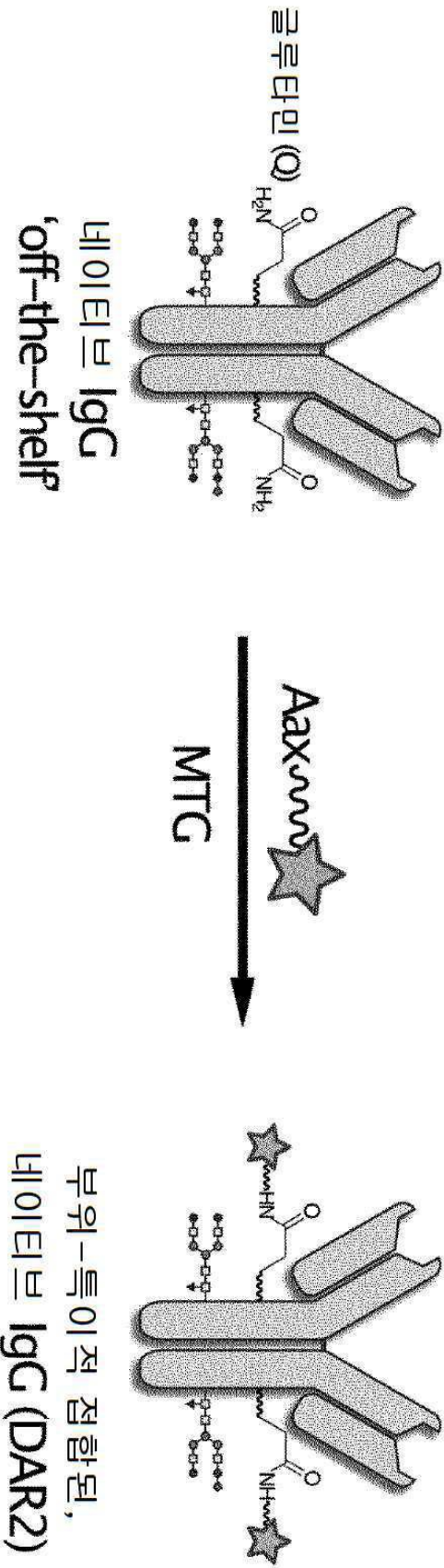
조건 3을 사용한 펩티드 링커의 접합 효율

펩티드 링커	명칭	조건 3을 사용한 트라스투주맙에 대한 접합 효율(%)	조건 3을 사용한 다라투무맙에 대한 접합 효율(%)
NH ₂ -C1-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 40)	NT24	97%	89%
NH ₂ -C4-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 46)	NT41	88%	88%
NH ₂ -C5-GRK(N3)-NH ₂ (서열 번호: 48)	NT36	75%	72%
NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 58)	NT40	58%	51%
NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (서열 번호: 60)	NT44	77%	73%
NH ₂ -C6-ThrArg-NH ₂ (서열 번호: 83)	NT64	92%	92%
NH ₂ -C6-IleArg-NH ₂ (서열 번호: 84)	NT65	78%	79%

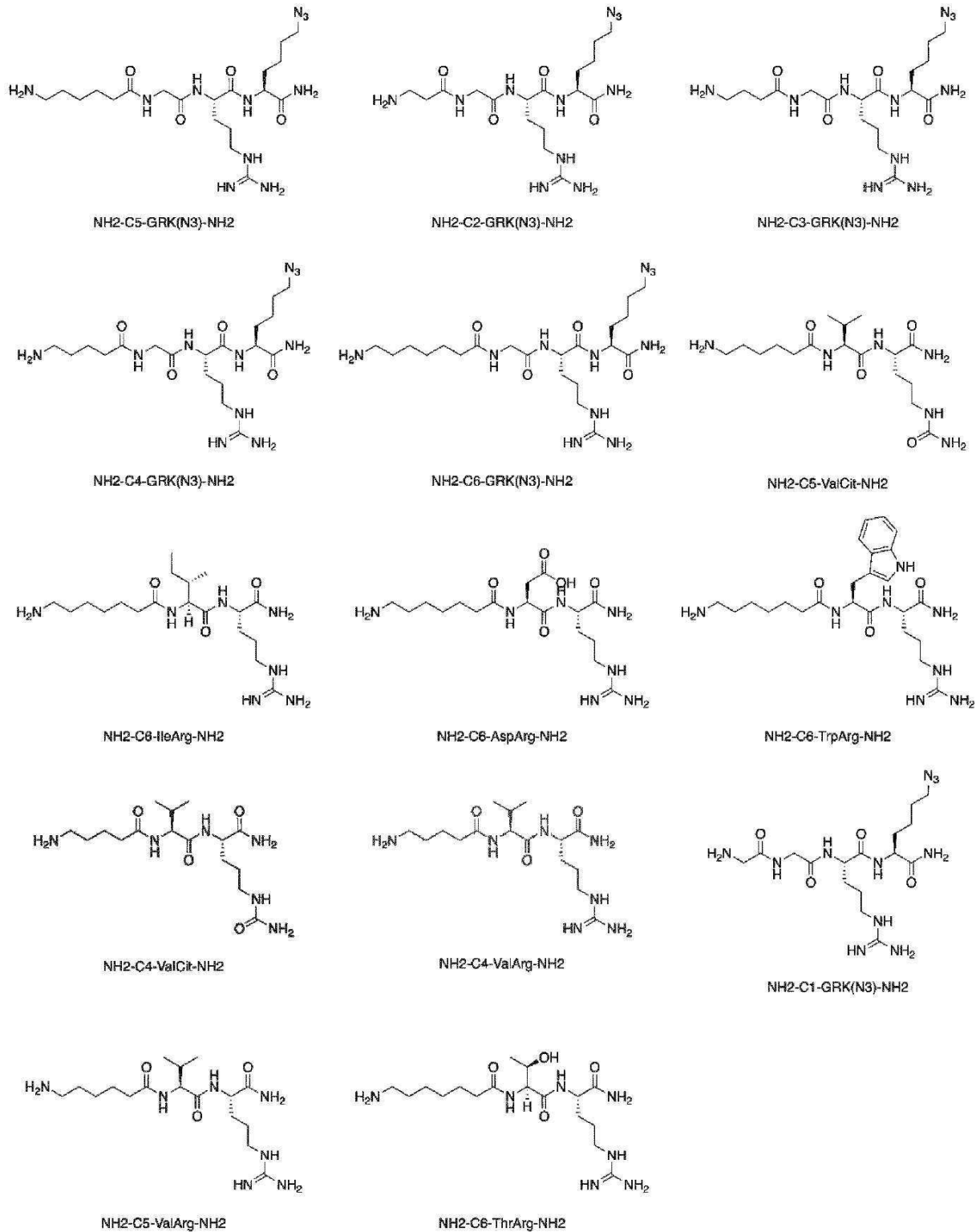
사용된 명명법 C1, C2, C3, C4, C5 또는 C6에서, 번호 (1 내지 6)는 1차 아민 및 카복실 기 사이의 스페이서의 메틸렌 유닛의 수를 나타낸다. 즉, C1은 글리신의 스페이서에 해당하고, C2는 β-알라닌의 스페이서에 해당하며, C3은 4-아미노부티르산의 스페이서에 해당하고, C4는 5-아미노프로피온산의 스페이서에 해당하며, C5는 6-아미노헥사노산의 스페이서에 해당하고, C6은 7-아미노헵타노산의 스페이서에 해당한다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Araris Biotech AG

<120> TRANSGLUTAMINASE CONJUGATION METHOD WITH AMINO ACID-BASED LINKERS

<130> AD3002 PCT BS

<140> EP20197056.3

<141> 2020-09-18

<160> 86

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptomyces mobaraensis MTG Zedira

<400> 1

Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro

1 5 10 15

Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu

20 25 30

Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His

35 40 45

Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu

50 55 60

Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro

65 70 75 80

Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn

85 90 95

Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe

100 105 110

Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln

115 120 125

Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala

130 135 140

His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn

145 150 155 160

Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser
165 170 175
Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His
180 185 190
Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser
195 200 205
Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro

210 215 220
Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg
225 230 235 240
Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val
245 250 255
Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp
260 265 270
Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser

275 280 285
Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu
290 295 300
Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro
305 310 315 320
Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
325 330 335

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptomyces mobaraensis

<400> 2

Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Glu Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15
Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu

20 25 30
 Thr Ile Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His
 35 40 45
 Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu

 50 55 60
 Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro
 65 70 75 80
 Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Phe Phe Asp Glu Asp Lys Tyr Lys Asn
 85 90 95
 Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe
 100 105 110
 Glu Gly Arg Val Ala Lys Asp Ser Phe Asp Glu Ala Lys Gly Phe Gln

 115 120 125
 Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala
 130 135 140
 His Asp Glu Gly Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn
 145 150 155 160
 Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser
 165 170 175
 Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Asp Arg Asn Gly Gly Asn His

 180 185 190
 Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser
 195 200 205
 Gly Gln Asp Arg Ser Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro
 210 215 220
 Glu Ala Phe Arg Pro Asp Arg Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg
 225 230 235 240
 Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Ser Phe Val

 245 250 255
 Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp
 260 265 270

Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser
275 280 285

Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Asp
290 295 300

Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Val Thr Phe Val Pro

305 310 315 320

Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Thr Gln Gly Trp Pro
325 330 335

<210> 3

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptomyces mobaraensis MTG P81453

<400> 3

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp

20 25 30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

35 40 45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp

65 70 75 80

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr

85 90 95

Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg

100 105 110

Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met

115 120 125

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr

130 135 140
 Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser

 145 150 155 160
 Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg

 165 170 175
 Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser

 180 185 190
 Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val

 195 200 205
 Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp

 210 215 220
 Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu
 225 230 235 240
 Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe

 245 250 255
 Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val

 260 265 270
 Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala

 275 280 285
 Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly

 290 295 300
 Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro
 305 310 315 320
 Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly

 325 330 335
 Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn

 340 345 350
 His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu

 355 360 365
 Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly

 370 375 380

Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp
 385 390 395 400
 Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
 405

<210> 4

<211> 395

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptovercillium ladakanum

<400> 4

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

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp
 50 55 60
 Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr
 65 70 75 80
 Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg
 85 90 95
 Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met
 100 105 110

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr
 115 120 125
 Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser
 130 135 140
 Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160
 Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser

165					170					175									
Phe	Asp	Glu	Glu	Lys	Gly	Phe	Gln	Arg	Ala	Arg	Glu	Val	Ala	Ser	Val				
180					185					190									
Met	Asn	Arg	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala	His	Asp	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Asp				
195					200					205									
Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Ala	Asn	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Arg	Asn	Glu				
210					215					220									
Asp	Ala	Arg	Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	Asn	Thr	Pro	Ser	Phe				
225					230					235					240				

Lys	Glu	Arg	Asn	Gly	Gly	Asn	His	Asp	Pro	Ser	Arg	Met	Lys	Ala	Val
				245					250					255	
Ile	Tyr	Ser	Lys	His	Phe	Trp	Ser	Gly	Gln	Asp	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala
			260					265					270		
Asp	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly
		275					280					285			
Thr	Gly	Leu	Val	Asp	Met	Ser	Arg	Asp	Arg	Asn	Ile	Pro	Arg	Ser	Pro
	290					295					300				

Thr	Ser	Pro	Gly	Glu	Gly	Phe	Val	Asn	Phe	Asp	Tyr	Gly	Trp	Phe	Gly
305					310					315					320
Ala	Gln	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Thr	Val	Trp	Thr	His	Gly	Asn
				325					330					335	
His	Tyr	His	Ala	Pro	Asn	Gly	Ser	Leu	Gly	Cys	His	Ala	Cys	Leu	Thr
			340					345					350		
Arg	Ala	Ser	Ser	Ala	Thr	Gly	Ser	Glu	Gly	Tyr	Ser	Asp	Phe	Asp	Arg
	355						360					365			

Gly Glu Pro Tyr Val Val Ser Pro Ser Pro Ser Pro Arg Met Leu Glu
370 375 380

His Arg Pro Arg Gln Gly Lys Ala Gly Leu Ala
385 390 395

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 1

<400> 5

Leu Leu Gln Gly Gly

1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 2

<400> 6

Leu Leu Gln Gly

1

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 3

<400> 7

Leu Ser Leu Ser Gln Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 4

<400> 8

Gly Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 5

<400> 9

Gly Leu Leu Gln Gly

1 5

<210> 10

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 6

<400> 10

Leu Leu Gln

1

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 7

<400> 11

Gly Ser Pro Leu Ala Gln Ser His Gly Gly

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 8

<400> 12

Gly Leu Leu Gln Gly Gly Gly

1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 9

<400> 13

Gly Leu Leu Gln Gly Gly

1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 10

<400> 14

Gly Leu Leu Gln

1

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 11

<400> 15

Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly Ala

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 12

<400> 16

Leu Leu Gln Gly Ala

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 13

<400> 17

Leu Leu Gln Tyr Gln Gly Ala

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 14

<400> 18

Leu Leu Gln Gly Ser Gly

1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 15

<400> 19

Leu Leu Gln Tyr Gln Gly

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 16

<400> 20

Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 17

<400> 21

Ser Leu Leu Gln Gly

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 18

<400> 22

Leu Leu Gln Leu Gln

1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 19

<400> 23

Leu Leu Gln Leu Leu Gln

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 20

<400> 24

Leu Leu Gln Gly Arg

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 21

<400> 25

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 22

<400> 26

Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 23

<400> 27

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 24

<400> 28

Glu Glu Gln Tyr Gln Ser

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 25

<400> 29

Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 26

<400> 30

Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr

1 5

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 27

<400> 31

Gln Tyr Gln Ser

1

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 28

<400> 32

Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr

1

5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 29

<400> 33

Tyr Arg Tyr Arg Gln

1

5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 30

<400> 34

Asp Tyr Ala Leu Gln

1

5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 31

<400> 35

Phe Gly Leu Gln Arg Pro Tyr

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 32

<400> 36

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 37

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 33

<400> 37

Leu Gln Arg

1

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q-Tag 34

<400> 38

Tyr Gln Arg

1

<210> 39

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 39
 Gly Ala Arg Xaa
 1
 <210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 40
 Gly Gly Arg Xaa
 1
 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)

<223> Xaa is beta-alanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) ... (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine

<400> 41

Xaa Ala Arg Xaa

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is beta-alanine

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) ... (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine

<400> 42

Xaa Gly Arg Xaa

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is γ -aminobutyric acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 43
 Xaa Ala Arg Xaa
 1
 <210> 44
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is γ -aminobutyric acid

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 44
 Xaa Gly Arg Xaa
 1
 <210> 45
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 5-aminovaleric acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 45
 Xaa Ala Arg Xaa
 1
 <210> 46
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES

 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 5-aminovaleric acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 46
 Xaa Gly Arg Xaa
 1
 <210> 47
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 47
 Xaa Ala Arg Xaa
 1
 <210> 48
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 48
 Xaa Gly Arg Xaa
 1
 <210> 49
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 49
 Xaa Ala Arg Xaa
 1

<210> 50
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) ... (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine
 <400> 50
 Xaa Gly Arg Xaa
 1

<210> 51
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (3) ... (3)
 <223> Xaa is citrulline
 <400> 51
 Gly Val Xaa
 1
 <210> 52
 <211> 3
 <212
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <400> 52
 Gly Val Arg
 1
 <210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is beta-alanine
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) ... (3)
 <223> Xaa is citrulline
 <400> 53
 Xaa Val Xaa
 1
 <210> 54
 <211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is beta-alanine

<400> 54

Xaa Val Arg

1

<210> 55

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is γ-aminobutyric acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) ... (3)

<223> Xaa is citrulline

<400> 55

Xaa Val Xaa

1

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is γ -aminobutyric acid
 <400> 56
 Xaa Val Arg

1
 <210> 57
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 5-aminovaleric acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) ... (3)
 <223> Xaa is citrulline
 <400> 57
 Xaa Val Xaa

1
 <210> 58
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 5-aminovaleric acid

<400> 58

Xaa Val Arg

1

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) ... (3)

<223> Xaa is citrulline

<400> 59

Xaa Val Xaa

1

<210> 60

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid

<400> 60

Xaa Val Arg

1

<210> 61

<211> 3
 <212> PRT
 <213
 > Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) ... (3)
 <223> Xaa is citrulline
 <400> 61
 Xaa Val Xaa
 1
 <210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Linker
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) ... (1)
 <223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid
 <400> 62
 Xaa Val Arg
 1
 <210> 63
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 63

Gly Thr Arg

1

<210> 64

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 64

Gly Ile Arg

1

<210> 65

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 65

Gly Asp Arg

1

<210> 66

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 66

Gly Trp Arg

1

<210> 67

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is beta-alanine

<400> 67

Xaa Thr Arg

1

<210> 68

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is beta-alanine

<400> 68

Xaa Ile Arg

1

<210> 69

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is beta-alanine

<400> 69

Xaa Asp Arg

1

<210> 70

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is beta-alanine

<220>

<223> Linker

<400> 70

Xaa Trp Arg

1

<210> 71

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is γ -aminobutyric acid

<400> 71

Xaa Thr Arg

1

<210> 72

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is γ -aminobutyric acid

<400> 72

Xaa Ile Arg

1

<210> 73

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is γ -aminobutyric acid

<400> 73

Xaa Asp Arg

1

<210> 74

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is γ -aminobutyric acid

<400> 74

Xaa Trp Arg

1

<210> 75

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 5-aminovaleric acid

<400> 75

Xaa Thr Arg

1

<210> 76

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 5-aminovaleric acid

<400> 76

Xaa Ile Arg

1

<210> 77

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 5-aminovaleric acid

<400> 77

Xaa Asp Arg

1

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 5-aminovaleric acid

<400> 78

Xaa Trp Arg

1

<210> 79

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid

<400> 79

Xaa Thr Arg

1

<210> 80

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid

<400> 80

Xaa Ile Arg

1

<210> 81

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid

<400> 81

Xaa Asp Arg

1

<210> 82

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is ϵ -aminocaproic acid

<400> 82

Xaa Trp Arg

1

<210> 83

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid

<400> 83

Xaa Thr Arg

1

<210> 84

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid

<400> 84

Xaa Ile Arg

1

<210> 85

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid

<400> 85

Xaa Asp Arg

1

<210> 86

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa is 7-aminoheptanoic acid

<400> 86

Xaa Trp Arg

1