



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0088905  
(43) 공개일자 2017년08월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 47/50* (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 47/48438* (2013.01)  
*A61K 47/48715* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7016749
- (22) 출원일자(국제) 2015년11월18일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년06월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/061310
- (87) 국제공개번호 WO 2016/081584  
국제공개일자 2016년05월26일
- (30) 우선권주장  
62/081,914 2014년11월19일 미국(US)
- (71) 출원인  
이뮤노젠 아이엔씨  
미국 02451-1477 매사추세츠주 월섬 원터 스트리트 830
- (72) 발명자  
허친스, 벤자민, 엠.  
미국 01719 매사추세츠주 박스버러 스토우 로드 329
- (74) 대리인  
양영준, 이상남

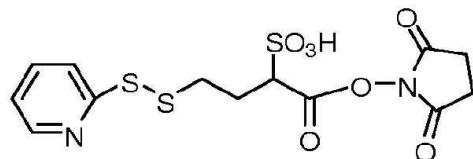
전체 청구항 수 : 총 71 항

(54) 발명의 명칭 세포 결합 작용제-세포독성 작용제 접합체를 제조하기 위한 공정

### (57) 요 약

본 발명은 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 제조하기 위한 신규한 공정을 제공한다. 상기 공정은 다음 단계를 포함한다: (a) 완충제를 포함하는 완충액에서 세포독성 작용제를 구조식 (I)에 의해 대표된 이중기능성 교차연결 시약 또는 이의 염과 반응시켜, 세포독성 작용제-링커 화합물을 포함하는 첫 번째 혼합물을 제공하는 단계, 여기서 완충액은 높은 완충능을 갖고; 그리고 (b) 단계 (a)로부터 세포독성 작용제-링커 화합물을 포함하는 첫 번째 혼합물을 4 내지 9의 pH를 갖는 용액에서 세포 결합 작용제와 반응시켜, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계. 본원에서 설명된 공정에 따라 제조된 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체 역시 본 발명에 포함된다.

[화학식 I]



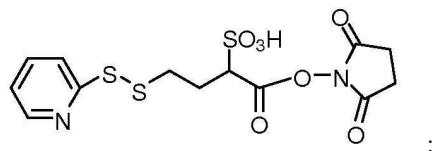
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 제조하기 위한 방법에 있어서, 다음 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 완충제를 포함하는 완충액에서 세포독성 작용제를 다음의 구조식에 의해 대표된 이중기능성 교차연결 시약 또는 이의 염과 반응시켜, 세포독성 작용제-링커 화합물을 포함하는 첫 번째 혼합물을 제공하는 단계, 여기서 완충액은 높은 완충능을 갖고:



(b) 단계 (a)로부터 획득된 첫 번째 혼합물에서 세포독성 작용제-링커 화합물을 4 내지 9의 pH를 갖는 용액에서 세포 결합 작용제와 반응시켜, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 세포 결합 작용제는 단편화하기 쉬운 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 세포독성 작용제는 메이탄시노이드인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 세포독성 작용제는 DM4인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중에서 어느 한 항에 있어서, 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 1.5:1 내지 12.5:1인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 2:1 내지 8:1인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

청구항 5에 있어서, 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 4:1 내지 6:1인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8

청구항 5에 있어서, 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 5:1인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

청구항 1 내지 8 중에서 어느 한 항에 있어서, 완충액은 4 내지 9의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

청구항 9에 있어서, 완충액은 7.5 내지 8.5의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

청구항 10에 있어서, 완충액은 7.9 내지 8.5, 8.0 내지 8.4 또는 8.1 내지 8.3의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

청구항 9에 있어서, 완충액은 8.2의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

청구항 1 내지 12 중에서 어느 한 항에 있어서, 완충제는 구연산염 완충액, 아세트산염 완충액, 숙신산염 완충액 및 인산염 완충액으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

청구항 1 내지 12 중에서 어느 한 항에 있어서, 완충제는 HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-히드록시프로판술폰산)), POPSO (피페라진-1,4-비스-(2-히드록시-프로판-술폰산) 무수물), HEPES (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄술폰산), EPPS (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-프로판술폰산), TES (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]-2-아미노에탄술폰산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술폰산) 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서, 완충제는 EPPS인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

청구항 1 내지 15 중에서 어느 한 항에 있어서, 완충액은 염화나트륨을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

청구항 1 내지 16 중에서 어느 한 항에 있어서, 완충액은 유기 용매를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

청구항 17에 있어서, 유기 용매는 DMA인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

청구항 17 또는 18에 있어서, 유기 용매는 완충액의 부피로 1-99%, 50%-99%, 60%-99% 또는 70%-99%의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서, 유기 용매는 완충액의 부피로 50%-90%, 55%-85%, 60%-80% 또는 65%-75%의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

청구항 19에 있어서, 유기 용매는 완충액의 부피로 70%의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22**

청구항 1 내지 21 중에서 어느 한 항에 있어서, 이중기능성 교차연결 시약에 비하여 몰 과잉 양의 세포독성 작용제가 단계 (a)의 반응에서 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 23**

청구항 22에 있어서, 세포독성 작용제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 1.1:1 내지 20:1, 1.1:1 내지

10:1, 1.1:1 내지 5:1 또는 1.1:1 내지 2:1인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 24

청구항 23에 있어서, 세포독성 작용제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 1.1:1 내지 1.3:1인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 25

청구항 23에 있어서, 세포독성 작용제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 1.2:1인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 26

청구항 1 내지 25 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 1 시간 내지 2 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 27

청구항 1 내지 25 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 2 시간 내지 5 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 28

청구항 1 내지 25 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 5 시간 내지 20 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 29

청구항 28에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 5 시간 내지 15 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 30

청구항 28에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 4 시간 내지 8 시간 또는 5 시간 내지 7 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 31

청구항 28에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 6 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 32

청구항 1 내지 31 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 15 °C 내지 25 °C의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 33

청구항 32에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 17 °C 내지 23 °C, 18 °C 내지 22 °C 또는 19 °C 내지 21 °C의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 34

청구항 32에 있어서, 단계 (a)에서 반응은 20 °C의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 35

청구항 1 내지 32 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 용액은 5.0-9.0, 5.5-9.0, 6.0-9.0 또는 6.5-9.0의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 36

청구항 35에 있어서, 단계 (b)에서 용액은 7.5-8.5의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 37**

청구항 35에 있어서, 단계 (b)에서 용액은 8.0-8.4 또는 8.1-8.3의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 38**

청구항 35에 있어서, 단계 (b)에서 용액은 8.2의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 39**

청구항 1 내지 38 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 용액은 구연산염 완충액, 아세트산염 완충액, 숙신산염 완충액 및 인산염 완충액으로 구성된 군에서 선택되는 완충제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 40**

청구항 1 내지 38 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 용액은 HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-히드록시프로판술폰산)), POPSO (피페라진-1,4-비스-(2-히드록시-프로판-술폰산) 무수물), HEPES (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-에탄술폰산), EPPS (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-프로판술폰산), TES (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]-2-아미노에탄술폰산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술폰산) 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 완충제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 41**

청구항 40에 있어서, 완충제는 EPPS인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 42**

청구항 1 내지 41 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 용액은 유기 용매를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 43**

청구항 42에 있어서, 유기 용매는 DMA인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 44**

청구항 42 또는 43에 있어서, 유기 용매는 용액의 부피로 1-25%, 2-20%, 2-15% 또는 2-10%의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 45**

청구항 44에 있어서, 유기 용매는 용액의 부피로 2.5-7.5%, 3-7%, 4-6% 또는 4.5-5.5%의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 46**

청구항 45에 있어서, 유기 용매는 용액의 부피로 5%의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 47**

청구항 1 내지 46 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)의 용액에서 세포 결합 작용제의 농도는 5 g/L 내지 100 g/L인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 48**

청구항 47에 있어서, 세포 결합 작용제의 농도는 5 g/L 내지 50 g/L 사이인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 49**

청구항 47에 있어서, 세포 결합 작용제의 농도는 10 g/L 내지 40 g/L 사이인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 50**

청구항 47에 있어서, 세포 결합 작용제의 농도는 15 g/L 내지 25 g/L, 18 g/L 내지 22 g/L 또는 19 g/L 내지 21 g/L 사이인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 51**

청구항 50에 있어서, 세포 결합 작용제의 농도는 20 g/L인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 52**

청구항 1 내지 51 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 10 시간 내지 30 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 53**

청구항 52에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 15 시간 내지 25 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 54**

청구항 52에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 8 시간 내지 24 시간, 12 시간 내지 20 시간, 14 시간 내지 18 시간 또는 15 시간 내지 17 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 55**

청구항 54에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 16 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 56**

청구항 52에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 18 시간 내지 26 시간, 20 시간 내지 24 시간 또는 19 시간 내지 23 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 57**

청구항 52에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 22 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 58**

청구항 1 내지 57 중에서 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 15 °C 내지 25 °C의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 59**

청구항 58에 있어서, 단계 (b)에서 반응은 20 °C의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 60**

청구항 1 내지 59 중에서 어느 한 항에 있어서, 이중기능성 교차연결 시약 대 세포 결합 작용제의 몰 비율은 2 내지 10인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 61**

청구항 60에 있어서, 이중기능성 교차연결 시약 대 세포 결합 작용제의 몰 비율은 3 내지 6인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 62**

청구항 61에 있어서, 이중기능성 교차연결 시약 대 세포 결합 작용제의 몰 비율은 3.5 내지 5인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 63**

청구항 62에 있어서, 이중기능성 교차연결 시약 대 세포 결합 작용제의 몰 비율은 4.0인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 64

청구항 1 내지 63 중에서 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 용액의 pH를 5 또는 그 미만으로 조정함으로써, 단계 (b)에서 반응을 원하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 65

청구항 1 내지 64 중에서 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 두 번째 혼합물을 정제하여 정제된 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 제공하는 것을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 66

청구항 65에 있어서, 두 번째 혼합물은 혼합물을 접선 유동 여과, 선택적 침전, 흡착성 여과, 흡착 크로마토그래피, 비-흡착성 크로마토그래피 또는 이들의 조합에 종속시킴으로써 정제되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 67

청구항 66에 있어서, 두 번째 혼합물은 혼합물을 접선 유동 여과에 종속시킴으로써 정제되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 68

청구항 1 내지 67 중에서 어느 한 항에 있어서, 세포 결합 작용제는 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 69

청구항 67에 있어서, 항체는 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 70

청구항 69에 있어서, 항체는 인간화 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 71

청구항 70에 있어서, 항체는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 트라스투주맙, 비바투주맙, 시브로투주맙, CNT095, huDS6, 리툭시맙, 항-Her2 항체, 항-EGFR 항체, 항-CD27L 항체, 항-EGFRvIII 항체, 항-크립토 항체, 항-CD138 항체, 항-CD38 항체, 항-EphA2 항체, 인테그린 표적화 항체, 항-CD37 항체, 엽산길항체 수용체 항체, 항-Her3 항체, 그리고 항-IGFIR 항체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

관련된 출원에 대한 참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에, 2014년 11월 19일자 제출된 U.S. 가출원 번호 62/081,914의 출원일에 우선권을 주장하고, 모든 도면, 화학식, 명세서, 청구항 및 서열 목록을 비롯한 이의 전체 내용은 본원에 참조로서 편입된다.

### 배경 기술

[0003]

발명의 배경

[0004]

암 및 다른 질환의 치료에 유용한 항체-약물-접합체 (ADC's)는 통상적으로, 3가지 상이한 요소로 구성된다: 세포 결합 작용제; 링커; 그리고 세포독성 작용제. 세포 결합 작용제, 예를 들면, 항체를 세포독성 작용제에 접합하는 전통적인 방법은 2가지 상이한 반응 단계를 이용한다. 첫 번째 반응 단계에서, 항체는 이중기능성 교차연

결 시약과 반응되어 링커-변형된 항체를 생산한다. 변형된 항체 산물은 이후, 과잉 링커 또는 가수분해된 링커 시약으로부터 임의선택적으로 정제된다. 두 번째 반응 단계에서, 링커-변형된 항체는 반응성 기, 예를 들면, 티올을 내포하는 세포독성 작용제와 반응되어 항체-세포독성 작용제 접합체를 산출하고, 이것은 추가 정제 단계에서 다시 한 번 정제된다. 이러한 전통적인 방법은 2가지 정제 단계를 필요로 할 수 있는데, 이것은 총괄 수율을 낮추고, 그리고 ADC의 대규모 제조를 위한 공정을 번거롭고 비경제적으로 만든다.

[0005] 대안으로, 세포독성 작용제는 먼저, 이중기능성 교차연결 시약과 반응하여 세포독성 작용제-링커 화합물을 형성할 수 있는데, 이것은 이후, 세포 결합 작용제와 반응되어 세포 결합 작용제-세포독성 작용제 접합체 (접합 반응)를 형성한다. 세포독성 작용제, 이중기능성 교차연결 시약 및 결과의 세포독성 작용제-링커 화합물은 일반적으로 소수성 화합물이고 물에서 낮은 용해도를 갖는다. 따라서, 세포독성 작용제-링커 화합물을 가용화시키기 위해 접합 반응 동안 일정한 양의 유기 용매가 존재해야 한다. 다른 한편, 대량의 유기 용매의 존재는 항체 안정성에 대한 유해한 효과를 가질 수 있다. 따라서, 기존의 공정은 낮은 농도의 세포 결합 작용제, 세포독성 작용제 및/또는 이중기능성 교차연결 시약이 이용되는 세포 결합 작용제-세포독성 작용제 접합체의 소규모 제조로 제한될 수 있다.

[0006] 전술한 내용에 비추어, 높은 항체 안정성을 갖는 세포 결합 작용제-세포독성 작용제 접합체를 제조하기 위한, 대규모 생산에 적합한 향상된 공정을 개발하는 것이 요구된다.

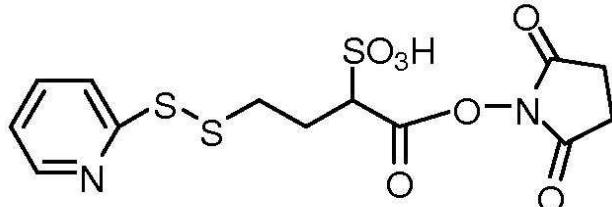
## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 발명의 요약

[0008] 본 발명은 항체-약물-접합체 (ADCs)의 대규모 생산에 적합한 신규한 공정을 제공한다. 상기 공정은 다음 단계를 포함한다:

[0009] (a) 완충제를 포함하는 완충액에서 세포독성 작용제를 다음의 구조식에 의해 대표된 이중기능성 교차연결 시약 또는 이의 염과 반응시켜, 세포독성 작용제-링커 화합물을 포함하는 첫 번째 혼합물을 제공하는 단계, 여기서 완충액은 높은 완충능을 갖고:



[0010] ; 그리고

[0011] (b) 단계 (a)로부터 첫 번째 혼합물에서 세포독성 작용제-링커 화합물을 4 내지 9의 pH를 갖는 용액에서 세포 결합 작용제와 반응시켜, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계.

[0012] 놀랍게도, 높은 완충능 완충액이 단계 (a)의 반응에서 이용될 때, 결과의 세포 결합 작용제 접합체는 단계 (a)의 반응에서 낮은 완충능 완충액을 이용하여 제조된 접합체와 비교하여 훨씬 적은 항체 단편화를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이에 더하여, 높은 농도의 세포 결합 작용제 (가령, 항체)가 접합 반응 (즉, 본 발명의 공정의 단계 (b))에서 이용될 수 있는데, 이것은 상기 공정을 대규모 생산에서 더욱 경제적으로 만든다. 게다가, 당분야에서 공정과 비교하여, 더욱 적은 양의 유기 용매 (가령, 디메틸아세트아미드 (DMA))가 접합 용액에서 필요한데, 이것은 항체 및 결과의 접합체의 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0013] 본 발명의 공정은 높은 순도 및/또는 안정성을 갖는 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 공정은 선행 기술에서 설명된 공정과 비교하여 항체 단편화를 감소시킨다.

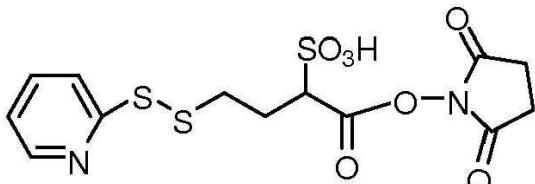
[0014] 본 발명은 본원에서 설명된 공정을 이용하여 제조된 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체에 또한 관계한다.

## 과제의 해결 수단

## 발명의 상세한 설명

본 발명은 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 제조하기 위한 신규한 공정을 제공한다. 상기 공정은 다음 단계를 포함한다:

(a) 완충제를 포함하는 완충액에서 세포독성 작용제를 다음의 구조식에 의해 대표된 이중기능성 교차연결 시약 또는 이의 염과 반응시켜, 세포독성 작용제-링커 화합물을 포함하는 첫 번째 혼합물을 제공하는 단계, 여기서 완충액은 높은 완충능을 갖고:



### sSPDB: 그리고

(b) 단계 (a)로부터 획득된 첫 번째 혼합물에서 세포독성 작용제-링커 화합물을 4 내지 9의 pH를 갖는 용액에서 세포 결합 작용제와 반응시켜, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 포함하는 두 번째 혼합물을 제공하는 단계.

본원에서 이용된 바와 같이, "염"은 부모 화합물이 이의 산 또는 염기 염을 만듦으로써 변형되는 본원에서 설명된 화합물의 유도체를 지칭한다. 더욱 특정하게는, 염은 부모 화합물이 부모 화합물을 무기 또는 유기 염기, 예를 들면, 알칼리성 수산화물 또는 알킬 아민과 반응시킴으로써 변형되는 유도체를 지칭한다. 한 구체예에서, 염은 나트륨 염이다. 대안으로, 염은 트리알킬암모늄 염, 예를 들면, N,N-디이소프로필에틸암모늄 염이다.

한 구체예에서, 세포 결합 작용제 (가령, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)는 단편화하기 쉽다. 본원에서 이용된 바와 같이, "단편화"는 단백질 (가령, 항체) 내에 공유 결합의 붕괴를 지칭한다. 한 구체예에서, 단편화는 유리티올의 존재에서 사슬간 이화 결합의 환원을 지칭한다. 단편화는 또한, 단백질 중주의 개열 및 측쇄의 단편화 또는 변형을 포함할 수 있다 (가령, Vlasak, J. and Ionescu, R. Fragmentation of monoclonal antibodies. mAbs 3:3, 253-263, May/June 2011을 참조한다). 단편화하기 쉬운 예시적인 항체 또는 항원 결합 단편은 IgG4, 람다 경쇄를 포함하는 항체, Fab 또는  $F(ab')_2$ 를 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 단편화는 분자의 크기에 일차적으로 기초된 분리 기술 또는 아미노산 측쇄의 화학을 수반하는 분리 기술을 이용하여 확인될 수 있다. 분자의 크기에 일차적으로 기초된 분리 기술은 크기-배제 크로마토그래피 (SEC), 황산도데실나트륨-폴리아크릴아미드 젤 전기이동 (SDS-PAGE) 및 SDS를 동반한 모세관 전기영동 (CE-SDS)을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 아미노산 측쇄의 화학을 수반하는 분리 기술은 액체 크로마토그래피, 예를 들면, 역상 HPLC, 소수성-상호작용 HPLC, 양이온-교환 HPLC, 빠른 단백질 액체 크로마토그래피 (FPLC), 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC) 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.

일정한 구체예에서, 본 발명의 공정의 단계 (a)에서 이용된 완충액은 높은 완충능을 갖는다. 본원에서 이용된 바와 같이, "완충능"은 부가된 산 또는 염기의 존재에서 반응 혼합물의 pH에서 유의미한 변화를 예방하는 완충액의 능력을 지칭한다.

한 구체예에서, 완충액은 이중기능성 교차연결 시약에 비하여 몰 과잉의 완충제를 포함한다. 다른 구체예에서, 완충액에서 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 1.1:1 내지 50:1; 1.2:1 내지 30:1; 1.3:1 내지 25:1; 또는 1.5:1 내지 12.5:1이다. 더욱 특정하게는, 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 2:1 내지 8:1이다. 훨씬 특정하게는, 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 4:1 내지 6:1이다. 다른 더욱 특정한 구체예에서, 완충제 대 이중기능성 교차연결 시약의 몰 비율은 5:1이다.

일정한 구체예에서, 본 발명의 공정의 단계 (a)에서 완충액은 4 내지 9의 pH를 갖는다. 더욱 특정하게는, pH는 4.5 내지 8.5, 5.0 내지 8.5, 5.5 내지 8.5, 6.0 내지 8.5, 6.5 내지 8.5, 7.0 내지 8.5, 7.1 내지 8.5, 7.2 내지 8.5, 7.3 내지 8.5, 7.4 내지 8.5, 7.5 내지 8.5, 7.5 내지 8.4, 7.5 내지 8.3, 5.0 내지 6.5, 5.0 내지

6.0, 또는 5.5 내지 6.5이다. 특정한 구체예에서, pH는 7.5 내지 8.5 (가령, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4 또는 8.5)이다. 다른 특정한 구체예에서, pH는 7.9 내지 8.5, 8.0 내지 8.4 또는 8.1 내지 8.3이다. 훨씬 특정하게는, pH는 8.2이다. 대안으로, pH는 4.5 내지 5.5 (가령, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 또는 5.5)이다. 다른 대안에서, pH는 4.7 내지 5.3, 4.8 내지 5.2 또는 4.9 내지 5.1이다. 훨씬 특정하게는, pH는 5.0이다.

[0026] 당분야에서 공지된 임의의 적절한 완충제가 이용될 수 있다. 적합한 완충제는 예로서, 구연산염 완충액, 아세트산염 완충액, 숙신산염 완충액, 그리고 인산염 완충액을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 한 구체예에서, 완충제는 HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)페라진-N'-(2-히드록시프로판술폰산)), POPSO (페라진-1,4-비스-(2-히드록시-프로판-술폰산) 무수물), HEPES (4-(2-히드록시에틸)페라진-1-에탄술폰산), EPPS (4-(2-히드록시에틸)페라진-1-프로판술폰산), TES (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]-2-아미노에탄술폰산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술폰산) 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 더욱 특정하게는, 완충제는 EPPS이다.

[0027] 일정한 구체예에서, 완충액은 완충액의 이온 강도를 유지하기 위해 비활성 염을 더욱 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 완충액은 염화나트륨을 더욱 포함한다.

[0028] 일정한 구체예에서, 단계 (a)의 완충액은 유기 용매를 포함한다. 더욱 특정하게는, 유기 용매는 디메틸아세트아미드 (DMA)이다. 한 구체예에서, 단계 (a)의 완충액은 물 및 유기 용매의 혼합물을 포함한다. 더욱 특정하게는, 단계 (a)의 완충액은 물 및 DMA의 혼합물을 포함한다. 유기 용매 (가령, DMA)는 완충액의 부피로 1%-99%, 5%-99%, 10%-99%, 20%-99%, 30%-99%, 40%-99%, 50%-99%, 60%-99%, 70%-99%, 80%-99%, 90%-99%의 양으로 존재할 수 있다. 한 구체예에서, 유기 용매 (가령, DMA)는 완충액의 부피로 50%-90%, 55%-85%, 60%-80% 또는 65%-75%의 양으로 존재한다. 더욱 특정한 구체예에서, 유기 용매 (가령, DMA)는 완충액의 부피로 70%의 양으로 존재한다.

[0029] 일정한 구체예에서, 물 등가량의 세포독성 작용제 및 이중기능성 교차연결 시약이 단계 (a)의 반응에서 이용된다. 일정한 구체예에서, 이중기능성 교차연결 시약에 비하여 물 과잉의 세포독성 작용제가 단계 (a)의 반응에서 이용된다. 한 구체예에서, 세포독성 작용제 대 이중기능성 교차연결 시약의 물 비율은 1.01:1 내지 20:1, 1.1:1 내지 20:1, 1.1:1 내지 10:1, 1.1:1 내지 5:1, 1.1:1 내지 4:1, 1.1:1 내지 3:1, 1.1:1 내지 2:1, 1.1:1 내지 1.5:1, 1.1:1 내지 1.4:1, 또는 1.1:1 내지 1.3:1이다. 더욱 특정하게는, 세포독성 작용제 대 이중기능성 교차연결 시약의 물 비율은 1.2:1이다.

[0030] 일정한 구체예에서, 세포독성 작용제에 비하여 물 과잉의 이중기능성 교차연결 시약이 단계 (a)의 반응에서 이용된다. 한 구체예에서, 이중기능성 교차연결 시약 대 세포독성 작용제의 물 비율은 1.01:1, 1.1:1 내지 20:1, 1.1:1 내지 10:1, 1.1:1 내지 5:1, 1.1:1 내지 4:1, 1.1:1 내지 3:1, 1.1:1 내지 2:1, 1.1:1 내지 1.5:1, 1.1:1 내지 1.4:1, 또는 1.1:1 내지 1.3:1이다.

[0031] 일정한 구체예에서, 본 발명의 공정의 단계 (a)에서 반응은 앞서 설명된 완충액에서 세포독성 작용제를 이중기능성 교차연결 시약 sSPDB와 혼합함으로써 수행된다. 반응은 2 분 내지 1 주, 1 시간 내지 48 시간, 1 시간 내지 36 시간, 1 시간 내지 24 시간, 5 시간 내지 20 시간, 5 시간 내지 15 시간, 6 시간 내지 14 시간, 4 시간 내지 8 시간, 5 시간 내지 7 시간, 1 시간 내지 5 시간, 1 시간 내지 4 시간, 1 시간 내지 2 시간, 또는 2 시간 내지 5 시간 동안 진행하도록 허용된다. 한 구체예에서, 반응은 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간 등 동안 진행하도록 허용된다.

[0032] 단계 (a)의 반응은 임의의 적절한 온도에서 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 반응은 10 °C 내지 50 °C, 10 °C 내지 40 °C, 또는 10 °C 내지 30 °C의 온도에서 수행될 수 있다. 다른 구체예에서, 반응은 15 °C 내지 25 °C, 16 °C 내지 24 °C, 17 °C 내지 23 °C, 18 °C 내지 22 °C 또는 19 °C 내지 21 °C의 온도에서 수행될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 반응은 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C 또는 25 °C에서 수행될 수 있다. 대안으로, 반응은 낮은 온도, 예를 들면, 10 °C 이하 또는 0 °C 이하 (용액이 예로서, 세포독성 작용제 및/또는 이중기능성 교차연결 시약을 용해시키는데 이용된 유기 용매의 존재에 의해 동결로부터 예방된다면) 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 반응은 -10 °C 내지 0 °C, 0 °C 내지 10 °C, 또는 0 °C 내지 5 °C의 온도에서 수행될 수 있다.

[0033] 일정한 구체예에서, 본 발명의 공정의 단계 (a)에서 세포독성 작용제 및 이중기능성 교차연결 시약을 반응시키

는 것으로부터 획득된 첫 번째 혼합물은 세포 결합 작용제와 반응하기 전에, 긴 기간 (가령, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 1 주, 2 주, 3 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 1 년, 2 년 또는 5 년) 동안 저장될 수 있다. 첫 번째 혼합물은 낮은 온도에서 (가령, 10 °C 이하, 5 °C 이하 또는 0 °C 이하에서, 또는 -10 °C 내지 0 °C, 0 °C 내지 10 °C, 또는 0 °C 내지 5 °C의 온도에서) 동결된 상태로 저장될 수 있다. 대안으로, 첫 번째 혼합물은 단계 (a)의 반응의 완결 시에 실온에서, 또는 10 °C 내지 25 °C, 15 °C 내지 25 °C, 또는 20 °C 내지 25 °C의 온도에서 저장될 수 있다.

[0034] 일정한 구체예에서, 첫 번째 혼합물은 세포독성 작용제-링커 화합물 및 불순물, 예를 들면, 반응하지 않은 세포독성 작용제, 반응하지 않은 이중기능성 교차연결 시약 및 반응 부산물, 예를 들면, 가수분해된 이중기능성 교차연결 시약 및/또는 세포독성 작용제의 이합체를 포함한다.

[0035] 일정한 구체예에서, 첫 번째 반응 혼합물은 본 발명의 공정의 단계 (b)에서 첫 번째 혼합물에서 세포독성 작용제-링커 화합물을 세포 결합 작용제와 반응시키기 전에 실제적으로 정제되지 않는다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "실제적으로 정제된"은 본 발명의 공정의 단계 (b)에서 첫 번째 반응 혼합물에서 세포독성 작용제-링커 화합물이 세포 결합 작용제와 반응되기 전에, 50%보다 적은, 40%보다 적은, 30%보다 적은, 20%보다 적은, 10%보다 적은, 9%보다 적은, 8%보다 적은, 7%보다 적은, 6%보다 적은, 5%보다 적은, 4%보다 적은, 3%보다 적은, 2%보다 적은 또는 1%보다 적은 불순물 (가령, 반응하지 않은 세포독성 작용제, 반응하지 않은 이중기능성 교차연결 시약 및 반응 부산물, 예를 들면, 가수분해된 이중기능성 교차연결 시약 및/또는 세포독성 작용제의 이합체)이 제거된다는 것을 의미한다.

[0036] 일정한 구체예에서, 본 발명의 공정의 단계 (a)로부터 획득된 첫 번째 혼합물은 4 내지 9, 5 내지 9, 5.5 내지 9, 6 내지 9, 6.3 내지 9, 또는 6.3 내지 8.7, 6.4 내지 8.6, 6.5 내지 8.5, 7.3 내지 8.7, 또는 7.4 내지 8.6의 pH를 갖는 용액 (가령, 접합 완충액)에서 세포 결합 작용제와 반응되어, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체를 포함하는 두 번째 혼합물을 제공한다. 더욱 특정하게는, 용액은 7.5 내지 8.5 (가령, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4 또는 8.5)의 pH를 갖는다. 다른 더욱 특정한 구체예에서, 용액은 7.9 내지 8.5, 8.0 내지 8.4, 또는 8.1 내지 8.3의 pH를 갖는다. 훨씬 특정한 구체예에서, 용액은 8.2의 pH를 갖는다. 다른 특정한 구체예에서, 용액은 6.5 내지 7.5 (가령, 6.5, 6.6, 6.1, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 또는 7.5)의 pH를 갖는다.

[0037] 일정한 구체예에서, 단계 (b)에서 용액은 완충제를 포함한다. 당분야에서 공지된 임의의 적절한 완충제가 이용될 수 있다. 적합한 완충제는 예로서, 구연산염 완충액, 아세트산염 완충액, 숙신산염 완충액, 그리고 인산염 완충액을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다. 한 구체예에서, 완충제는 HEPSSO (N-(2-히드록시에틸)페페라진-N'-(2-히드록시프로판슬픈산)), POPSO (페페라진-1,4-비스-(2-히드록시-프로판-슬픈산) 무수물), HEPES (4-(2-히드록시에틸)페페라진-1-에탄슬픈산), EPPS (4-(2-히드록시에틸)페페라진-1-프로판슬픈산), TES (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]-2-아미노에탄슬픈산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄슬픈산) 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 더욱 특정하게는, 완충제는 EPPS이다. 용액은 완충액의 이온 강도를 유지하기 위해 비활성 염을 더욱 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 완충액은 염화나트륨을 더욱 포함한다.

[0038] 일정한 구체예에서, 본 발명의 공정의 단계 (b)의 용액은 유기 용매를 더욱 포함한다. 더욱 특정하게는, 유기 용매는 디메틸아세트아미드 (DMA)이다. 한 구체예에서, 단계 (b)의 용액은 물 및 유기 용매의 혼합물을 포함한다. 더욱 특정하게는, 단계 (b)의 용액은 물 및 DMA의 혼합물을 포함한다. 유기 용매 (가령, DMA)는 용액의 부피로 1%-99%, 1%-90%, 1%-80%, 1%-70%, 1%-60%, 1%-50%, 1%-40%, 1%-30%, 1%-25%, 2%-20%, 2%-15%, 2%-10%, 2.5%-7.5%, 3%-7%, 4%-6%, 또는 4.5%-5.5%의 양으로 존재할 수 있다. 더욱 특정하게는, 유기 용매 (가령, DMA)는 용액의 부피로 5%의 양으로 존재한다.

[0039] 일정한 구체예에서, 본 발명의 공정의 단계 (b)에서, 첫 번째 혼합물은 세포 결합 작용제를 포함하는 수성 용액을 본 발명의 공정의 단계 (a)로부터 획득된 첫 번째 혼합물에 첨가함으로써 세포 결합 작용제와 반응된다. 대안으로, 단계 (a)로부터 획득된 첫 번째 혼합물이 세포 결합 작용제를 포함하는 수성 용액에 첨가된다. 일정한 구체예에서, 단계 (a)로부터 획득된 첫 번째 혼합물은 세포 결합 작용제와 반응하기 전에 pH 조정된다. 한 구체예에서, 첫 번째 혼합물은 세포 결합 작용제와 반응하기 전에, 세포 결합 작용제를 포함하는 수성 용액의 pH에 동등한 pH를 갖도록 pH 조정된다.

[0040] 일정한 구체예에서, 단계 (b)에서 반응은 높은 농도의 세포 결합 작용제로 수행된다. 한 구체예에서, 단계 (b)의 용액에서 세포 결합 작용제의 농도는 5 g/L 내지 100 g/L이다. 더욱 특정하게는, 농도는 5 g/L 내지 50 g/L, 5 g/L 내지 40 g/L, 10 g/L 내지 40 g/L, 10 g/L 내지 30 g/L, 또는 15 g/L 내지 25 g/L이다. 더욱 특정한 구

체예에서, 농도는 15 g/L 내지 25 g/L, 18 g/L 내지 22 g/L 또는 19 g/L 내지 21 g/L이다. 훨씬 특정한 구체예에서, 농도는 20 g/L이다.

[0041] 일정한 구체예에서, 세포 결합 작용제에 비하여 과잉 양의 이중기능성 교차연결 시약이 본 발명의 공정에서 이용된다. 한 구체예에서, 이중기능성 교차연결 시약 대 세포 결합 작용제의 몰 비율은 1 내지 20, 2 내지 10, 3 내지 8, 또는 3 내지 6의 범위 안에 있다. 다른 구체예에서, 이중기능성 교차연결 시약 대 세포 결합 작용제의 몰 비율은 3.5 내지 5, 예를 들면, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 또는 5.0이다.

[0042] 일정한 구체예에서, 단계 (b)에서 반응은 5 시간 내지 48 시간, 10 시간 내지 48 시간, 10 시간 내지 30 시간, 15 시간 내지 25 시간 동안 진행하도록 허용된다. 특정한 구체예에서, 단계 (b)에서 반응은 8 시간 내지 24 시간, 12 시간 내지 20 시간, 14 시간 내지 18 시간, 또는 15 시간 내지 17 시간 동안 진행하도록 허용된다. 더욱 특정한 구체예에서, 단계 (b)에서 반응은 16 시간 동안 진행하도록 허용된다. 다른 구체예에서, 단계 (b)에서 반응은 14 시간 내지 30 시간, 18 시간 내지 26 시간, 20 시간 내지 24 시간 또는 19 시간 내지 23 시간 동안 진행하도록 허용된다. 더욱 특정한 구체예에서, 단계 (b)에서 반응은 22 시간 동안 진행하도록 허용된다.

[0043] 단계 (b)에서 반응은 임의의 적절한 온도에서 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 반응은 10 °C 내지 50 °C, 10 °C 내지 40 °C, 또는 10 °C 내지 30 °C의 온도에서 수행될 수 있다. 다른 구체예에서, 반응은 15 °C 내지 25 °C, 16 °C 내지 24 °C, 17 °C 내지 23 °C, 18 °C 내지 22 °C 또는 19 °C 내지 21 °C의 온도에서 수행될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 반응은 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C 또는 25 °C에서 수행될 수 있다. 대안으로, 반응은 낮은 온도, 예를 들면, 10 °C 이하 또는 0 °C 이하 (용액이 예로서, 세포독성 작용제 및/또는 이중기능성 교차연결 시약을 용해시키는데 이용된 유기 용매의 존재에 의해 동결로부터 예방된다면) 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 반응은 -10 °C 내지 0 °C, 0°C 내지 10 °C, 또는 0 °C 내지 5 °C의 온도에서 수행될 수 있다.

[0044] 일정한 구체예에서, 본 발명의 공정은 단계 (b) 후, 퀸칭 단계를 더욱 포함한다. 한 구체예에서, 퀸칭은 단계 (b)로부터 획득된 두 번째 혼합물의 pH를 낮은 pH (가령, 6.5보다 적거나 또는 이와 동등한, 6.0보다 적거나 또는 이와 동등한, 5.5보다 적거나 또는 이와 동등한, 5.4보다 적거나 또는 이와 동등한, 5.3보다 적거나 또는 이와 동등한, 5.2보다 적거나 또는 이와 동등한, 5.1보다 적거나 또는 이와 동등한, 5.0보다 적거나 또는 이와 동등한 pH)로 급속히 조정함으로써 달성된다. 한 구체예에서, 두 번째 혼합물의 pH는 4.0 내지 6.5, 4.5 내지 6.0, 4.5 내지 5.5, 4.6 내지 5.4, 4.7 내지 5.3, 4.8 내지 5.2 또는 4.9 내지 5.1의 pH로 조정된다. 더욱 특정한 구체예에서, 두 번째 혼합물의 pH는 pH 5.0으로 조정된다. 두 번째 혼합물의 pH는 산을 두 번째 혼합물에 첨가함으로써 조정될 수 있다. 더욱 특정하게는, 두 번째 혼합물의 pH는 아세트산을 두 번째 혼합물에 첨가함으로써 조정될 수 있다.

[0045] 다른 구체예에서, 퀸칭은 임의의 반응하지 않은 세포독성 작용제 및/또는 반응하지 않은 이중기능성 교차연결 시약을 퀸칭하기 위해, 하나 또는 그 이상의 퀸칭 작용제를 두 번째 혼합물에 첨가함으로써 달성된다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "퀸칭 작용제"는 유리 세포독성 작용제 및/또는 이중기능성 교차연결 시약과 반응하는 시약을 지칭한다.

[0046] 한 구체예에서, 말레이미드 또는 할로아세트아미드 퀸칭 시약, 예를 들면, 4-말레이미도부티르산, 3-말레이미도프로피온산, N-에틸말레이미드, 요오드아세트아미드, 또는 요오드아세트아미도프로피온산이 세포독성 작용제 내에 임의의 반응하지 않은 기 (가령, 티올)이 퀸칭되도록 담보하는데 이용될 수 있다. 퀸칭 단계는 세포독성 작용제, 특히 반응하지 않은 티올 기를 갖는 세포독성 작용제 (가령, DM1)의 이합체화를 예방하는데 도움을 줄 수 있다. 이합체화된 세포독성 작용제는 제거하기 어려울 수 있다. 퀸칭 단계는 또한, 선천적 항체 이황화 기와의 원치 않는 티올-이황화 교환 반응을 최소화할 수 있다. 극성, 하전된 티올-퀸칭 시약 (가령, 4-말레이미도부티르산 또는 3-말레이미도프로피온산)으로 퀸칭 시에, 과잉의 반응하지 않은 세포독성 작용제는 극성, 하전된, 수용성 부가물로 전환되는데, 이것은 정제 단계 동안 공유적으로-연결된 접합체로부터 쉽게 분리될 수 있다. 비극성 및 중성 티올-퀸칭 시약으로 퀸칭 역시 이용될 수 있다.

[0047] 한 구체예에서, 혼합물은 이러한 혼합물을 반응하지 않은 이중기능성 교차연결 시약과 반응하는 퀸칭 시약과 접촉시킴으로써 퀸칭된다. 가령, 임의의 반응하지 않은 이중기능성 교차연결 시약을 퀸칭하기 위해, 친핵체가 혼합물에 첨가될 수 있다. 친핵체는 바람직하게는, 친핵체를 내포하는 아미노 기, 예를 들면, 리신, 타우린 및 히드록실아민이다.

- [0048] 일정한 구체예에서, 단계 (b)의 반응은 퀸칭 단계 전에, 다시 말하면, pH를 조정하고 및/또는 두 번째 혼합물을 앞서 설명된 퀸칭 작용제와 접촉시키는 전에, 완결까지 진행하도록 허용된다.
- [0049] 반응 단계 (b) 이후에, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체는 정제 단계에 종속된다. 이점에 관하여, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체는 막-기초된 접선 유동 여과 과정인 접선 유동 여과 (TFF), 비-흡착성 크로마토그래피, 흡착성 크로마토그래피, 흡착성 여과, 선택적 침전, 또는 임의의 다른 적합한 정제 과정뿐만 아니라 이들의 조합을 이용하여, 혼합물의 다른 성분 (가령, 유리 이중기능성 교차연결 작용제, 유리 세포독성 작용제 및 반응 부산물)으로부터 정제될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 한 구체예에서, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체는 단일 정제 단계 (가령, TFF)를 이용하여 정제된다. 바람직하게는, 상기 접합체는 단일 정제 단계 (가령, TFF)를 이용하여 정제되고 적절한 제제 내로 교환된다. 본 발명의 다른 구체예에서, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체는 2개의 순차적 정제 단계를 이용하여 정제된다. 가령, 상기 접합체는 먼저 선택적 침전, 흡착성 여과, 흡수성 크로마토그래피 또는 비-흡수성 크로마토그래피에 의해 정제되고, 그 이후에 TFF로 정제된다. 당업자는 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체의 정제가 세포독성 작용제에 화학적으로 연계된 세포 결합 작용제를 포함하는 안정된 접합체의 단리를 할 수 있게 한다는 것을 인지할 것이다.
- [0051] Pellicon 유형 시스템 (Millipore, Billerica, Mass.), Sartocon 카세트 시스템 (Sartorius AG, Edgewood, N.Y.), 그리고 Centrasette 유형 시스템 (Pall Corp., East Hills, N.Y.)을 비롯한 임의의 적절한 TFF 시스템이 정제에 활용될 수 있다.
- [0052] 임의의 적절한 흡착성 크로마토그래피 수지가 정제에 활용될 수 있다. 바람직한 흡착성 크로마토그래피 수지는 수산화인회석 크로마토그래피, 소수성 전하 유도 크로마토그래피 (HCIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 혼합된 방식 이온 교환 크로마토그래피, 고정된 금속 친화성 크로마토그래피 (IMAC), 염료 리간드 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 그리고 이들의 조합을 포함한다. 적합한 수산화인회석 수지의 실례는 세라믹 수산화인회석 (CHT 유형 I 및 유형 II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), HA Ultrogel 수산화인회석 (Pall Corp., East Hills, N.Y.), 그리고 세라믹 불화인회석 (CFT 유형 I 및 유형 II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)을 포함한다. 적합한 HCIC 수지의 실례는 MEP Hypercel 수지 (Pall Corp., East Hills, N.Y.)이다. 적합한 HIC 수지의 실례는 부틸-세파로오스, 헥실-세파로오스, 페닐-세파로오스, 그리고 옥틸 세파로오스 수지 (이들 모두 GE Healthcare, Piscataway, N.J.)뿐만 아니라 마크로-프렙 메틸 및 마크로-프렙 t-부틸 수지 (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)를 포함한다. 적합한 이온 교환 수지의 실례는 SP-세파로오스, CM-세파로오스, 그리고 Q-세파로오스 수지 (이들 모두 GE Healthcare, Piscataway, N.J.), 그리고 Unosphere S 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)를 포함한다. 적합한 혼합된 방식 이온 교환체의 실례는 Bakerbond ABx 수지 (JT Baker, Phillipsburg N.J.)를 포함한다. 적합한 IMAC 수지의 실례는 퀼레이팅 세파로오스 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 및 Profinity IMAC 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)을 포함한다. 적합한 염료 리간드 수지의 실례는 블루 세파로오스 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 및 Affi-겔 블루 수지 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)를 포함한다. 적합한 친화성 수지의 실례는 단백질 A 세파로오스 수지 (가령, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.)를 포함하고, 여기서 세포 결합 작용제는 항체이고, 그리고 렉틴 친화성 수지, 예를 들면, Lentil 렉틴 세파로오스 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)를 포함하고, 여기서 세포 결합 작용제는 적절한 렉틴 결합 부위를 보유한다. 대안으로, 세포 결합 작용제에 특이적인 항체가 이용될 수 있다. 이런 항체는 예로서, 세파로오스 4 빠른 유동 수지 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)에 고정될 수 있다. 적합한 역상 수지의 실례는 C4, C8, 그리고 C18 수지 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.)를 포함한다.
- [0053] 임의의 적절한 비-흡착성 크로마토그래피 수지가 정제에 활용될 수 있다. 적합한 비-흡착성 크로마토그래피 수지의 실례는 당업자에게 공지된 SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ 수지 (가령, S-200 및 S-300), SUPERDEX™ 수지 (가령, SUPERDEX™ 75 및 SUPERDEX™ 200), BIO-GEL® 수지 (가령, P-6, P-10, P-30, P-60, 그리고 P-100) 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0054] 본 발명의 공정에 의해 제조된 세포 결합 작용제-세포독성 작용제 접합체는 실제적으로 높은 순도 및 안정성을 갖는다. 본 발명의 한 양상에서, 실제적으로 높은 순도의 세포 결합 작용제-세포독성 작용제 접합체는 다음의 특질 중에서 하나 또는 그 이상을 갖는다: (a) 25%보다 적은, 20%보다 적은, 15%보다 적은 (가령, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%보다 적거나 또는 이와 동등한) 항체 단편화, (b) 90%보다 큰 (가령, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%보다 크거나 또는 이와 동등

한), 바람직하게는 95%보다 큰 접합체 종류가 단위체성이고, (c) 접합체 제조물에서 접합되지 않은 링커 수준이 약 10%보다 적고 (가령, 약 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0%보다 적거나 또는 이와 동등하고) (전체 링커에 비하여), (d) 10%보다 적은 (가령, 약 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0%보다 적거나 또는 이와 동등한) 접합체 종류가 교차연결되고, (e) 접합체 제조물에서 유리 세포독성 작용제 수준이 약 2%보다 적고 (가령, 약 1.5%, 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.1%, 1.0%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 또는 0%보다 적거나 또는 이와 동등하고) (전체 세포독성 작용제에 비하여 mol/mol) 및/또는 (f) 저장 동안 (가령, 약 1 주, 약 2 주, 약 3 주, 약 1 개월, 약 2 개월, 약 3 개월, 약 4 개월, 약 5 개월, 약 6 개월, 약 1 년, 약 2 년, 약 3 년, 약 4 년, 또는 약 5 년 후) 유리 세포독성 작용제의 수준에서 실제적인 증가 없음. 유리 세포독성 작용제의 수준에서 "실제적인 증가"는 일정한 저장 시간 (가령, 약 1 주, 약 2 주, 약 3 주, 약 1 개월, 약 2 개월, 약 3 개월, 약 4 개월, 약 5 개월, 약 6 개월, 약 1 년, 약 2 년, 약 3 년, 약 4 년, 또는 약 5 년) 후, 유리 세포독성 작용제의 수준에서 증가가 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 약 1.0%, 약 1.1%, 약 1.2%, 약 1.3%, 약 1.4%, 약 1.5%, 약 1.6%, 약 1.7%, 약 1.8%, 약 1.9%, 약 2.0%, 약 2.2%, 약 2.5%, 약 2.7%, 약 3.0%, 약 3.2%, 약 3.5%, 약 3.7%, 또는 약 4.0%보다 적다는 것을 의미한다.

[0055] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "접합되지 않은 링커"는 이중기능성 교차연결 시약과 공유 연결되는 세포 결합 작용제를 지칭하고, 여기서 상기 세포 결합 작용제는 이중기능성 교차연결 시약의 링커를 통해 세포독성 작용제에 공유적으로 연계되지 않는다 (즉, "접합되지 않은 링커"는 CBA-L에 의해 대표될 수 있는데, 여기서 CBA는 세포 결합 작용제를 나타내고, 그리고 L은 이중기능성 교차연결 시약을 나타낸다. 대조적으로, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체는 CBA-L-D에 의해 대표될 수 있는데, 여기서 D는 세포독성 작용제를 나타낸다).

[0056] 한 구체예에서, 세포 결합 작용제 세포독성 작용제 접합체에서 세포독성 작용제 대 세포 결합 작용제 (즉, DAR)의 평균 몰 비율은 약 1 내지 약 10, 약 2 내지 약 7, 약 3 내지 약 5, 약 2.5 내지 약 4.5 (가령, 약 2.5, 약 2.6, 약 2.7, 약 2.8, 약 2.9, 약 3.0, 약 3.1, 약 3.3, 약 3.4, 약 3.5, 약 3.6, 약 3.7, 약 3.8, 약 3.9, 약 4.0, 약 4.1, 약 4.2, 약 4.3, 약 4.4, 약 4.5), 약 3.0 내지 약 4.0, 약 3.2 내지 약 4.2, 또는 약 4.5 내지 5.5 (가령, 약 4.5, 약 4.6, 약 4.7, 약 4.8, 약 4.9, 약 5.0, 약 5.1, 약 5.2, 약 5.3, 약 5.4, 또는 약 5.5)이다.

#### 세포 결합 작용제

[0058] 본 발명의 공정에서 이용을 위해, 세포 결합 작용제는 세포, 전형적으로 및 바람직하게는, 동물 세포 (가령, 인간 세포)에 결합하는 임의의 적절한 작용제일 수 있다. 세포 결합 작용제는 바람직하게는, 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 적합한 세포 결합 작용제는 예로서, 항체 (가령, 단일클론 항체 및 이들의 단편), 인터페론 (가령, 알파., 베타., 감마.), 림포카인 (가령, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6), 호르몬 (가령, 인슐린, TRH (갑상선자극 호르몬 방출 호르몬), MSH (멜라닌세포 자극 호르몬), 스테로이드 호르몬, 예를 들면, 안드로겐 및 에스트로겐), 성장 인자 및 집락 자극 인자, 예를 들면, EGF, TGF-알파, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF 및 GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)), 영양소-수송 분자 (가령, 트랜스페린), 비타민 (가령, 엽산염) 및 세포의 표면 상에서 표적 분자에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 작용제 또는 분자를 포함한다.

[0059] 세포 결합 작용제가 항체인 경우에, 이것은 폴리펩티드 또는 글리코토프인 항원에 결합하고, 그리고 막경유 분자 (가령, 수용체) 또는 리간드, 예를 들면, 성장 인자일 수 있다. 예시적인 항원은 분자, 예를 들면, 레닌; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬을 비롯한 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지질단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 난포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예를 들면, 인자 vmc, 인자 IX, 조직 인자 (TF), 그리고 폰빌레브란트 인자; 항응고 인자, 예를 들면, 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성체, 예를 들면, 우로카니아제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성체 (t-PA); 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 피사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나아제; RANTES (활성화 시에 조절되고 정상적으로 T-세포 발현되고 분비됨); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예를 들면, 인간 혈청 알부민; 뮤에레리안-저해 물질; 렐락신 A-사슬; 렐락신 B-사슬; 프로렐락신; 생쥐 성선자극호르몬-연관된 펩티드; 미생물 단백질, 예를 들면, 베타 락타마아제; DNA분해효소; IgE; 세포독성 T-림프구 연관된 항원 (CTLA), 예를 들면, CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스양 인자; 신경영양 인자, 예를 들면, 뼈-유래된 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예를 들면, NGF-.베타.; 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예를 들면, aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 전환 성장 인자 (TGF), 예를

들면, TGF-알파 및 TGF-.베타.1, TGF-.베타.2, TGF-.베타.3, TGF-.베타.4, 또는 TGF-.베타.5를 비롯한 TGF-베타; 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; EpCAM; GD3; FLT3; PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; EphA 수용체; EphB 수용체; 엽산염 수용체; FOLR1; 매소텔린; 크립토;  $\alpha\beta_6$ ; 인테그린; VEGF, VEGFR; EGFR; 섬유모세포 성장 인자 수용체 (FGFR) (가령, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4); 트랜스페린 수용체; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; CD 단백질, 예를 들면, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 또는 전체적으로 참조로서 편입되는 U.S. 특허 출원 공개 번호 2008/0171040 또는 U.S. 특허 출원 공개 번호 2008/0305044에서 개시된 하나 또는 그 이상의 종양-연관된 항원 또는 세포 표면 수용체에 결합하는 항체; 에리트로포이에틴; 뼈유도성 인자; 면역독소; 뼈 형성 단백질 (BMP); 인터페론, 예를 들면, 인터페론-알파, -베타, 그리고 -감마; 집락 자극 인자 (CSFs), 예를 들면, M-CSF, GM-CSF, 그리고 G-CSF; 인터류킨 (ILs), 예를 들면, IL-1 내지 IL-10; 초과산화물 디스뮤타아제; T 세포 수용체; 표면 막 단백질; 봉괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예를 들면, 예로서 HIV 외피의 부분; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예를 들면, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 연관된 항원, 예를 들면, HER2, HER3, 또는 HER4 수용체; 엔도글린; c-Met; IGF1R; 전립선 항원, 예를 들면, PCA3, PSA, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, TMEFF2, 그리고 STEAP1; LGR5; B7H4; 그리고 상기 열거된 폴리펩티드 중에서 한 가지의 단편을 포함한다.

[0060]

추가적으로, 골수 세포에 결합하는 GM-CSF는 급성 골수성 백혈병으로부터 병든 세포에 세포 결합 작용제로서 이용될 수 있다. 활성화된 T-세포에 결합하는 IL-2는 이식조직 이식편 거부반응의 예방, 이식편 대 숙주 질환의 치료 및 예방, 그리고 급성 T-세포 백혈병의 치료에 이용될 수 있다. 멜라닌세포에 결합하는 MSH는 흑색종에 지향된 항체가 그러한 것처럼 흑색종의 치료에 이용될 수 있다. 엽산은 난소 종양 및 다른 종양에서 발현된 엽산염 수용체를 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 표피 성장 인자는 편평상피 암, 예를 들면, 폐 및 두경부 암을 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 소마토스타틴은 신경모세포종 및 다른 종양 유형을 표적으로 하는데 이용될 수 있다.

[0061]

유방 및 고환의 암은 세포 결합 작용제로서 각각, 에스트로겐 (또는 에스트로겐 유사체) 또는 안드로겐 (또는 안드로겐 유사체)으로 성공적으로 표적화될 수 있다.

[0062]

용어 "항체"는 본원에서 이용된 바와 같이, 임의의 면역글로불린, 임의의 면역글로불린 단편, 예를 들면, Fab, Fab', F(ab').sub.2, dsFv, sFv, 미니바디, 디아바디, 트리바디, 테트라바디 (Parham, J. Immunol., 131: 2895-2902 (1983); Spring et al. J. Immunol., 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244 (1960), Kim et al., Mol. Cancer Ther., 7: 2486-2497 (2008), Carter, Nature Revs., 6: 343-357 (2006)), 또는 세포의 표면 상에서 항원에 결합할 수 있는 면역글로불린 키메라 (가령, 이것은 상보성 결정 영역 (CDR)을 내포한다)를 지칭한다. 임의의 적절한 항체가 세포 결합 작용제로서 이용될 수 있다. 당업자는 적절한 항체의 선별이 표적화되는 세포 개체군에 의존할 것이라는 것을 인지할 것이다. 이점에 관하여, 특정 세포 개체군 (전형적으로 및 바람직하게는, 병든 세포 개체군)에서 선별적으로 발현되는 세포 표면 분자 (즉, 항원)의 유형 및 숫자가 본 발명 조성물에서 이용을 위한 적절한 항체의 선별을 지배할 것이다. 세포 표면 발현 프로필은 종양 세포 유형을 비롯한 매우 다양한 세포 유형에 대해 알려져 있거나, 또는 알려지지 않으면, 일파적인 분자생물학 및 조직화학 기술을 이용하여 결정될 수 있다.

[0063]

항체는 다중클론 또는 단일클론일 수 있지만, 가장 바람직하게는 단일클론 항체이다. 본원에서 이용된 바와 같이, "다중클론" 항체는 전형적으로, 면역화된 동물의 혈청에서 내포된 항체 분자의 이질성 개체군을 지칭한다. "단일클론" 항체는 특정 항원에 특이적인 항체 분자의 균질한 개체군을 지칭한다. 단일클론 항체는 전형적으로, B 립프구 ("B 세포")의 단일 클론에 의해 생산된다. 단일클론 항체는 표준 하이브리도마 기법을 비롯하여, 당업자에게 공지된 다양한 기술을 이용하여 획득될 수 있다 (가령, Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), 그리고 C. A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5.sup.th Ed., Garland Publishing, New York, N.Y. (2001)를 참조한다). 간단히 말하면, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 방법은 전형적으로, 임의의 적절한 동물, 전형적으로 및 바람직하게는, 생쥐에 항원 (즉, "면역원")을 주입하는 것을 수반한다. 상기 동물은 차후에 희생되고, 그리고 이의 비장으로부터 단리된 B 세포가 인간 골수종 세포와 융합된다. 하이브리드 세포 (즉, "하이브리도마")가 생산되는데, 이것은 무한히 증식하고, 그리고 원하는 특이성을 갖는 높은 역가의 항체를 시험판내에서 연속적으로 분비한다. 당분야에서 공지된 임의의 적절한 방법이 원하는 특이성을 갖는 항체를 생산하는 하이브

리도마 세포를 확인하는데 이용될 수 있다. 이런 방법은 예로서, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA), 웨스턴 블롯 분석, 그리고 방사면역검정을 포함한다. 하이브리도마의 개체군은 개별 클론을 단리하기 위해 선별검사되고, 이들은 각각, 항원에 대한 단일 항체 종류를 분비한다. 각 하이브리도마가 단일 B 세포와의 융합으로부터 유래된 클론이기 때문에, 이것이 생산하는 모든 항체 분자뿐만 아니라 이들의 항원 결합 부위 및 아이소타입은 구조에서 동일하다. 단일클론 항체는 또한, EBV-하이브리도마 기법 (가령, Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2): 361-67 (1984), 그리고 Roder et al., Methods Enzymol., 121: 140-67 (1986)을 참조한다), 박테리오파지 벡터 발현 시스템 (가령, Huse et al., Science, 246: 1275-81 (1989)을 참조한다), 또는 항체 단편, 예를 들면, Fab 및 scFv (단일 사슬 가변 영역)을 포함하는 파지 전시 라이브러리 (가령, U.S. 특허 번호 5,885,793 및 5,969,108, 그리고 국제 특허 출원 공개 WO 92/01047 및 WO 99/06587을 참조한다)를 비롯한 다른 적합한 기술을 이용하여 산출될 수 있다.

[0064]

단일클론 항체는 임의의 적절한 동물로부터 단리되거나 또는 생산될 수 있지만, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 생쥐 또는 인간, 그리고 가장 바람직하게는 인간에서 생산된다. 생쥐에서 항체를 생산하기 위한 방법은 당업자에게 널리 공지되고 본원에서 설명된다. 인간 항체에 대하여, 당업자는 다중클론 항체가 적절한 항원으로 예방접종된 또는 면역화된 인간 개체의 혈청으로부터 단리될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 대안으로, 인간 항체는 비인간 동물, 예를 들면, 생쥐에서 인간 항체를 생산하기 위해 공지된 기술을 조정함으로써 산출될 수 있다 (가령, U.S. 특허 번호 5,545,806, 5,569,825, 그리고 5,714,352, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 번호 2002/0197266 A1을 참조한다).

[0065]

인간 항체, 특히 인간 단일클론 항체는 인간에서 치료적 적용을 위한 이상적인 선택이긴 하지만, 전형적으로 생쥐 단일클론 항체보다 산출하기가 더욱 어렵다. 생쥐 단일클론 항체는 하지만, 인간에 투여될 때 급속한 숙주 항체 반응을 유도하는데, 이것은 항체-세포독성 작용제 접합체의 치료적 또는 진단적 잠재력을 감소시킬 수 있다. 이를 합병증을 회피하기 위해, 단일클론 항체는 바람직하게는, 인간 면역계에 의해 "외래"인 것으로 인식되지 않는다.

[0066]

이를 위해, 파지 전시가 항체를 산출하는데 이용될 수 있다. 이점에 관하여, 항체의 항원 결합 가변 (V) 도메인을 인코딩하는 파지 라이브러리가 표준 분자생물학 및 재조합 DNA 기술을 이용하여 산출될 수 있다 (가령, Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3.sup.rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)을 참조한다). 원하는 특이성을 갖는 가변 영역을 인코딩하는 파지가 원하는 항원에 특이적 결합에 대해 선별되고, 그리고 선별된 가변 도메인을 포함하는 완전한 인간 항체가 재구성된다. 재구성된 항체를 인코딩하는 핵산 서열은 단일클론 항체의 특징을 갖는 인간 항체가 세포에 의해 분비되도록, 적합한 세포주, 예를 들면, 하이브리도마 생산에 이용된 글수종 세포 내로 도입된다 (가령, Janeway et al., 위와 같음, Huse et al., 위와 같음, 그리고 U.S. 특허 번호 6,265,150을 참조한다). 대안으로, 단일클론 항체는 특정한 인간 종쇄와 경쇄 면역글로불린 유전자에 대해 유전자도입인 생쥐로부터 산출될 수 있다. 이런 방법은 당분야에서 공지되고, 그리고 예로서, U.S. 특허 번호 5,545,806 및 5,569,825, 그리고 Janeway et al., 위와 같음에서 설명된다.

[0067]

가장 바람직하게는, 항체는 인간화 항체이다. 본원에서 이용된 바와 같이, "인간화" 항체는 항체의 항원 결합 루프를 형성하는, 생쥐 단일클론 항체의 상보성 결정 영역 (CDR)이 인간 항체 분자의 프레임워크 위에 합체되는 것이다. 생쥐 및 인간 항체의 프레임워크의 유사성 때문에, 이러한 접근법은 인간 항체와 항원적으로 동일하지만, CDR 서열이 유래되었던 생쥐 단일클론 항체와 동일한 항원에 결합하는 단일클론 항체를 생산하는 것으로 당분야에서 일반적으로 인정된다. 인간화 항체를 산출하기 위한 방법은 당분야에서 널리 공지되고, 그리고 예로서, Janeway et al., 위와 같음, U.S. 특허 번호 5,225,539, 5,585,089 및 5,693,761, 유럽 특허 번호 0239400 B1, 그리고 영국 특허 번호 2188638에서 상세하게 설명된다. 인간화 항체는 또한, U.S. 특허 번호 5,639,641 및 Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235: 959-973 (1994)에서 설명된 항체 표면치환 기술을 이용하여 산출될 수 있다. 본 발명 조성물의 접합체에서 이용된 항체는 가장 바람직하게는 인간화 단일클론 항체이지만, 앞서 설명된 바와 같은 인간 단일클론 항체 및 생쥐 단일클론 항체 역시 발명의 범위 내에 있다.

[0068]

최소한 하나의 항원 결합 부위를 갖고, 그리고 따라서, 표적 세포의 표면 상에 존재하는 최소한 하나의 항원 또는 수용체를 인식하고 여기에 결합하는 항체 단편 역시 본 발명의 범위 안에 있다. 이점에 관하여, 무순상 항체 분자의 단백질분해 개열은 항원을 인식하고 여기에 결합하는 능력을 유지하는 다양한 항체 단편을 생산할 수 있다. 가령, 프로테아제 파파인으로 항체 분자의 제한된 소화는 전형적으로 3개의 단편을 생산하는데, 이들 중에서 2개는 동일하고, 그리고 이들이 부모 항체 분자의 항원 결합 활성을 유지하기 때문에, Fab 단편으로서 지칭된다. 효소 펩신으로 항체 분자의 개열은 2개의 항체 단편을 정상적으로 생산하는데, 이들 중에서 하나는 항체

분자의 양쪽 항원 결합 팔을 유지하고, 그리고 따라서, F(ab').sub.2 단편으로서 지칭된다. 디티오토레이를 또는 메르캅토에틸아민으로 F(ab').sub.2 단편의 환원은 Fab' 단편으로서 지칭된 단편을 생산한다. 합성 웨티드를 통해 가벼운 항체 사슬의 V 도메인에 연결된 항체 중쇄의 가변 (V) 도메인을 포함하는 절두된 Fab 단편으로 구성되는 단일 사슬 가변 영역 단편 (sFv) 항체 단편은 일과적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 산출될 수 있다 (가령, Janeway et al., 위와 같음을 참조한다). 유사하게, 이황화-안정된 가변 영역 단편 (dsFv)은 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다 (가령, Reiter et al., Protein Engineering, 7: 697-704 (1994)를 참조한다). 항체 단편은 하지만, 본 발명의 맥락에서 이들 예시적인 유형의 항체 단편에 한정되지 않는다. 원하는 세포 표면 수용체 또는 항원을 인식하고 여기에 결합하는 임의의 적절한 항체 단편이 이용될 수 있다. 항체 단편은 예로서, Parham, J. Immunol., 131: 2895-2902 (1983), Spring et al., J. Immunol., 113: 470-478 (1974), 그리고 Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244 (1960)에서 더욱 설명된다. 항체-항원 결합은 당분야에서 공지된 임의의 적절한 방법, 예를 들면, 예로서 방사면역검정 (RIA), ELISA, 웨스턴 블롯, 면역침전, 그리고 경쟁적 저해 검정을 이용하여 검정될 수 있다 (가령, Janeway et al., 위와 같음, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 번호 2002/0197266 A1을 참조한다).

[0069]

이에 더하여, 항체는 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. "키메라"는 항체가 최소한 2개의 상이한 종으로부터 획득되거나 또는 유래된 최소한 2개의 면역글로불린, 또는 이들의 단편 (가령, 2개의 상이한 면역글로불린, 예를 들면, 뮤린 면역글로불린 가변 영역과 합동된 인간 면역글로불린 불변 영역)을 포함하는 것으로 의미된다. 항체는 또한, 도메인 항체 (dAb) 또는 이의 항원 결합 단편, 예를 들면, 예로서 나타 항체 (가령, Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3: 752, (1996)), 또는 상어 항체, 예를 들면, 예로서 새로운 항원 수용체 (IgNAR) (가령, Greenberg et al., Nature, 374: 168 (1995), 그리고 Stanfield et al., Science, 305: 1770-1773 (2004)을 참조한다)일 수 있다.

[0070]

본 발명의 맥락에서 임의의 적절한 항체가 이용될 수 있다. 가령, 단일클론 항체 J5는 공통 급성 림프모구성 백혈병 항원 (CALLA)에 특이적인 뮤린 IgG2a 항체이고 (Ritz et al., Nature, 283: 583-585 (1980)), 그리고 CALLA를 발현하는 세포 (가령, 급성 림프모구성 백혈병 세포)를 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 단일클론 항체 MY9는 CD33 항원에 특이적으로 결합하는 뮤린 IgG1 항체이고 (Griffin et al., Leukemia Res., 8: 521 (1984)), 그리고 CD33을 발현하는 세포 (가령, 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포)를 표적으로 하는데 이용될 수 있다.

[0071]

유사하게, 단일클론 항체 항-B4 (B4로서 또한 지칭됨)는 B 세포 상에 CD19 항원에 결합하는 뮤린 IgG1 항체이고 (Nadler et al., J. Immunol., 131: 244-250 (1983)), 그리고 CD19를 발현하는 B 세포 또는 병든 세포 (가령, 비호지킨 림프종 세포 및 만성 림프모구성 백혈병 세포)를 표적으로 하는데 이용될 수 있다. N901은 소세포 폐 종양을 비롯하여, 신경내분비 기원의 세포 상에서 발견된 CD56 (신경 세포 부착 분자) 항원에 결합하는 뮤린 단일클론 항체인데, 이것은 약물을 신경내분비 기원의 세포에 표적화하기 위해 접합체에서 이용될 수 있다. J5, MY9, 그리고 B4 항체는 바람직하게는, 접합체의 일부로서 그들의 이용에 앞서 표면치환되거나 또는 인간화된다. 항체의 표면치환 또는 인간화는 예로서, Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-73 (1994)에서 설명된다.

[0072]

이에 더하여, 단일클론 항체 C242는 CanAg 항원 (가령, U.S. 특허 번호 5,552,293을 참조한다)에 결합하고, 그리고 접합체를 CanAg 발현 종양, 예를 들면, 결장직장, 췌장, 비소세포 폐, 그리고 위암에 표적화하는데 이용될 수 있다. HuC242는 단일클론 항체 C242의 인간화 형태이다 (가령, U.S. 특허 번호 5,552,293을 참조한다). HuC242가 생산되는 하이브리도마는 ECACC 식별 번호 90012601로 기탁된다. HuC242는 CDR-항체 방법론 (가령, U.S. 특허 번호 5,585,089, 5,693,761, 그리고 5,693,762를 참조한다) 또는 표면치환 기술 (가령, U.S. 특허 번호 5,639,641을 참조한다)을 이용하여 제조될 수 있다. HuC242는 접합체를 CanAg 항원을 발현하는 종양 세포, 예를 들면, 예로서 결장직장, 췌장, 비소세포 폐, 그리고 위암 세포에 표적화하는데 이용될 수 있다.

[0073]

난소암 및 전립선암 세포를 표적으로 하기 위해, 항-MUC1 항체가 접합체에서 세포 결합 작용제로서 이용될 수 있다. 항-MUC1 항체는 예로서, 항-HMFG-2 (가령, Taylor-Papadimitriou et al., Int. J. Cancer, 28: 17-21 (1981)), hCTM01 (가령, van H of et al., Cancer Res., 56: 5179-5185 (1996)을 참조한다), 그리고 DS6을 포함한다. 전립선암 세포 역시 항-전립선-특이적 막 항원 (PSMA)을 세포 결합 작용제로서 이용함으로써 접합체, 예를 들면, J591로 표적화될 수 있다 (가령, Liu et al., Cancer Res., 57: 3629-3634 (1997)을 참조한다). 게다가, Her2 항원을 발현하는 암 세포, 예를 들면, 유방, 전립선, 그리고 난소암은 항-Her2 항체, 예를 들면, 트라스투주맙을 세포 결합 작용제로서 이용함으로써 접합체로 표적화될 수 있다. 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 및 이의 변이체를 발현하는 세포, 예를 들면, 유형 III 결손 돌연변이주, EGFRvIII은 항-EGFR 항체를 이용함으

로써 접합체로 표적화될 수 있다. 항-EGFR 항체는 국제 특허 출원 번호 PCT/US11/058,385 및 PCT/US11/058,378에서 설명된다. 항-EGFRvIII 항체는 U.S. 특허 번호 7,736,644 및 7,628,986, 그리고 U.S. 출원 공개 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790 및 2009/0155282에서 설명된다. 인슐린-유사 성장 인자 수용체에 결합하는 항-IGF-IR 항체, 예를 들면, U.S. 특허 번호 7,982,024에서 설명된 것들 역시 접합체에서 이용될 수 있다. CD27L, 크립토, CD138, CD38, EphA2, 인테그린, CD37, 엽산염, CD20, PSGR, NGEP, PSCA, TMEFF2, STEAP1, 엔도글린, 그리고 Her3에 결합하는 항체 역시 접합체에서 이용될 수 있다.

[0074] 한 구체예에서, 항체는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 항-HER2 항체 (가령, 트라스투주맙), 비바투주맙, 시브로투주맙, 리툭시맙, huDS6, 국제 특허 출원 공개 WO 2010/124797에서 설명된 항-메소텔린 항체 (가령, MFT), U.S. 특허 출원 공개 2010/0093980에서 설명된 항-크립토 항체 (가령, huB3F6), U.S. 특허 출원 공개 2007/0183971에서 설명된 항-CD138 항체 (가령, huB-B4), 국제 특허 출원 번호 PCT/US11/058,385 및 PCT/US11/058,378에서 설명된 항-EGFR 항체 (가령, EGFR-7), U.S. 특허 번호 7,736,644 및 7,628,986, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790 및 2009/0155282에서 설명된 항-EGFRvIII 항체, 국제 특허 출원 공개 WO 2011/039721 및 WO 2011/039724에서 설명된 인간화 EphA2 항체 (가령, 2H11R35R74); 국제 특허 출원 공개 WO 2008/047242에서 설명된 항-CD38 항체 (가령, hu38SB19), 국제 특허 출원 공개 WO 2011/106528, 그리고 U.S. 특허 출원 공개 2012/0009181에서 설명된 엽산길항체 항체 (가령, huMov19); U.S. 특허 번호 5,958,872, 6,596,743, 그리고 7,982,024에서 설명된 항-IGF1R 항체; U.S. 특허 출원 공개 2011/0256153에서 설명된 항-CD37 항체 (가령, huCD37-3); U.S. 출원 공개 2006/0127407에서 설명된 항-인테그린  $\alpha_v\beta_6$  항체 (가령, CNT095); 그리고 국제 특허 출원 공개 WO 2012/019024에서 설명된 항-Her3 항체로 구성된 군에서 선택된다. 한 구체예에서, 세포 결합 작용제는 FGFR2에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (가령, US2014/030820에서 설명된 것들, 이의 전체 교시는 본원에 참조로서 편입된다)이다. 다른 구체예에서, 세포 결합 작용제는 FGFR2 및 FGFR4에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (가령, US 2014/301946에서 설명된 것들, 이의 전체 교시는 본원에 참조로서 편입된다)이다.

[0075] 또 다른 구체예에서, 세포 결합 작용제는 인간 FGFR3 (서열 번호: 11)에 결합한다. 더욱 특정하게는, 세포 결합 작용제는 인간 FGFR3 (서열 번호 11)에 결합하고, 그리고 서열 GYMFTSYGIS (서열 번호 1)를 갖는 CDRH1, 서열 WVSTYNGDTNYAQKFQFG (서열 번호 2)를 갖는 CDRH2, 서열 VLGYYDSIDGYYYGMDV (서열 번호 3)를 갖는 CDRH3, 서열 GGNNIGDKSVH (서열 번호 4)를 갖는 CDRL1, 서열 LDTERPS (서열 번호 5)를 갖는 CDRL2, 그리고 서열 QVWDSGSDHVV (서열 번호 6)를 갖는 CDRL3을 포함한다. 훨씬 특정하게는, 세포 결합 작용제는 다음의 가변 중쇄 아미노산 서열:

[0076] EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYMFTSYG1SWVRQAPGQGLEWMGVVSTYNGDTNYAQKFQGRVTVTTDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCARVLGY YDSIDGYYYGMDVWGGTTTVSS (서열 번호 7) 및 다음의 가변 경쇄 아미노산 서열:

[0077] QSVLTQPPSLSVAPGKTATFTCGGNNIGDKSVHWYRQKPGQAPVLVMYLDTERPSGIPERMSGSNFGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGG TKLTVLG (서열 번호 8)을 더욱 포함한다.

[0078] 다른 더욱 특정한 구체예에서, 세포 결합 작용제는 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 더욱 포함한다. 다른 구체예에서, 세포 결합 작용제는 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 경쇄 및 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 각각 포함하는 2개의 중쇄를 더욱 포함한다.

[0079] 특히 바람직한 항체는 본원에서 설명된 인간화 단일클론 항체이다. 실례는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 인간화 단일클론 항-Her2 항체 (가령, 트라스투주맙), 비바투주맙, 시브로투주맙, CNT095, huDS6, 그리고 리툭시맙을 포함하지만 이들에 한정되지 않는다 (가령, U.S. 특허 번호 5,639,641 및 5,665,357, U.S. 특허 출원 번호 60/424,332 (이것은 U.S. 특허 번호 7,557,189에 관련된다), 국제 (PCT) 특허 출원 공개 WO 02/16401, Pedersen et al., 위와 같음, Roguska et al., 위와 같음, Liu et al., 위와 같음, Nadler et al., 위와 같음, Colomer et al., Cancer Invest., 19: 49-56 (2001), Heider et al., Eur. J. Cancer, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., J. Clin. Oncol., 12: 1193-1203 (1994), 그리고 Maloney et al., Blood, 90: 2188-2195 (1997)을 참조한다). 다른 인간화 단일클론 항체는 당분야에서 공지되고 본 발명과 관련하여 이용될 수 있다.

[0080] 한 구체예에서, 세포 결합 작용제는 huMy9-6, 또는 다른 관련된 항체인데, 이들은 U.S. 특허 번호 7,342,110 및 7,557,189 (본원에 참조로서 편입됨)에서 설명된다.

- [0081] 다른 구체예에서, 세포 결합 작용제는 U.S. 출원 번호 61/307,797, 61/346,595, 61/413,172 및 U.S. 출원 번호 13/033,723 (US 2012-0009181 A1로서 공개됨)에서 설명된 엽산길항체 수용체 항체이다. 이들 모든 출원의 교시는 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.
- [0082] 다른 구체예에서, 세포 결합 작용제는 인간 엽산염 수용체 1 (FOLR1)에 특이적으로 결합하는 인간화 엽산길항체 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 여기서 상기 항체는 다음을 포함한다: (a) GYFMN을 포함하는 중쇄 CDR1; RIHPYDGDTFYNQXaa<sub>1</sub>FXaa<sub>2</sub>Xaa<sub>3</sub>을 포함하는 중쇄 CDR2; 그리고 YDGSRAMDY를 포함하는 중쇄 CDR3; 그리고 (b) KASQSVSFAGTSLMH를 포함하는 경쇄 CDR1; RASNLEA를 포함하는 경쇄 CDR2; 그리고 QQSREYPYT를 포함하는 경쇄 CDR3; 여기서 Xaa<sub>1</sub>은 K, Q, H, 그리고 R에서 선택되고; Xaa<sub>2</sub>는 Q, H, N, 그리고 R에서 선택되고; 그리고 Xaa<sub>3</sub>은 G, E, T, S, A, 그리고 V에서 선택된다. 바람직하게는, 중쇄 CDR2 서열은 RIHPYDGDTFYNQKFQG를 포함한다.
- [0083] 다른 구체예에서, 엽산길항체 항체는 다음의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 인간 엽산염 수용체 1에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다:
- [0084] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGR
- [0085] IHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYD
- [0086] GSRAAMDYWGQGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
- [0087] FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYI
- [0088] CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKD
- [0089] TLMISRTPETCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
- [0090] YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
- [0091] TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
- [0092] SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK.
- [0093] 다른 구체예에서, 엽산길항체 항체는 2010년 4월 7일자에 ATCC에 기탁되고, 그리고 ATCC 수탁 번호 PTA-10772 및 PTA-10773 또는 10774를 갖는 플라스미드 DNA에 의해 인코딩된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0094] 다른 구체예에서, 엽산길항체 항체는
- [0095] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGR IHPYDG
- [0096] DTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAAMDYWGQG
- [0097] TTVTVSS와 최소한 약 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변 도메인, 그리고
- [0098] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRL
- [0099] LIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPY
- [0100] TFGGGTKEIKR; 또는
- [0101] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRL
- [0102] LIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPY
- [0103] TFGGGTKEIKR과 최소한 약 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 도메인을 포함하는 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0104] 비록 세포 결합 작용제가 바람직하게는 항체이긴 하지만, 세포 결합 작용제는 또한, 비항체 분자일 수 있다. 적합한 비항체 분자는 예로서, 인터페론 (가령, 알파, 베타, 또는 감마 인터페론), 림포카인 (가령, 인터류킨 2 (IL-2), IL-3, IL-4, 또는 IL-6), 호르몬 (가령, 인슐린), 성장 인자 (가령, EGF, TGF-알파, FGF, 그리고 VEGF), 집락 자극 인자 (가령, G-CSF, M-CSF, 그리고 GM-CSF (가령, Burgess, Immunology Today, 5: 155-158 (1984)를 참조한다), 소마토스타틴, 그리고 트랜스페린 (가령, O'Keefe et al., J. Biol. Chem., 260: 932-937 (1985)를 참조한다)을 포함한다. 가령, 골수 세포에 결합하는 GM-CSF는 급성 골수성 백혈병 세포를 표적으로 하는 세포 결합 작용제로서 이용될 수 있다. 이에 더하여, 활성화된 T-세포에 결합하는 IL-2는 이식조직 이식편

거부반응의 예방, 이식편 대 숙주 질환의 치료 및 예방, 그리고 급성 T-세포 백혈병의 치료에 이용될 수 있다. 표피 성장 인자 (EGF)는 편평상피 암, 예를 들면, 폐암 및 두경부암을 표적으로 하는데 이용될 수 있다. 소마토 스타틴은 신경모세포종 세포 및 다른 종양 세포 유형을 표적으로 하는데 이용될 수 있다.

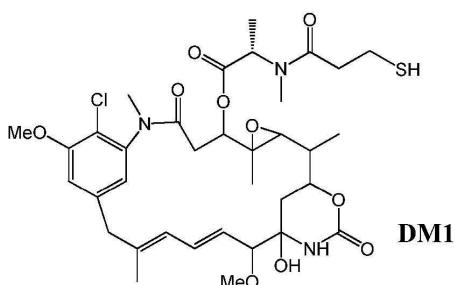
## 세포독성 작용제

본원에서 이용된 바와 같이, "세포독성 작용제"는 세포의 죽음을 유발하거나, 세포 사멸을 유도하거나, 또는 세포 생존력을 감소시키는 임의의 화합물을 지칭한다. 적합한 세포독성 작용제는 예로서, 메이탄시노이드 및 접합 가능 안사미토신 (가령, 2011년 11월 3일자에 제출된 국제 특허 출원 번호 PCT/US11/59131을 참조한다), 턱소이드, CC-1065 및 CC-1065 유사체, 그리고 돌라스타틴 및 돌라스타틴 유사체를 포함한다. 본 발명의 특정한 구체 예에서, 세포독성 작용제는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 유사체를 비롯한 메이탄시노이드이다. 메이탄시노이드는 미소관 형성을 저해하고 포유류 세포에 고도로 독성인 화합물이다. 적합한 메이탄시놀 유사체의 실례는 변형된 방향족 고리를 갖는 것들 및 다른 위치에서 변형을 갖는 것들을 포함한다. 이런 메이탄시노이드는 예로서, U.S. 특허 번호 4,256,746, 4,294,757, 4,307,016, 4,313,946, 4,315,929, 4,322,348, 4,331,598, 4,361,650, 4,362,663, 4,364,866, 4,424,219, 4,371,533, 4,450,254, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 그리고 6,333,410에서 설명된다.

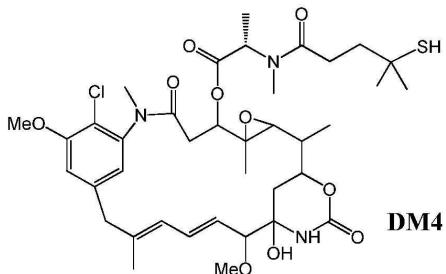
변형된 방향족 고리를 갖는 메이탄시놀 유사체의 실례는 다음을 포함한다: (1) C-19-데클로로 (U.S. 특허 번호 4,256,746) (안사미토신 P2의 LAH 환원에 의해 제조됨), (2) C-20-히드록시 (또는 C-20-테메틸) +/-C-19-데클로로 (U.S. 특허 번호 4,361,650 및 4,307,016) (스트렙토미세스 (Streptomyces) 또는 방선균 (Actinomycetes)을 이용한 탈메틸화 또는 LAH를 이용한 탈염소에 의해 제조됨), 그리고 (3) C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (--OCOR), +/-데클로로 (U.S. 특허 번호 4,294,757) (아실 염화물을 이용한 아실화에 의해 제조됨).

방향족 고리 이외의 위치의 변형을 갖는 메이탄시놀 유사체의 실례는 다음을 포함한다: (1) C-9-SH (U.S. 특허 번호 4,424,219) (메이탄시놀 및 H.sub.2S 또는 P.sub.2S.sub.5의 반응에 의해 제조됨), (2) C-14-알콕시메틸 (데메톡시/CH.sub.20R) (U.S. 특허 번호 4,331,598), (3) C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH.sub.20H 또는 CH.sub.20Ac) (U.S. 특허 번호 4,450,254) (노카르디아 (Nocardia)로부터 제조됨), (4) C-15-히드록시/아실옥시 (U.S. 특허 번호 4,364,866) (스트렙토미세스 (Streptomyces)에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 제조됨), (5) C-15-메톡시 (U.S. 특허 번호 4,313,946 및 4,315,929) (트레위아 누디플로라 (Trewia nudiflora)로부터 단리됨), (6) C-18-N-데메틸 (U.S. 특허 번호 4,362,663 및 4,322,348) (스트렙토미세스 (Streptomyces)에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조됨), 그리고 (7) 4,5-데옥시 (U.S. 특허 번호 4,371,533) (메이탄시놀의 티타늄 삼염화물/LAH 환원에 의해 제조됨).

본 발명의 특정한 구체예에서, 본 발명의 공정에서 이용될 수 있는 세포독성 작용제는  $N^2$ -데아세틸- $N^2$ -(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신으로서 또한 알려져 있는 티올-내포 메이탄시노이드 DM1이다. DM1의 구조는 화학식 (I)에 의해 대표된다:



본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 공정에서 이용될 수 있는 세포독성 작용제는  $N^{2'}\text{-데아세틸-}N^{2'}\text{-}(4\text{-메틸-4\text{-메르캅토-1\text{-옥소펜틸}})\text{-메이탄신으로서 또한 알려져 있는 티올-내포 메이탄시노이드 DM1이다. DM4의 구조는 화학식 (II)에 의해 대표된다:$

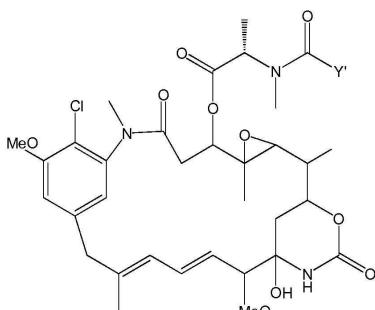


[0112]

다른 메이탄시노이드, 예를 들면, 황 원자를 보유하는 탄소 원자 상에서 모노 또는 디-알킬 치환을 보유하는 티올 및 이황화물-내포 메이탄시노이드가 본 발명의 맥락에서 이용될 수 있다. 특히 바람직하게는 C-3 위치에서 (a) C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 데스메틸 기능성, 그리고 (b) 아실 기가 방해된 슬퍼드릴 기를 보유하는 아실화된 아미노산 측쇄를 갖는 메이탄시노이드인데, 여기서 티올 기능성을 보유하는 아실 기의 탄소 원자는 1개 또는 2개의 치환체를 갖고, 상기 치환체는 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지된 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 더 나아가 여기서 이들 치환체 중에서 한 가지는 H일 수 있고, 그리고 여기서 아실 기는 카르보닐 기능성 및 황 원자 사이에 최소한 3개의 탄소 원자의 선형 사슬 길이를 갖는다.

[0114]

본 발명의 맥락에서 이용을 위한 추가 메이탄시노이드는 화학식 (III)에 의해 대표된 화합물을 포함한다:



[0115]

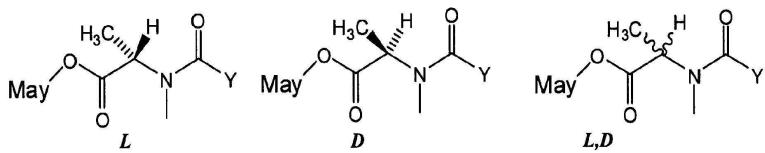
여기서 Y'는

[0116]

$(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ 를 나타내고, 여기서  $R_1$  및  $R_2$ 는 각각 독립적으로, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 분지된 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤�테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서  $R_2$ 는 또한 H일 수 있고, 여기서 A, B, D는 3-10개 탄소 원자를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순한 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 여기서  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  및  $R_{12}$ 는 각각 독립적으로 H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 분지된 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤�테로환상 방향족, 또는 헤�테로시클로알킬 라디칼이고, 여기서 1, m, n, o, p, q, r, s, 그리고 t는 각각 독립적으로 제로 또는 1 내지 5의 정수이고, 단서로서 1, m, n, o, p, q, r, s 및 t 중에서 최소한 2개는 임의의 시간에 제로가 아니고, 그리고 여기서 Z는 H, SR 또는 COR이고, 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 분지된 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤�테로환상 방향족, 또는 헤�테로시클로알킬 라디칼이다. 화학식 (III)의 바람직한 구체예는 (a)  $R_1$ 은 H이고,  $R_2$ 는 메틸이고, Z는 H이고, (b)  $R_1$  및  $R_2$ 는 메틸이고, Z는 H이고, (c)  $R_1$ 은 H이고,  $R_2$ 는 메틸이고, Z는  $-SCH_3$ 이고, 그리고 (d)  $R_1$  및  $R_2$ 는 메틸이고, Z는  $-SCH_3$ 인 화학식 (III)의 화합물을 포함한다.

[0118]

이런 추가 메이탄시노이드는 또한, 화학식 (IV-L), (IV-D), 또는 (IV-D,L)에 의해 대표된 화합물을 포함한다:



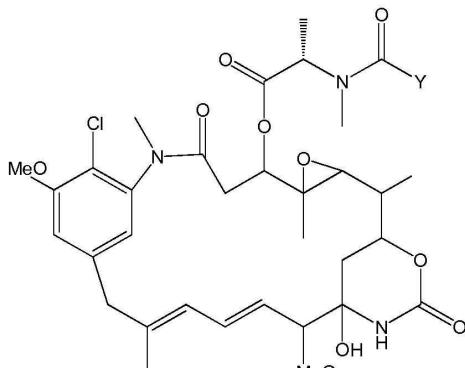
[0119]

[0120]

여기서 Y는  $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ 를 나타내고, 여기서  $R_1$  및  $R_2$ 는 각각 독립적으로 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 분지된 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서  $R_2$ 는 또한 H일 수 있고, 여기서  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  및  $R_8$ 은 각각 독립적으로 H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 분지된 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 여기서 1,  $m$ , 그리고  $n$ 은 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고, 그리고 이에 더하여  $n$ 은 제로일 수 있고, 여기서 Z는 H, SR, 또는 COR이고 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지된 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서 May는 C-3에서 측쇄, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 데스메틸을 보유하는 메이탄시노이드를 나타낸다. 화학식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 바람직한 구체예는 (a)  $R_1$ 은 H이고,  $R_2$ 는 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 은 각각 H이고, 1과  $m$ 은 각각 1이고,  $n$ 은 0이고, 그리고 Z는 H이고, (b)  $R_1$ 은 H이고,  $R_2$ 는 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 은 각각 H이고, 1과  $m$ 은 1이고,  $n$ 은 0이고, 그리고 Z는 H이고, (c)  $R_1$ 은 H이고,  $R_2$ 는 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 은 각각 H이고, 1과  $m$ 은 각각 1이고,  $n$ 은 0이고, 그리고 Z는  $-SCH_3$ 이고, 또는 (d)  $R_1$  및  $R_2$ 는 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 은 각각 H이고, 1과  $m$ 은 1이고,  $n$ 은 0이고, 그리고 Z는  $-SCH_3$ 인 화학식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 화합물을 포함한다. 바람직하게는, 세포독성 작용제는 화학식 (IV-L)에 의해 대표된다.

[0121]

추가 바람직한 메이탄시노이드는 또한, 화학식 (V)에 의해 대표된 화합물을 포함한다:



[0122]

[0123]

여기서  $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ , 여기서  $R_1$  및  $R_2$ 는 각각 독립적으로 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 분지된 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서  $R_2$ 는 또한 H일 수 있고, 여기서  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  및  $R_8$ 은 각각 독립적으로 H, 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 분지된 또는 환상 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 여기서 1,  $m$ , 그리고  $n$ 은 각각 독립적으로 1 내지 5의 정수이고, 그리고 이에 더하여  $n$ 은 제로일 수 있고, 여기서 Z는 H, SR, 또는 COR이고 여기서 R은 1 내지 10개 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지된 알킬 또는 알케닐, 3 내지 10개 탄소 원자를 갖는 환상 알킬 또는 알케닐, 또는 단순한 또는 치환된 아릴 또는 헤테로환상 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이고, 그리고 여기서 May는 C-3에서 측쇄, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 데스메틸을 보유하는 메이탄시노이드를 나타낸다. 화학식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 바람직한 구체예는 (a)  $R_1$ 은 H이고,  $R_2$ 는 메틸이고,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ 은 각각 H이고, 1과  $m$ 은 각각 1이

고, n은 0이고, 그리고 Z는 H이고, (b) R<sub>1</sub>은 H이고, R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 H이고, (c) R<sub>1</sub>은 H이고, R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 각각 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 -SCH<sub>3</sub>이고, 또는 (d) R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 -SCH<sub>3</sub>이고, 또는 (d) R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 -SCH<sub>3</sub>인 화학식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 화합물을 포함한다.

[0124] 화학식 (V)의 바람직한 구체예는 (a) R<sub>1</sub>은 H이고, R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> 및 R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 각각 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 H이고, (b) R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> 및 R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 H이고, (c) R<sub>1</sub>은 H이고, R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> 및 R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 각각 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 -SCH<sub>3</sub>이고, 또는 (d) R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 메틸이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> 및 R<sub>8</sub>은 각각 H이고, 1과 m은 1이고, n은 0이고, 그리고 Z는 -SCH<sub>3</sub>인 화학식 (V)의 화합물을 포함한다.

[0125] 메이탄시노이드에 더하여, 접합체에서 이용되는 세포독성 작용제는 탁산 또는 이의 유도체일 수 있다. 탁산은 파클리탁셀 (탁솔.RTM.), 세포독성 자연 산물, 그리고 도세탁셀 (탁소테르.RTM.), 반합성 유도체를 포함하는 화합물의 패밀리인데, 이들 둘 모두 암의 치료에서 폭넓게 이용된다. 탁산은 튜불린의 해중합화를 저해하고, 세포 사멸을 유발하는 유사분열 방추 독약이다. 비록 도세탁셀 및 파클리탁셀이 암의 치료에서 유용한 작용제이긴 하지만, 이들의 항종양 활성을 정상적인 세포를 향한 그들의 비특이적 독성으로 인해 제한된다. 게다가, 파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은 화합물은 그들 자체로는, 세포 결합 작용제의 접합체에 이용될 만큼 충분히 강력하지 않다.

[0126] 본원에서 설명된 발명이 더욱 충분히 이해될 수 있도록 하기 위해, 다음 실시예가 진술된다. 이들 실시예는 단지 예시를 목적으로 하고 본 발명을 임의의 방식으로 한정하는 것으로 해석되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0127] 실시예

[0128] 실시예 1.

[0129] 분석법:

[0130] 항체 및 접합체 농도는 252nm 및 280nm에서 항체 및 DM4 성분에 대한 실험적으로 결정된 또는 계산된 흡광 계수를 이용하여 계측되었다.

[0131] 단위체, 고분자량 종류는 Tosoh Bioscience TSK G3000SWXL (7.8x300mm), 5μm 입자 크기 칼럼을 이용한 SEC-HPLC에 의해 결정되었다. 이동상은 0.5mL/분의 유속에서 이동된, 15% 이소프로판올을 내포하는 160 mM 인산칼륨, 212 mM 염화칼륨 pH 7.0이고, 280nm에서 흡광도에 의해 검출되었다.

[0132] 항체 단편은 단백질 230 키트 (Part#5087-1518)를 이용하여, 2100 전문가 소프트웨어가 설치된 Agilent 2100 바이오분석기를 이용하여 계측되었다. 변성된 표본은 1.6mM N-에틸말레이미드 (NEM)를 내포하도록 보충된 변성 완충액의 첨가에 의해 제조되고, 그리고 표본은 5 분 동안 70 °C까지 가열된다. 희석, 표본 및 사다리 적하, 그리고 분석을 비롯한 모든 다른 단계는 Agilent 단백질 230 키트 사용설명서에 따라 수행된다. 항체 단편화 백분율은 모든 항체 관련된 피크의 합에 의해 나눗셈된, 항체 단위체 종류보다 작은 모든 피크의 합 (공지된 당화 인공물 배제)에 계산된다.

[0133] 원지 반응 제조 (본 발명의 공정의 단계 (a))

[0134] 세포독성 작용제-링커 화합물의 형성을 위한 원지 반응은 70.0% (v/v) DMA, 그리고 30% (v/v)의 4가지 연구 완충액 (200mM 숙신산염, pH 5.0; 20mM 숙신산염, pH 5.0; 167mM EPPS, 67 mM NaCl, 2mM EDTA pH 8.2; 20mM EPPS, pH 8.2) 중에서 한 가지에서 DM4 (12mM)를 SPDB 또는 술포-SPDB 링커 (10mM)와 반응시킴으로써 수행되었다. 혼합물은 와동되고, 20.0 °C에서 6 시간 동안 항온처리되고, 그리고 정제 없이 즉시 이용되었다.

[0135] 접합체 제조 (본 발명의 공정의 단계 (b)):

[0136] 접합 혼합물은 2.5% 또는 10%의 최종 DMA 수준에 도달하기 위해 적절한 양의 접합 완충액 (50mM EPPS, 20mM 염화나트륨, 2mM EDTA, pH 8.2)을 계산된 양의 DMA와 혼합함으로써 제조되었다. 젤 여과 크로마토그래피에 의해 접합 완충액 내로 이전에 완충액 교환되었던 항체1, 항-FOLR1 항체가 이후, 최종 표적 항체 농도를 달성하기 위

해 이러한 혼합물에 첨가되었다. 3-내지-4의 메이탄시노이드-대-항체 비율 (MAR)을 달성하는데 필요한 계산된 양의 원지 반응 혼합물이 첨가되었고, 그리고 반응물은 즉시 혼합되었다. 접합 반응물은 이후, 케도 진탕기에서 160 rpm에서 혼합하면서, 20.0 °C에서 22 시간 동안 항온처리되었다. 항온처리 기간의 종결점에서, pH 8.2 반응 혼합물은 6.5% (v/v)의 1M 아세트산의 첨가에 의해 pH 조정되고, 그리고 22μm PVDF 필터를 통해 여과되었다. 여과되고, pH 조정된 반응 혼합물은 겔 여과에 의해 정제되었고, 그리고 정제된 접합체는 UV-가시 흡광도 분광법, 고성능 액체크로마토그래피에 의한 크기 배제 크로마토그래피 (SEC-HPLC), 그리고 비-환원된 CE-SDS (GelChip)에 의해 분석되었다.

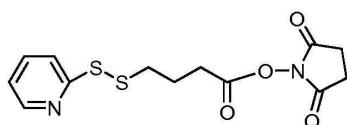
표 1

[0137]	원지 조건	접합 조건	단편 (%)		단위체 (%)		수율 (%)		메이탄시노이드 통합 효율 (%)	
			sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB		
	40g/L 10% DMA	10g/L 10% DMA	11.2	11.3	95.8	95.3	87.4	89.5	87.1	78.2
167mM EPPS, pH 8.2	10g/L 2.5% DMA	10g/L 10% DMA	9.5	9.4	96.3	95.7	90.9	89.0	66.9	74.7
	40g/L 2.5% DMA	40g/L 10% DMA	13.4	11.9	96.7	96.1	90.3	86.7	67.1	60.1
20mM EPPS, pH 8.2	10g/L 10% DMA	10g/L 2.5% DMA	15.2	11.1	95.3	95.0	86.8	88.6	88.4	82.1
	10g/L 2.5% DMA	10g/L 10% DMA	13.7	9.3	96.0	95.5	90.5	88.5	67.8	79.4
	10g/L 2.5% DMA	10g/L 2.5% DMA	측정되지 않음	측정되지 않음						

표 2

[0138]	원지 조건	접합 조건	단편 (%)		단위체 (%)		수율 (%)		통합 효율 (rMAR/MAR, %)	
			sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB		
	40g/L 10% DMA (26/25)	40g/L 10% DMA (26/25)	측정되지 않음							
200mM 숙신 산염, pH 5.0	10g/L 10% DMA (10/09)	10g/L 2.5% DMA	9.1	9.7	96.26	95.74	91.0	89.3	66.1	68.6
	10g/L 2.5% DMA	40g/L 10% DMA	측정되지 않음	측정되지 않음						
10mM 숙신산염, pH 5.0	10g/L 10% DMA (14/13)	10g/L 2.5% DMA	12.1	10.4	96.05	95.42	89.4	87.8	67.1	80.4
	10g/L 2.5% DMA	10g/L 2.5% DMA	측정되지 않음	측정되지 않음						

표 1 및 2에서 보여지는 바와 같이, 높은 완충능을 갖는 완충액이 sSPDB 및 DM4의 원지 반응 (즉, 단계 (a)의 반응)에 이용될 때, 결과의 접합체는 낮은 완충능을 갖는 완충액을 이용함으로써 제조된 접합체와 비교하여 훨씬 적은 항체 단편화를 갖는다. 대조적으로, 완충능은 SPDB가 이중기능성 교차연결 시약으로서 이용될 때 항체 단편화에 대한 유의미한 효과를 갖지 않는다. SPDB 링커에 대한 구조는 아래에 도시된다:



[0140]

[0141]

[0142]

## 실시예 2.

[0143]

서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 갖는 항체2, 항-FGFR3 항체는 30 mg/mL까지 농축되고, 그리고 10 디아볼륨을 위해 반응 완충액 (50 mM EPPS, 20mM 염화나트륨, 2 mM EDTA, pH 8.2) 내로 정용여과되고, 그리고 45 g/L까지 더욱 농축되었다. 술포-SPDB (10mM)에 비하여 1.2 몰 비율의 DM4 (12mM)가 167 mM EPPS, 66.7 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.2 및 70.0% (v/v) DMA에서 항체에 비하여 4.68 몰 비율의 술포-SPDB와 반응되었다. 원지 반응은 20 ± 3°C에서 10 ± 4 시간 동안 수행되고, 이후 50 mM EPPS, 20mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.2 ± 0.2 및 5.0% DMA (v/v)에서 20 mg/mL의 최종 Ab 농도를 달성하기 위해 DMA과 함께 항체2에 첨가되었다. 접합 반응은 16 ± 8 시간 동안 20.0 ± 3.0°C에서 수행되었다. 반응 후, 접합 혼합물은 6.5% (v/v)의 1M 아세트산의 첨가에 의해 5.0까지 급속히 pH 조정되었다. pH 조정된 혼합물은 20 mg/mL까지 농축되고, 그리고 16 디아볼륨을 위해 기저 조제 완충액 (10 mM 아세트산염, pH 5.0 ± 0.1)에 대해 정용여과되었다. 정제된 접합체는 수크로오스 (45%, w/v) 및 폴리소르베이트-20 (10%, w/v)의 농축된 원액을 이용하여, 10 mM 아세트산염, 9% (w/v) 수크로오스, 0.01% (w/v) 폴리소르베이트-20 (Tween-20), pH 5.0에서 5.0 mg/mL로 조제되었다.

## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; IMMUNOGEN, INC.

&lt;120&gt; PROCESS FOR PREPARING CELL-BINDING AGENT-CYTOTOXIC AGENT CONJUGATES

&lt;130&gt; 121162-03020

&lt;150&gt; 62/081914

&lt;151&gt; 2014-11-19

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 1

Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;

223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 2

Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400

> 4

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

&lt;400&gt; 6

Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His Val Val

1 5 10

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 8

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

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

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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 456

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 9

1	5	10	15
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
20	25	30	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr			
35	40	45	
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
50	55	60	
Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			

65	70	75	80
Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
85	90	95	
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Gly			

100	105	110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
115	120	125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
130	135	140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
145	150	155
160		
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
165	170	175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
180	185	190
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
195	200	205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val		
210	215	220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
225	230	235
240		
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
245	250	255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
260	265	270
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
275	280	285
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
305	310	315
320		
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
325	330	335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
340	345	350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 355 360 365  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 385 390 395 400  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 405 410 415  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 420 425 430  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 10  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic

<400> 10  
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Thr Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr  
 35 40 45

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

Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195 200 205

Ala Pro Ala Glu Cys Ser

210

<210> 11

<211> 795

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile

1 5 10 15

Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val

20 25 30

Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Glu Leu Val

35 40 45

Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly

50 55 60

Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val

65 70 75 80

Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Val Leu Asn Ala

85 90 95

Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Arg

100 105 110

Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly

115 120 125

Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr

130 135 140

Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu

145 150 155 160

Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly

165 170 175

Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg

180 185 190

Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser

195 200 205

Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys

210 215 220

Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp

225 230 235 240

Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro

245 250 255

Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys

260 265 270

Val Tyr Ser Asp Ala Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val

275 280 285

Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu

290 295 300

Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser

305 310 315 320

Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala

325 330 335

Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu

340 345 350

Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr

355 360 365

Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val

370 375 380

Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly

385 390 395 400

Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg

405 410 415

Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Asn Ser Ser Asn Thr Pro Leu

420 425 430

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

435 440 445

Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg

450 455 460

Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln

465 470 475 480

Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys

485 490 495

Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys

500 505 510

Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly

515 520 525

Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Gly Gly

530 535 540

Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu

545 550 555 560

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

565 570 575

Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys

580 585 590

Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Cys Ile

595 600 605

His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val

610 615 620

Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val His Asn Leu Asp

625 630 635 640

Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala

645 650 655

Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Ser Asp Val Ser Phe

660 665 670

Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro

675 680 685

Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg

690 695 700

Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg

705 710 715 720

Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Arg Pro Thr Phe Lys Leu Val Glu

725 730 735

Asp Leu Asp Arg Val Leu Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp

740 745 750

Leu Ser Ala Pro Phe Glu Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser

755 760 765

Ser Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro

770 775 780

Pro Ala Pro Pro Ser Ser Gly Gly Ser Arg Thr

785 790 795