

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 17일 (17.09.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/184944 A1

- (51) 국제특허분류:
C07D 207/46 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/003282
- (22) 국제출원일: 2020년 3월 9일 (09.03.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
62/815,557 2019년 3월 8일 (08.03.2019) US
- (71) 출원인: 애플티스 주식회사 (ABTIS CO., LTD.) [KR/KR]; 16648 경기도 수원시 권선구 산업로156번길 142-10, 에이동815, Gyeonggi-do (KR). 성균관대학교 산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 정상전 (CHUNG, Sang Jeon); 16420 경기도 수원시 장안구 화산로 85, 119동 2001호, Gyeonggi-do (KR). 김주환 (KIM, Ju Hwan); 16603 경기도 수원시 권선구 상탑로 1, 503호, Gyeonggi-do (KR). 이영근 (LEE, Young Geun); 16607 경기도 수원시 권선구 상탑로 66-6, 202호, Gyeonggi-do (KR). 이태진 (LEE, Tae Jin); 16363 경기도 수원시 장안구 서부로 2065, 104동 501호, Gyeonggi-do (KR). 서진우 (SEO, Jin Woo); 16408 경기도 수원시 권선구 구운로45번길 91-7, 204호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 아이피에스 (IPS PATENT FIRM); 06656 서울시 서초구 반포대로23길 14, 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: SITE-SPECIFIC ANTIBODY CONJUGATION AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AS SPECIFIC EXAMPLE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 위치특이적 항체 콘주게이션 및 이의 구체예로서의 항체-약물 콘주게이트

amino acid sequence :

G—P—S—V—F—L—F—P—P—K—P—K—D—T—L—M—I

EU numbering
for heavy chain :

237 239 241 243 245 247 249 251 253
238 240 242 244 246 248 250 252

(57) Abstract: The present application relates to a technology enabling a specific number of chemical functional groups or cargo moieties to be labeled at specific sites of an antibody. An antibody product having high uniformity can be provided by the present application. In addition, an antibody product in which functions of the antibody do not decline can be provided by the present application. That is, an antibody product of which avidity and half-life do not decline can be provided. The present application is very meaningful by being the first technology that enables site-specific labeling of antibodies without a complicated process.

(57) 요약서: 본 출원은 항체의 특정 위치에 특정한 갯수의 화학작용기 또는 카고 모이어티를 표지할 수 있는 기술에 관한 것이다. 본 출원에 의하여 높은 균일성을 갖는 항체 산물이 제공될 수 있다. 나아가, 본 출원에 의하여 항체의 기능이 저하되지 않는 항체 산물이 제공될 수 있다. 즉, 항체 결합력 및 반감기가 저하되지 않는 항체 산물이 제공될 수 있다. 본 출원은 복잡한 공정이 없이 항체의 위치특이적 표지를 가능하게 한 최초의 기술로서 큰 의미를 갖는다.

[다음 쪽 계속]

Exhibit 1004
AJINOMOTO CO., INC.
IPR2025-00283

WO 2020/184944 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 위치특이적 항체 콘쥬게이션 및 이의 구체예로서의 항체-약물 콘쥬게이트

기술분야

- [1] 본 출원은 항체의 특정 아미노산 잔기에 선택적으로 물질(저분자화합물, 합성고분자, 생체고분자(펩타이드, 탄수화물, 단백질 등))을 표지하거나 또는 특정 표적세포 혹은 조직으로 운반하고자 하는 분자(이하 “카고”라고 명명함)를 항체에 연결하는 기술에 관한 것이다. 나아가, 본 출원은 항체의 특정 위치에 원하는 개수의 물질을 표지하거나 또는 항체의 특정 아미노산 잔기에 원하는 개수의 카고를 연결하는 기술에 관한 것이다. 또한, 본 출원은 상기 방법에 의하여 제조된 항체 복합체 또는 항체의 절편 복합체를 이용하는 방법을 포함하고 있다.

배경기술

- [2] 항체 (antibody)는 특정 분자를 인식하는 기능을 갖는 생체 분자로서 다양한 산업적 용도로 사용되고 있다. 일례로 항체를 이용하여 특정 물질을 검출 혹은 검색(스크리닝)할 수 있고, 특정 물질이 체내 또는 세포 내에서 이동하는 경로를 확인할 수 있으며, 특정 물질에 대한 면역반응을 유도하여 치료 용도로도 사용될 수 있다.
- [3] 이러한 항체의 기능을 확장하기 위하여 항체를 개선하기 위한 시도가 있어왔다. 대표적으로, 항체의 기능을 보완하거나 확장하기 위하여 외부 물질들을 표지하기 위한 시도가 이루어졌다. 대표적으로, 형광물질을 항체에 표지하여 형광 어세이에 활용하거나, 특정 병증을 치료하기 위한 제제를 항체에 표지하여 항체의 치료 효능을 극대화할 수 있다. 이러한 시도들 및 기술을 본 출원에서 항체 표지 (antibody labeling)로 통칭한다. 본 출원은 신규한 항체 표지 방법에 관한 것이다.
- [4] 초기의 항체 표지는 항체에 무작위적으로 외부 물질을 부착하는 방식으로 이루어졌으나, 이러한 방법에는 많은 문제가 있다. 이렇게 제조된 항체는 균질성이 떨어지는 문제가 있다. 이러한 항체들은 각각 부착된 물질의 개수가 다르고 그 결합 위치가 다르기 때문에 효과가 불균질해지는 문제가 있다. 이러한 문제는 높은 안전성 및 재현가능성을 요구하는 항체-약물 콘쥬게이트 (antibody-drug conjugate; ADC) 기술의 발전에 큰 장애가 된다.
- [5] 또한 항체의 인식 효과가 현저히 저하되는 문제가 있다. 항체는 항원을 인식하는 항원 결합 도메인 (antigen-binding domain)을 포함하는 Fab 도메인과 항체의 결정화에 관여하는 Fc 도메인으로 구성된다. 무작위적인 표지는 외부 물질을 항체의 항원 결합 도메인 또는 이에 인접한 위치에 결합시킴으로써 항체의 인식 효과를 크게 저하시켰다.

- [6] 이로 인해 해당 기술분야에는 위치특이적으로 균일하게 항체를 표지하는 기술에 대한 수요가 있었다. 일부 기술이 개발되긴 하였으나, 대부분 항체를 유전적으로 조작하거나 변형시키는 등 기술적, 경제적 효과가 부족한 면이 있다. 본 출원은 상기 문제를 해결하여 항체에 대한 추가적인 조작 없이, 항체의 특정 위치에 특이적으로 특정 물질(혹은 “모이어티(moiety)”)을 연결할 수 있고, 나아가 항체를 이용하여 특정 물질(약물 혹은 표지물질)을 특정 세포 혹은 조직으로 전달하는 기술에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

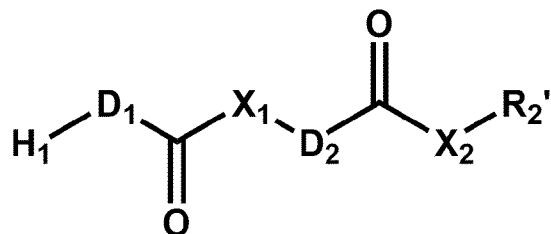
기술적 과제

- [7] 본 출원은 항체의 특정 위치에 특이적으로 화학작용기를 전달하기 위한 기술을 제공한다. 일 구체예에서, 본 출원은 항체의 246번 라이신에 화학작용기를 특이적으로 전달하기 위한 기술을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 출원은 항체의 248번 라이신에 화학작용기를 특이적으로 전달하기 위한 기술을 제공한다. 또 다른 구체예에서, 본 출원은 항체의 246번 라이신 및 248번 라이신에 화학작용기를 특이적으로 전달하기 위한 기술을 제공한다.
- [8] 본 출원은 항체에 원하는 개수의 화학작용기를 연결할 수 있는 기술을 제공한다. 일 구체예에서, 본 출원은 특정 모이어티가 2개 결합되어 있는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 출원은 특정 모이어티가 4개 결합되어 있는 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [9] 본 출원은 항체의 특정 위치에 특이적으로 카고 모이어티를 연결하기 위한 기술을 제공한다. 일 구체예에서, 본 출원은 항체의 246번 라이신에 카고 모이어티를 특이적으로 연결하기 위한 기술을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 출원은 항체의 248번 라이신에 카고 모이어티를 특이적으로 연결하기 위한 기술을 제공한다. 또 다른 구체예에서, 본 출원은 항체의 246번 라이신 및 248번 라이신에 카고 모이어티를 특이적으로 연결하기 위한 기술을 제공한다.
- [10] 본 출원은 항체에 원하는 개수의 카고 모이어티를 연결할 수 있는 기술을 제공한다. 일 구체예에서, 본 출원은 카고 모이어티가 2개 연결되어 있는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 출원은 카고 모이어티가 4개 연결되어 있는 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [11] 본 출원은 이상의 항체 또는 항체 단편을 이용하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 출원은 항체-약물 복합체를 이용하여 특정 질환을 치료(treat)하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [12] 본 출원은 하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물을 제공한다:
- [13] [화학식 2]

[14]



[15] 이때, H₁은 제1 클릭화학작용기이고, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X₁은 S이고, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X₂는 O이고, R₂'은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐이다.

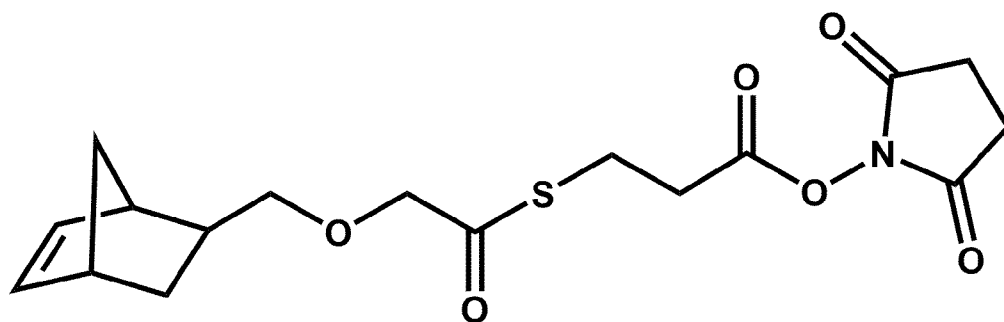
[16] 나아가, 본 출원은 H₁은 말단 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 화합물을 제공한다. 더 나아가, 본 출원은 H₁은 노르보넨, 테트라진, 아자이드 및 디벤조시클로옥신-아민 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 화합물을 제공한다.

[17] 또는 나아가, 본 출원은 R₂'은 N-석시니미드인 것을 특징으로 하는 상기 화합물을 제공한다.

[18] 또는 나아가, 본 출원은 상기 화학식 2는 하기 화학식 2-1, 2-2, 또는 2-3과 같은 것을 특징으로 하는 상기 화합물을 제공한다.

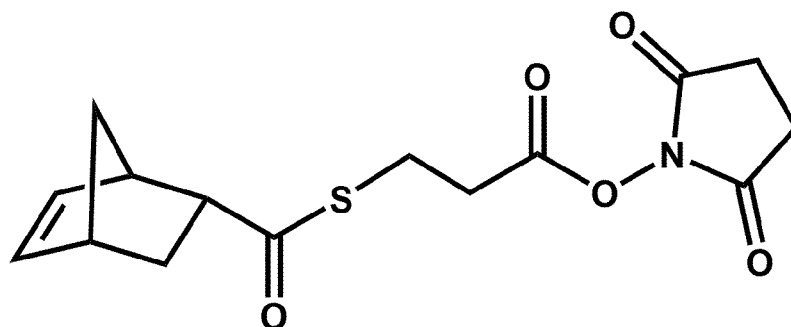
[19] [화학식 2-1]

[20]



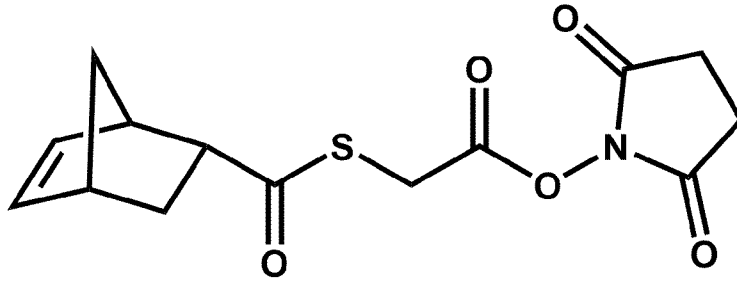
[21] [화학식 2-2]

[22]



[23] [화학식 2-3]

[24]



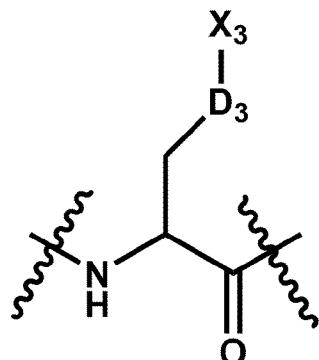
[25]

[26] 본 출원은 하기 화학식 4-2의 구조를 갖는 펩타이드를 제공한다:

[27] [화학식 4-2]

[28] **(Xaa)₁₋₃-C-(Xaa)₂-H-Xa₁-G-Xa₂-L-V-Xa₃-C-(Xaa)₁₋₃**

[29] 이때, 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

[30] Xa₁은  이고, 이때 D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이며

또한 X₃는 NH₂이고, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되며, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이고, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된다.

[31] 나아가, 본 출원은 D₃는 공유결합, 메틸렌, 또는 에틸렌인 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드를 제공한다.

[32] 또는 나아가, 본 출원은 상기 화학식 4-2는 하기 화학식 4-6과 같은 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드를 제공한다:

[33] [화학식 4-6]

[34] **D-C-A-W-H-Xa₁-G-E-L-V-W-C-T**

[35] 이때, D는 아스파르트산이고, A는 알라닌이며, E는 글루탐산이고, W는 트립토판이며, T는 트레오닌이다.

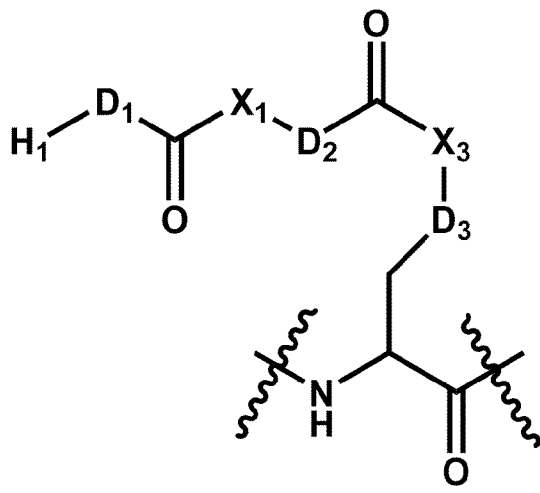
[36]

[37] 본 출원은 하기 화학식 6-2의 구조를 갖는 펩타이드-화합물 콘쥬게이트를 제공한다:

[38] [화학식 6-2]

[39] **(Xaa)₁₋₃-C-(Xaa)₂-H-(Xa₁)'-G-Xa₂-L-V-Xa₃-C-(Xaa)₁₋₃**

[40] 이때, 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이고, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, L은 류신이고, V는 발린이며, 또한 Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고, 또한

[41] (Xa₁)'은 이며, 이때

[42] H₁은 제1 클릭화학작용기이고, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X₁은 S이고, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고 또한 X₃는 NH이며, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되고, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이며, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된다.

[43] 나아가, 본 출원은 (Xa₁)'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리가 약 11.668Å 보다 작은 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘쥬게이트를 제공한다.

[44] 또는 나아가, 본 출원은 D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이고, D₃는 C_x알킬렌이며, 이때, y는 1 이상인 정수이고, 1≤x+y≤5인 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘쥬게이트를 제공한다.

[45] 또는 나아가, 본 출원은 (Xa₁)'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리가 약 16.208Å 보다 큰 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘쥬게이트를 제공한다.

[46] 또는 나아가, 본 출원은 D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이고, D₃는 C_x알킬렌이며, 이때, y는 1 이상인 정수이고, 9≤x+y≤12인 것을 특징으로 하는

펩타이드-화합물 콘주게이트를 제공한다. 더 나아가, 본 출원은 D_2 는 C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌인 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘주게이트를 제공한다.

[47] 또는 나아가, 본 출원은 $(Xa_1)'$ 의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리가 약 $11.668\text{\AA}$ 이상이고 약 $16.208\text{\AA}$ 이하인 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘주게이트를 제공한다.

[48] 또는 나아가, 본 출원은 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, D_3 는 C_x 알킬렌이며, 이때, y 는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 인 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘주게이트를 제공한다.

[49] 또는 나아가, 본 출원은 상기 화학식 6-2는 하기 화학식 6-3과 같은 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘주게이트를 제공한다:

[50] [화학식 6-3]

[51] **$D-C-A-W-H-(Xa_1)'\text{-G-E-L-V-W-C-T}$**

[52] 이때, D는 아스파르트산이고, A는 알라닌이며, E는 글루탐산이고, W는 트립토판이며, T는 트레오닌이다.

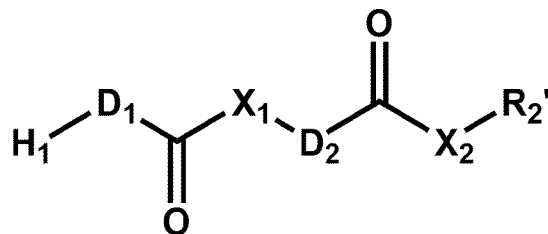
[53] 또는 나아가, 본 출원은 D_1 은 공유결합이고 D_2 는 메틸렌인 것을 특징으로 하는 상기 펩타이드-화합물 콘주게이트를 제공한다.

[54]

[55] 본 출원은 하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물:

[56] [화학식 2]

[57]

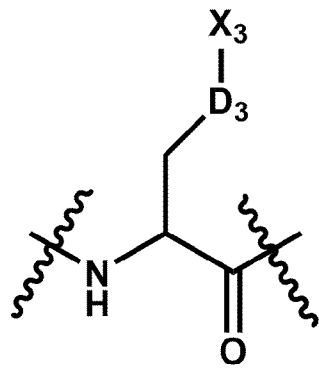


[58] 이때, H_1 은 제1 클릭화학작용기이고, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X_1 은 S이고, D_2 는 C_{1-7} 알킬렌, C_{2-7} 알케닐렌, C_{2-7} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X_2 는 O이고, R_2' 은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐인 것과 하기 화학식 4-2의 구조를 갖는 펩타이드:

[59] [화학식 4-2]

[60] **$(Xaa)_{1-3}\text{-C-(Xaa)}_2\text{-H-Xa}_1\text{-G-Xa}_2\text{-L-V-Xa}_3\text{-C-(Xaa)}_{1-3}$**

[61] 이때, 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa_2 는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa_3 는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

[62] X_{a1} 은  이고, 이때 D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이며

또한 X_3 는 NH_2 이고, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되며, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이고, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된 것을 반응시킴을 포함하는 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법을 제공한다.

[63] 나아가, 본 출원은 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, D_3 는 C_x 알킬렌이며, 이때, y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 이며, 상기 방법으로 제조된 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하는 것을 특징으로 하는 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법을 제공한다.

[64] 또는 나아가, 본 출원은 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, D_3 는 C_x 알킬렌이며, 이때, y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 이며, 본 방법으로 제조된 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하는 것을 특징으로 하는 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법을 제공한다.

[65] 또는 나아가, 본 출원은 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, D_3 는 C_x 알킬렌이며, 이때, y 는 1 이상인 정수이고, $9 \leq x+y \leq 12$ 이며, 본 방법으로 제조된 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하는 것을 특징으로 하는 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법을 제공한다.

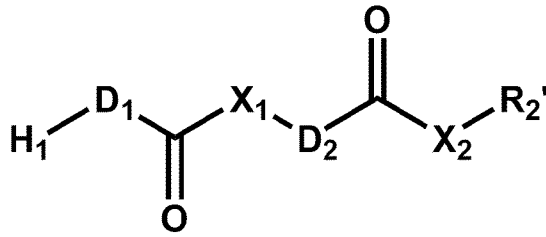
[66] 또는 나아가, 본 출원은 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, D_3 는 C_x 알킬렌이며, 이때, y 는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 이며, 본 방법으로 제조된 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하는 것을 특징으로 하는 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법을 제공한다.

[67]

[68] 본 출원은 하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물:

[69] [화학식 2]

[70]



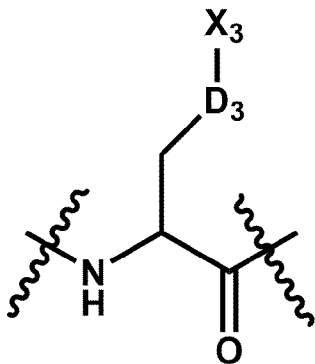
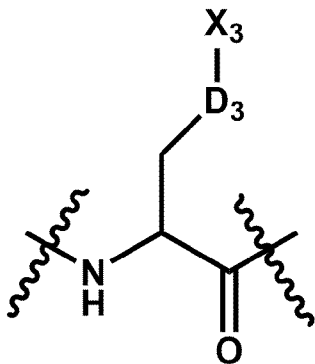
[71] 이때, H₁은 제1 클릭화학작용기이고, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X₁은 S이고, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X₂는 O이며, R₂'은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐인 것; 및

[72] 하기 화학식 4-2의 구조를 갖는 펩타이드:

[73] [화학식 4-2]

[74] **(Xaa)₁₋₃-C-(Xaa)₂-H-Xa₁-G-Xa₂-L-V-Xa₃-C-(Xaa)₁₋₃**

[75] 이때, 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

[76] Xa₁은  이고, 이때 D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이며

또한 X₃는 NH₂이고, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되며, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이고, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된 것을 포함하는 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제 제조용 키트를 제공한다.

[77]

[78] 본 출원은 하기 화학식 8-1, 화학식 8-2, 및 화학식 8-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:

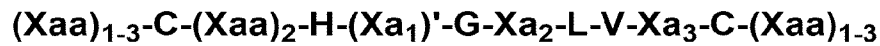
항체 또는 이의 단편을 제공한다. 더 나아가, 본 출원은 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다.

[92]

[93] 본 출원은 하기 화학식 6-2의 구조를 갖는 펩타이드-화합물 콘주게이트:

[94] [화학식 6-2]

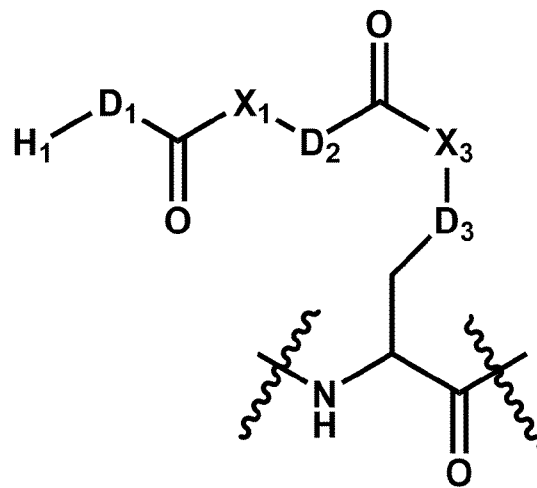
[95]



[96]

이때, 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이고, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, L은 류신이고, V는 발린이며, 또한 Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

[97]

(Xa₁)'은이며, 이때 H₁은 제1

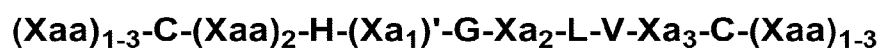
클릭화학작용기이고, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X₁은 S이고, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고 또한 X₃는 NH이며, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되고, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이며, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된 것과 항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하는 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조 방법을 제공한다.

[98]

[99] 본 출원은 하기 화학식 6-2의 구조를 갖는 펩타이드-화합물 콘주게이트:

[100] [화학식 6-2]

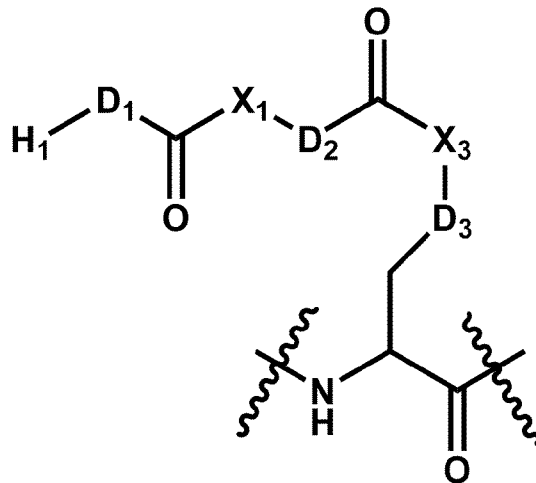
[101]



[102]

이때, 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이고, Xa₂는 글루탐산 또는

[103] 아스파라긴이며, L은 류신이고, V는 발린이며, 또한 W는 트립토판이고, 또한 $(Xa_1)'$ 은 0이며, 이때 H_1 은 제1



클릭화학작용기이고, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, X₁은 S이고, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고 또한 X₃는 NH이며, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되고, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이며, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된 것; 및 항체 또는 이의 단편을 포함하는 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조용 키트를 제공한다.

[104]

[105] 본 출원은 하기 화학식 9의 구조를 갖는 화합물을 제공한다:

[106] [화학식 9]

[107] $C_m - H_2$

[108] 이때, C_m 은 카고 모이어티이고, H_2 는 제2 클릭 화학작용기이다.

[109]

[110] 본 출원은 하기 화학식 8-1, 화학식 8-2, 및 화학식 8-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:

[111] [화학식 8-1]

[112] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)'—P—K—D—T—L—M—I**

[113] [화학식 8-2]

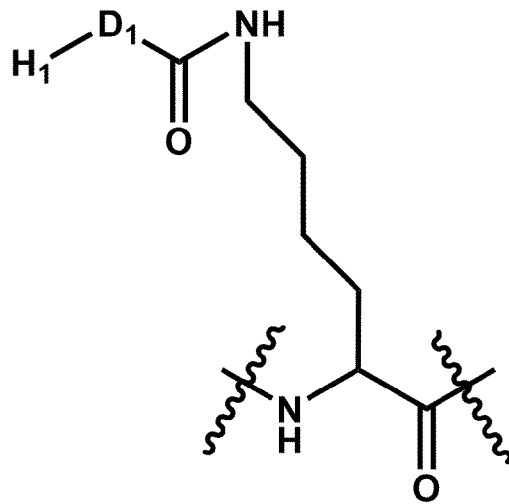
[114] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—K—P—(K)'—D—T—L—M—I**

[115] [화학식 8-3]

[116] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)'—P—(K)'—D—T—L—M—I**

[117] 이때, G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는

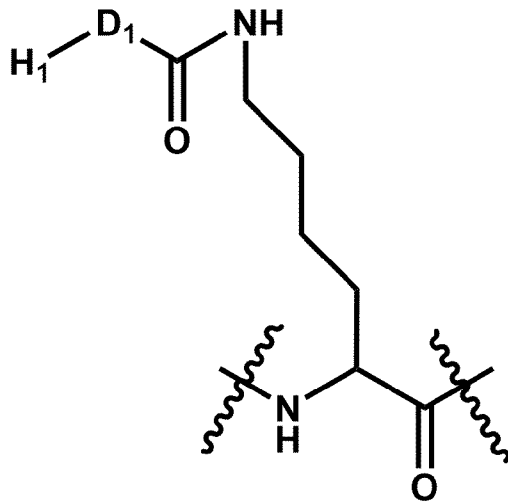
- [118] 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한
(K)'은 H_1-D_1 이며, 이때 H_1 은 제1



- 클릭화학작용기이고, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나인 것과
[119] 하기 화학식 9의 구조를 갖는 화합물:
[120] [화학식 9]
[121] C_m-H_2
[122] 이때, C_m 은 카고 모이어티이고, H_2 는 상기 제1 클릭화학작용기와 상보적인 제2 클릭화학작용기인 것을 반응시킴을 포함하는 항체-약물 콘쥬게이트의 제조 방법을 제공한다.

- [123]
[124] 본 출원은 하기 화학식 8-1, 화학식 8-2, 및 화학식 8-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편:
[125] [화학식 8-1]
[126] $G-P-S-V-F-L-F-P-P-(K)'-P-K-D-T-L-M-I$
[127] [화학식 8-2]
[128] $G-P-S-V-F-L-F-P-P-K-P-(K)'-D-T-L-M-I$
[129] [화학식 8-3]
[130] $G-P-S-V-F-L-F-P-P-(K)'-P-(K)'-D-T-L-M-I$
[131] 이때, G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

[132]



이며, 이때 H_1 은 제1 클릭화학작용기이고,

D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나인 것; 및

[133] 하기 화학식 9의 구조를 갖는 화합물:

[134] [화학식 9]

[135] C_m-H_2

[136] 이때, C_m 은 카고 모이어티이고, H_2 는 상기 제1 클릭화학작용기와 상보적인 제2 클릭화학작용기인 것을 포함하는 항체-약물 콘쥬게이트 제조용 키트를 제공한다.

[137]

[138] 본 출원은 하기 화학식 10-1, 화학식 10-2, 및 화학식 10-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:

[139] [화학식 10-1]

[140] $G-P-S-V-F-L-F-P-P-(K)''-P-K-D-T-L-M-I$

[141] [화학식 10-2]

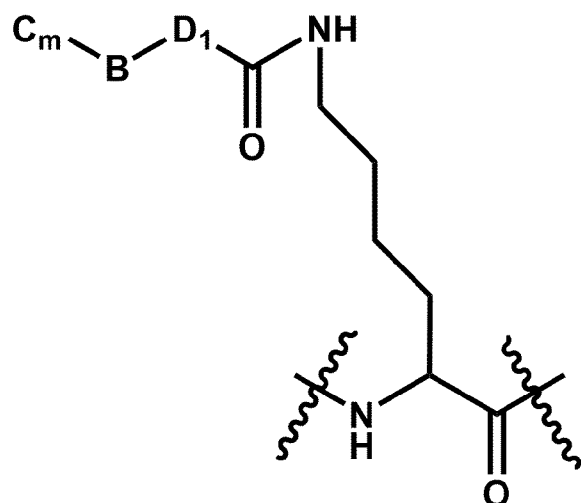
[142] $G-P-S-V-F-L-F-P-P-K-P-(K)''-D-T-L-M-I$

[143] [화학식 10-3]

[144] $G-P-S-V-F-L-F-P-P-(K)''-P-(K)''-D-T-L-M-I$

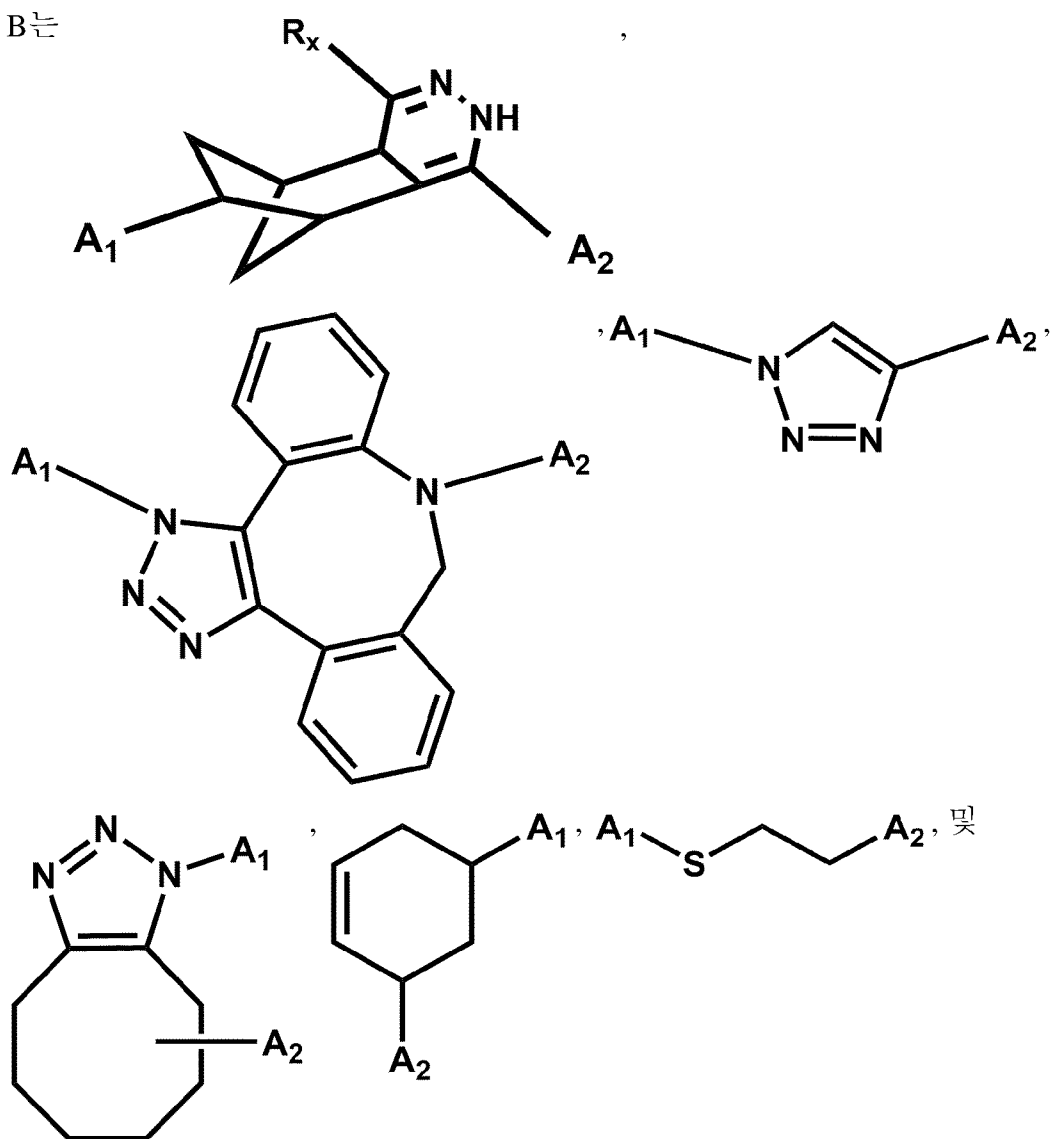
[145] 이때, G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

[146]

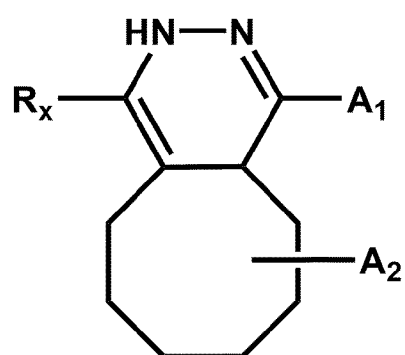


이며, 이때 C_m 은 카고 모이어티이고,

B는



중 선택된 어느 하나이며, 이때 A_1 과 A_2 는 둘 다



같은 것과 연결되지 않도록 상기 카고 모이어티 또는 D_1 과 연결되고, R_x 는 H, 할로젠, 및 C_{1-3} 알킬로부터 선택되며, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이다.

- [147] 나아가, 본 출원은 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-2 및 10-3의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 더 나아가, 본 출원은 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [148] 또는 나아가, 본 출원은 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-1 및 10-3의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 더 나아가, 본 출원은 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [149] 또는 나아가, 본 출원은 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-1 및 10-2의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 더 나아가, 본 출원은 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다.
- [150] 또는 나아가, 본 출원은 상기 카고 모이어티는 약물 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 더 나아가, 본 출원은 상기 카고 모이어티는 2개 이상의 약물 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 또는 더 나아가, 본 출원은 상기 약물 모이어티는 항암제인 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 또 다시 나아가, 본 출원은 상기 항암제는 DM1, DM3, DM4, 아브린, 리친 A, 슈도모나스 엑소독신, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 종양 괴사 인자, α 인터페론, β 인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 사이토카인, 아포토시스 유도 제제, 항-신혈관형성 제제, 림포카인, 탁세인, DNA-알킬화 제제, 안트라시클린, 튜블리신 유사체, 듀오카르마이신 유사체, 오리스타틴 E, 오리스타틴 F, 마이탄시노이드, 반응성 폴리에틸렌글리콜 잔기를 포함하는 세포독성 제제, 탁손, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, t. 콜키신, 독소루비신, 도노루비신, 디히드로록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 메토틱세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 디카르바진, 메클로레타민, 티오테파클로람부실, 메이팔란, 카르무스틴, 로무스틴, 시클로포스파미드, 부설판, 디브로모마니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 시스플라틴,

닥티노마이신, 블레오마이신, 안트라마이신, 칼리키아마이신, 아비라테론, 벤다무스틴, 보르테조밐, 카르보플라틴, 카바지탁셀, 다사티닙, 도세탁셀, 에피루비신, 엘로티닙, 에베롤리무스, 젬시타빈, 제피티닙, 이다루비신, 이마티닙, 히드록시유레아, 라파티닙, 류프로레틴, 멜팔란, 네다플라틴, 닐로티닙, 옥살리플라틴, 파조파닙, 페메트렉세드, 피코플라틴, 로미렙신, 사트라플라틴, 소라페닙, 베무라페닙, 수니티닙, 테니포사이트, 트리플라틴, 및 비노렐빈 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 상기 항체 또는 이의 단편을 제공한다.

[151]

[152] 본 출원은 상기 항체-약물 콘주게이트를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.

[153]

나아가, 본 출원은 상기 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 심장암, 자궁경부암, 대장암, 직장암, 식도암, 섬유육종, 위암, 위장암, 두경부암, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 골수종, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 고환 생식세포 암, 흉선종 및 흉선암 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 암 치료용 조성물을 제공한다.

[154]

또는 나아가, 본 출원은 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물을 제공한다.

[155]

[156] 본 출원은 상기 항체-약물 콘주게이트를 포함하는 약학적 조성물을 대상에 투여함을 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.

[157]

나아가, 본 출원은 상기 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 심장암, 자궁경부암, 대장암, 직장암, 식도암, 섬유육종, 위암, 위장암, 두경부암, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 골수종, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 고환 생식세포 암, 흉선종 및 흉선암 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 상기 암의 치료 방법을 제공한다.

[158]

또는 나아가, 본 출원은 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 암의 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[159]

본 출원에 의한 항체 산물은 특정 위치에 특정한 갯수의 화학작용기 또는 카고 모이어티가 표지될 수 있다. 이로 인해 본 출원은 높은 균일성을 갖는 항체 산물을 제공할 수 있다. 나아가, 본 출원은 항체의 기능이 저하되지 않는 항체 산물을 제공할 수 있다. 즉, 항체 결합력 및 반감기가 저하되지 않는 항체 산물을 제공할 수 있다. 본 출원은 복잡한 공정이 없이 항체의 위치특이적 표지를 가능하게 한 최초의 기술로서 의미가 있다.

도면의 간단한 설명

[160]

도 1은 Fc 도메인의 일부의 서열 및 EU 넘버링 체계에 의한 서열번호이다.

- [161] 도 2는 246번 라이신 및 248번 라이신을 포함하는 Fc 도메인 상의 라이신 잔기들의 위치를 도시한 것이다.
- [162] 도 3 및 도 4는 SSFI와 Fc 도메인 간의 위치관계를 나타낸 것이다.
- [163] 도 5는 SSFI의 Xa_1 과 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신을 도시한 것이다.
- [164] 도 6은 246번 라이신의 아민 기와 SSFI의 Xa_1 의 베타 탄소 사이의 거리에 관한 것이다.
- [165] 도 7은 248번 라이신의 아민 기와 SSFI의 Xa_1 의 베타 탄소 사이의 거리에 관한 것이다.
- [166] 도 8은 $R_1'-L_2$ -SSFI의 구조와 $(Xa_1)'$ 의 베타 탄소와 제1 카보닐 탄소 사이의 거리 (L_c)를 도시한 것이다.
- [167] 도 9는 $(Xa_1)'$ 의 결사슬의 방향 (점선 화살표)이 도면의 x축과 평행하도록 $R_1'-L_2$ -SSFI과 Fc 도메인의 위치 관계를 도시한 것이다.
- [168] 도 10은 제1 카보닐 탄소가 248번 라이신과 잘 반응하기 위한 조건을 나타낸다.
- [169] 도 11은 제1 카보닐 탄소가 246번 라이신과 잘 반응하기 위한 조건을 나타낸다.
- [170] 도 12는 제1 카보닐 탄소가 246번 또는 248번 라이신에 선택적으로 반응하기 위한 조건을 나타낸다.
- [171] 도 13은 FcRn 결합 위치와 246번 라이신 및 248번 라이신을 Fc 도메인에 표시한 것이다.
- [172] 도 14는 SSFI와 Fc 도메인의 결합 구조와 Fc와 FcRn의 결합 위치를 비교 분석한 것이다.
- [173] 도 15는 화합물 I의 합성 방법을 도시한 것이다.
- [174] 도 16은 질량 분석을 통한 화합물 I의 구조 확인 결과이다.
- [175] 도 17은 화합물 II의 합성 방법을 도시한 것이다.
- [176] 도 18은 질량 분석을 통한 화합물 II의 구조 확인 결과이다.
- [177] 도 19는 화합물 III의 합성 방법을 도시한 것이다.
- [178] 도 20은 질량 분석을 통한 화합물 III의 구조 확인 결과이다.
- [179] 도 21 및 22는 화합물 IV의 합성 방법을 도시한 것이다.
- [180] 도 23은 질량 분석을 통한 화합물 IV의 구조 확인 결과이다.
- [181] 도 24는 질량 분석을 통한 SSFI (6Lys)의 구조 확인 결과이다.
- [182] 도 25는 질량 분석을 통한 SSFI (6Orn)의 구조 확인 결과이다.
- [183] 도 26은 질량 분석을 통한 SSFI (6Dab)의 구조 확인 결과이다.
- [184] 도 27은 질량 분석을 통한 SSFI (6Dap)의 구조 확인 결과이다.
- [185] 도 28은 질량 분석을 통한 DD2의 구조 확인 결과이다.
- [186] 도 29는 질량 분석을 통한 DD3의 구조 확인 결과이다.
- [187] 도 30은 질량 분석을 통한 DD4의 구조 확인 결과이다.
- [188] 도 31은 질량 분석을 통한 DD5의 구조 확인 결과이다.
- [189] 도 32는 질량 분석을 통한 DD6의 구조 확인 결과이다.

- [190] 도 33은 질량 분석을 통한 화합물 I-SSFI (6Lys)의 구조 확인 결과이다.
- [191] 도 34는 질량 분석을 통한 화합물 II-SSFI (6Lys)의 구조 확인 결과이다.
- [192] 도 35는 질량 분석을 통한 화합물 III-SSFI (6Lys)의 구조 확인 결과이다.
- [193] 도 36은 질량 분석을 통한 화합물 III-SSFI (6Orn)의 구조 확인 결과이다.
- [194] 도 37은 질량 분석을 통한 화합물 III-SSFI (6Dab)의 구조 확인 결과이다.
- [195] 도 38은 질량 분석을 통한 화합물 III-SSFI (6Dap)의 구조 확인 결과이다.
- [196] 도 39는 질량 분석을 통한 화합물 IV-SSFI (6Dap)의 구조 확인 결과이다.
- [197] 도 40은 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵과 화합물 I-SSFI (6Lys)를 이용한 결합 반응의 관찰 결과이다.
- [198] 도 41은 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵과 화합물 II-SSFI (6Lys)를 이용한 결합 반응의 관찰 결과이다.
- [199] 도 42는 화합물 III-SSFI(6Dap, Dab, Orn, Lys)와 항체의 반응을 도시한 것이다.
- [200] 도 43은 최종 결과물인 Ab(246/248)-Norbornene의 구조를 도시한 것이다.
- [201] 도 44는 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵과 화합물 III-SSFI (6Dap)를 이용한 결합 반응의 관찰 결과이다.
- [202] 도 45는 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵과 화합물 III-SSFI (6Dab)를 이용한 결합 반응의 관찰 결과이다.
- [203] 도 46은 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵과 화합물 III-SSFI (6Orn)를 이용한 결합 반응의 관찰 결과이다.
- [204] 도 47은 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵과 화합물 III-SSFI (6Lys)를 이용한 결합 반응의 관찰 결과이다.
- [205] 도 48은 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵과 화합물 IV-SSFI (6Dap)를 이용한 결합 반응의 관찰 결과이다.
- [206] 도 49 및 50은 항체-노보넨 결합에 의한 분자량 증가 스펙트럼을 도시한 것이다.
- [207] 도 51 내지 54는 트라스투주맵과 항체-노보넨 복합체의 MS/MS의 크로마토그램 결과이다.
- [208] 도 55는 MS/MS 스펙트럼에 의한 서열 매칭 결과이다.
- [209] 도 56은 트라스투주맵-아자이드의 구조 확인을 위해 측정된 트라스투주맵의 질량 스펙트럼이다.
- [210] 도 57은 트라스투주맵-아자이드의 구조 확인을 위해 측정된 트라스투주맵-아지드 복합체의 질량 스펙트럼이다.
- [211] 도 58은 질량 분석을 통한 테트라진-DM1의 구조 확인 결과이다.
- [212] 도 59는 화합물 III-SSFI (6Dap) 기반 트라스투주맵-DM1 콘쥬게이트의 구조를 도시한 것이다.
- [213] 도 60은 HIC-HPLC을 통한 트라스투주맵-DM1 콘쥬게이트의 생성 반응의 관찰 결과이다.
- [214] 도 61 및 62는 노보넨-테트라진-DM1 결합에 의한 트라스투주맵의 분자량 증가

스펙트럼을 도시한 것이다.

- [215] 도 63은 노보넨이 표지된 항체에 결합시킨 3종의 페이로드의 구조를 도시한 것이다.
- [216] 도 64는 항체-약물 콘쥬게이트의 항원 결합력 분석 결과이다.
- [217] 도 65 내지 67은 항체-약물 콘쥬게이트의 혈장 안정성 분석 결과이다.
- [218] 도 68 내지 70은 항체-약물 콘쥬게이트의 세포 수준에서의 약효평가 결과이다.
- [219] 도 71 내지 72는 항체-약물 콘쥬게이트의 동물 수준에서의 약효평가 결과이다.
- [220] 도 73은 항체-약물 콘쥬게이트의 약물동태시험 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[221] 정의

- [222] 다르게 정의되지 않는 한, 본 출원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 출원의 기술분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참조 문헌은 본 출원에서 사용된 용어 다수의 일반적인 정의를 당업자에게 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본 출원에서 사용되는 한, 하기의 용어들은 다르게 명시되지 않는 한, 하기에서 이들에게 부여한 의미를 갖는다.
- [223] 일부 실시예에서, 화학구조는 대응되는 화학명과 함께 개시된다. 분쟁이 발생하는 경우, 화학명보다 우선하여, 화학구조에 의하여 의미를 파악해야 한다.
- [224] 본 출원에서 사용되는 용어 "헤테로"는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하는 화합물 또는 그룹을 지칭한다. 용어 "헤테로원자"는 탄소나 수소가 아닌 원자로서, 예를 들어 B, Si, N, P, O, S, 및 Se, 이중 바람직 하계는 N, O, 및 S와 같은 다가 원소나 F, Cl, Br, 및 I와 같은 일가 원소 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [225] 본 출원에서 사용되는 용어 "저급"은 탄화수소, 예를 들어 알킬렌 등을 수식하기 위한 용어로서 해당 탄화수소가 6 또는 더 적은 탄소 원자를 갖는 것을 뜻한다. 예컨대, C_{1~6} 사슬 모양 또는 가지 모양 알킬 기는 다른 명칭으로 "저급 알킬" 기로 언급된다.
- [226] 본 출원에서 사용된 용어 "옥시"는 산소 원자의 이차 라디칼로서, -O-를 의미한다.
- [227] "알킬" 또는 "알칸"은 사슬 모양 또는 가지 모양 비방향족 탄화수소로서 완전히 포화된 것이다. 대표적으로, 사슬 모양 또는 가지 모양 알킬 기는 다르게 정의되지 않는 한 1 내지 약 20 개, 바람직하게는 1 내지 약 10 의 탄소 원자를 갖는다. 사슬 모양 및 가지 모양 알킬 기는 메틸, 에틸, n-프로필, iso-프로필, n-부틸, sec-부틸, tert-부틸, 펜틸, 헥실, 펜틸 및 옥틸을 포함한다.

- [228] "알케닐" 또는 "알켄"은 사슬 모양 또는 가지 모양 비방향족 탄화수소로서 적어도 하나의 이중 결합을 포함하는 것이다. 대표적으로, 사슬 모양 또는 가지 모양 알케닐 기는 다르게 정의되지 않는 한 1 내지 약 20 개, 바람직하게는 1 내지 약 10 의 탄소 원자를 갖는다.
- [229] "알키닐" 또는 "알킨"은 사슬 모양 또는 가지 모양 비방향족 탄화수소로서 적어도 하나의 삼중 결합을 포함하는 것이다. 대표적으로, 사슬 모양 또는 가지 모양 알키닐 기는 다르게 정의되지 않는 한 1 내지 약 20 개, 바람직하게는 1 내지 약 10 의 탄소 원자를 갖는다.
- [230] "시클로알칸" 또는 "시클로알킬" 기는 완전히 포화된 시클릭 탄화수소이다. "시클로알킬"은 모노시클릭 및 폴리시클릭 고리를 포함한다. 다르게 정의되지 않는 한 일반적으로, 모노시클릭 시클로알킬 기는 3 내지 약 10 개의 탄소 원자를 갖고, 더욱 일반적으로 3 내지 8 개의 탄소 원자를 갖는다. 폴리시클릭 시클로알킬의 첫번째 고리 외의 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 시클로알킬은 바이시클릭 분자로서 1, 2 또는 3 또는 그 이상의 원자가 2 개의 고리 사이에서 공유된 것을 포함한다. "융합된 시클로알킬"이라는 용어는 폴리시클릭 시클로알킬로서 각각의 고리가 다른 고리와 함께 인접한 2 개의 원자를 공유하는 것을 의미한다. 융합된 폴리시클릭 시클로알킬의 첫번째 고리 외의 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다.
- [231] 용어 "시클로알킨" 또는 "시클로알키닐"은 적어도 하나의 삼중결합을 포함하는 시클릭 탄화수소로서, "스트레인된 알킨"으로도 지칭된다. "시클로알키닐"은 모노시클릭 및 폴리시클릭 고리를 포함한다. 다르게 정의되지 않는 한 일반적으로, 모노시클릭 시클로알키닐은 3 내지 약 10 개의 탄소 원자를 갖고, 더욱 일반적으로 3 내지 8 개의 탄소 원자를 갖는다. 폴리시클릭 시클로알키닐의 첫번째 고리 외의 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 시클로알키닐은 바이시클릭 분자로서 1, 2 또는 3 또는 그 이상의 원자가 2 개의 고리 사이에서 공유된 것을 포함한다. "융합된 시클로알키닐"이라는 용어는 폴리시클릭 시클로알키닐로서 각각의 고리가 다른 고리와 함께 인접한 2 개의 원자를 공유하는 것을 의미한다. 융합된 폴리시클릭 시클로알키닐의 첫번째 고리 외의 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다.
- [232] 그 자체인 분자로 쓰이거나 또는 다른 분자의 일부로 사용되는 용어 "알킬렌"은 알칸으로부터 유도된 2가 라디칼 (divalent radical)을 의미한다. 예컨대, 상기 그룹은 10개 이하의 탄소 원자를 갖고 있는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 및 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. "저급 알킬렌"은 짧은 알킬렌 그룹으로서, 일반적으로 6 또는 더 적은 탄소 원자를 갖는 것을 의미한다. "알킬렌"이라는 용어는, 따로 언급되지 않는 한, 본 출원에서 "헤테로알킬렌"으로 표현되는 그룹들을 포함하도록 의도되었다.
- [233] 용어 "헤테로알킬렌"은 헤테로알킬로부터 유도된 2가 라디칼을 의미하며,

예시적으로 $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—S—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$ 및 $\text{—CH}_2\text{—S—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$
 $\text{—NH—CH}_2\text{—}$ 를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 헤테로알킬렌 그룹에
 있어, 사슬의 각각의 끝 또는 모든 끝에 같거나 다른 헤테로원자들이 있을 수
 있다 (알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노,
 아미노옥시알킬렌 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다). 더 나아가, 양 끝의
 연결 표시는 그룹의 화학식의 배열과는 무관하다. 예를 들어 설명하면, 화학식
 $\text{—C(O)}_2\text{R'—}$ 은 $\text{—C(O)}_2\text{R'—}$ 와 $\text{—R'(O)}_2\text{C—}$ 둘 다를 의미한다.

- [234] 그 자체인 분자로 쓰이거나 또는 다른 분자의 일부로 사용되는 용어
 "알케닐렌"은 알켄으로부터 유도된 2가 라디칼 (divalent radical)을 의미한다.
 예컨대, 상기 그룹은 10개 이하의 탄소 원자를 갖고 있는 —CH=CH— , —CH_2
 $\text{CH=CHCH}_2\text{—}$, 및 —CH=CH—CH=CH— 를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
 "알케닐렌"이라는 용어는, 따로 언급되지 않는 한, 본 출원에서
 헤테로알케닐렌을 포함하도록 의도되었다.
- [235] 그 자체인 분자로 쓰이거나 또는 다른 분자의 일부로 사용되는 용어
 "알키닐렌"은 알킨으로부터 유도된 2가 라디칼 (divalent radical)을 의미한다.
 예컨대, 상기 그룹은 10개 이하의 탄소 원자를 갖고 있는 $\text{—C}\equiv\text{C—}$, $\text{—CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{—}$,
 및 $\text{—C}\equiv\text{C—C}\equiv\text{C—}$ 를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. "알키닐렌"이라는
 용어는, 따로 언급되지 않는 한, 본 출원에서 헤테로알키닐렌을 포함하도록
 의도되었다.
- [236] 그 자체인 분자로 쓰이거나 또는 다른 분자의 일부로 사용되는 용어
 "시클로알킬렌"은 시클로알켄으로부터 유도된 2가 라디칼 (divalent radical)을
 의미한다. "시클로알킬렌"이라는 용어는, 따로 언급되지 않는 한, 본 출원에서
 헤테로시클로알킬렌을 포함하도록 의도되었다.
- [237] 본 명세서, 예시, 및 청구항 전반에서 사용되는 "알킬렌"이라는 용어는
 "비치환된 알킬렌" 및 "치환된 알킬렌"을 둘 다 포함하도록 의도되었으며, 이중
 후자는 알킬렌 기로서 상기 탄화수소의 하나 이상의 탄소 상에서 수소를
 대신하는 치환기를 갖는 것을 의미한다. 상기 치환기는, 다르게 명시되지 않는
 한, 예시적으로, 할로젠, 히드록실, 카르보닐 (예를 들어 카르복실,
 알콕시카르보닐, 포르밀, 또는 아실), 티오키카르보닐 (예를 들어 티오에스테르,
 티오아세테이트, 또는 티오포르메이트), 알콕시, 포스포릴, 포스페이트,
 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 니트로,
 아지도, 술폰히드릴, 알킬티오, 설페이트, 술폰네이트, 설파모일, 술폰아미도,
 술폰닐, 헤테로시클릴, 아랄킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 기를 포함할 수
 있다. 치환하는 것이 적절한 경우, 탄화수소 사슬 상의 치환된 잔기가 그
 자체로도 치환될 수 있다는 것은 당업자에게 이해될 수 있다. 예를 들어, 치환된
 알킬렌의 치환기는 치환된 형태 및 비치환된 형태의 아미노, 아지도, 이민도,
 아미도, 포스포릴 (포스포네이트 및 포스피네이트를 포함함), 술폰닐 (설페이트,
 술폰아미도, 설파모일 및 술폰네이트를 포함함), 및 실릴 기를 포함할 수 있고,

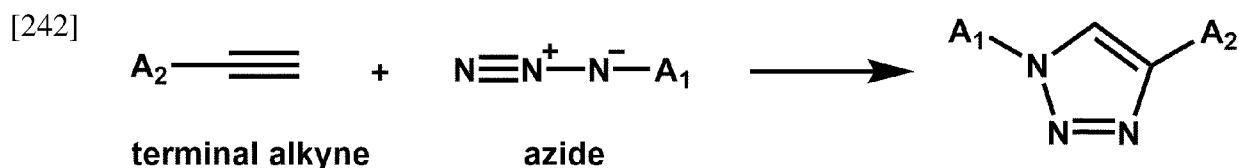
에테르, 알킬티오, 카르보닐 (케톤, 알데히드, 카르복실레이트, 및 에스테르를 포함함), -CF₃, -CN 및 이와 같은 것을 마찬가지로 포함할 수 있다. 예시적인 치환된 알킬은 아래에 설명되어 있다. 시클로알킬렌은 알킬, 알케닐, 알콕시, 알킬티오, 아미노알킬, 카르보닐-치환된 알킬, -CF₃, -CN, 및 이와 같은 것으로 추가적으로 치환될 수 있다. 상기 내용은 알케닐렌 및 알키닐렌에도 동일하게 적용된다.

[238] "C_{x-y}"라는 용어는, 예를 들어, 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌 같은 잔기와 함께 사용되는 경우 사슬에 x 내지 y 개의 탄소를 포함하는 잔기를 포함하도록 의도되었다. 예를 들어, "C_{x-y}알킬렌"이라는 용어는 치환된 또는 비치환된, 사슬 모양 알킬렌 및 가지 모양 알킬렌 기로서 사슬에 x 내지 y 개의 탄소를 포함하는 것을 포함하고, 예시적으로 디플루오로메틸렌 및 2,2,2-트리플루오로에틸렌, 등과 같은 할로알킬렌 기를 포함하는 것을 의미한다. C₀ 알킬렌은 공유결합을 의미한다. "C_{2-y}알케닐렌" 및 "C_{2-y}알키닐렌"이라는 용어는 상기 알킬렌에 대한 정의에서 설명된 것과 같이 길이 및 가능한 치환에 관한 정의가 적용되는 치환된 또는 비치환된 불포화된 지방족 잔기이지만, 각각 적어도 하나의 이중 또는 삼중 결합을 포함하는 것을 의미한다.

[239] 용어 "클릭화학반응 (click-chemistry)"은 Scripps Research Institute의 K. Barry Sharpless에 의하여, 두 개의 분자가 빠르고 안정적으로 공유 결합을 형성하도록 설계된 상보적인 화학작용기 및 화학 반응을 설명하기 위해 도입된 화학적 개념이다. 클릭화학반응은 특정한 반응을 의미하는 것이 아니라, 이러한 빠르고 안정적인 반응의 개념을 의미한다. 어떤 실시예에서, 클릭화학반응은 모듈화되고, 범위가 넓고, 높은 수율을 갖고, 부산물이 중대하지 않고, 입체특이적이고, 생리학적으로 안정하고, 열역학적으로 큰 원동력을 갖고 (예컨데, >84 kJ/mol), 또한/또는 높은 원자 경제성을 가져야 한다. 몇 가지 반응들이 상기 조건들을 만족하는 것으로 알려져있다:

[240] (1) 휴이스젠 1,3-이극성 고리화첨가 (Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition) (예시적으로, Cu(I)-촉매 고리화첨가 반응을 포함하며, 종종 "클릭 반응 (click reaction)"으로 일반화되어 지칭됨; Tornøe et al., Journal of Organic Chemistry (2002) 67: 3057-3064 등 참조): 구리 또는 루테튬이 일반적으로 촉매로 사용된다;

[241] [휴이스젠 1,3-이극성 고리화첨가의 모식도]

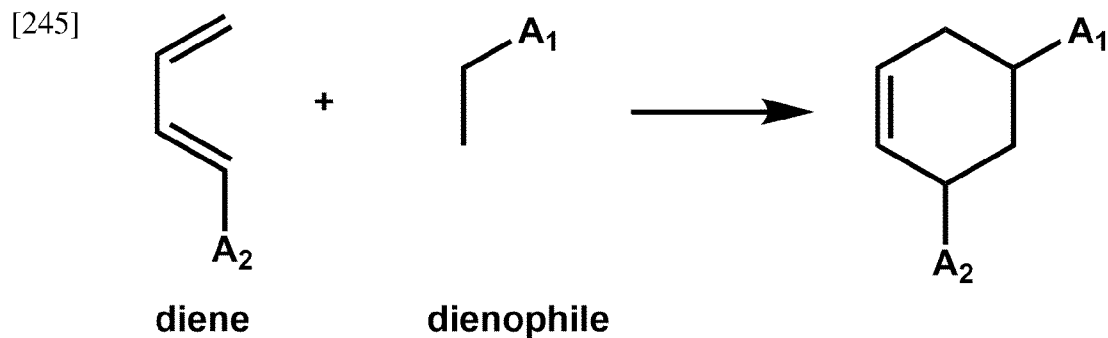


1,3-dipolar cycloaddition

[243] (2) 디엘스-알더 반응 (Diels-Alder reaction), 예를 들어 정상 전자-요구 디엘스-알더 반응 (normal electron-demand Diels-Alder reaction) 및 역 전자-요구

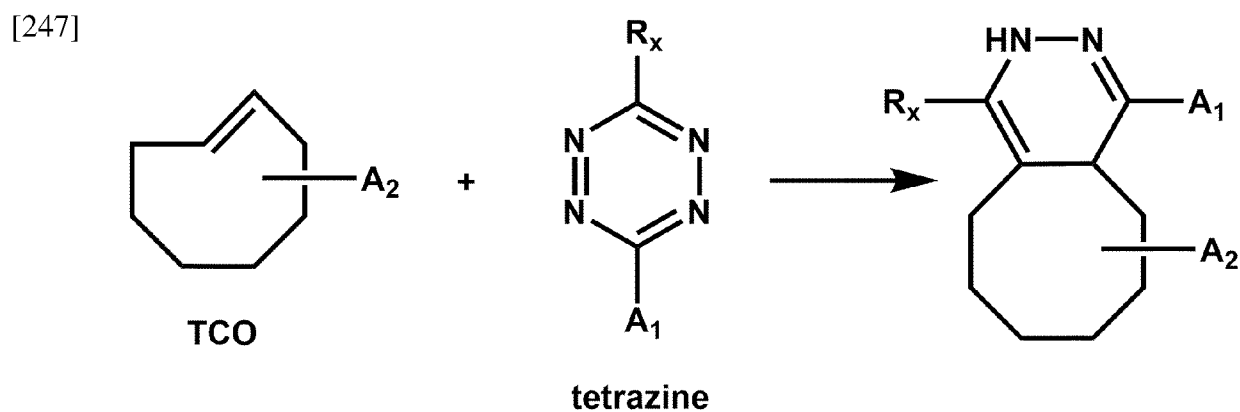
디엘스-알더 반응 (inverse electron-demand Diels-Alder reaction)을 포함하나 이에 한정되지 않는 고리화첨가 반응 (예시적으로, 스트레인 유도 고리화첨가 (strain-promoted cycloaddition; SPAAC));

[244] [디엘스-알더 반응 모식도]

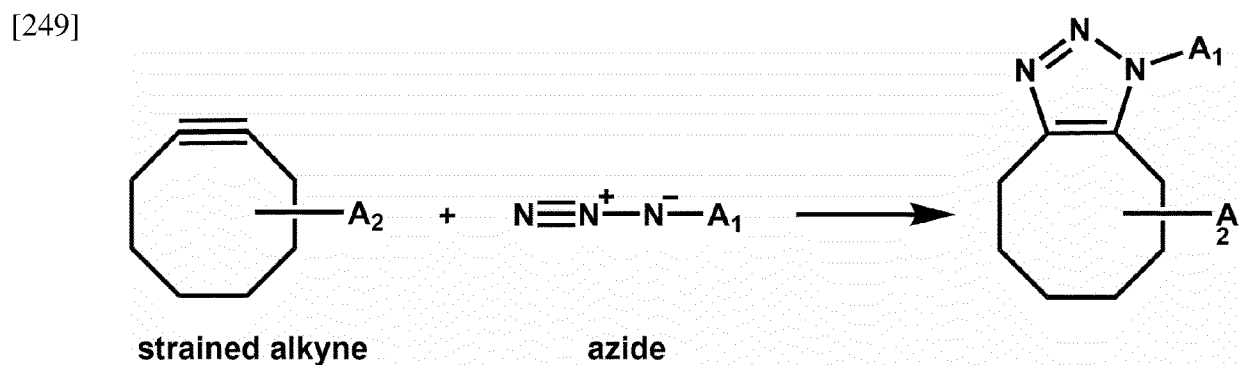


Diels-Alder reaction

[246] [디엘스-알더 반응의 예시; TCO와 테트라진]



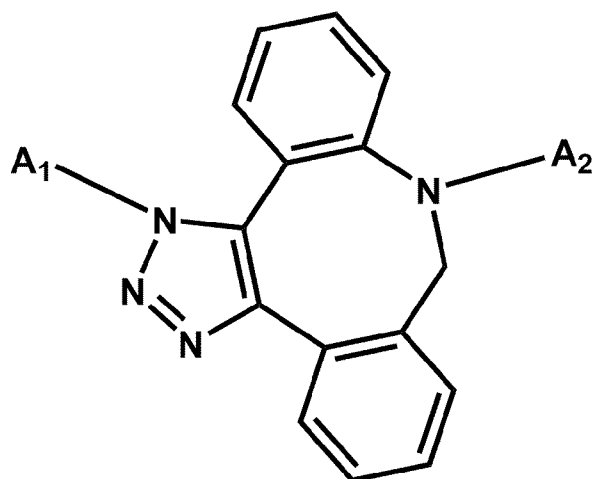
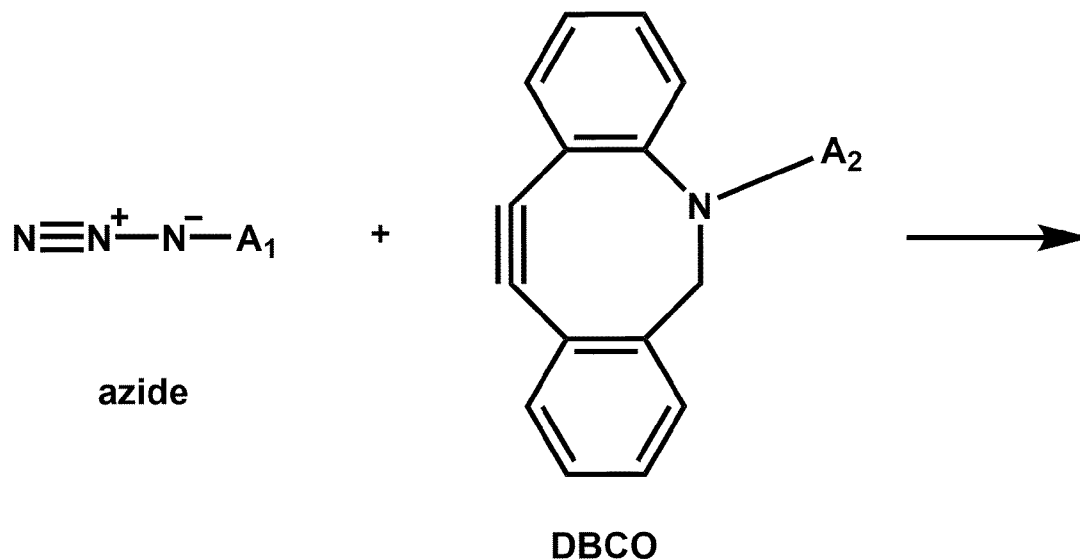
[248] [스트레인 유도 고리화첨가반응의 모식도]



Strain-promoted cycloaddition

[250] [스트레인 유도 고리화첨가반응의 예시; 아자이드와 DBCO]

[251]



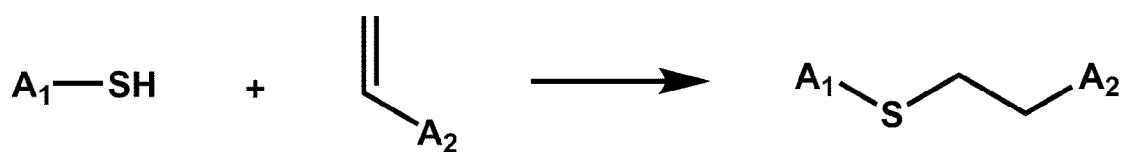
[252] (3) 에폭사이드 (epoxide) 및 아지리딘 (aziridine)과 같은 작은 스트레인된 고리 (strained ring)에 대한 친핵성 첨가 반응 (Nucleophilic addition);

[253] (4) 활성화된 카르보닐 기 (activated carbonyl group)에 대한 친핵성 첨가 반응;

[254] (5) 탄소-탄소 이중결합 또는 삼중결합에 대한 첨가 반응.

[255] [티올과 알켄의 첨가반응]

[256]



thiol

alkene

[257] 본 출원에서 사용된 용어 "클릭화학작용기 (click-chemistry functional group)"는 클릭화학반응에 관여하는 작용기를 의미한다. 예를 들어, 스트레인된 알킨, 에컨데 시클로옥틴은 클릭화학작용기에 해당한다. 일반적으로 클릭화학반응은 서로 상보적인 클릭화학작용기를 각각 포함하는 적어도 두 개의 분자를 필요로

한다. 이렇게 서로 반응성을 갖는 클릭화학작용기의 쌍은 종종 본 출원 내에서 "파트너 클릭화학작용기 (partner click-chemistry functional group)"로 언급된다. 예를 들어, 아자이드와 시클로옥틴의 스트레인-유도 고리화첨가 반응 (strain-promoted cycloaddition)에 있어 아자이드는 시클로옥틴 및 기타 다른 알킨들의 파트너 클릭화학작용기이다. 본 출원에서 사용되는 예시적인 클릭화학작용기는 말단 알킨 (terminal alkyne), 아자이드 (azide), 스트레인된 알킨 (strained alkyne), 다이엔 (diene), 친다이엔체 (dienophile), 트랜스 시클로옥틴 (trans-cyclooctene), 알켄 (alkene), 티올 (thiol), 및 테트라진 (tetrazine)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 그밖의 클릭화학작용기는 당업자에게 알려져있다.

- [258] 본 출원에서 사용된 용어 "이탈기 (leaving group)"는 당업자에게 잘 알려진 개념과 같으며 (Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structure- Fourth Edition of Jerry March, John Wiley and Sons Ed.; 1992, pages 351-357), 임의의 반응물에 연결된 화학작용기로서, 상기 반응물이 치환반응 (displacement reaction), 예컨대 친핵성 치환반응을 거칠 때 이동하는 것을 의미한다. 좋은 이탈기는 친핵성 치환반응에서 잘 이동하는 이탈기를 의미한다. 예시적인 좋은 이탈기는 할로젠 (F, Cl, Br, 및 I), 토실레이트, 메실레이트, 트리플레이트, 아세테이트, 트리플루오로메틸아세테이트, 캄퍼술포네이트 (camphorsulfonate), 2-티옥소벤조[d]티아졸-3(2H)-일 (2-thioxobenzo[d]thiazol-3(2H)-yl), N-히드로석시니미드 (N-hydrosuccinimide), N-아릴옥사이드, 및 하나 이상의 전자끄는기 (electron withdrawing group; EWG)로 치환된 아릴옥사이드를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 하나 이상의 전자끄는기로 치환된 아릴옥사이드는 예시적으로 2-니트로페녹사이드, 4-니트로페녹사이드, 2,4-디니트로페녹사이드, 펜타플루오로페녹사이드, 2-클로로-4-니트로페녹사이드, 2,4-디클로로페녹사이드, 및 2,4,6-클로로페녹사이드를 포함하고, 전자끄는기는 예시적으로 할로젠 (F, Cl, Br, 또는 I), -NO₂, -CN, -C(O)(C₁₋₆알킬), -C(O)(아릴), -C(O)O(C₁₋₆알킬), -C(O)O(아릴) 등을 포함한다.

- [259] 본 출원에서 사용된 용어 "인터랙툼 (interactome)"은 단백질 또는 펩타이드 간의 단백질-단백질 상호작용 (protein-protein interaction; PPI)이 있는 경우 상기 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 단백질 또는 펩타이드를 의미한다. 예컨대, 샤페론 단백질과 이의 승객 단백질은 서로의 인터랙툼이다. "단백질-단백질 상호작용"은 둘 이상의 단백질 또는 펩타이드 분자가 상호작용에 의하여 높은 특이성을 가지고 물리적 접촉을 이루는 것을 의미한다. 이때 원인이 되는 상호작용은 전자기력, 수소결합, 및 소수성 상호작용을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [260] 본 출원에서 사용된 용어 "항체 인터랙툼 (antibody interactome)"는 이뮤노글로불린을 포함하는 항체에 대한 인터랙툼을 의미한다. 예시적인 항체 인터랙툼들이 표 1에 나타나있다. 이 중에서도 Fc-III 등의 펩타이드는

이뮤노글로불린의 Fc 도메인과의 결합 활성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 이러한 경우 상기 펩타이드를 "Fc 인터랙토姆 (Fc interactome)"으로도 지칭한다.

[261]

〈표 1〉 SSAI의 목록

Peptide	Binding Constant	Binding Capacity	Elution pH	Remarks
PAM	$K_d = 0.3\mu\text{M}$	n.a.	3 or 9	Dendrimer comb. library SpA mimic
D-PAM	n.a.	50	3.5	
D-PAM- ϕ	n.a.	10	4	
TWKTSRISIF	n.a.	n.a.	n.a.	Phage display library
FGRLVSSAIRY	n.a.	n.a.	n.a.	SpA mimic
Fc-III (DeLano et al.)	$K_d = 16\text{nM}$	26.6mg/ μmol	3.5	Phage display cyclic peptide library SpA mimic
Fc-III-(Sephacrose)				
FcBP-2	$K_d = 1.8\text{nM}$			Bicyclic peptide
Fc-III-4C	$K_d = 2.5\text{nM}$	n.a.	3.5	Bicyclic peptide
EPIHRSTLTALL	n.a.	320 $\mu\text{g/g}$	n.a.	Phage display library SpA mimic
APAR	$K_d = 94\text{nM}$	9.1	n.a.	Comb. tetrapeptide library
FcRM	$K_d = 20\mu\text{M}$	n.a.	2.7	Synthetic cyclic peptide library, Fc γ -receptor mimic

[262]

〈표 1〉 (계속)

Peptide	Binding Constant	Binding Capacity	Elution pH	Remarks
HWRGWV	$K_d = 10 \mu\text{M}$	28.4	4	Comb. library (one-bead-one-peptide) SpA mimic
HYFKFD	$K_d = 11 \mu\text{M}$	27.0	n.a.	
HFRRHL	$K_d = 26 \mu\text{M}$	33.6	n.a.	
HWChGWV	$K_d = 108 \mu\text{M}$	72	n.a.	
D ₂ AAG	$K_a = 7.9 \times 10^5 \text{M}^{-1}$	36.2	3.6	Comb. library SpA mimic
DAAG	$K_a = 2.6 \times 10^5 \text{M}^{-1}$	49.6	3.6	
cyclo [(Na-Ac)S(A)- RWHYFK-Lact-E]	n.a.	n.a.	3.5	Cyclic peptide
cyclo [(Na-Ac)-Dap(A)- RWHYFK-Lact-E]	n.a.	n.a.	3.5	
cyclo [Link-M-WFRHYK]	$K_d = 7.6 \mu\text{M}$	19.7	4.0	mRNA display library SpA mimic
NKFRGKYK	$K_a = 8.6 \times 10^6 \text{M}^{-1}$	DBC-4.9	4.0	Spot peptide array Fcv mimic
NARKFYKG	$K_a = 6.5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$	DBC-5.0	4.0	

[263]

〈표 1〉 (계속)

Peptide	Binding Constant	Binding Capacity	Elution pH	Remarks
FYWHCLDE(1)	$K_d = 1.5\mu\text{M}$	104.2	6.0	Biomimetic design strategy Fc-binder (SpA mimic) Dual affinity ligand
FYCHWALE(2)	$K_d = 6.1\mu\text{M}$	87.6	6.0	
FYCHTIDE(3)	$K_d = 5.7\mu\text{M}$	63.7	6.0	
Dual 1/3 (2:1)	$K_d = 0.69\mu\text{M}$	137.9	6.0	
RRGW	$K_d = 0.5\text{nM}$	n.a.	n.a.	Computer design strategy Fc-binder
KHRENKD	$K_d = 20\text{nM}$	n.a.	n.a.	Phage-display library SpA mimic

* Maximal binding capacity (q_m) in mg/mL, DBC: Dynamic binding capacity. The depicted values are towards IgG and may not be directly compared to each other because they were obtained at different conditions or by different methods. n.a.: Not available.

[264]

[265]

- [266] 본 출원에 의한 용어 "항체 (antibody)"는 이뮤노글로불린 분자 또는 이의 단편을 의미한다. 이뮤노글로불린은 통상적으로 잘 알려져있으며, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 가지고 있다. 다만 본 출원에 의한 항체는 이의 단편 역시 포괄하는 개념이므로, Fc 단편의 경우와 같이 특정 항원에 대한 결합능이 없어도 무관하다. 나아가, 항체는 자연 유래 이뮤노글로불린 외에도 동일 또는 유사한 구조를 가진 재조합 단백질, 퓨전 단백질 (fusion protein), 키메라 단백질 (chimeric protein), 인간 이뮤노글로불린, 인간 외의 동물의 이뮤노글로불린을 모두 포함하도록 의도되었다.
- [267] 본 출원에 의한 용어 "콘쥬게이트 (conjugate)"는 콘쥬게이트 파트너가 서로 공유결합을 이룸으로써 만들어진 이종의 분자를 의미한다. 상기 공유결합은 바람직하게는 클릭화학반응에 의하여 형성될 수 있다. 상기 용어 "콘쥬게이트 파트너 (conjugation partner)"는 콘쥬게이트를 형성하고자하는 각각의 분자를 의미한다. 이때, 콘쥬게이트를 수행하는 자가 특정 분자에 임의의 다른 분자를 연결하는 것을 의도하는 경우, 편의상 상기 특정 분자를 "목적 분자 (target molecule)" 또는 "목적 단백질 (target protein)"으로 통칭할 수 있고, 상기 임의의 다른 분자를 "카고 분자 (cargo molecule)" 또는 "카고 모이어티 (cargo moiety)"로 통칭할 수 있다.
- [268] 본 출원에 의한 용어 "운반자 모이어티 (carrier moiety)"는 콘쥬게이트를 구성하는 일 부분으로서, 연결된 분자의 혈장 안정성 (serum stability)을 높이거나 반감기를 늘리는 기능을 하는 분자를 의미한다. 운반자 모이어티로 사용될 수 있는 분자는 당업계에 널리 알려져 있다. 대표적인 운반자 모이어티의 예시는 알부민, 젤라틴, 엘라스틴 (토포엘라스틴을 포함함), 엘라스틴-유도 폴리펩티드 (elastin-derived polypeptide) (α -엘라스틴 및 엘라스틴-유사 폴리펩티드 (ELPs)), 글리아딘 (gliadin), 레구민 (legumin), 제인 (zein), 대두 단백질 (soy protein) (예를 들어, 대두 단백질 아이솔레이트 (soy protein isolate; SPI)), 우유 단백질, 웨이 단백질, 및 빌리루빈 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [269] 본 출원에 의한 용어 "형광 모이어티 (fluorescent moiety)"는 형광 용도로 이용하기 위한 염료 (dye), 또는 염료 시약 (dye reagent)을 포괄하고자 의도되었다. 염료 및 염료 시약으로 사용될 수 있는 분자는 당업계에 널리 알려져있다. 대표적인 형광 모이어티의 예시는 표 2와 같으나, 이에 한정되는 것은 아니다 (Immunotech-Coulter Corp. catalog, "Cytometry Monoclonal Reagent Guide," 8/95, p.3).

[270]

<표 2> 형광 모이어티의 목록

Fluorochrome	Maximum Absorbance	Excitation at 488 nm	Maximum Emission	Fluorescence
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	495 nm	Yes	525 nm	Green
Phycoerythrin (PE)	488; 565 nm	Yes	575 nm	Orange-red
Energy Coupled Dye [ECD] (PE-Texas-Red)	488; 565 nm	Yes	610-635 nm	Red
Phycoerythrin-Cyanin 5 (PE-Cy5)	488; 565; 652 nm	Yes	670 nm	Deep-red

[271] 본 출원에 의한 용어 "약물 모이어티 (drug moiety)"는 임의의 질병에 대한 치료 효능을 갖는 분자를 의미한다. 본 출원에 의한 약물 모이어티는 통상적인 기술자에게 임의의 질병에 대하여 효능이 있는 것으로 알려진 것들을 포함한다. 대표적으로 항암 효능을 갖는 약물 모이어티는 DM1, DM3, DM4, 아브린, 리친 A, 슈도모나스 엑소독신, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 종양 괴사 인자, α 인터페론, β 인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 사이토카인, 아포토시스 유도 제제, 항-신혈관형성 제제, 림포카인, 탁세인, DNA-알킬화 제제, 안트라시클린, 튜블리신 유사체, 듀오카르마이신 유사체, 오리스타틴 E, 오리스타틴 F, 마이탄시노이드, 반응성 폴리에틸렌글리콜 잔기를 포함하는 세포독성 제제, 탁손, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에베틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, t. 콜키신, 독소루비신, 도노루비신, 디히드로록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 메토크세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 디카르바진, 메클로레타민, 티오테파클로람부실, 메이팔란, 카르무스틴, 로무스틴, 시클로포스파미드, 부설판, 디브로모마니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 시스플라틴, 닥티노마이신, 블레오마이신, 안트라마이신, 칼리키아마이신, 아비라테론, 벤다무스틴, 보르테조미, 카르보플라틴, 카바지탁셀, 다사티닙, 도세탁셀, 에피루비신, 엘로티닙, 에베롤리무스, 챔시타빈, 제피티닙, 이다루비신, 이마티닙, 히드록시우레아, 라파티닙, 류프로레린, 멜팔란, 네다플라틴, 닐로티닙, 옥살리플라틴, 파조파닙, 페메트렉세드, 피코플라틴, 로미렙신, 사트라플라틴, 소라페닙, 베무라페닙, 수니티닙, 테니포사이드, 트리플라틴, 및 비노렐빈을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[272] 본 출원에 의한 용어 "방사성 모이어티 (radioactive moiety)"는 방사성 동위원소를 포함하는 모이어티를 의미한다. 방사성 동위원소 표지

(radiolabelling)은 진단 이미지 촬영 (diagnostic imaging) 및 방사성 치료에 유용하다. 대표적인 방사성 모이어티는 ^{18}F , ^{11}C , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , 및 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [273] 용어 "약학적으로 허용가능한 담체(Pharmaceutically acceptable carrier)"는 부형제, 희석제 또는 보조제를 포함하는 의미로 사용된다. 상기 담체는 예를 들면, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 담체는 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 풍미제, 유화제, 보존제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [274] 용어 "약학적으로 허용가능한 염(Pharmaceutically acceptable salt)"은 본 출원의 단백질체 및 화합물의 생물학적 유효성 및 성질이 유지되고, 생물학적으로 또는 다른 방식으로 바람직하지 않지 않은 염을 지칭한다. 많은 경우에, 본 발명의 단백질체 및 화합물은 전하를 띠는 기, 예를 들어, 전하를 띠는 아미노 및/또는 카르복실기 또는 이와 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 산 부가염은 무기 및 유기 산으로부터 제조될 수 있고, 약학적으로 허용가능한 염기 부가염은 무기 및 유기 염기로부터 제조될 수 있다.
- [275] 용어 "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 상기 치료는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 "완화(Palliating)"하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병 상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이(time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.
- [276] "치료적 유효량" (또는 "유효량")은 대상 또는 환자에게 투여되는 경우 처치를 달성하는데 충분한 활성 성분, 예를 들어, 본 발명에 따른 작용제의 양을 지칭한다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물의 치료적 유효량을 구성하는 것은 당업자에게 의해 용이하게 결정될 수 있다. 눈 요법의 문맥에서, "치료적 유효량"은 눈 질환 또는 용태와 관련된 하나 이상의 유전자의 발현에서의 증가 또는 감소, 세포자멸사 또는 기타 세포 사망 경로의 유도, 증상에서의 임상 개선, 비정상적인 혈관신생 또는 염증에서의 감소 등이 포함되는, 눈 질환 또는 용태의

처치와 관련된 하나 이상의 파라미터에서 객관적으로 측정된 변화를 일으키는 양이다. 물론, 치료적 유효량은 처치될 특정 대상 및 용태, 대상의 체중 및 연령, 질환 용태의 중증도, 선택된 특정 화합물, 이어지는 투약 계획, 투여 시간조정, 투여 방식 등에 따라 변할 것이고, 이들 모두는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 조합 요법의 상황에서, 특정 활성 성분의 치료적 유효량을 구성하는 것은 단독요법 (즉, 활성 성분으로서 하나의 화학 본체만을 사용하는 치료 계획)으로서 투여되는 활성 성분의 치료적 유효량을 구성하는 것과 다를 수 있다는 것이 이해될 것이다.

- [277] "대상" 또는 "환자"는 본 발명의 분자에 의해 달성될 수 있는 처치를 필요로 하는 동물을 지칭한다. 본 발명에 따라 처치될 수 있는 동물에는 척추동물이 포함되고, 포유동물 예컨대 소과, 개과, 말과, 고양이과, 양과, 돼지과 및 영장류 (인간 및 비-인간 영장류 포함) 동물이 특히 바람직한 예이다.
- [278] 용어 "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.
- [279]
- [280] 1. 항체 (antibody)
- [281] 본 설명은 본 출원의 이해를 돕기 위하여 제공되는 항체의 구조, 학문적 체계, 및 생리적 작용에 대한 설명을 제공하는 것을 목적으로 하며, 본 출원의 권리범위의 대상이 되는 항체는 본 설명에 의하여 한정되어선 안 된다.
- [282] 항체는 알려진 바와 같이 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄로 이루어져 있다. 항체를 기능적으로 간단히 나누면 경쇄를 포함하는 항원 결합 단편 가변부위 (Fragment antigen-binding variable region; Fab)와 중쇄의 일부로 구성된 결정화 단편 부위 (Fragment crystallizable region)으로 나뉜다. Fab는 항원과 결합하는 파라토프 (paratope)를 포함하며, 알려진 바와 같이 항체가 항원에 대한 특이적 결합 활성을 갖도록 하는 부위이다. Fc 도메인은 세포의 Fc 수용기 (Fc receptor; FcR)에 대한 리간드로서, 면역반응을 유도하는 데 중요한 역할을 한다. 또한 Fc 도메인은 신생아 Fc 수용체 (neonatal Fc receptor)와 결합하여 항체가 반복적으로 세포에 내재화되도록 함으로써 항체의 반감기를 늘리는 데에도 중요한 역할을 한다.
- [283] 이로부터 항체 표지의 몇몇 바람직한 방향성을 도출할 수 있다. (1) 먼저, 표지는 항체의 파라토프와 이격된 곳에서 이루어지는 것이 바람직하다. 표지가 파라토프 또는 이와 인접한 곳에서 이루어진다면, 항체의 항원에 대한 결합능이 크게 저하될 수 있다. (2) 두번째로, 표지는 FcRn을 포함하는 FcR의 인식 부위와 이격된 곳에서 이루어지는 것이 바람직하다. 표지가 상기 수용체의 인식부위 또는 이와 인접한 곳에서 이루어진다면 항체의 면역 유도 기능이 저하되거나 또한 항체의 반감기가 크게 떨어질 수 있다. Fc 도메인의 결합 활성 모티프에 대한 정보는 DeLano, W. L. (2000). Convergent Solutions to Binding at a Protein-Protein Interface. *Science*, 287(5456), 1279-1283., 및 W. Lance Martin et al.

(2001), Molecular Cell, Vol. 7, 867-877, April, 2001 등에서 확인 가능하다.

- [284] 본 출원에서 항체의 Fc 도메인에 대한 아미노산 서열에 대한 언급이 나온다면, 다르게 언급되지 않는 한 서열번호는 EU 넘버링 체계 (EU numbering system)에 따른다. EU 넘버링 체계는 Edelman GM, et al., The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule, Proc Natl Acad Sci U S A., 1969 May;63(1):78-85.에서 IgG의 서열이 연구된 이후 Fc 도메인의 서열 체계로 널리 이용되고 있다.

[285]

- [286] 1.1. 바람직한 표지 위치의 탐구

- [287] 상기 표지 위치의 기준, 즉 (1) 파라토프와 이격된 곳이고 (2) FcRn을 포함한 FcR의 인식 부위와 이격된 곳이어야 할 것을 고려하여 항체의 표지 위치를 설계할 수 있다. 아미노산 중 생체공유제이트 (bioconjugate) 반응에 활용되는 것으로는 대표적으로 라이신, 시스테인, 및 티로신이 있다. 항체의 Fc 도메인에 존재하는 246번 라이신 (Lys₂₄₆, 또는 246번 라이신)과 248번 라이신 (Lys₂₄₈, 또는 248번 라이신)은 상기 조건들을 모두 만족하는 잔기로서 바람직한 표지 위치 중 하나이다. 상기 Lys₂₄₆ 및 Lys₂₄₈의 위치가 포함된 Fc 영역의 서열은 GPSVFLFPPKPKDTLMI이며, 서열 및 EU 넘버링 체계에 의한 서열번호는 도 1과 같다 (도1, 서열번호 1).

- [288] 특정한 실시예에서, 본 출원에 의한 항체는 서열번호 1 또는 이의 유도체 (derivatives)를 포함할 수 있다. 나아가, 본 출원에 의한 항체는 246번 라이신이 치환된 서열번호 1의 유도체를 포함할 수 있다. 또는 나아가, 본 출원에 의한 항체는 248번 라이신이 치환된 서열번호 1의 유도체를 포함할 수 있다. 더 나아가, 본 출원에 의한 항체는 246번 라이신 및 248번 라이신이 치환된 서열번호 1의 유도체를 포함할 수 있다.

- [289] 상기 서열번호 1 또는 이의 유도체는 허용 가능한 범위에서 변이된 것을 포함한다. 특정한 실시예에서, 상기 변이된 서열은 서열번호 1 또는 이의 유도체에 대하여 약 90%, 약 85%, 약 80%, 약 75%, 또는 약 70% 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이하 언급되는 특정한 실시예들에 있어, 화학식 7-1 내지 7-3, 8-1 내지 8-3, 및 10-1 내지 10-3 등 서열번호 1의 유도체 역시 허용 가능한 범위에서 변이된 것을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

- [290] 도 2는 246번 라이신 및 248번 라이신을 포함하는 fc 도메인 상의 라이신 잔기들의 위치를 도시한 것이다.

[291]

[292]

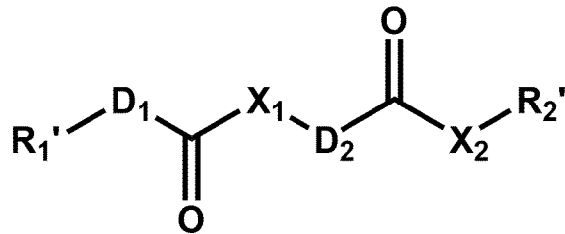
- [293] 2. 링커 (linker; R₁'-L₁)

- [294] 본 출원에 의하여 항체 표지를 위해 사용될 수 있는 신규한 화합물이 개시된다. 본 원에서는 이러한 화합물을 편의상 링커로 명칭하며, 기호로는 R₁'-L₁으로 표시한다.

[295] 본 출원은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물을 제공한다:

[296] [화학식 1]

[297]



[298] 이때,

[299] R_1' 은 제1 화학작용기이고,

[300] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[301] X_1 은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,

[302] D_2 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[303] X_2 은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,

[304] R_2' 은 제2 화학작용기이다.

[305] 상기 화학식 1에 있어, D_1 과 연결된 카보닐기를 제1 카보닐기(first carbonyl group)로 명칭한다. 또한, D_2 와 연결된 카보닐기를 제2 카보닐기(second carbonyl group)로 명칭한다.

[306] 특정한 실시예에서, R_1' 은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 터올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민으로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R_1' 은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.

[307] 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 운반자 모이어티(carrier moiety), 형광 모이어티(fluorescent moiety), 약물 모이어티(drug moiety), 또는 방사성 모이어티(radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R_1' 은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R_1' 은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 파라토프(paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.

[308] 특정한 실시예에서, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_1 은 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 일 수 있다. 또는 나아가, D_1 은 공유결합일 수 있다. D_1 이 공유결합인 경우, R_1' 과 제1 카보닐기 탄소는 직접 연결된다. 이하에서 화합물의 구조를 설명함에 있어

알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 시클로알킬렌은 모두 각각 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐렌, 헤테로알키닐렌, 헤테로시클로알킬렌을 포함하는 개념이며, 이는 '정의' 부분에서도 명시되어 있다.

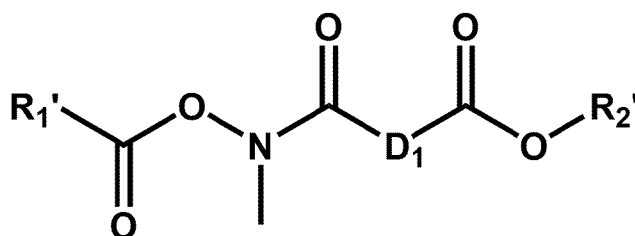
- [309] 특정한 실시예에서, X_1 은 NR_1 , S 또는 O 일 수 있고, 이때 R_1 은 H , 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-3} 알킬렌일 수 있다. 나아가, X_1 은 S 일 수 있다. X_1 은 제1 카보닐기 탄소의 전자를 끌어감으로써 제1 카보닐기를 활성화시킬 수 있다.
- [310] 특정한 실시예에서, D_2 는 C_{1-7} 알킬렌, C_{2-7} 알케닐렌, C_{2-7} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_2 는 C_{1-2} 알킬렌일 수 있다. 더 나아가, D_2 는 메틸렌일 수 있다.
- [311] 특정한 실시예에서, X_2 는 NR_1 , S 또는 O 일 수 있고, 이때 R_1 은 H , 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-3} 알킬렌일 수 있다. 나아가, X_2 는 O 일 수 있다. X_2 는 제2 카보닐기 탄소의 전자를 끌어감으로써 제2 카보닐기를 활성화시킬 수 있다.
- [312] 특정한 실시예에서, R_2' 은 할로젠, N -석시니미드, p -니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐일 수 있다.
- [313] 특정한 실시예에서, R_2' 과 X_2 는 함께 이탈기 (leaving group)를 형성할 수 있다. 예시적으로, X_2 는 O 이고, R_2' 은 N -석시니미드, p -니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐일 수 있다. 나아가, R_2' 은 N -석시니미드일 수 있다. 제2 카보닐기에 좋은 이탈기가 연결될 때, 제2 카보닐기의 반응성이 높아질 수 있다. 예시적으로, N -히드록시석시니미드 에스테르 (N -hydroxysuccinimide ester; NHS ester)는 반응성이 매우 높은 것으로 알려져 있다.

[314]

[315] 본 출원은 하기 화학식 1-2의 구조를 갖는 화합물을 제공한다:

[316] [화학식 1-2]

[317]



[318] 이때,

[319] R_1' 은 제1 화학작용기이고,

[320] D_1 는 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[321] R_2' 은 제2 화학작용기이다.

[322] 특정한 실시예에서, R_1' 은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는

디벤조시클로옥신-아민로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.

[323] 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R₁'은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.

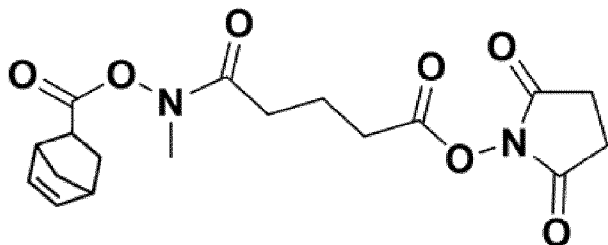
[324] 특정한 실시예에서, D₁은 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 C₁₋₂알킬렌일 수 있다. 더 나아가, D₁는 메틸렌일 수 있다.

[325] 특정한 실시예에서, R₂'과 O는 함께 이탈기를 형성할 수 있다. 이때, R₂'은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐일 수 있다. 나아가, R₂'은 N-석시니미드일 수 있다.

[326] 특정한 실시예에서, 화학식 1-2에 의한 화합물은 하기 화학식 1-3의 구조를 가질 수 있다:

[327] [화학식 1-3]

[328]



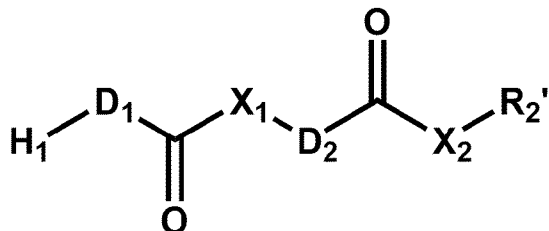
[329]

[330] 2.1. 제1클릭화학작용기를 포함하는 링커 (linker comprising first click-chemistry functional group; H₁-L₁)

[331] 본 출원은 하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물을 제공한다:

[332] [화학식 2]

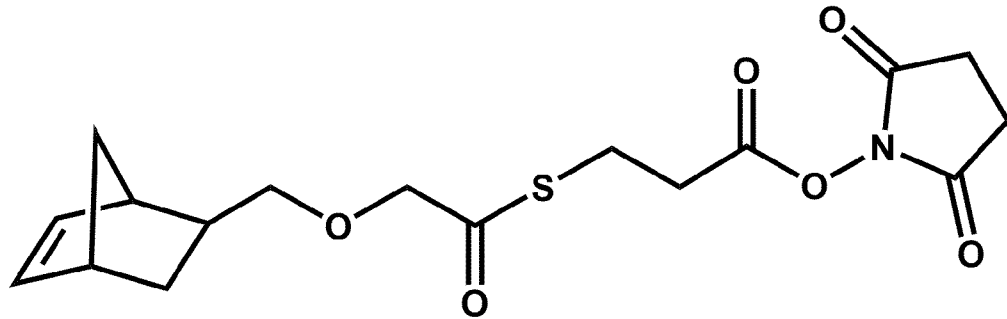
[333]



[334] 이때,

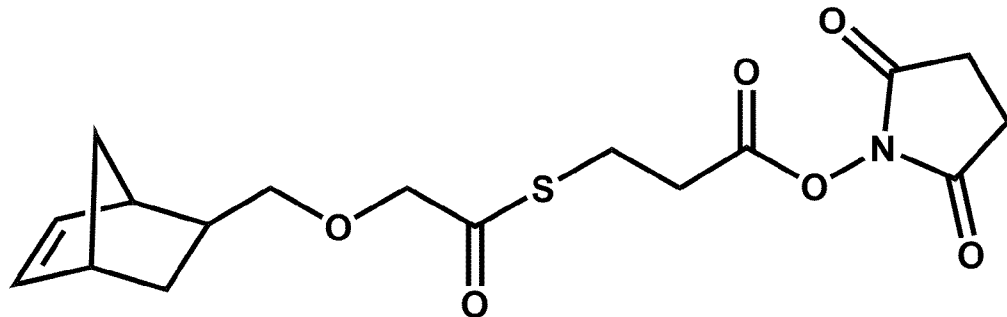
- [335] H_1 은 제1 클릭화학작용기이고,
 [336] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,,
 [337] X_1 은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,
 [338] D_2 는 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,
 [339] X_2 는 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,
 [340] R_2' 은 제2 화학작용기이다. 본원에서는 상기 화학식 2의 구조를 갖는 링커를 '제1 클릭화학작용기를 포함하는 링커 (linker comprising first click-chemistry functional group)'으로 명칭하며, 기호로는 H_1-L_1 으로 표시한다.
 [341] 상기 화학식 2에 있어, D_1 과 연결된 카보닐기를 제1 카보닐기(first carbonyl group)로 명칭한다. 또한, D_2 와 연결된 카보닐기를 제2 카보닐기(second carbonyl group)로 명칭한다.
 [342] 특정한 실시예에서, H_1 은 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더 나아가, H_1 은 아자이드, 또는 스트레인된 알킨일 수 있다. 또 더 나아가, H_1 은 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민일 수 있다. 또는, 더 나아가, H_1 은 다이엔, 또는 친다이엔체일 수 있다. 또 더 나아가, H_1 은 테트라진, 또는 노르보르넨일 수 있다. 또는, H_1 은 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐일 수 있다.
 [343] 특정한 실시예에서, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_1 은 $-CH_2OCH_2-$ 일 수 있다. 또는 나아가, D_1 은 공유결합일 수 있다.
 [344] 특정한 실시예에서, X_1 은 NR_1 , S 또는 O일 수 있고, 이때 R_1 은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-3} 알킬렌일 수 있다. 나아가, X_1 은 S일 수 있다.
 [345] 특정한 실시예에서, D_2 는 C_{1-7} 알킬렌, C_{2-7} 알케닐렌, C_{2-7} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_2 은 C_{1-2} 알킬렌일 수 있다. 더 나아가, D_2 는 메틸렌일 수 있다.
 [346] 특정한 실시예에서, X_2 는 NR_1 , S 또는 O일 수 있고, 이때 R_1 은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-3} 알킬렌일 수 있다. 나아가, X_2 는 O일 수 있다.
 [347] 특정한 실시예에서, R_2' 은 할로젠, N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐일 수 있다.
 [348] 특정한 실시예에서, R_2' 과 X_2 는 함께 이탈기(leaving group)를 형성할 수 있다. 예시적으로, X_2 는 O이고, R_2' 은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐일 수 있다. 나아가, R_2' 은 N-석시니미드일 수 있다.
 [349] 특정한 실시예에서, 화학식 2에 의한 화합물은 하기 화학식 2-1 내지 2-3 중 어느 하나의 구조를 가질 수 있다:
 [350] [화학식 2-1]

[351]



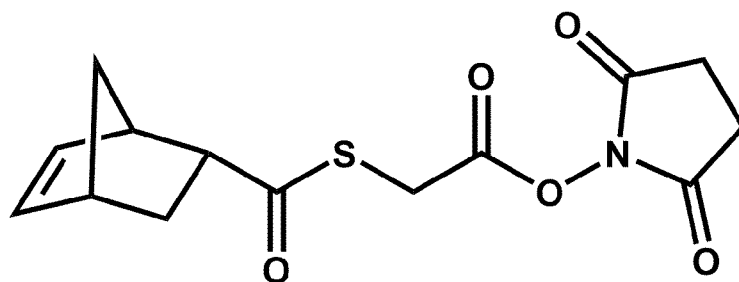
[352] [화학식 2-2]

[353]



[354] [화학식 2-3]

[355]



[356]

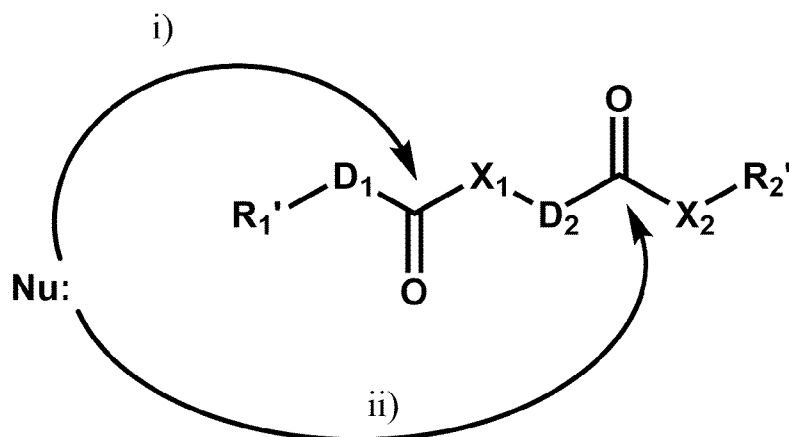
[357] 2.2. 제1 카보닐기와 제2 카보닐기의 반응성 차이에 따라 치환반응이 일어나는 위치가 특이적으로 정해질 수 있다 (Occurring position of a disposition reaction may be determined by the difference of reactivity of first carbonyl group and second carbonyl group)

[358] 상기 화학식 1, 화학식 2 및 이의 하위 실시예들의 링커의 설계에 있어, X₁과 X₂, R₂'의 설계에 따라 치환반응의 위치가 특정될 수 있다.

[359] 본 출원에서 개시되는 링커는 활성화된 제1 카보닐기 및/또는 제2 카보닐기에서 일어나는 치환 반응을 통하여 R₁'을 목적 분자에 전달하는 기능을 한다. 이러한 치환 반응을 모식화하면 이하 반응식 1과 같다.

[360] [반응식 1]

[361]



[362] 상기 반응식 1에서, 편의상 목적 분자를 'Nu:'로 표시하였다. 비공유전자쌍을 가지고 있어 친핵체 (nucleophile)로 기능하는 Nu:는 제1 카보닐기 및/또는 제2 카보닐기와 친핵성 아실 치환반응 (nucleophilic acyl substitution reaction)을 일으켜 링커와 결합을 형성하게 된다. 친핵성 아실 치환반응에 있어, 카보닐기의 반응성은 이탈기의 염기성 (basicity)에 의해 결정된다. 이에 따라 카보닐기의 반응성은

[363] 카르복실레이트<아미드<카르복시산<에스테르<티오에스테르 (thioester)<아실 포스페이트 (acyl phosphate)

[364] 순으로 증가하는 것으로 알려져있다. 또한 NHS 에스테르 등의 카보닐기는 매우 안정한 이탈기를 형성하므로 반응성이 높은 것으로 알려져있다.

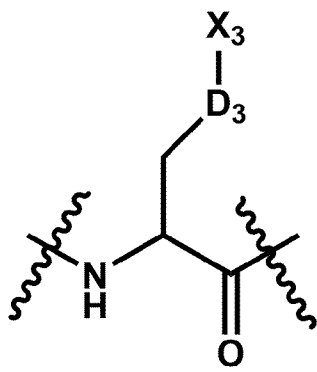
[365] 특정한 실시예에서, X₁ 및 X₂는 탄소보다 전기음성도가 큰 원소일 수 있다. 나아가, X₁ 및 X₂는 NR₁, S 또는 O일 수 있고, 이때 R₁은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C₁₋₃알킬렌일 수 있다. X₁ 및 X₂는 이들과 연결된 잔기와 함께 이탈기를 형성할 수 있으므로 카보닐기를 활성화시킬 수 있다.

[366]

[367] 이때, 선택적으로 Nu:가 i) 제1 카보닐기와 우선적으로 반응하거나 또는 ii) 제2 카보닐기와 우선적으로 반응하도록 할 수 있다. 이러한 반응의 경향성은 제1 카보닐기와 제2 카보닐기의 반응성 차이에 따라 결정될 수 있다. 예시적으로, X₁을 포함하는 이탈기의 염기성이 X₂를 포함하는 이탈기 보다 작은 경우, 제1 카보닐기가 먼저 반응할 수 있다. 다른 예시에서, X₂를 포함하는 이탈기의 염기성이 X₁을 포함하는 이탈기 보다 작은 경우, 제2 카보닐기가 먼저 반응할 수 있다.

[368] 바람직한 실시예에서, 본 출원에 의한 링커는 제2 카보닐기의 반응성이 제1 카보닐기보다 큰 것이 바람직하다. 본 출원은 제2 카보닐기와 연결된 X₂-R₂'가 좋은 이탈기를 형성하도록 하고, 제1 카보닐기를 온건한 반응성을 갖는 아미드, 티오에스테르, 에스테르 등으로 설계함으로써 선택적 반응을 가능하게 하였다. 예시적으로 화학식 1-3의 링커를 볼 때, 제2 카보닐기는 NHS 에스테르이므로 제1 카보닐기 (티오에스테르) 보다 먼저 반응을 일으킬 수 있다.

- [369] 공개번호 US20180141976A1 및 WO2018199337A1의 기술은 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제 (이하 4. 참조)의 형태가 본 출원과 비슷하지만, 크로스링커에 두 개의 NHS 에스테르가 포함되는 점에서 본 출원과 상이하다. 크로스링커의 두 개의 카보닐기는 반응성이 같고, 높은 수율로 원하는 전달용 제제를 제조하는 것이 어렵다. 또한, NHS 에스테르의 반응성이 높아서 크로스링커가 두 개의 SSFI와 반응할 가능성이 높다. 본 출원은 제1 카보닐기를 반응성이 온건한 (mild) 티오에스테르 등으로 설계함으로써 이런 문제를 해결하였다.
- [370]
- [371] 3. 위치-특이적 항체 인터랙툼 (site-specific antibody interactome; SSAI)
- [372] 본 출원에 의하여 표지하고자 하는 분자를 항체의 특정 위치에 근접시키기 위한 신규한 펩타이드가 개시된다. 본원에서는 이러한 펩타이드를 편의상 위치-특이적 항체 인터랙툼 (site-specific antibody interactome)으로 명칭하며, 기호로는 SSAI로 표시한다.
- [373] 본 출원에 의해 제공되는 SSAI는 항체의 특정한 위치에 대한 결합 활성을 가질 수 있다.
- [374] 특정한 실시예에서, SSAI는 항체의 Fab 도메인에 대한 결합 활성을 가질 수 있다. 이때, SSAI는 항체는 파라토프로부터 이격된 위치에 대한 결합 활성을 갖는 것이 바람직할 수 있다.
- [375] 특정한 실시예에서, SSAI는 항체의 Fc 도메인에 대한 결합 활성을 가질 수 있다. 이때, SSAI는 항체의 FcRn 결합 위치 (FcRn binding site) 또는 이에 영향을 주는 잔기로부터 이격된 위치에 대한 결합 활성을 갖는 것이 바람직할 수 있다.
- [376]
- [377] 3.1. 위치-특이적 Fc 인터랙툼 (site-specific Fc interactome; SSFI)
- [378] 상기 SSAI 중 Fc 도메인에 대한 특이적 결합 활성을 갖는 펩타이드를 '위치-특이적 Fc 인터랙툼 (site-specific Fc interactome)'으로 명칭하고, 기호로는 SSFI로 표시한다.
- [379] 특정한 실시예에서, SSFI는 하기 화학식 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다:
- [380] [화학식 3]
- [381] **(Xaa)₂-H-Xa₁-G-Xa₂-L-V-Xa₃** (서열번호 3)
- [382] 이때,
- [383] 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,
- [384] H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고,
- [385]



이고, 이때 D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이며 또한 X_3 는

NH_2 , OH , 또는 SH 이다. 상기 서열은 Dias, R. L. A., et al (2006). Protein Ligand Design: From Phage Display to Synthetic Protein Epitope Mimetics in Human Antibody Fc-Binding Peptidomimetics. Journal of the American Chemical Society, 128(8), 2726-2732. 및 DeLano.W.L., et al., Convergent solutions to binding at a protein-protein interface, Science 2000, 287, 1279-1283. 등의 논문에서 Fc 도메인에 대한 결합 활성을 보이는 것으로 밝혀진 서열인 AWHLGELVW (서열번호 2)의 유사체로서, Fc 도메인에 대한 결합 활성을 갖는다. 본 출원에 의한 Fc 결합 활성 모티프는 다음과 같은 특징을 갖는다. 1) 먼저, Fc 결합 활성을 갖도록 하는 핵심 잔기들을 특정하였다. 2) 또한, 상기 서열번호 2의 4번째 류신을 자유 전자쌍을 갖는 Xa_1 으로 변경함으로써, 링커와 친핵성 치환 반응을 할 수 있도록 설계하였다. $(X)_n$ 는 n 개의 X 로 구성되어있음을 의미하고, $(X)_{n-m}$ 은 n 이상 m 이하의 개수의 X 로 구성되어있음을 의미한다. 이하에서, D_3 와 연결된 탄소를 Xa_1 의 "베타 탄소 (β -carbon)"로 명칭한다.

[386] 나아가, 상기 화학식 3의 아미노산 서열은 하기 화학식 3-1과 같은 구조일 수 있다:

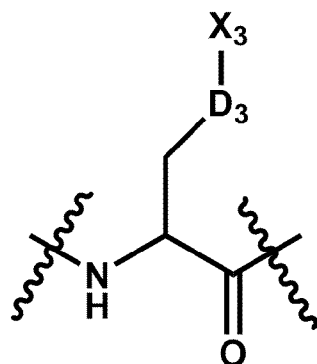
[387] [화학식 3-1]

[388] **A - W - H - Xa_1 - G - Xa_2 - L - V - Xa_3** (서열번호 4)

[389] 이때,

[390] A는 알라닌이고, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa_2 는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa_3 는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고,

[391] Xa_1 은



이고, 이때 D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이며

또한 X_3 는 NH_2 , OH , 또는 SH 이다. 상기 화학식 3과 화학식 3-1에서, X_3 는 NH_2 일 수 있다. 또는, X_{a2} 는 글루탐산일 수 있다. 또는, X_{a3} 는 트립토판일 수 있다.

[392]

[393] 상기 화학식 3 및 이의 하위 실시예의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 내부 잔기가 서로 연결된 환형 펩타이드 (cyclic peptide) 형태일 때 더 좋은 결합 활성을 갖는 것으로 알려져있다. 본 출원은 상기 화학식 3의 아미노산 서열을 포함하는 환형 펩타이드를 제공한다.

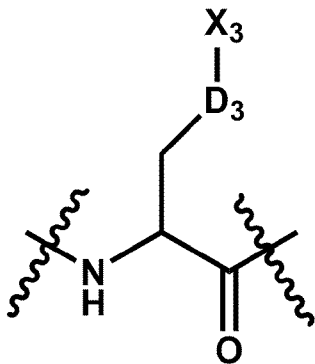
[394] 본 출원은 하기 화학식 4-1의 구조를 갖는 환형 펩타이드를 제공한다:

[395] [화학식 4-1]

[396] $L\text{-P}-(Xaa)_2\text{-H-Xa}_1\text{-G-Xa}_2\text{-L-V-Xa}_3\text{-D}\text{-P}$ (서열번호 5)

[397] 이때, N 말단의 LP와 DP는 D-프로린-L-프로린 템플레이트 (D-proline-L-proline template)를 형성하고,

[398] 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, H는 히스티딘이고, G는 글라이신이며, X_{a2} 는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, X_{a3} 는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고,

[399] X_{a1} 은  이고, 이때 D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이며

또한 X_3 는 NH_2 , OH , 또는 SH 이다.

[400] 특정한 실시예에서, X_3 는 NH_2 일 수 있다. 특정한 실시예에서, $(X)_2$ 는 AW일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a2} 는 글루탐산일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a3} 는 트립토판일 수 있다.

[401]

[402] 본 출원은 하기 화학식 4-2의 구조를 갖는 환형 펩타이드를 제공한다:

[403] [화학식 4-2]

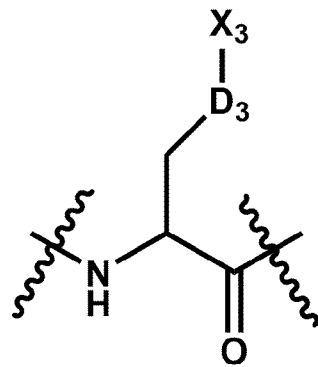
[404] $(Xaa)_{1-3}\text{-C}-(Xaa)_2\text{-H-Xa}_1\text{-G-Xa}_2\text{-L-V-Xa}_3\text{-C}-(Xaa)_{1-3}$ (서열번호 6)

[405] 이때,

[406] 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,

[407] C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글라이신이며, X_{a2} 는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, X_{a3} 는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

[408] X_{a1} 은



이고, 이때 D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이며

또한 X_3 는 NH_2 , OH , 또는 SH 이다.

[409] 특정한 실시예에서, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성될 수 있다.

[410] 특정한 실시예에서, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결될 수 있다.

[411] 특정한 실시예에서, X_3 는 NH_2 일 수 있다. 특정한 실시예에서, $(X)_2$ 는 AW 일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a2} 는 글루탐산일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a3} 는 트립토판일 수 있다.

[412] 특정한 실시예에서, N 말단의 $(X)_{1-3}$ 을 구성하는 잔기 중 하나와 C 말단의 $(X)_{1-3}$ 을 구성하는 잔기 중 하나는 서로 결합되어있을 수 있다. 일 예시에서, 상기 화학식 4-2의 펩타이드는 하기 화학식 4-3의 구조를 가질 수 있다:

[413] [화학식 4-3]

[414] $L^P - D - C - (Xaa)_2 - H - X_{a1} - G - X_{a2} - L - V - X_{a3} - C - T - D^P$

(서열번호 7)

[415] 이때, N 말단의 L^P 와 D^P 는 D-프롤린-L-프롤린 템플레이트 (D-proline-L-proline template)를 형성할 수 있다.

[416] 다른 예시에서, 상기 화학식 4-2의 펩타이드는 하기 화학식 4-4의 구조를 가질 수 있다.

[417] [화학식 4-4]

[418] $C - D - C - (Xaa)_2 - H - X_{a1} - G - X_{a2} - L - V - X_{a3} - C - T - C$

(서열번호 8)

[419] 이때, N 말단의 시스테인과 C 말단의 시스테인은 서로 연결될 수 있다.

[420]

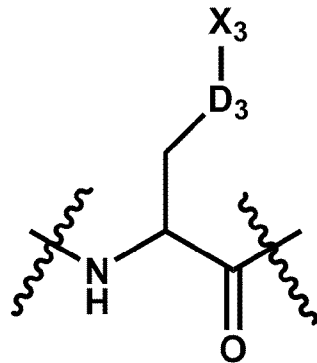
[421] 본 출원은 하기 화학식 4-5의 구조를 갖는 환형 펩타이드를 제공한다:

[422] [화학식 4-5]

[423] $D - C - (Xaa)_2 - H - X_{a1} - G - X_{a2} - L - V - X_{a3} - C - T$ (서열번호 9)

[424] 이때,

- [425] D는 아스파르트산이고, T는 트레오닌이며,
 [426] 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,
 [427] C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한
 [428] Xa₁은



또한 X₃는 NH₂, OH, 또는 SH이다.

- [429] 특정한 실시예에서, 상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성될 수 있다.
- [430] 특정한 실시예에서, N 말단으로부터 2 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결될 수 있다. 특정한 실시예에서, X₃는 NH₂일 수 있다. 특정한 실시예에서, (X)₂는 AW일 수 있다. 특정한 실시예에서, Xa₂는 글루탐산일 수 있다. 특정한 실시예에서, Xa₃는 트립토판일 수 있다.
- [431] 특정한 실시예에서, 상기 화학식 4-5는 하기 화학식 4-6과 같을 수 있다:
- [432] [화학식 4-6] (서열번호 10)
- [433] **D-C-A-W-H-Xa₁-G-E-L-V-W-C-T** (서열번호 10)
- [434] 이때, A는 알라닌이고, E는 글루탐산이다.
- [435]
- [436] 상기 화학식 4-1 내지 4-6의 구조를 갖는 펩타이드는 항체에 대한 결합 활성을 보일 수 있다. 나아가, 상기 펩타이드는 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보일 수 있다. 또는 나아가, 상기 펩타이드는 항체의 Fc 도메인에 대한 결합 활성을 보일 수 있다.
- [437]
- [438] 특정한 실시예에서, 본 출원에 의한 SSFI는 N-말단이 숙시닐화 (succinylated)될 수 있다. 특정한 실시예에서, 본 출원에 의한 SSFI는 N-말단의 (X)₁₋₃에 극성 아미노산 잔기 (polar amino acid)를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 본 출원에 의한 SSFI는 C-말단의 (X)₁₋₃에 극성 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이때, 극성 아미노산 잔기는 산성 아미노산 (acidic amino acid) 및 염기성 아미노산 (basic amino acid)을 포함한다. 나아가, 상기 극성 아미노산 잔기는

글루탐산, 또는 아스파르트산을 포함할 수 있다.

[439]

[440] 3.2. 본 출원에 의한 위치-특이적 Fc 인터랙톰과 항체의 Fc 도메인은 특정된 위치 관계를 이루며 배열될 수 있다 (Site-specific Fc interactome according to the present application may be arranged with an Fc domain of an antibody, forming a specific topology).

[441] 본 목차에서는 본 출원의 이해를 돕기 위하여 예시로서 화학식 4-6의 화합물을 제시하고 있으나, 본 출원의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다. 이하의 설명은 화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6의 화합물에도 적용되는 설명이며, 화학식 4-6은 편의상 가져온 예시에 불과함에 유의해야 할 것이다.

[442] 앞서 설명된 바와 같이 본 출원에 의한 SSFI는 항체의 Fc와 결합 활성을 갖는다. 이때, SSFI와 Fc 도메인은 아미노산 잔기 간의 상호작용에 의하여 특정한 위치 관계를 이루면서 배열될 수 있다. 본 출원에 의한 SSFI 서열과 Fc 도메인의 대표적인 상호작용으로는 SSFI와 (1) Fc 도메인의 433번 히스티딘과의 솔트 링크지 (salt linkage), (2) 434번 아스파라긴과의 수소 결합, (3) 380번 글루탐산과의 솔트 링크지, (4) 255번 아르기닌과의 솔트 링크지 등이 있다. 이미 알려진 연구결과를 통해 이러한 상호작용 및 이로 인한 특정한 위치 관계를 파악할 수 있다 (DeLano.W.L., et al., Convergent solutions to binding at a protein-protein interface, Science 2000, 287, 1279-1283 참조).

[443] 본 출원에 의한 SSFI를 설계함에 있어, SSFI가 Fc 도메인과 안정적인 위치 관계를 이루도록 하는 것이 중요하다 (When designing SSFI according to the present invention, it is important that SSFI forms a stable topology with Fc domain). 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제 및 이를 이용한 표지 공정은 연구를 통해 밝혀진 SSFI와 Fc 도메인의 위치 관계를 기반으로 설계되었기 때문이다 (하기 5.2., 5.3., 5.4. 참조). SSFI의 설계 과정에서 SSFI와 Fc 도메인의 상호작용이 불안정하게 되어 분자 간의 위치 관계가 방해 받는다면, 표지 공정이 부정적인 영향을 받을 수 있으므로 바람직하지 않다 (If during a designing process of SSFI should the interaction between SSFI and Fc domain gets unstable so that their topology gets disturbed, it will be unfavorable as the labeling process may get negative effects).

[444] 상기 설계 원칙에 관한 예시를 예시적인 화합물을 통해 설명한다. 화학식 4-6에 의한 SSFI는 이하와 같은 구조를 갖는다:

[445] [화학식 4-6] (서열번호 10)

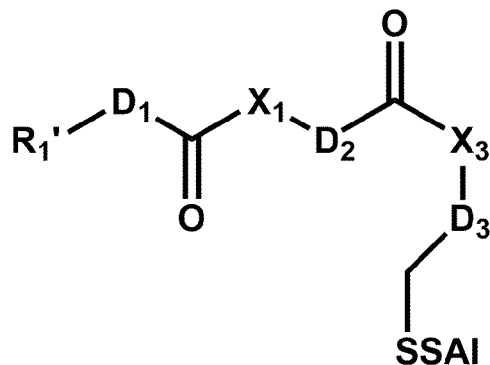
[446] **D-C-A-W-H-Xa₁-G-E-L-V-W-C-T** (서열번호 10)

[447] 서열번호 10에 의한 SSFI와 Fc 도메인 간의 위치관계를 논문 자료 등을 바탕으로 시뮬레이션한 결과는 도 3 및 도 4와 같다 (DeLano.W.L., et al., Convergent solutions to binding at a protein-protein interface, Science 2000, 287,

1279-1283 참조). 이때, SSFI의 5번 히스티딘 잔기는 Fc 도메인의 380번 글루탐산과 솔트 링크지를 형성하며, 이는 SSFI와 Fc 도메인 사이의 위치 관계에 중요한 영향을 미치는 것으로 확인되었다 (도 4의 점선 참조). 이로 인해 SSFI의 설계에 있어 히스티딘 잔기와 그 위치는 변경하지 않는 것이 바람직하다 (화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6에서 Xa_1 옆에 있는 H 참조). 이 외에도, 8번 글루탐산 잔기는 전기적 음성을 띄는 잔기로서 전기적 양성을 띄는 Fc 도메인의 255번 아르기닌과 솔트 링크지를 형성하여 SSFI와 Fc 도메인 사이의 위치 관계에 중요한 영향을 미치는 것으로 확인되었다 (도 4의 점선 참조). 따라서 해당 잔기는 글루탐산에 대응될 수 있는 산성 아미노산 (acidic amino acid)이 바람직하며, 아스파라긴으로 대체될 수 있다 (화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6의 Xa_2 참조). 상기 아미노산 잔기들이 다른 아미노산 잔기로 변경되거나 임의의 작용기로 치환된다면 분자 간 상호작용에 영향을 주어 SSFI와 Fc 도메인의 위치 관계에 영향을 줄 것이다.

- [448] 이에 더하여, 서열번호 10의 7번 글리신은 부피가 작은 아미노산으로서 SSFI의 꺾임 구조를 형성하기 위해 필요하다. 따라서, SSFI의 설계에 있어 글리신과 그 위치는 변경하지 않는 것이 바람직하다 (화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6에서 Xa_1 과 Xa_2 사이의 G 참조).
- [449] 도 5는 Fc 도메인의 라이신 잔기들과 SSFI의 위치 관계를 도시한 것이다. 상기 위치 관계에서 Xa_1 과 가장 인접하게 위치한 Fc 도메인의 라이신은 246번 라이신 및 248번 라이신을 확인할 수 있었다 (도 5).
- [450] 246번 라이신의 아민 기와 Xa_1 의 베타 탄소 사이의 거리를 측정한 결과, 라이신 결합지를 구성하는 결합들의 회전에 따라 최소 거리가 약 $11.668\text{\AA}$ (이하 $D_{246,\min}$), 최대 거리가 약 $20.765\text{\AA}$ (이하 $D_{246,\max}$)으로 확인되었다 (도 6).
- [451] 248번 라이신의 아민 기와 Xa_1 의 베타 탄소 사이의 거리를 측정한 결과, 라이신 결합지를 구성하는 결합들의 회전에 따라 최소 거리가 약 $6.723\text{\AA}$ (이하 $D_{248,\min}$), 최대 거리가 약 $16.208\text{\AA}$ (이하 $D_{248,\max}$)으로 확인되었다 (도 7).
- [452] 이하 5.3.에서 설명되는 바와 같이, 상기 거리관계는 링커 및 SSFI, 또한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제의 설계에 있어 중요한 고려사항이 될 수 있다.
- [453]
- [454] 4. 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제 (agent for delivering first functional group to an antibody); R_1' - L_1 과 SSAI의 콘쥬게이트 (conjugate of R_1' - L_1 and SSAI; R_1' - L_2 -SSAI)
- [455] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제 (agent for delivering first functional group to an antibody)가 개시된다. 본원에서는 이러한 화합물을 기호로 R_1' - L_2 -SSAI로 표시한다. 구조에 따라 R_1' - L_1 과 SSAI의 콘쥬게이트로 (conjugate of R_1' - L_1 and SSAI)도 지칭한다.
- [456] 본 출원은 하기 화학식 5의 구조를 갖는 R_1' - L_2 -SSAI를 제공한다:
- [457] [화학식 5]

[458]



[459] 이때,

[460] R_1' 은 제1 화학작용기이고,[461] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,[462] X_1 은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,[463] D_2 는 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,[464] D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이고,[465] X_3 는 NH, O, 또는 S이며,

[466] SSAI는 위치-특이적 항체 인터랙툼이다.

[467] 특정한 실시예에서, R_1' 은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R_1' 은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.

[468] 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R_1' 은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R_1' 은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.

[469] 특정한 실시예에서, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_1 은 $-CH_2OCH_2-$ 일 수 있다. 또는 나아가, D_1 은 공유결합일 수 있다.

[470] 특정한 실시예에서, X_1 은 NR_1 , S 또는 O일 수 있고, 이때 R_1 은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-3} 알킬렌일 수 있다. 나아가, X_1 은 S일 수 있다.

[471] 특정한 실시예에서, D_2 는 C_{1-7} 알킬렌, C_{2-7} 알케닐렌, C_{2-7} 알키닐렌, 및 C_{3-8}

시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_2 은 C_{1-2} 알킬렌일 수 있다. 더 나아가, D_2 는 메틸렌일 수 있다.

[472] 특정한 실시예에서, X_3 는 NH일 수 있다.

[473] 특정한 실시예에서, SSAI는 Fab에 대한 결합 활성을 갖는 펩타이드 서열일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, SSAI는 Fc 도메인에 대한 결합 활성을 갖는 펩타이드 서열일 수 있다.

[474]

[475] 상기 화학식 5에서 SSAI가 SSFI인 경우 이를 R_1' - L_2 -SSFI로 지칭한다. 본 출원에 의한 R_1' - L_2 -SSFI는 본 출원에 의한 SSFI의 X_{a1} 이 R_1' - L_1 의 제2 카보닐기와 친핵성 치환반응을 일으킴으로써 생성된다 (하기 4-2. 및 반응식 2 참조). 따라서, 본 출원에 의한 R_1' - L_2 -SSFI는 화학식 3, 화학식 3-1 및 화학식 4-1 내지 4-6의 X_{a1} 이 (X_{a1})'으로 치환된 것을 포함하며, 하기의 예시적인 실시예들에만 한정되는 것은 아니다.

[476] 본 출원은 하기 화학식 5-1의 아미노산 서열을 포함하는 R_1' - L_2 -SSFI를 제공한다:

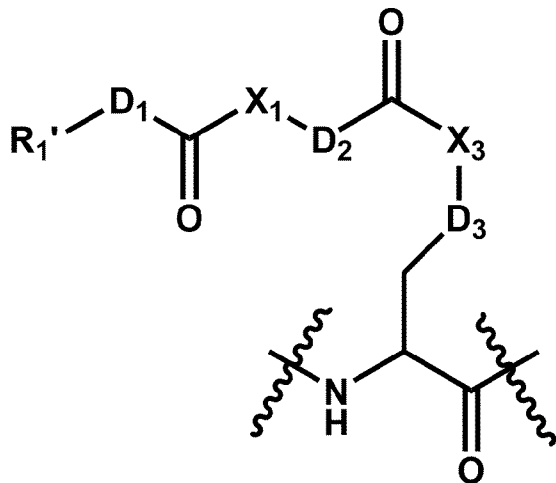
[477] [화학식 5-1]

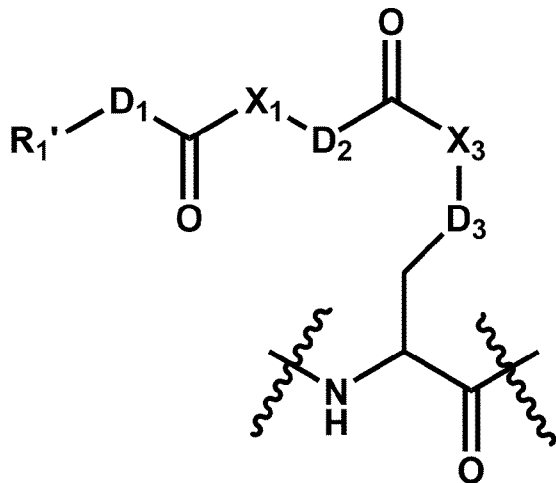
[478] **(Xaa)₂-H-(Xa₁)'-G-Xa₂-L-V-Xa₃** (서열번호 11)

[479] 이때,

[480] 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,

[481] H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고,

[482] (X_{a1})'은 이며, 이때



[483] R_1' 은 제1 화학작용기이고,

[484] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[485] X_1 은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,

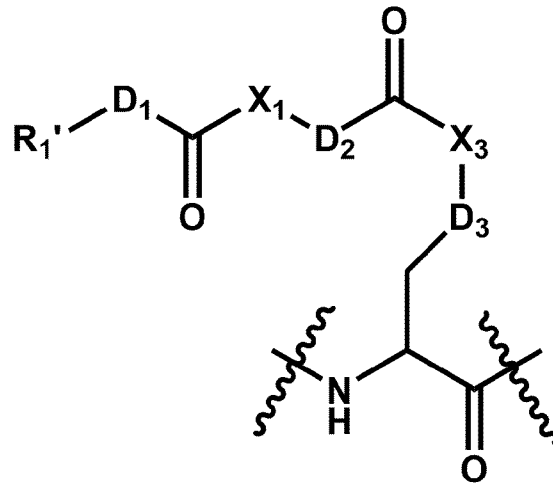
[486] D_2 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[487] D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이고,

- [488] X_3 는 NH, O, 또는 S이다.
- [489] 특정한 실시예에서, R_1' 은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R_1' 은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.
- [490] 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 또는 나아가, R_1' 은 VC 링커를 포함할 수 있다. (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R_1' 은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.
- [491] 특정한 실시예에서, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_1 은 $-CH_2OCH_2-$ 일 수 있다. 또는 나아가, D_1 은 공유결합일 수 있다.
- [492] 특정한 실시예에서, X_1 은 NR_1 , S 또는 O일 수 있고, 이때 R_1 은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-3} 알킬렌일 수 있다.
- [493] 특정한 실시예에서, D_2 는 C_{1-7} 알킬렌, C_{2-7} 알케닐렌, C_{2-7} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_2 은 C_{1-2} 알킬렌일 수 있다. 더 나아가, D_2 는 메틸렌일 수 있다.
- [494] 특정한 실시예에서, X_3 는 NH일 수 있다.
- [495] 특정한 실시예에서, $(X)_2$ 는 AW일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a2} 는 글루탐산일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a3} 는 트립토판일 수 있다.
- [496]
- [497] 본 출원은 하기 화학식 5-2의 구조를 갖는 $R_1'-L_2$ -SSFI를 제공한다:
- [498] [화학식 5-2]
- [499] **$(Xaa)_{1-3}-C-(Xaa)_2-H-(Xa_1)'\text{-}G\text{-}Xa_2\text{-}L\text{-}V\text{-}Xa_3\text{-}C-(Xaa)_{1-3}$** (서열번호 12)
- [500] 이때,
- [501] 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,
- [502] C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa_2 는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa_3 는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

[503] (Xa₁)'은

이며, 이때



[504] R₁'은 제1 화학작용기이고,

[505] D₁은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[506] X₁은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,

[507] D₂는 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[508] D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고,

[509] X₃는 NH, O, 또는 S이다.

[510] 특정한 실시예에서, R₁'은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.

[511] 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R₁'은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.

[512] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.

[513] 특정한 실시예에서, X₁은 NR₁, S 또는 O일 수 있고, 이때 R₁은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C₁₋₃알킬렌일 수 있다.

- [514] 특정한 실시예에서, D_2 는 C_{1-7} 알킬렌, C_{2-7} 알케닐렌, C_{2-7} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_2 는 C_{1-2} 알킬렌일 수 있다. 더 나아가, D_2 는 메틸렌일 수 있다.
- [515] 특정한 실시예에서, 화학식 5-2는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성될 수 있다 ((X_{a1})'을 포함한다).
- [516] 특정한 실시예에서, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결될 수 있다.
- [517] 특정한 실시예에서, X_3 는 NH일 수 있다. 특정한 실시예에서, (X)₂는 AW일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a2} 는 글루탐산일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a3} 는 트립토판일 수 있다.
- [518] 특정한 실시예에서, N 말단의 (X)₁₋₃을 구성하는 잔기 중 하나와 C 말단의 (X)₁₋₃을 구성하는 잔기 중 하나는 서로 결합되어있을 수 있다.
- [519] 특정한 실시예에서, 화학식 5-2는 화학식 5-3과 같을 수 있다:
- [520] [화학식 5-3]
- [521] **D-C-A-W-H-(X_{a1})'-G-E-L-V-W-C-T** (서열번호 13)
- [522] 이때, A는 알라닌이고, E는 글루탐산이다.
- [523]
- [524] 상기 화학식 5 및 5-1 내지 5-3의 구조를 갖는 R_1' - L_2 -SSAI또는 R_1' - L_2 -SSFI는 항체에 대한 결합 활성을 보일 수 있다. 나아가, 상기 R_1' - L_2 -SSAI또는 R_1' - L_2 -SSFI는 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보일 수 있다. 또는 나아가, 상기 R_1' - L_2 -SSAI또는 R_1' - L_2 -SSFI는 항체의 Fc 도메인에 대한 결합 활성을 보일 수 있다.
- [525]
- [526] 4.1. 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제 (agent for delivering first click-chemistry functional group to an antibody); H_1 - L_1 과 SSAI의 콘쥬게이트 (conjugate of H_1 - L_1 and SSAI; H_1 - L_2 -SSAI)
- [527] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제 (agent for delivering first click-chemistry functional group to an antibody)가 개시된다. 본원에서는 이러한 화합물을 기호로 H_1 - L_2 -SSAI로 표시한다. 구조에 따라 H_1 - L_1 과 SSAI의 콘쥬게이트로 (conjugate of H_1 - L_1 and SSAI)도 지칭한다. 이때, SSAI가 SSFI인 경우 H_1 - L_2 -SSFI로도 표시한다.
- [528] 본 출원에 의한 H_1 - L_2 -SSAI 또는 H_1 - L_2 -SSFI는 상기 '4. 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제'에 있어 R_1' 이 클릭화학작용기인 것들을 포함하며, 하기의 예시적인 실시예들에 한정되는 것은 아니다.
- [529]
- [530] 본 출원은 하기 화학식 6-1의 아미노산 서열을 포함하는 H_1 - L_2 -SSFI를

제공한다:

[531] [화학식 6-1]

[532] $(Xaa)_2-H-(Xa_1)'-G-Xa_2-L-V-Xa_3$ (서열번호 14)

[533] 이때,

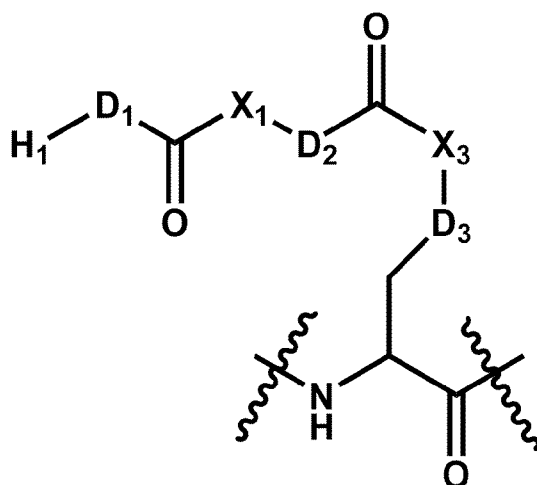
[534] 각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,

[535] H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고,

L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고,

[536] (Xa₁)'은

이며, 이때



[537] H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

[538] D₁은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[539] X₁은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,

[540] D₂는 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[541] D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고,

[542] X₃는 NH, O, 또는 S이다.

[543] 특정한 실시예에서, H₁은 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔,

친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더 나아가,

H₁은 아자이드, 또는 스트레인된 알킨일 수 있다. 또 더 나아가, H₁은 아자이드,

또는 디벤조시클로옥신-아민일 수 있다. 또는, 더 나아가, H₁은 다이엔, 또는

친다이엔체일 수 있다. 또 더 나아가, H₁은 테트라진, 또는 노르보르넨일 수 있다.

또는, H₁은 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐일 수 있다.

[544] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.

[545] 특정한 실시예에서, X₁은 NR₁, S 또는 O일 수 있고, 이때 R₁은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C₁₋₃알킬렌일 수 있다.

[546] 특정한 실시예에서, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₂는 C₁₋₂알킬렌일 수

있다. 더 나아가, D_2 는 메틸렌일 수 있다.

[547] 특정한 실시예에서, X_3 는 NH일 수 있다.

[548] 특정한 실시예에서, $(X)_2$ 는 AW일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a2} 는 글루탐산일 수 있다. 특정한 실시예에서, X_{a3} 는 트립토판일 수 있다.

[549]

[550] 본 출원은 하기 화학식 6-2의 구조를 갖는 H_1 - L_2 -SSFI를 제공한다:

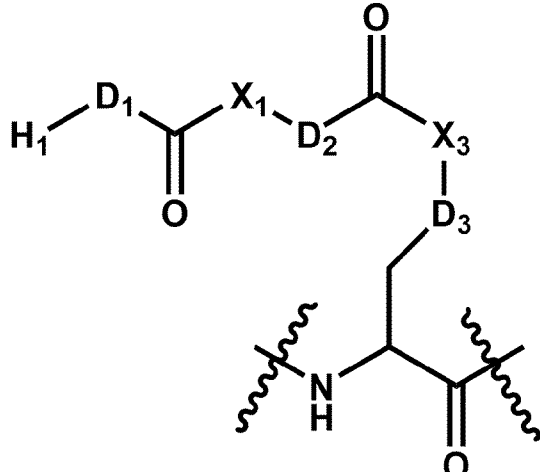
[551] [화학식 6-2]

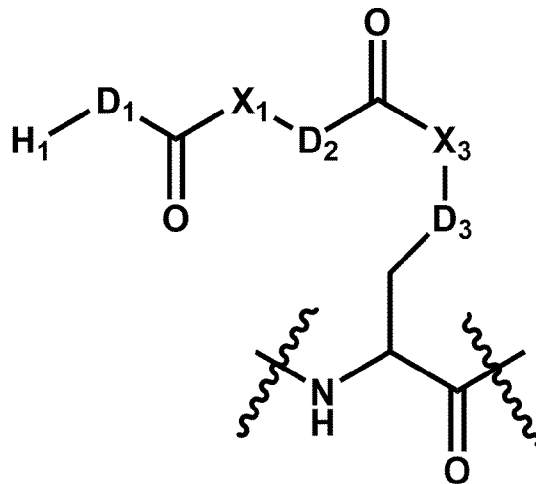
[552] **$(Xaa)_{1-3}$ -C-(Xaa)₂-H-(Xa_1)'-G- Xa_2 -L-V- Xa_3 -C-(Xaa)₁₋₃** (서열번호 15)

[553] 이때,

[554] 각각의 Xaa 는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,

[555] C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa_2 는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa_3 는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

[556] $(Xa_1)'$ 은 이며, 이때



[557] H_1 은 제1 클릭화학작용기이고,

[558] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[559] X_1 은 탄소보다 전기음성도가 큰 원소이고,

[560] D_2 는 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[561] D_3 는 공유결합 또는 C_{1-3} 알킬렌이고,

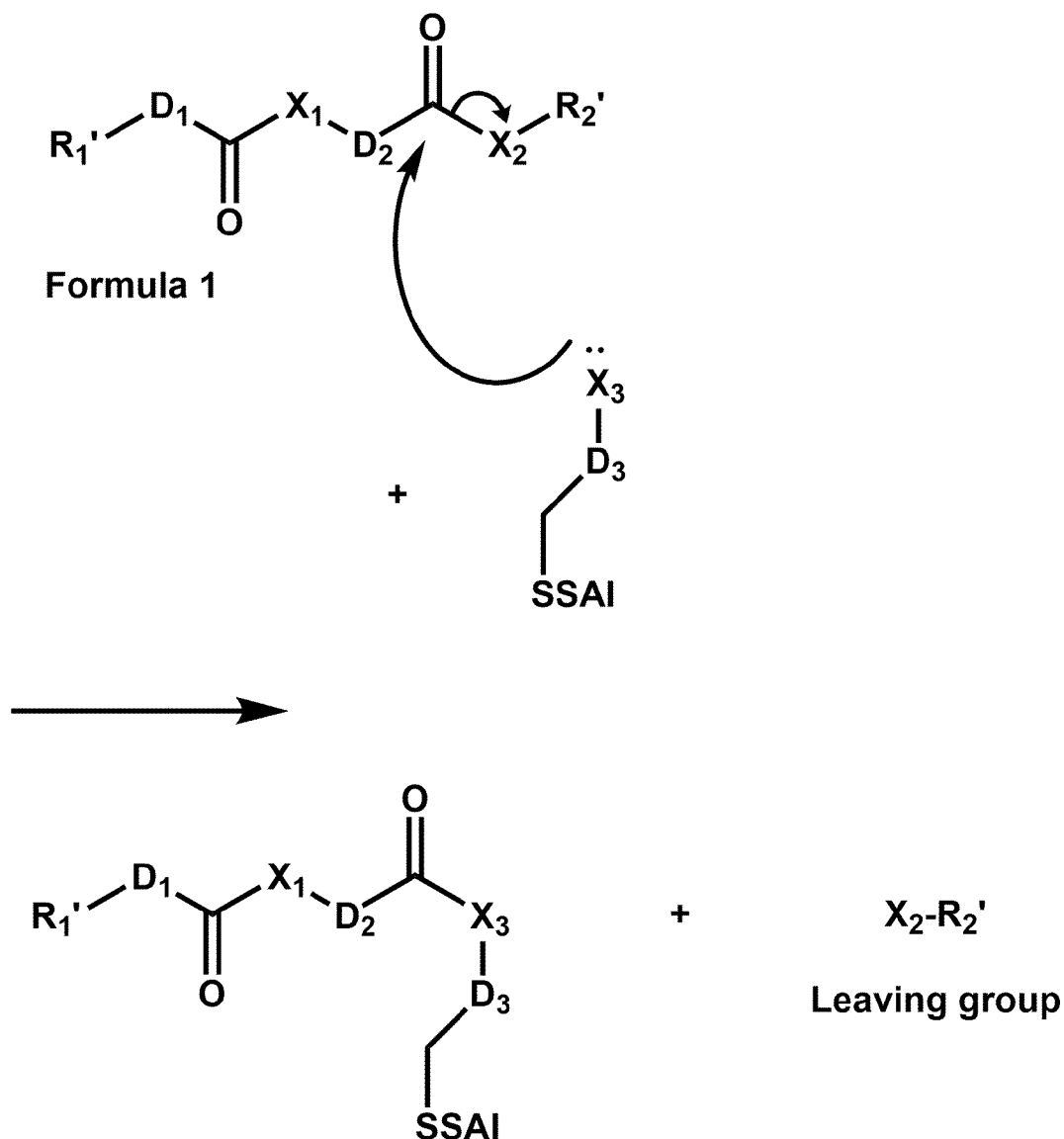
[562] X_3 는 NH, O, 또는 S이다.

[563] 특정한 실시예에서, H_1 은 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더 나아가, H_1 은 아자이드, 또는 스트레인된 알킨일 수 있다. 또 더 나아가, H_1 은 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민일 수 있다. 또는, 더 나아가, H_1 은 다이엔, 또는 친다이엔체일 수 있다. 또 더 나아가, H_1 은 테트라진, 또는 노르보르넨일 수 있다. 또는, H_1 은 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐일 수 있다.

[564] 특정한 실시예에서, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_1 은 $-CH_2OCH_2-$ 일 수

- 있다. 또는 나아가, D_1 은 공유결합일 수 있다.
- [565] 특정한 실시예에서, X_1 은 NR_1 , S 또는 O일 수 있고, 이때 R_1 은 H, 할로젠, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-3} 알킬렌일 수 있다.
- [566] 특정한 실시예에서, D_2 는 C_{1-7} 알킬렌, C_{2-7} 알케닐렌, C_{2-7} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_2 은 C_{1-2} 알킬렌일 수 있다. 더 나아가, D_2 는 메틸렌일 수 있다.
- [567] 특정한 실시예에서, 화학식 5-2는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성될 수 있다 ($(Xa_1)'$ 을 포함한다).
- [568] 특정한 실시예에서, N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결될 수 있다.
- [569] 특정한 실시예에서, X_3 는 NH일 수 있다. 특정한 실시예에서, $(X)_2$ 는 AW일 수 있다. 특정한 실시예에서, Xa_2 는 글루탐산일 수 있다. 특정한 실시예에서, Xa_3 는 트립토판일 수 있다.
- [570] 특정한 실시예에서, N 말단의 $(X)_{1-3}$ 을 구성하는 잔기 중 하나와 C 말단의 $(X)_{1-3}$ 을 구성하는 잔기 중 하나는 서로 결합되어있을 수 있다.
- [571] 특정한 실시예에서, 화학식 6-2는 화학식 6-3과 같을 수 있다:
- [572] [화학식 6-3] (서열번호 16)
- [573] **D-C-A-W-H- $(Xa_1)'$ -G-E-L-V-W-C-T** (서열번호 16)
- [574] 이때, A는 알라닌이고, E는 글루탐산이다.
- [575]
- [576] 상기 화학식 6-1 내지 6-3의 구조를 갖는 H_1-L_2 -SSAI또는 H_1-L_2 -SSFI는 항체에 대한 결합 활성을 보일 수 있다. 나아가, 상기 H_1-L_2 -SSAI또는 H_1-L_2 -SSFI는 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보일 수 있다. 또는 나아가, 상기 H_1-L_2 -SSAI또는 H_1-L_2 -SSFI는 항체의 Fc 도메인에 대한 결합 활성을 보일 수 있다.
- [577]
- [578] 4.2. 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제의 제조 방법
- [579] 본 출원에 의하여 상기 $R_1'-L_2$ -SSAI, $R_1'-L_2$ -SSFI, H_1-L_2 -SSAI, 및 H_1-L_2 -SSFI (이하 $R_1'-L_2$ -SSAI로 통칭)의 제조 방법이 개시된다. 하기 제조 방법에 관한 기재는 발명의 이해를 돕기 위한 것임에 유의해야 할 것이다.
- [580]
- [581] 예시적으로 화학식 5의 화합물을 제조하기 위한 방법을 설명한다. 특정한 실시예에서, 상기 화학식 5의 화합물은 하기 반응식 2의 반응에 의해 제조될 수 있다.
- [582] [반응식 2]

[583]



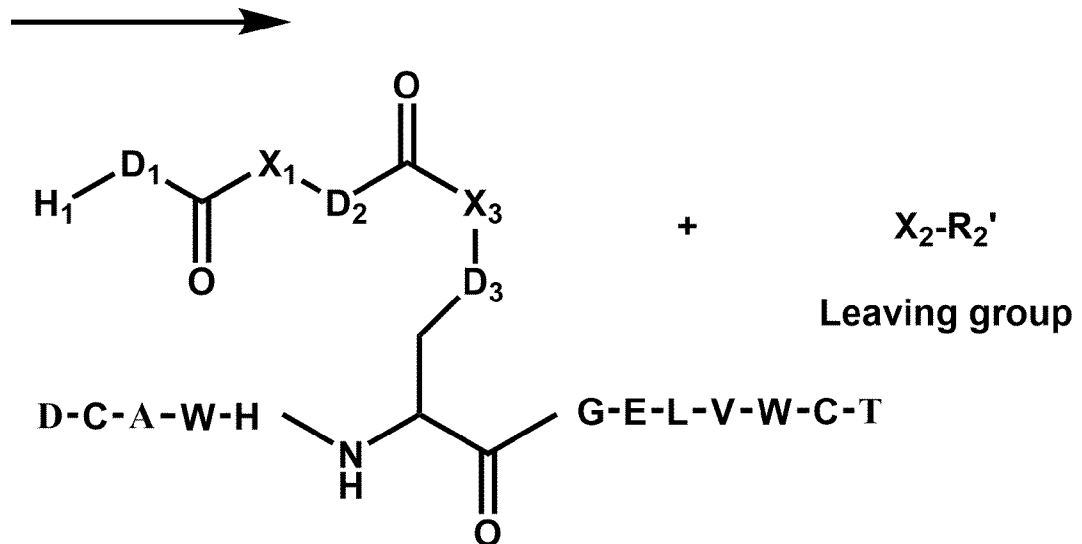
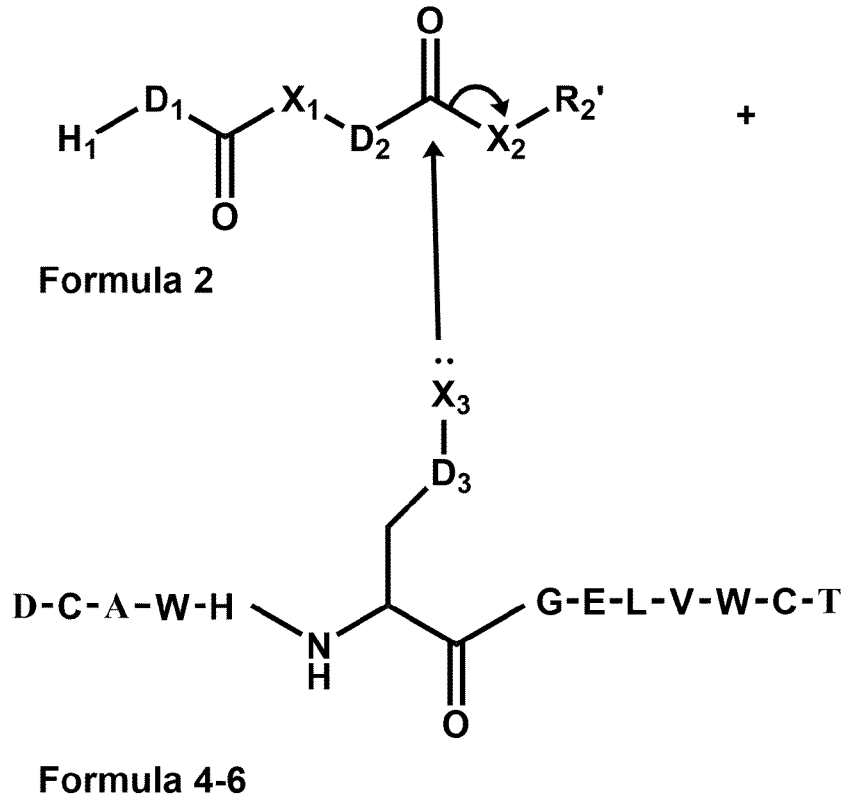
[584] 본 출원에 의한 R₁'-L₂-SSAI는 본 출원에 의한 링커 (R₁'-L₁)와 위치-특이적 항체 인터랙툼 (SSAI)을 반응시켜 제조 가능하다. 본 출원에 의한 SSAI는 친핵체 (nucleophile)인 X₃를 포함하도록 설계되어 있다. X₃는 링커에 포함된 활성화된 카보닐기를 공격하여 친핵성 치환 반응을 일으킬 수 있다. 이때, X₃가 제2 카보닐 탄소를 공격하면 본 출원에 의한 R₁'-L₂-SSAI가 제조된다.

[585]

[586] 보다 구체적인 예시로서, 화학식 6-3의 화합물을 제조하기 위한 방법을 설명한다. 특정한 실시예에서, 상기 화학식 6-3의 화합물은 하기 반응식 3의 반응에 의해 제조될 수 있다.

[587] [반응식 3]

[588]

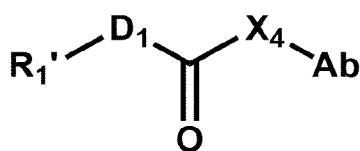
**Formula 6-3**

[589] 본 출원에 의한 화학식 3 또는 3-1의 아미노산 서열을 포함하거나 화학식 4-1 내지 4-6의 구조를 갖는 SSAI는 친핵체인 X_3 를 포함하는 X_{a1} 잔기를 포함하고 있다. X_3 는 링커에 포함된 제2 카보닐기를 공격하므로, 본 출원에 의한 $R_1'-L_2$ -SSAI가 제조된다.

[590]

- [591] 특정한 실시예에서, 본 출원에 의한 링커에 있어 X_2 를 포함하는 이탈기의 염기성이 X_1 을 포함하는 이탈기 보다 작을 수 있다. 특정한 실시예에서, 본 출원에 의한 링커에 있어 제2 카보닐기와 연결된 X_2-R_2' 이 좋은 이탈기를 형성하도록 할 수 있다. 나아가, X_2 는 O이고, R_2' 은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐일 수 있다. 이 경우 제2 카보닐기의 반응성이 제1 카보닐기보다 커진다. 따라서, SSAI의 X_3 가 링커의 제2 카보닐기를 특이적으로 공격할 수 있다.
- [592]
- [593] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제의 제조 방법이 개시된다.
- [594] 본 출원은 본 출원에 의한 링커와
- [595] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙토를 반응시킴을 포함하는
- [596] $R_1'-L_2$ -SSAI의 제조 방법을 제공한다.
- [597] 특정한 실시예에서, 상기 링커는 상기 화학식 1, 2, 2-1 내지 2-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [598] 특정한 실시예에서, 상기 위치-특이적 항체 인터랙토는 상기 화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 포함하거나 갖는 것일 수 있다.
- [599] 나아가, 상기 링커는 상기 화학식 2의 구조를 갖는 것이고, 상기 위치-특이적 항체 인터랙토는 상기 화학식 4-2 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 갖는 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 위치-특이적 항체 인터랙토는 상기 화학식 4-6의 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [600]
- [601] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법이 개시된다.
- [602] 본 출원은 본 출원에 의한 링커와
- [603] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙토를 반응시킴을 포함하는
- [604] H_1-L_2 -SSAI의 제조 방법을 제공한다.
- [605] 특정한 실시예에서, 상기 링커는 상기 화학식 2, 2-1 내지 2-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [606] 특정한 실시예에서, 상기 위치-특이적 항체 인터랙토는 상기 화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 포함하거나 갖는 것일 수 있다.
- [607] 나아가, 상기 링커는 상기 화학식 2의 구조를 갖는 것이고, 상기 위치-특이적 항체 인터랙토는 상기 화학식 4-2 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 갖는 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 위치-특이적 항체 인터랙토는 상기 화학식 4-6의 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [608]
- [609] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제 제조용 키트가 개시된다.

- [610] 본 출원은 본 출원에 의한 링커, 및 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙툼을 포함하는 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제 제조용 키트를 제공한다.
- [611] 특정한 실시예에서, 상기 링커는 상기 화학식 1, 2, 2-1 내지 2-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [612] 특정한 실시예에서, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼은 상기 화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 포함하거나 갖는 것일 수 있다.
- [613] 나아가, 상기 링커는 상기 화학식 2의 구조를 갖는 것이고, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼은 상기 화학식 4-2 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 갖는 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼은 상기 화학식 4-6의 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [614]
- [615] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제 제조용 키트가 개시된다.
- [616] 본 출원은 본 출원에 의한 제1 클릭화학작용기를 포함하는 링커, 및 위치-특이적 항체 인터랙툼을 포함하는 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제 제조용 키트를 제공한다.
- [617] 특정한 실시예에서, 상기 링커는 상기 화학식 2, 2-1 내지 2-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [618] 특정한 실시예에서, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼은 상기 화학식 3, 3-1, 4-1 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 포함하거나 갖는 것일 수 있다.
- [619] 나아가, 상기 링커는 상기 화학식 2의 구조를 갖는 것이고, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼은 상기 화학식 4-2 내지 4-6 중 선택된 어느 하나의 구조를 갖는 것일 수 있다. 더 나아가, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼은 상기 화학식 4-6의 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [620]
- [621] 5. 제1 화학작용기를 포함하는 항체 (antibody comprising first functional group; R_1' -Ab)
- [622] 본 출원에 의하여 제1 화학작용기를 포함하는 항체 (antibody comprising first functional group)가 개시된다. 본원에서는 이러한 화합물을 기호로 R_1' -Ab로 표시한다.
- [623]
- [624] 본 출원은 화학식 7로 표시되는 R_1' -Ab를 제공한다:
- [625] [화학식 7]
- [626]

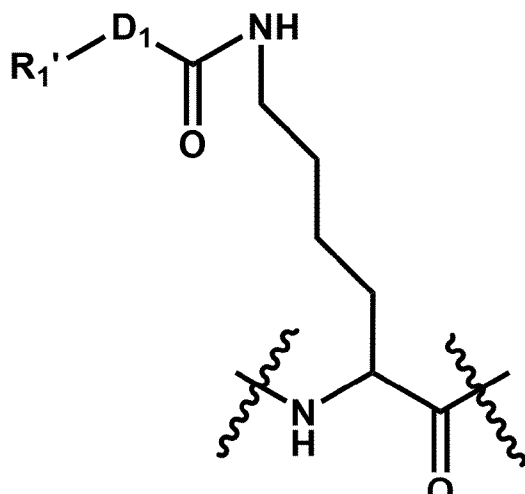


- [627] 이때, R_1' 은 제1 화학작용기이고,
- [628] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,
- [629] X_4 는 NH, O, 또는 S이고,
- [630] Ab는 항체이다.
- [631] 특정한 실시예에서, R_1' 은 클릭화학작용기일 수 있다. 나아가, R_1' 은 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더 나아가, R_1' 은 아자이드, 또는 스트레인된 알킨일 수 있다. 또 더 나아가, R_1' 은 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민일 수 있다. 또는, 더 나아가, R_1' 은 다이엔, 또는 친다이엔체일 수 있다. 또 더 나아가, R_1' 은 테트라진, 또는 노르보르넨일 수 있다. 또는, R_1' 은 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐일 수 있다.
- [632] 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R_1' 은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R_1' 은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R_1' 은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.
- [633] 특정한 실시예에서, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_1 은 $-CH_2OCH_2-$ 일 수 있다. 또는 나아가, D_1 은 공유결합일 수 있다.
- [634] 특정한 실시예에서, X_4 는 NH일 수 있다.
- [635] 특정한 실시예에서, Ab는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, Ab는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, Ab는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, Ab는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, Ab는 항체의 단편일 수 있다.
- [636] 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 Fab 도메인을 통해 연결될 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 Fc 도메인을 통해 연결될 수 있다. 나아가, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 더 나아가, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 또는, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 또는, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 두 개의 Fc 도메인 중 하나 만을 통하여 연결될 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두를 통하여 연결될 수 있다.
- [637]
- [638] 본 출원은 하기 화학식 7-1의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:
- [639] [화학식 7-1]
- [640] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)'—P—K—D—T—L—M—I**

(서열번호 17)

[641] 이때,

[642] G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

[643] (K)'은 이며, 이때

[644] R₁'은 제1 화학작용기이고,

[645] D₁은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이다. 상기 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 이에 대응되는 위치를 통하여 R₁'이 연결된 것이다.

[646] 특정한 실시예에서, R₁'은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.

[647] 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R₁'은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.

[648] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수

있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.

[649] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다.

[650] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 7-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 7-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[651]

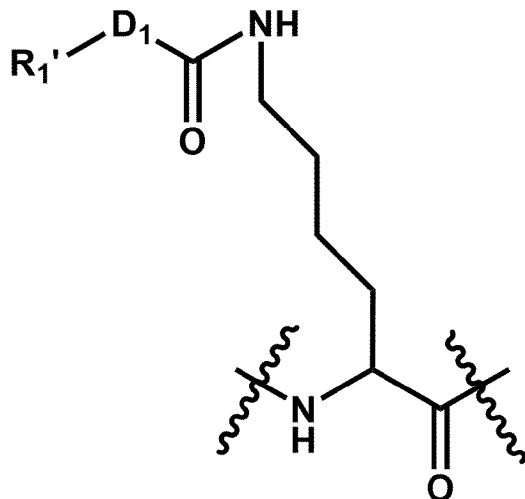
[652] 본 출원은 하기 화학식 7-2의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:

[653] [화학식 7-2]

[654] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—K—P—(K)'—D—T—L—M—I**
(서열번호 18)

[655] 이때,

[656] G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

[657] (K)'은 이며, 이때

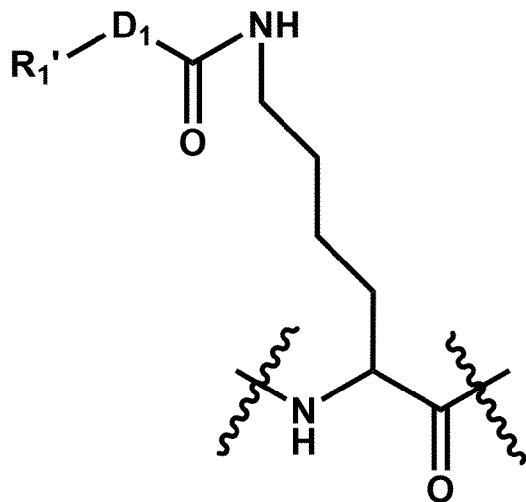
[658] R₁'은 제1 화학작용기이고,

[659] D₁은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이다. 상기 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인의 248번 라이신 또는 이에 대응되는 위치를 통하여 R₁'이 연결된 것이다.

[660] 특정한 실시예에서, R₁'은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄,

티올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.

- [661] 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R₁'은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.
- [662] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.
- [663] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다.
- [664] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 7-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 7-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [665]
- [666] 본 출원은 하기 화학식 7-3의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:
- [667] [화학식 7-3] (서열번호 19)
- [668] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)'—P—(K)'—D—T—L—M—I**
(서열번호 19)
- [669] 이때,
- [670] G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한
- [671]

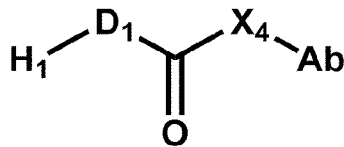


- [672] R₁'은 제1 화학작용기이고,
- [673] D₁은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이다. 상기 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신, 또는 이에 대응되는 위치를 통하여 R₁'이 연결된 것이다.
- [674] 특정한 실시예에서, R₁'은 클릭화학작용기를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 클릭화학작용기는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 하나 이상일 수 있다. 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 스트레인된 알킨으로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민로부터 선택될 수 있다. 또는, 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 다이엔, 또는 친다이엔체로부터 선택될 수 있다. 또 더 나아가, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 노르보르넨으로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 클릭화학작용기는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐으로부터 선택될 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 2개 이상의 클릭화학작용기를 포함할 수 있다.
- [675] 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R₁'은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R₁'은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R₁'은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.
- [676] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.
- [677] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일

수 있다.

- [678] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 7-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 7-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [679]
- [680] 본 출원은 화학식 7-1, 7-2 및 7-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 이때, 화학식 7-1 내지 7-3에 관한 내용은 상기 설명과 같다.
- [681] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합일 수 있다.
- [682] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 7-1의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 7-2 및 7-3의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 7-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 7-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [683] 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 7-2의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 7-1 및 7-3의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 7-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 7-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [684] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 7-3의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 7-1 및 7-2의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 7-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 7-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [685]
- [686] 5.1. 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 (antibody comprising first click-chemistry functional group)
- [687] 본 출원에 의하여 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 (antibody comprising first click-chemistry functional group)가 개시된다. 본원에서는 이러한 화합물을 기호로 H₁-Ab로 표시한다.
- [688]
- [689] 본 출원은 화학식 8로 표시되는 H₁-Ab를 제공한다:
- [690] [화학식 8]

[691]



[692]

이때, H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

[693]

D₁은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이며,

[694]

X₄는 NH, O, 또는 S이고,

[695]

Ab는 항체이다.

[696]

특정한 실시예에서, H₁은 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더 나아가, H₁은 아자이드, 또는 스트레인된 알킨일 수 있다. 또 더 나아가, H₁은 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민일 수 있다. 또는, 더 나아가, H₁은 다이엔, 또는 친다이엔체일 수 있다. 또 더 나아가, H₁은 테트라진, 또는 노르보르넨일 수 있다. 또는, H₁은 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐일 수 있다.

[697]

특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.

[698]

특정한 실시예에서, X₄는 NH일 수 있다.

[699]

특정한 실시예에서, Ab는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, Ab는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, Ab는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, Ab는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, Ab는 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, Ab는 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, Ab는 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[700]

특정한 실시예에서, X₄와 Ab는 Ab의 Fab 도메인을 통해 연결될 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, X₄와 Ab는 Ab의 Fc 도메인을 통해 연결될 수 있다. 나아가, X₄와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 더 나아가, X₄와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 또는, X₄와 Ab는 Fc 도메인의 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 또는, X₄와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 특정한 실시예에서, X₄와 Ab는 Ab의 두 개의 Fc 도메인 중 하나 만을 통하여 연결될 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, X₄와 Ab는 Ab의 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두를 통하여 연결될 수 있다.

[701]

[702]

본 출원은 하기 화학식 8-1의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:

[703]

[화학식 8-1]

[704]

G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)'—P—K—D—T—L—M—I

이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[726] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 8-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[727]

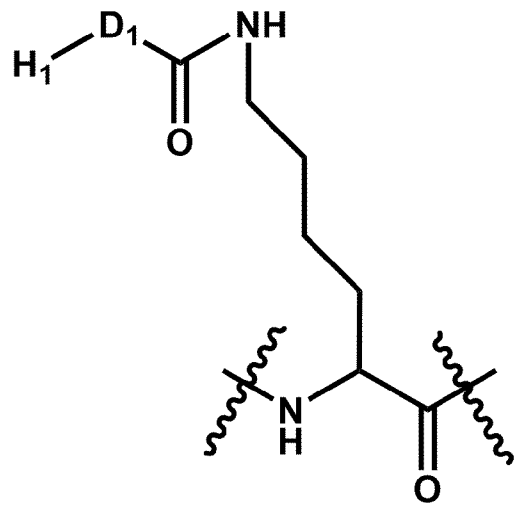
[728] 본 출원은 하기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:

[729] [화학식 8-3] (서열번호 22)

[730] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)'—P—(K)'—D—T—L—M—I**
(서열번호 22)

[731] 이때,

[732] G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

[733] (K)'은 각각 독립적으로 이며, 이때

[734] H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

[735] D₁은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이다. 상기 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신, 또는 이에 대응되는 위치를 통하여 H₁이 연결된 것이다.

[736] 특정한 실시예에서, H₁은 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더 나아가, H₁은 아자이드, 또는 스트레인된 알킨일 수 있다. 또 더 나아가, H₁은 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민일 수 있다. 또는, 더 나아가, H₁은 다이엔, 또는

친다이엔체일 수 있다. 또 더 나아가, H₁은 테트라진, 또는 노르보르넨일 수 있다. 또는, H₁은 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐일 수 있다.

- [737] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.
- [738] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.
- [739] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [740]
- [741] 본 출원은 화학식 8-1, 8-2 및 8-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 이때, 화학식 8-1 내지 8-3에 관한 내용은 상기 설명과 같다.
- [742] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합일 수 있다.
- [743] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 8-1의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 8-2 및 8-3의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 8-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [744] 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 8-2의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 8-1 및 8-3의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 8-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [745] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 8-1 및 8-2의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [746] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는

이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[747]

[748] 5.2. 제1 화학작용기를 포함하는 항체의 제조 방법

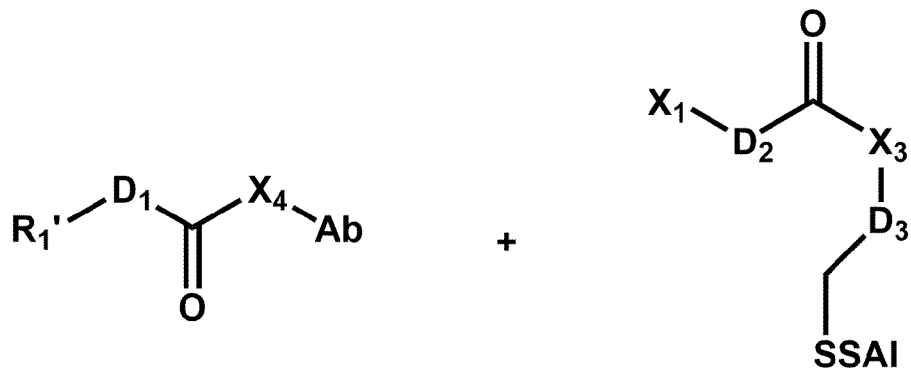
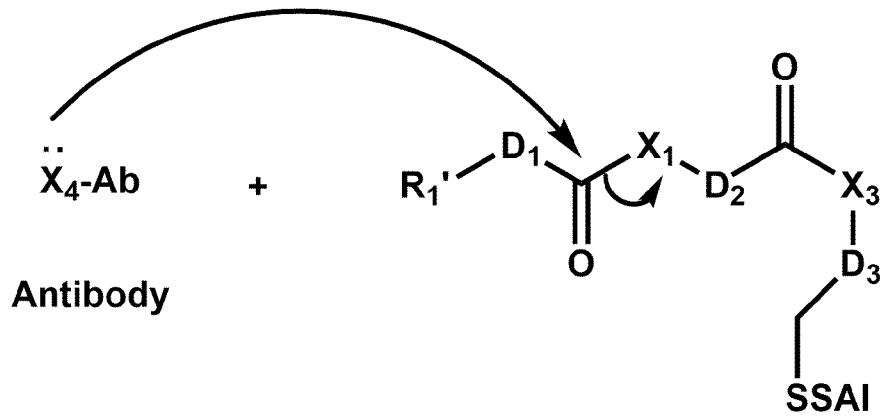
[749] 본 출원에 의하여 상기 R₁'-Ab, 및 H₁-Ab (이하 R₁'-Ab로 통칭)의 제조 방법이 개시된다. 하기 제조 방법에 관한 기재는 발명의 이해를 돕기 위한 것임에 유의해야 할 것이다.

[750]

[751] 예시적으로 화학식 7의 화합물을 제조하기 위한 방법을 설명한다. 특정한 실시예에서, 상기 화학식 7의 화합물은 하기 반응식 4의 반응에 의해 제조될 수 있다.

[752] [반응식 4]

[753]



[754] 본 출원에 의한 링커의 제1 카보닐기는 온건한 반응성을 갖기 때문에 항체의 아민 기와 밀접한 위치관계를 가질 때 크로스링킹이 이루어질 수 있다. 먼저, 화학식 5에 의한 $R_1'-L_2$ -SSAI가 항체의 특정 위치에 근접하여 반응을 일으킬 수 있는 환경이 조성된다. 본 출원에 의한 $R_1'-L_2$ -SSAI는 링커의 제1 카보닐기에 대응되는 활성화된 카보닐기 (X_1 과 연결된 카보닐기)를 가지고 있어 친핵성 치환반응을 일으킬 수 있다. 이때, 항체에 존재하는 자유 전자쌍을 가진 원자 (X_4)가 친핵체 (nucleophile)로 작용하여 상기 카보닐기를 공격함으로써 화학식 7의 화합물이 제조될 수 있다. 이때, 링커의 설계에 의하여 위치-특이적 항체 인터랙툼이 이탈기에 포함되어 이탈하며, 최종산물에서 SSAI가 제거된다. 이러한 특성은 하기 5.8.에서 보는 바와 같이 항체 산물의 물성에 좋은 영향을 준다.

[755] 특정한 실시예에서, 상기 X_4 는 NH_2 일 수 있다. 나아가, 상기 X_4 는 라이신

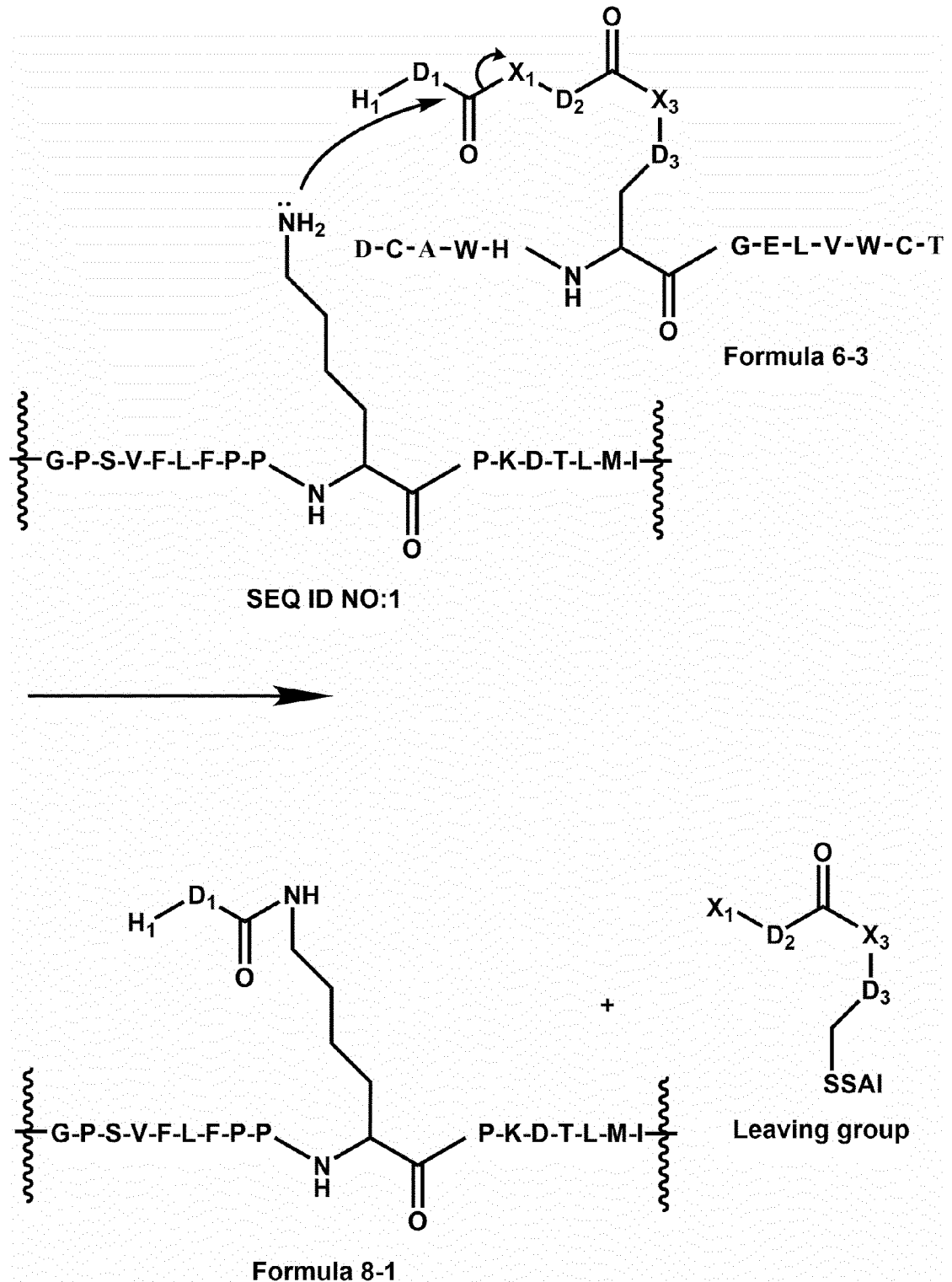
잔기의 NH_2 일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 X_4 는 SH 일 수 있다. 나아가, 상기 X_4 는 시스테인 잔기의 SH 일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 X_4 는 OH 일 수 있다.

[756]

[757] 보다 구체적인 예시로 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조 방법을 설명한다. 특정한 실시예에서, 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함하는 화합물은 하기 반응식 5의 반응에 의해 제조될 수 있다.

[758] [반응식 5]

[759]



[760] 화학식 6-3의 구조 (선택적으로 두 개의 시스테인 전기가 연결된 구조)를 갖는 화합물은 SSFI의 서열을 가지고 있어 항체의 Fc 도메인으로 유도된다 (3.2. 참조). 이때, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 항체는 Fc 도메인에 라이신 잔기를 포함하고 있고, 이러한 라이신 잔기는 친핵체로 작용할 수 있다. 상기 예시는 그중 246번 라이신 또는 이에 대응되는 잔기 (이하 246번 라이신)가

친핵체로 작용하는 경우를 나타낸 것이다. 이 경우 246번 라이신의 아민기가 화학식 6-3의 제1 카보닐기를 공격함으로써 화학식 8-1의 화합물이 생성된다. 이렇게 항체의 Fc 도메인의 라이신 잔기에 H_1 또는 R_1 이 전달될 수 있다. 이때, 어떤 특정 라이신 잔기에 화학작용기가 전달될 것인지는 이하의 5.3. 및 5.4.에서 설명하는 것과 같이 링커, SSAI, 및 R_1 -L₂-SSAI의 설계에 따라 결정될 수 있다.

[761]

[762] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 화학작용기를 포함하는 항체의 제조 방법이 개시된다.

[763] 본 출원은 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제와

[764] 항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하는

[765] R_1 -Ab의 제조 방법을 제공한다.

[766] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제는 상기 화학식 5, 5-1 내지 5-3, 및 6-1 내지 6-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.

[767] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[768] 특정한 실시예에서, 본 출원은 특정한 Fc 도메인의 라이신 잔기에 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조 방법을 제공한다. 이때, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제로는 이하 5.4.에서 설명되는 양태들의 것이 사용될 수 있다.

[769]

[770] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체의 제조 방법이 개시된다.

[771] 본 출원은 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제와

[772] 항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하는

[773] H_1 -Ab의 제조 방법을 제공한다.

[774] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 상기 화학식 6-1 내지 6-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 상기 화학식 6-3의 구조를 가질 수 있다.

[775] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 전장 항체 (whole

antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[776] 특정한 실시예에서, 본 출원은 특정한 Fc 도메인의 라이신 잔기에 제1 클릭화학작용기가 전달된 항체의 제조 방법을 제공한다. 이때, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제로는 이하 5.4.에서 설명되는 양태들의 것이 사용될 수 있다.

[777]

[778] 본 출원에 의하여 항체에 대한 제1 화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조용 키트가 개시된다.

[779] 본 출원은 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제, 및 항체 또는 이의 단편을 포함하는 제1 화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조용 키트를 제공한다.

[780] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제는 상기 화학식 5, 5-1 내지 5-3, 및 6-1 내지 6-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.

[781] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[782]

[783] 또는, 본 출원은 본 출원에 의한 링커 ($R_1'-L_1$);

[784] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙툼; 및

[785] 항체 또는 이의 단편을 포함하는 제1 화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조용 키트를 제공한다.

[786] 특정한 실시예에서, 상기 링커는 화학식 1, 2, 및 2-1 내지 2-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.

[787] 특정한 실시예에서, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼은 화학식 3, 3-1, 및 4-1 내지 4-6 중 선택된 어느 하나일 수 있다.

[788] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은

항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[789]

[790] 본 출원은 특정한 Fc 도메인의 라이신 잔기에 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조용 키트를 제공한다. 이때, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제, 링커 및 위치-특이적 항체 인터랙토믹스로는 이하 5.4.에서 설명되는 양태들의 것이 사용될 수 있다.

[791]

[792] 본 출원에 의하여 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조용 키트가 개시된다.

[793] 본 출원은 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용제제, 및 항체 또는 이의 단편을 포함하는 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조용 키트를 제공한다.

[794] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용제제는 상기 화학식 6-1 내지 6-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용제제는 상기 화학식 6-3의 구조를 가질 수 있다.

[795] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[796]

[797] 또는, 본 출원은 본 출원에 의한 링커 (H_1-L_1);

[798] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙토믹; 및

[799] 항체 또는 이의 단편을 포함하는 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조용 키트를 제공한다.

[800] 특정한 실시예에서, 상기 링커는 화학식 2, 및 2-1 내지 2-3 중 선택된 어느 하나일 수 있다.

[801] 특정한 실시예에서, 상기 위치-특이적 항체 인터랙토믹은 화학식 3, 3-1, 및 4-1 내지 4-6 중 선택된 어느 하나일 수 있다.

[802] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 전장 항체 (whole

antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 항체의 단편일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 야생 상태 (wild-type)의 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 조작된 항체 (manipulated)일 수 있다.

[803]

[804] 본 출원은 특정한 Fc 도메인의 라이신 잔기에 제1 클릭화학작용기가 전달된 항체의 제조용 키트를 제공한다. 이때, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제, 링커 및 위치-특이적 항체 인터랙토믹으로는 이하 5.4.에서 설명되는 양태들의 것이 사용될 수 있다.

[805]

[806] 5.3. R_1' -L₂-SSFI에 있어, (Xa₁)'의 기능과 이의 위치의 설계 원칙 (The function of (Xa₁)' and design principle behind the location of (Xa₁)' on R_1' -L₂-SSFI)

[807] 본 목차에서는 본 출원의 이해를 돕기 위하여 예시로서 화학식 6-3의 화합물을 제시하고 있으나, 본 출원의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다. 이하의 설명은 화학식 5, 5-1 내지 5-3, 6-1 내지 6-3의 화합물에도 적용되는 설명이며, 화학식 6-3은 편의상 가져온 예시에 불과함에 유의해야 할 것이다.

[808] 상기 5.2.에서 검토한 바와 같이 R_1' -L₂-SSFI의 (Xa₁)'은 친핵성 치환 반응을 통해 R_1' 을 항체에 전달하는 기능을 한다. 본 출원에서는 친핵성 치환 반응이 잘 일어나기 위한 조건으로 (1) (Xa₁)'이 Fc 도메인의 라이신 잔기와 인접하고, (2) R_1' 이 결합된 곁사슬 (side chain)의 방향이 상기 라이신 잔기로 향해야 할 것으로 상정하였다. (Xa₁)'의 위치와 곁사슬의 방향이 Fc 도메인의 라이신 잔기와 멀어질수록 공정의 수율 및 균일성이 하락할 것으로 예상했다. 또한, (3) (Xa₁)'의 치환 위치는 SSFI와 Fc 도메인의 상호작용 (3.2. 참조)에 큰 영향을 주지 않는 것이 바람직할 것이다.

[809] 도 3 및 도 5에서 간접적으로 확인 가능하듯, Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신과의 관계에서 (1)의 조건을 만족하는 SSFI 상의 위치는 하기 화학식 6-3을 기준으로 할 때 5번, 6번, 7번, 및 8번 위치로 확인되었다.

[810] [화학식 6-3]

[811] **D-C-A-W-H-(Xa₁)'-G-E-L-V-W-C-T**

[812] 이때, 5번 위치에 대응되는 히스티딘은 Fc 도메인의 380번 글루탐산과 솔트 링키지를 형성하는 잔기로서 변경하면 SSFI와 Fc 도메인의 상호작용에 영향을 줄 수 있어 (3)에 어긋난다. 또한 이의 곁사슬의 방향이 246번 라이신 및 248번 라이신과 가깝지 않아 (2)에 어긋난다. 7번 위치에 대응되는 글리신은 SSFI의 꺾임 구조를 형성하는 것에 도움을 주므로 부피가 큰 (Xa₁)' 잔기로 변경하는 것이 바람직하지 않다. 8번 위치에 대응되는 글루탐산은 Fc 도메인의 255번 아르기닌과 솔트 링키지를 형성하는 잔기로서 변경하면 SSFI와 Fc 도메인의 상호작용에 영향을 줄 수 있어 (3)에 어긋난다 (3.2. 참조). 6번 위치는 상기 (1),

(2), 및 (3)의 조건을 모두 만족하는 위치로서 $(X_{a1})'$ 의 위치로 가장 적합하다고 판단되었으며, 이에 의해 본 출원에 의한 $R_1'-L_2$ -SSFI를 완성할 수 있었다.

[813]

[814] 5.4. $R_1'-L_1$ 의 D_2 , 및 SSFI의 D_3 의 길이에 따라 R_1' 이 항체에 전달되는 위치가 달라질 수 있다 (The position of R_1' on an antibody may differ by the length of D_2 on $R_1'-L_1$, and D_3 on SSFI)

[815] 본 목적은 본 출원에 의한 $R_1'-L_2$ -SSFI의 바람직한 설계 원칙을 설명하기 위한 것이다. $R_1'-L_2$ -SSFI의 설계에 따라 Fc 도메인의 특정 라이신 기에 R_1' 을 특이적으로 전달하는 것이 가능해질 수 있다. 또한 바람직한 $R_1'-L_2$ -SSFI의 제조를 위한 $R_1'-L_1$ 및 SSFI의 설계 원칙을 설명하는 것을 목적으로 한다.

[816] 위에서 5.2.를 읽은 통상의 기술자는 $R_1'-L_2$ -SSFI의 $(X_{a1})'$ 의 제1 카보닐 탄소가 Fc 도메인의 라이신의 아민 기와 인접해야 친핵성 치환반응이 일어날 수 있음을 알 수 있을 것이다. 또한, 위의 3.2.의 설명에 의하여 통상의 기술자는 $R_1'-L_2$ -SSFI와 Fc가 특정한 위치 관계를 이루면서 배열되고, 이때 $(X_{a1})'$ 의 베타 탄소와 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신의 아민 기가 일정한 거리만큼 떨어짐을 알 수 있을 것이다 (도 5). 이를 조합하여 $R_1'-L_2$ -SSFI를 설계함에 있어, (1) $(X_{a1})'$ 의 베타 탄소와 제1 카보닐 탄소 사이의 거리 (이하 L_c 로 통칭)와 (2) 상기 특정한 위치 관계에서 $(X_{a1})'$ 의 베타 탄소와 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신의 아민 기 사이의 거리가 같거나 유사하면 원하는 라이신 잔기에 대하여 특이적인 표지가 가능할 것으로 예상되었다.

[817]

[818] 본 출원에 의한 $R_1'-L_2$ -SSFI의 구조와 L_c 를 도시하면 도 8과 같다. 도 8에서 보듯이 $(X_{a1})'$ 의 베타 탄소와 제1 카보닐 탄소 사이에는 D_3 , X_3 , 탄소 원자, D_2 , 및 X_1 이 위치하고 있으며 이중 D_3 , X_3 는 SSFI의 설계와 관련이 있고 D_2 , X_1 은 L_1-R_1' 의 설계와 관련이 있다.

[819] 편의상 D_3 는 C_x 알킬렌이고, X_3 는 N이며, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, X_1 은 S이며, 이때 y 는 1 이상인 정수인 경우를 상정하여 발명을 구체화하였다. 이때, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌의 길이는 같은 것으로 상정하였다. 도 8의 링커 구조를 discovery studio를 통해 모델링하여 L_c 를 계산한 결과, $x+y$ 의 값에 따라 확인된 L_c 의 값은 표 3과 같다. 계산 과정에서 상기 사슬은 가장 긴 길이를 갖는 상태로 모델링하였다.

[820]

<표 3> $x+y$ 에 따른 L_c 의 값

$x+y$	L_c (Å)
1 ($x=0, y=1$)	6.616
2	7.784
3	9.102
4	10.299
5	11.599
6	12.816
7	14.100
8	15.334
9	16.601
10	17.848
11	19.099
12	20.357
13	21.592
14	22.857

[821] 이하에서 R_1' - L_2 -SSFI과 Fc 도메인의 라이신 잔기의 위치 관계를 도시하기 위하여 제공되는 예시적인 도면들은 도 9을 기준으로 제공된다. 도 9은 $(X_{A1})'$ 의 결사슬의 방향 (점선 화살표)이 도면의 x축과 평행하도록 R_1' - L_2 -SSFI과 Fc 도메인의 위치 관계를 도시한 것이다. 도 9을 통해 $(X_{A1})'$ 의 결사슬이 246번 및 248번 라이신의 아민 기로 향하는 것을 확인 가능하며 (5.3. 참조), L_c 의 길이에 따라 246번 라이신 또는 248번 라이신에 특이적으로 반응시킬 수 있음을 도면을 통해 확인할 수 있다. 이하의 도 10 내지 12은 예시적인 L_c 의 길이에 따라 도 9을 도면의 y축과 평행한 방향 (굵은 실선 화살표)에서 바라본 것이다.

[822] 상기 3.2.에서 $(X_{A1})'$ 의 베타 탄소와 Fc 도메인의 246번 및 248번 라이신의 아민 기까지의 거리에 관해 언급한 바 있다 ($D_{246,min}$, $D_{246,max}$, $D_{248,min}$, $D_{248,max}$). $(X_{A1})'$ 의 베타 탄소는 Fc 도메인의 246번 라이신 잔기보다 248번 라이신과 가깝다. 따라서, 상기 L_c 의 값이 $D_{246,min}$ 보다 작으면 제1 카보닐 탄소는 248번 라이신과 보다 잘 반응할 것이고 (도 10), L_c 의 값이 $D_{248,max}$ 보다 크면 제1 카보닐 탄소는 246번 라이신과 보다 잘 반응할 것이며 (도 11), L_c 의 값이 $D_{246,min}$ 이상 $D_{248,max}$ 이하라면 246번 라이신 및 248번 라이신에 선택적으로 반응할 것으로 (도 12) 예상하였다.

[823]

[824] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를

전달하기 위한 $R_1'-L_2$ -SSFI가 개시된다 (도 11 참조)

- [825] 본 출원은 $(X_{a1})'$ 의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 $D_{246,min}$ (약 11.668Å) 보다 작은 것을 특징으로 하는 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제를 제공한다. 이때, L_c 는 약 6.5, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 또는 약 11.5Å의 값을 가질 수 있다.
- [826] 특정한 실시예에서, 상기 $R_1'-L_2$ -SSFI가 화학식 5, 5-1 내지 5-3, 및 6-1 내지 6-3 중 어느 하나의 구조를 가질 때, D_3 는 C_x 알킬렌이고, X_3 는 N이며, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, X_1 은 S이며 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 일 수 있다. 나아가, $x+y$ 는 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다. 예시적으로, $x=0$ 이고 $1 \leq y \leq 5$ 일 수 있다. 다른 예시에서, $x=1$ 이고 $1 \leq y \leq 4$ 일 수 있다. 또 다른 예시에서, $x=2$ 이고 $1 \leq y \leq 3$ 일 수 있다. 또 다른 예시에서, $x=3$ 이고 $1 \leq y \leq 2$ 일 수 있다. 해당 수치범위는 표 3을 기준으로 결정된 것이다.
- [827] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 $R_1'-L_2$ -SSFI가 개시된다.
- [828]
- [829] 본 출원은 이의 일 양태로서 $(X_{a1})'$ 의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 $D_{248,max}$ (약 16.208Å) 보다 큰 것을 특징으로 하는 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제를 제공한다. 예시적으로, L_c 는 약 16.5, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 또는 약 20.5 Å의 값을 가질 수 있다.
- [830] 특정한 실시예에서, 상기 $R_1'-L_2$ -SSFI가 화학식 5, 5-1 내지 5-3, 및 6-1 내지 6-3 중 어느 하나의 구조를 가질 때, D_3 는 C_x 알킬렌이고, X_3 는 N이며, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, X_1 은 S이며 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $x+y \geq 9$ 일 수 있다. 나아가, $x+y$ 는 9, 10, 11, 또는 12일 수 있다. 예시적으로, $x=0$ 이고 $9 \leq y \leq 12$ 일 수 있다. 다른 예시에서, $x=1$ 이고 y 는 $8 \leq y \leq 11$ 일 수 있다. 또 다른 예시에서, $x=2$ 이고 $7 \leq y \leq 10$ 일 수 있다. 또 다른 예시에서, $x=3$ 이고 $6 \leq y \leq 9$ 일 수 있다. 선택적으로, D_2 는 알키닐렌일 수 있다. D_2 가 알키닐렌인 경우 $(X_{a1})'$ 의 결사슬이 입체적으로 리지드 (rigid)해지므로 결사슬이 휘는 것을 방지할 수 있다.
- [831]
- [832]
- [833] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 $R_1'-L_2$ -SSFI가 개시된다.
- [834]
- [835] 본 출원은 이의 일 양태로서 $(X_{a1})'$ 의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 $D_{246,min}$ (약 11.668Å) 이상 $D_{248,max}$ (약 16.208Å) 이하의 값을 갖는 것을 특징으로 하는 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제를 제공한다. 이때, L_c 는 약 11.668, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 15.5, 약 16, 또는 약 16.208 Å의 값을 가질 수 있다.

- [836] 특정한 실시예에서, 상기 $R_1'-L_2$ -SSFI가 화학식 5, 5-1 내지 5-3, 및 6-1 내지 6-3 중 어느 하나의 구조를 가질 때, D_3 는 C_x 알킬렌이고, X_3 는 N이며, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고, X_1 은 S이며 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 일 수 있다. 이때, $x+y$ 는 6, 7, 또는 8일 수 있다. 예시적으로, $x=0$ 이고 $6 \leq y \leq 8$ 일 수 있다. 다른 예시에서, $x=1$ 이고 $5 \leq y \leq 7$ 일 수 있다. 또 다른 예시에서, $x=2$ 이고 $4 \leq y \leq 6$ 일 수 있다. 또 다른 예시에서, $x=3$ 이고 $3 \leq y \leq 5$ 일 수 있다.
- [837]
- [838] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 $R_1'-L_2$ -SSFI의 제조 방법이 개시된다.
- [839] 본 출원은 4.2.의 제조 방법에 있어,
- [840] 본 출원에 의한 링커와
- [841] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙터를 반응시킴을 포함하고,
- [842] 상기 링커에 있어 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [843] 상기 위치-특이적 항체 인터랙터에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고,
- [844] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 인 것을 특징으로 하는 $R_1'-L_2$ -SSAI의 제조 방법을 제공한다. 나아가, 상기 방법으로 제조된 $R_1'-L_2$ -SSAI는 항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달할 수 있다.
- [845]
- [846] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 $R_1'-L_2$ -SSFI의 제조용 키트가 개시된다.
- [847] 본 출원은 4.2.의 제조용 키트에 있어,
- [848] 본 출원에 의한 링커와
- [849] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙터를 포함하고,
- [850] 상기 링커에 있어 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [851] 상기 위치-특이적 항체 인터랙터에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고,
- [852] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 인 것을 특징으로 하는 $R_1'-L_2$ -SSAI의 제조용 키트를 제공한다.
- [853]
- [854] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 $R_1'-L_2$ -SSFI의 제조 방법이 개시된다.
- [855] 본 출원은 4.2.의 제조 방법에 있어,
- [856] 본 출원에 의한 링커와
- [857] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙터를 반응시킴을 포함하고,
- [858] 상기 링커에 있어 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [859] 상기 위치-특이적 항체 인터랙터에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고,
- [860] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $9 \leq x+y \leq 12$ 인 것을 특징으로 하는 $R_1'-L_2$ -SSAI의 제조 방법을 제공한다. 나아가, 상기 방법으로 제조된 $R_1'-L_2$ -SSAI는 항체와

반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달할 수 있다.

[861]

[862] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1' -L₂-SSFI의 제조용 키트가 개시된다.

[863] 본 출원은 4.2.의 제조용 키트에 있어,

[864] 본 출원에 의한 링커와

[865] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙터를 포함하고,

[866] 상기 링커에 있어 D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이며,

[867] 상기 위치-특이적 항체 인터랙터에 있어 D₃는 C_x알킬렌이고,

[868] 이때 y는 1 이상인 정수이고, $9 \leq x+y \leq 12$ 인 것을 특징으로 하는 R_1' -L₂-SSAI의 제조용 키트를 제공한다.

[869]

[870] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1' -L₂-SSFI의 제조 방법이 개시된다.

[871] 본 출원은 4.2.의 제조 방법에 있어,

[872] 본 출원에 의한 링커와

[873] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙터를 반응시킴을 포함하고,

[874] 상기 링커에 있어 D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이며,

[875] 상기 위치-특이적 항체 인터랙터에 있어 D₃는 C_x알킬렌이고,

[876] 이때 y는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 인 것을 특징으로 하는 R_1' -L₂-SSAI의 제조 방법을 제공한다. 나아가, 상기 방법으로 제조된 R_1' -L₂-SSAI는 항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적으로 제1 화학작용기를 전달할 수 있다.

[877]

[878] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1' -L₂-SSFI의 제조용 키트가 개시된다.

[879] 본 출원은 4.2.의 제조용 키트에 있어,

[880] 본 출원에 의한 링커와

[881] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙터를 포함하고,

[882] 상기 링커에 있어 D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이며,

[883] 상기 위치-특이적 항체 인터랙터에 있어 D₃는 C_x알킬렌이고,

[884] 이때 y는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 인 것을 특징으로 하는 R_1' -L₂-SSAI의 제조용 키트를 제공한다.

[885]

[886] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조 방법이 개시된다.

[887] 본 출원은 5.2.의 제조 방법에 있어,

- [888] 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제와
- [889] 항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하고,
- [890] 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 (X_{A1})'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 약 11.668 Å 보다 작은 것을 특징으로 하는 R_1' -Ab의 제조 방법을 제공한다.
- [891] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [892] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 일 수 있다.
- [893]
- [894] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조용 키트가 개시된다.
- [895] 본 출원은 5.2.의 제조용 키트에 있어,
- [896] 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제와
- [897] 항체 또는 이의 단편을 포함하고,
- [898] 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 (X_{A1})'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 약 11.668Å 보다 작은 것을 특징으로 하는 R_1' -Ab의 제조용 키트를 제공한다.
- [899] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [900] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 일 수 있다.
- [901] 또는, 본 출원은 5.2.의 제조용 키트에 있어,
- [902] 본 출원에 의한 링커;
- [903] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙툼; 및
- [904] 항체 또는 이의 단편을 포함하고,
- [905] 상기 링커에 있어 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [906] 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고,
- [907] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 인 것을 특징으로 하는 R_1' -Ab의 제조용 키트를 제공한다.
- [908]
- [909] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조 방법이 개시된다.
- [910] 본 출원은 5.2.의 제조 방법에 있어,
- [911] 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제와
- [912] 항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하고,
- [913] 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 (X_{A1})'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 약 16.208Å 보다 큰 것을 특징으로 하는 R_1' -Ab의 제조 방법을 제공한다.
- [914] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 D_3

- 는 C_x 알킬렌이고, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
 [915] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $9 \leq x+y \leq 12$ 일 수 있다.
 [916]
 [917] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조용 키트가 개시된다.
 [918] 본 출원은 5.2.의 제조용 키트에 있어,
 [919] 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제와
 [920] 항체 또는 이의 단편을 포함하고,
 [921] 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 $(Xa_1)'$ 의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 약 $16.208\text{\AA}$ 보다 큰 것을 특징으로 하는 R_1' -Ab의 제조용 키트를 제공한다.
 [922] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
 [923] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $9 \leq x+y \leq 12$ 일 수 있다.
 [924] 또는, 본 출원은 5.2.의 제조용 키트에 있어,
 [925] 본 출원에 의한 링커;
 [926] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙툼; 및
 [927] 항체 또는 이의 단편을 포함하고,
 [928] 상기 링커에 있어 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
 [929] 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고,
 [930] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $9 \leq x+y \leq 12$ 인 것을 특징으로 하는 R_1' -Ab의 제조용 키트를 제공한다.
 [931]
 [932] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적으로 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조 방법이 개시된다.
 [933] 본 출원은 5.2.의 제조 방법에 있어,
 [934] 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제와
 [935] 항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하고,
 [936] 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 $(Xa_1)'$ 의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 약 $11.668\text{\AA}$ 이상 약 $16.208\text{\AA}$ 이하인 것을 특징으로 하는 R_1' -Ab의 제조 방법을 제공한다.
 [937] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
 [938] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 일 수 있다.
 [939]
 [940] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적으로 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조용 키트가 개시된다.
 [941] 본 출원은 5.2.의 제조용 키트에 있어,

- [942] 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제와
- [943] 항체 또는 이의 단편을 포함하고,
- [944] 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 (X_{a1})'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 약 11.668Å 이상 약 16.208Å 이하인 것을 특징으로 하는 R_1 '-Ab의 제조용 키트를 제공한다.
- [945] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 화학작용기 전달용 제제에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고, D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [946] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 일 수 있다.
- [947] 또는, 본 출원은 5.2.의 제조용 키트에 있어,
- [948] 본 출원에 의한 링커;
- [949] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙툼; 및
- [950] 항체 또는 이의 단편을 포함하고,
- [951] 상기 링커에 있어 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며,
- [952] 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고,
- [953] 이때 y 는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 인 것을 특징으로 하는 R_1 '-Ab의 제조용 키트를 제공한다.
- [954]
- [955] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신에 모두 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조 방법이 개시된다.
- [956] 본 출원은 항체에 대한 제1 화학작용기 1차 전달용 제제 (first agent for delivering first functional group to an antibody)와 항체 또는 이의 단편을 반응시킴; 및
- [957] 항체에 대한 제1 화학작용기 2차 전달용 제제 (second agent for delivering first functional group to an antibody)와 상기 항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하는
- [958] R_1 '-Ab의 제조 방법을 제공한다.
- [959] 특정한 실시예에서, 항체에 대한 제1 화학작용기 1차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1 '- L_2 -SSFI이고, 항체에 대한 제1 화학작용기 2차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1 '- L_2 -SSFI일 수 있다.
- [960] 특정한 실시예에서, 항체에 대한 제1 화학작용기 1차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1 '- L_2 -SSFI이고, 항체에 대한 제1 화학작용기 2차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1 '- L_2 -SSFI일 수 있다.
- [961] 특정한 실시예에서, 항체에 대한 제1 화학작용기 1차 전달용 제제와 항체 또는 이의 단편을 반응시킴; 및 항체에 대한 제1 화학작용기 2차 전달용 제제와 상기

항체 또는 이의 단편을 반응시킴은 순차적으로 수행될 수 있다.

[962]

[963] 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신에 모두 제1 화학작용기가 전달된 항체의 제조용 키트가 개시된다.

[964] 본 출원은 항체에 대한 제1 화학작용기 1차 전달용 제제;

[965] 항체에 대한 제1 화학작용기 2차 전달용 제제; 및

[966] 항체 또는 이의 단편을 포함하는

[967] R_1' -Ab의 제조용 키트를 제공한다.

[968] 특정한 실시예에서, 항체에 대한 제1 화학작용기 1차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1' -L₂-SSFI이고, 항체에 대한 제1 화학작용기 2차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1' -L₂-SSFI일 수 있다.

[969] 특정한 실시예에서, 항체에 대한 제1 화학작용기 1차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1' -L₂-SSFI이고, 항체에 대한 제1 화학작용기 2차 전달용 제제는 위에서 개시된 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 화학작용기를 전달하기 위한 R_1' -L₂-SSFI일 수 있다.

[970]

[971] 5.5. 제1 카보닐기의 반응성을 조절하여 보다 더 위치특이적인 화학작용기의 전달이 가능하다 (It is able to transfer the first functional group with more site-specificity by modulating the reactivity of the first carbonyl group)

[972] 5.2.에서 설명된 바와 같이 제1 화학작용기를 포함하는 항체는 항체의 친핵체가 R_1' -L₂-SSFI의 제1 카보닐기를 공격하여 제조된다. 제1 카보닐기는 링커의 제2 카보닐기 보다 온건한 반응성을 갖는 것을 특징으로 한다 (2.2. 참조). 제1 카보닐기는 항체의 특정 아민 기가 인접한 위치 관계 (in vicinity)에 있을 때에만 반응을 일으킬 수 있도록 반응성이 조절되었다. 본 출원은 이처럼 반응을 위한 인접성 조건 (vicinity condition for reaction)을 통하여 제1 카보닐기가 임의의 아민 기와 잘 반응하지 않도록 하고 반응의 높은 위치특이성을 가능하게 했다.

[973] 공개번호 US20180141976A1 및 WO2018199337A1의 기술은 Fc-III의 유사체를 이용하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 위치선택적으로 조절하는 것을 목적으로 하고 있다. 상기 공개기술들은 디석시니미딜 (disuccinimidyl) 크로스링커를 사용하고 있어 제1 카보닐기와 제2 카보닐기의 반응성이 동일하게 높다 (2.2. 참조). 이로 인해 제1 카보닐기의 반응성이 높으며, 반응을 위한 인접성 조건이 없으므로, 임의의 라이신 기가 표지될 가능성이 높다.

[974]

[975] 5.6. 본 출원에 의해 제조된 제1 화학작용기를 포함하는 항체는 높은 균일성 및

수율을 갖는다 (The antibody comprising first functional group prepared according to the present invention has high uniformity and yield)

[976] 상기 5.3. 및 5.4.에 의해 (1) "항체의 특정 위치에 특이적으로" 제1 화학작용기를 (2) "원하는 개수로" 전달하고자 하는 과제에 해결방법 및 수단이 구체적으로 설명되었다. 이하 실험예에서 확인 가능하듯, 상기 해결방법을 통해 제조된 제1 화학작용기를 포함하는 항체는 높은 특이성 및 수율을 가지고 Fc 도메인의 특정 라이신 잔기에 전달되는 것을 확인할 수 있었다 (실험예 3.3. 참조). 이에 본 출원은 완성에 이르게 되었다.

[977] 상기 배경기술에서 보았듯이 항체 표지를 통한 콘쥬게이트 산물의 균일성이 높다는 것은 (1) 항체 콘쥬게이트 콘쥬게이트의 기능이 균일하게 보장되고, (2) 그 효과가 예상 가능하여 안전하며, (3) 항체의 기능적 부위를 회피하여 표지하는 것이 가능해져 항체의 기능 저하를 피할 수 있는 장점이 있다.

[978] 공개번호 US20180141976A1 및 WO2018199337A1의 기술은 Fc-III의 유사체를 이용하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 위치선택적으로 조절하는 것을 목적으로 하고 있다. 그러나, 두 가지 이유에 의하여 공개기술은 항체의 균일성 및 수율이 낮을 수밖에 없다. 먼저, 공개기술에 의하면 (X_{a1})의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리 (L_c)가 약 15Å이므로 246번 라이신 또는 248번 라이신에 선택적인 표지가 가능할뿐 한 개의 위치를 특이적으로 선택할 수 없다. 두번째로, 공개기술에 의한 크로스링커의 제1 카보닐기는 반응성이 높아 반응을 위한 인접성 조건을 갖지 않는다 (5.5. 참조). 이로 인해 제1 카보닐기가 임의의 라이신 기와 반응할 가능성이 높다. 따라서 항체 표지 산물의 균일성 및 수율이 본 출원보다 떨어지는 단점이 있다.

[979]

[980] 5.7. 본 출원에 의한 제1 화학작용기를 포함하는 항체는 FcRn 결합 위치가 가려지지 않으므로 항체의 기능이 저하되지 않는다 (The antibody comprising the first functional group according to the present invention does not have its FcRn binding site shielded, by which functions of the antibody are not decreased)

[981] 상기 1.1.에서 항체 표지 위치의 설계 원칙으로 (1) 파라토프와 이격되고 (2) FcRn을 포함한 FcR의 인식 부위와 이격될 것임을 설명한 바 있다. 246번 및 248번 라이신은 Fc 도메인에 포함되므로 파라토프와 이격되어 있으나, 해당 위치가 FcRn의 인식 부위와 중첩될지 문제될 수 있다.

[982] FcRn은 다양한 기능을 가지고 있으나, 특히 IgG 리사이클링 (IgG recycling)에 관여하여 항체의 반감기를 높이는 데에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 항체가 체내에서 사용되는 경우, 즉 치료제, 조영제 등으로 사용되는 경우, FcRn과 항체의 상호작용이 원활하게 이루어지지 못하면 항체의 반감기가 짧아져 제대로 기능을 하지 못할 수 있다.

[983]

[984] 5.7.1. 246번 라이신과 248번 라이신은 항체의 FcRn 결합 위치와 이격되어 있다

(Lys246 and Lys248 are detached from the FcRn binding site of the antibody)

- [985] Fc 도메인 상의 라이신 잔기를 선정함에 있어 Fc의 FcRn 결합 위치 (FcRn binding site)로부터 이격될 것이 중요한 고려 대상이었다. 도 13은 Fc 도메인과 FcRn의 결합 구조, Fc 도메인 상의 246, 248번 라이신과 FcRn 결합 위치의 위치를 도시한 것이다. Fc 도메인과 FcRn의 결합 구조를 나타냄에 있어서는 논문 및 컴퓨터 모델링을 활용하였다 (Ying T, Ju TW, Wang Y, Prabakaran P, Dimitrov DS. Interactions of IgG1 CH2 and CH3 Domains with FcRn. Front Immunol. 2014;5:146., Monnet C, Jorieux S, Urbain R, et al. Selection of IgG Variants with Increased FcRn Binding Using Random and Directed Mutagenesis: Impact on Effector Functions. Front Immunol. 2015;6:39.) (도 13 좌측). 동일한 논문 자료들에서 제시된 FcRn 결합 위치와 246번 라이신 및 248번 라이신을 Fc 도메인에 표시하였다 (도 13 우측). 두 도면을 참조할 때, 246번 라이신 및 248번 라이신의 결합 위치가 FcRn 결합 위치의 반대쪽으로 향하는 것을 확인할 수 있다.
- [986] 이를 통하여 항체 표지 위치를 선정할 때 FcRn과 Fc 도메인의 상호작용에 영향을 주지 않을 것이 고려되었다. 실제로 제조된 항체 역시 반감기가 감소하지 않아 의도한대로 FcRn의 결합에 영향을 주지 않는 것이 확인되었다 (실험예 5. 참조).
- [987]
- [988] 5.8. 본 출원에 의한 제1 화학작용기를 포함하는 항체의 제조 공정은 SSAI가 이탈하는 것을 특징으로 한다 (The method for producing the antibody comprising the first functional group according to the present invention is characterized in that SSAI leaves during the method)
- [989] 5.2.의 반응식 4 및 5에서 보듯이, 본 출원에 의한 R₁'-Ab의 제조 공정은 SSAI가 친핵성 치환반응의 이탈기에 포함되어 최종생성물인 R₁'-Ab로부터 이탈하는 것을 특징으로 한다. 본 출원에 의한 SSFI와 Fc 도메인의 결합 구조 (3.2. 참조)와 Fc와 FcRn의 결합 위치를 비교 분석한 결과, SSFI가 FcRn 결합 위치의 일부를 덮는 것으로 확인되었다 (도 14). 이에 비추어, R₁'-Ab의 제조 공정 과정에서 SSFI에 이탈하지 않는다면 반감기 등 항체의 물성에 좋지 않은 영향을 줄 것으로 예상할 수 있다.
- [990] 공개번호 US20180141976A1의 기술은 Fc-III의 유사체를 이용하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 위치선택적으로 조절하는 것을 목적으로 하고 있으나, 해당 기술은 제조 공정에서 SSFI가 이탈되지 않으므로 최종 항체 표지 산물에 SSFI가 포함되어 있는 점에서 본 출원과 차이가 있다.
- [991] 공개번호 WO2018199337A1의 기술은 Fc-III의 유사체를 이용하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 위치선택적으로 조절하는 것을 목적으로 하고, 최종 항체 표지 산물에 SSFI가 포함되지 않으나, 해당 기술은 제조 공정에서 SSFI를 제거하기 위하여 "2가의 기인 절단성 링커"를 끊어주는 단계를 추가적으로 거쳐야 하는데, 본 출원에 의하면 이러한 추가적인 단계 없이 SSFI가

컨쥬게이트 반응 도중에 이탈되는 장점이 있다. 또한, 해당 발명의 2가의 기인 절단성 링커 (a cleavable linker that is a divalent group)를 끊어주는 단계에 의하면 항체의 구조를 이루는 다이설파이드 결합이 끊어질 수 있는 문제가 있다. 본 출원은 특별한 조건이 없이 용이하게 일어나는 친핵성 치환반응을 이용하므로 이러한 문제가 획기적으로 개선될 수 있다.

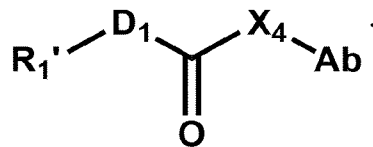
[992]

[993] 5.9. 본 출원에 의한 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체는 생체반응성이 높은 화학작용기를 포함하지 않아, 콘쥬게이트 형성 반응 외의 부반응이 일어나지 않는다 (the antibody comprising first click-chemistry functional group according to the present invention does not comprise highly bioreactive functional group, by which no side reaction other than the conjugate forming reaction occurs)

[994] 본 출원의 R_1' -Ab의 제조 방법에 의하여 제조된 항체는 화학식 7과 같은 구조를 갖는다:

[995] [화학식 7]

[996]



[997] 246번 라이신, 또는 248번 라이신에 R_1' 이 전달된 경우, X_4 는 NH이고 D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌일 것이다. 이때 항체와 연결된 -NH-(CO)-는 아마이드 결합으로서 체내에서 일반적으로 안정한 결합이며, D_1 역시 일반적으로 생체반응성이 높지 않은 구조이다. 따라서 본 출원에 의해 제조된 R_1' -Ab는 표지된 분자 (R_1') 외에는 생체반응성이 높은 구조가 부가되지 않으므로 안전성 (safety)이 높음을 예상할 수 있다.

[998] 특히 R_1' -Ab가 클릭화학작용기가 전달된 H_1 -Ab인 경우, 생체반응성이 높은 구조가 부가되지 않으므로, 클릭화학반응 외의 부차적인 반응이 일어나지 않아 클릭화학반응의 수율이 향상될 것이다.

[999] 공개번호 WO2018199337A1의 기술은 Fc-III의 유사체를 이용하여 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 위치선택적으로 조절하는 것을 목적으로 하고, 생체 직교성 관능기 (biorthogonal functional group)를 이용하려는 목적을 가지고 있다. 그러나 해당 기술에 의한 항체 생성물은 "2가의 기인 절단성 링커" (a cleavable linker that is a divalent group)를 끊어주는 단계에 의해 티올, 히드록시, 카르복시 산, 인산, 아민 등의 부가적인 화학작용기를 갖게 되는 점에서 본 출원과 차이가 있다. 이러한 부가적인 화학작용기는 생체반응성을 갖는 작용기이므로 항체 생성물의 안전성에 영향을 미칠 수 있다.

[1000]

[1001] 6. 페이로드 (payload; C_m-H_2)

[1002] 본 출원에 의하여 페이로드 (payload)가 개시된다. 본원에서는 이러한 화합물을

기호로 C_m-H_2 로 표시한다.

[1003]

[1004] 본 출원은 화학식 9로 표시되는 C_m-H_2 를 제공한다:

[1005] [화학식 9]

[1006] C_m-H_2

[1007] 이때,

[1008] C_m 은 카고 모이어티이고,

[1009] H_2 는 제2 클릭화학작용기이다.

[1010] 특정한 실시예에서, C_m 은 운반자 모이어티 (carrier moiety), 형광 모이어티 (fluorescent moiety), 약물 모이어티 (drug moiety), 또는 방사성 모이어티 (radioactive moiety)를 포함할 수 있다. 나아가, R_1 '은 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, R_1 '은 VC 링커를 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, R_1 '은 파라토프 (paratope)를 포함하는 항체 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다.

[1011] 특정한 실시예에서, C_m 이 약물 모이어티를 포함하는 경우, 상기 약물 모이어티는 항암제일 수 있다. 나아가, 상기 항암제는 DM1, DM3, DM4, 아브린, 리친 A, 슈도모나스 엑소독신, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 종양 괴사 인자, α 인터페론, β 인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 사이토카인, 아포토시스 유도 제제, 항-신혈관형성 제제, 림포카인, 탁세인, DNA-알킬화 제제, 안트라시클린, 튜블리신 유사체, 듀오카르마이신 유사체, 오리스타틴 E, 오리스타틴 F, 마이탄시노이드, 반응성 폴리에틸렌글리콜 잔기를 포함하는 세포독성 제제, 탁손, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, t. 콜키신, 독소루비신, 도노루비신, 디히드로록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 메토크세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 디카르바진, 메클로레타민, 티오테파클로람부실, 메이팔란, 카르무스틴, 로무스틴, 시클로포스파미드, 부설판, 디브로모마니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 시스플라틴, 닥티노마이신, 블레오마이신, 안트라마이신, 칼리키아마이신, 아비라테론, 벤다무스틴, 보르테조밐, 카르보플라틴, 카바지탁셀, 다사티닙, 도세탁셀, 에피루비신, 엘로티닙, 에베롤리무스, 켄시타빈, 제피티닙, 이다루비신, 이마티닙, 히드록시유레아, 라파티닙, 류프로레린, 멜팔란, 네다플라틴, 닐로티닙, 옥살리플라틴, 파조파닙, 페메트렉세드, 피코플라틴, 로미렙신, 사트라플라틴, 소라페닙, 베무라페닙, 수니티닙, 테니포사이드, 트리플라틴, 및 비노렐빈 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[1012] 특정한 실시예에서, C_m 은 복수의 운반자 모이어티, 형광 모이어티, 약물

모이어티, 또는 방사성 모이어티를 포함할 수 있다. 나아가, C_m 은 2개 이상의 약물 모이어티를 포함할 수 있다. 또는 나아가, C_m 은 VC 링커를 포함할 수 있다.

[1013] 특정한 실시예에서, H_2 는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더 나아가, H_2 은 아자이드, 또는 스트레인된 알킨일 수 있다. 또 더 나아가, H_2 는 아자이드, 또는 디벤조시클로옥신-아민일 수 있다. 또는, 더 나아가, H_2 는 다이엔, 또는 친다이엔체일 수 있다. 또 더 나아가, H_2 는 테트라진, 또는 노르보르넨일 수 있다. 또는, H_2 는 테트라진, 또는 트랜스시클로옥텐일 수 있다.

[1014] 특정한 실시예에서, 본 출원에 의한 H_1 -Ab와 반응시키고자 할 때, H_2 는 제1 클릭화학작용기 (H_1)와 상보적 (complementary)인 것일 수 있다.

[1015]

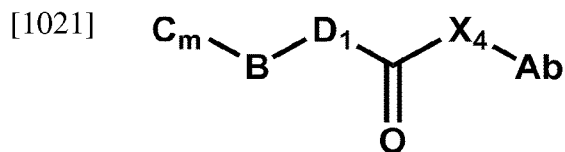
[1016] 7. 항체-페이로드 콘쥬게이트 (conjugate of antibody and payload; C_m -Ab)

[1017] 본 출원에 의하여 항체-페이로드 콘쥬게이트 (conjugate of antibody and payload)가 개시된다. 본원에서는 이러한 화합물을 기호로 C_m -Ab로 표시한다.

[1018]

[1019] 본 출원은 화학식 10으로 표시되는 C_m -Ab를 제공한다:

[1020] [화학식 10]



[1022] 이때, C_m 은 카고 모이어티이고,

[1023] B는 제1 클릭화학작용기와 제2 클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조이며,

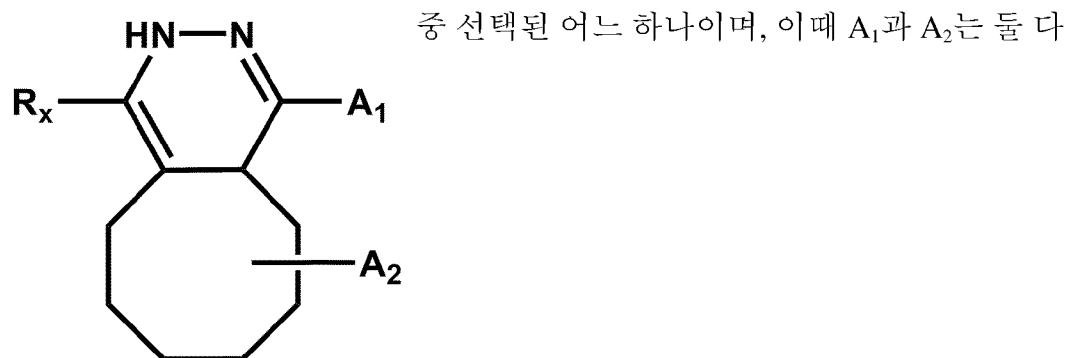
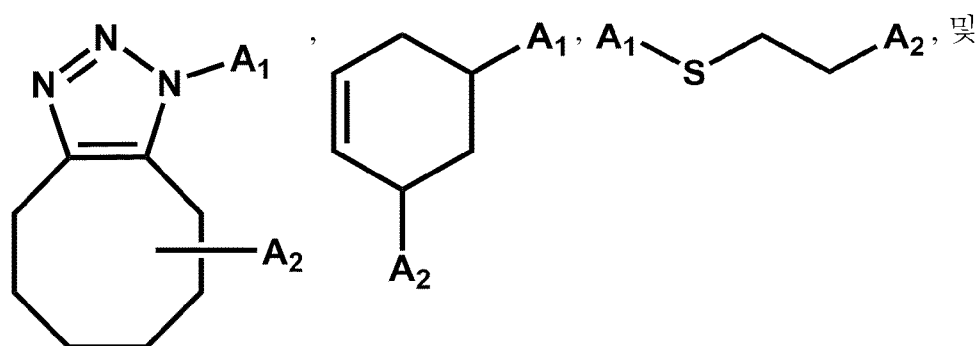
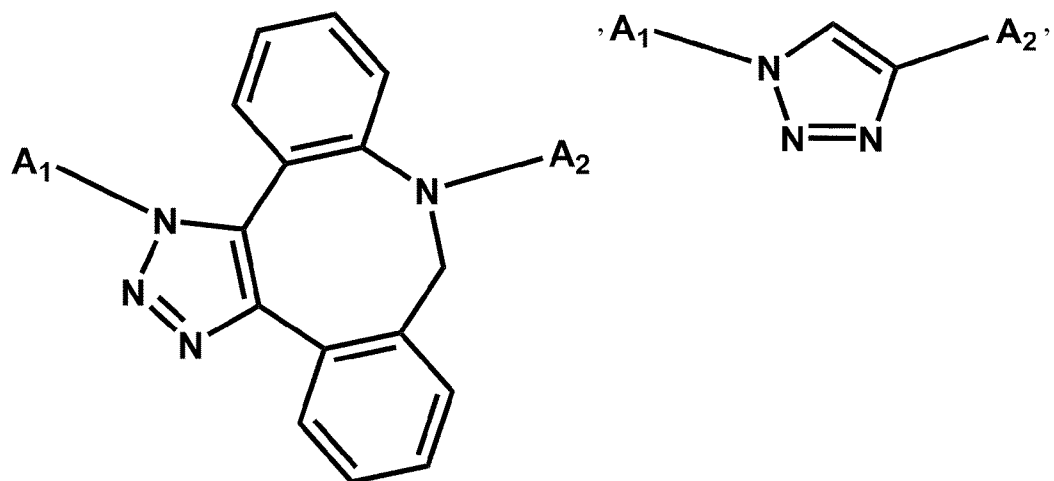
[1024] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이고,

[1025] X_4 는 NH, O, 또는 S이고,

[1026] Ab는 항체이다.

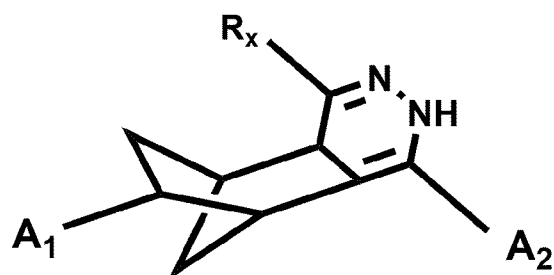
[1027] 상기 카고 모이어티에 관한 내용은 '6. 페이로드'에 기재된 내용을 준용한다.

[1028] 특정한 실시예에서, B는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나, 및 이의 파트너클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조일 수 있다. 나아가, B는



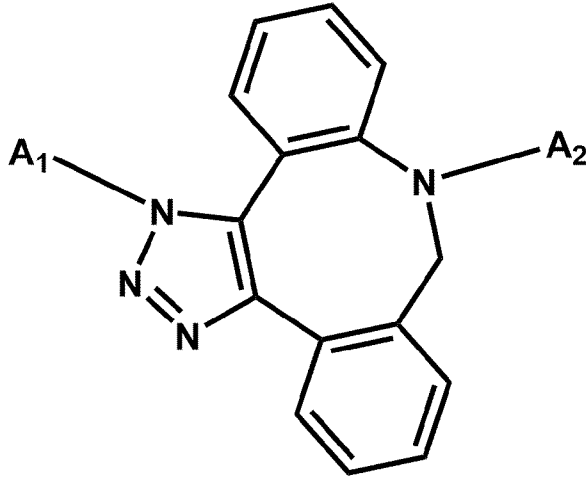
같은 것과 연결되지 않도록 상기 카고 모이어티 또는 D₁과 연결되고, R_x는 H, 할로젠, 및 C₁₋₃알킬로부터 선택될 수 있다. 더 나아가, B는

일 수 있다. 또는, 더 나아가, B는



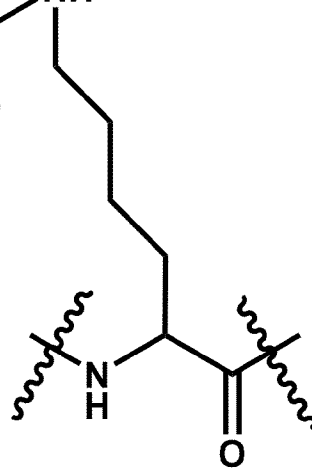
[1029]

일 수 있다.



- [1030] 특정한 실시예에서, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D_1 은 $-CH_2OCH_2-$ 일 수 있다. 또는 나아가, D_1 은 공유결합일 수 있다.
- [1031] 특정한 실시예에서, X_4 는 NH일 수 있다.
- [1032] 특정한 실시예에서, Ab는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, Ab는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, Ab는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, Ab는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, Ab는 항체의 단편일 수 있다.
- [1033] 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 Fab 도메인을 통해 연결될 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 Fc 도메인을 통해 연결될 수 있다. 나아가, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 더 나아가, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 또는, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 또는, X_4 와 Ab는 Fc 도메인의 246번 라이신 및 248번 라이신을 통해 연결될 수 있다. 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 두 개의 Fc 도메인 중 하나만을 통하여 연결될 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, X_4 와 Ab는 Ab의 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두를 통하여 연결될 수 있다.
- [1034]
- [1035] 본 출원은 하기 화학식 10-1의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:
- [1036] [화학식 10-1]
- [1037] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)"—P—K—D—T—L—M—I**
(서열번호 23)
- [1038] 이때,
- [1039] G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

[1040] (K)"은 C_m-B-D_1 $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ 이며, 이때



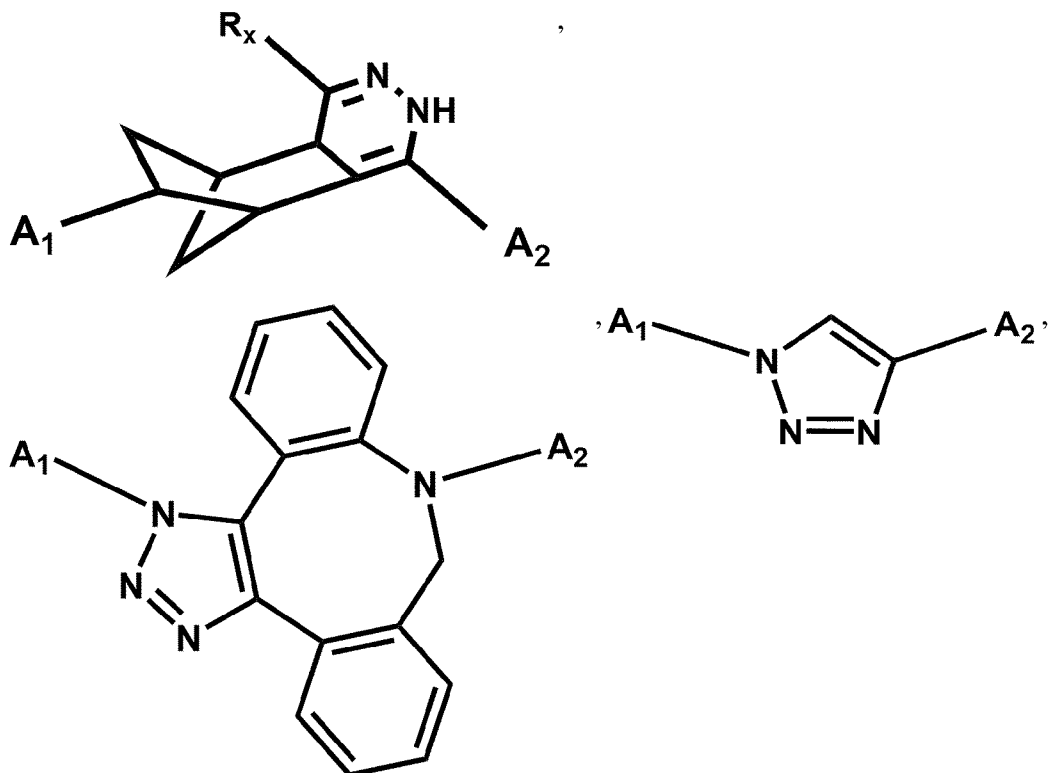
[1041] C_m 은 카고 모이어티이고,

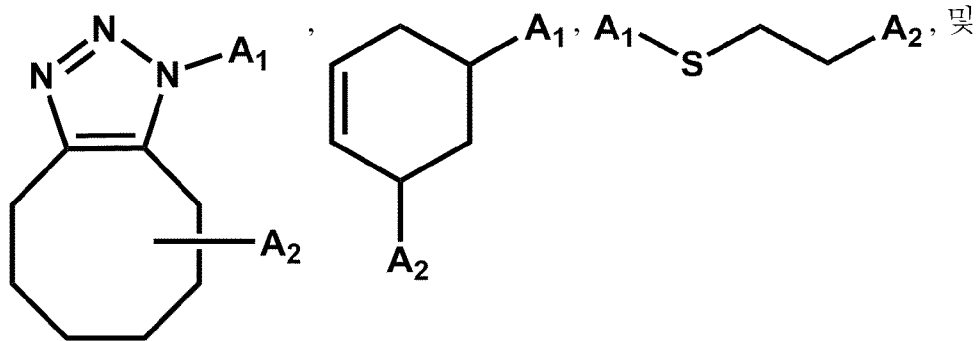
[1042] B는 제1 클릭화학작용기와 제2 클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조이며,

[1043] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이다. 상기 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 이에 대응되는 위치에 카고 모이어티가 콘쥬게이트된 것이다.

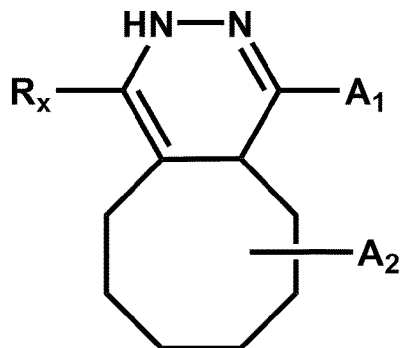
[1044] 상기 카고 모이어티에 관한 내용은 '6. 페이로드'에 기재된 내용을 준용한다.

[1045] 특정한 실시예에서, B는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나, 및 이의 파트너클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조일 수 있다. 나아가, B는



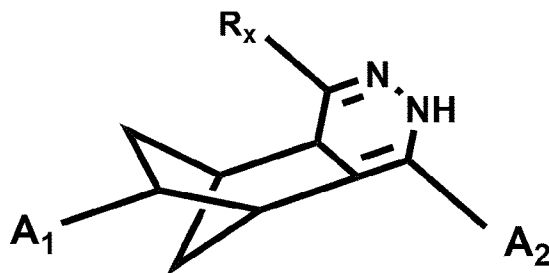


중 선택된 어느 하나이며, 이때 A₁과 A₂는 둘 다

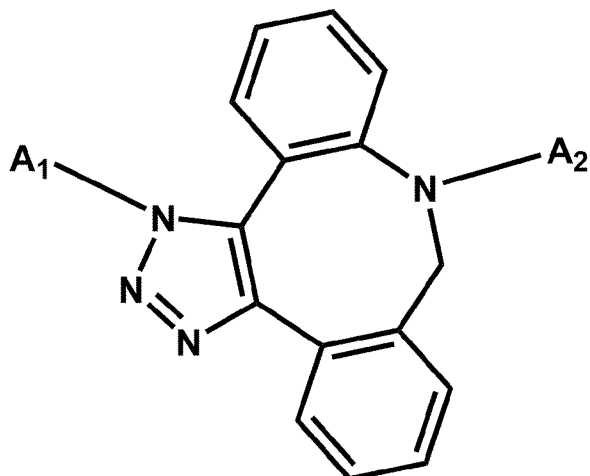


같은 것과 연결되지 않도록 상기 카고 모이어티 또는 D₁과 연결되고, Rx는 H, 할로젠, 및 C₁₋₃알킬로부터 선택될 수 있다. 더 나아가, B는

일 수 있다. 또는, 더 나아가, B는



일 수 있다.



[1046] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.

[1047] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서,

상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다.

[1048] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[1049]

[1050] 본 출원은 하기 화학식 7-2의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:

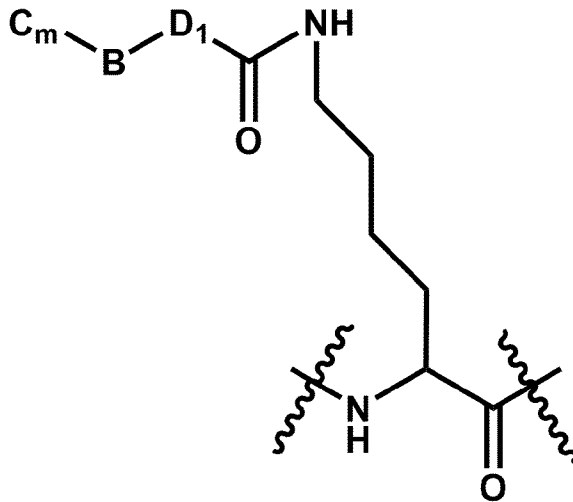
[1051] [화학식 10-2]

[1052] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—K—P—(K)"—D—T—L—M—I**
(서열번호 24)

[1053] 이때,

[1054] G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

[1055] (K)"은 C_m-B-D_1 이며, 이때



[1056] C_m 은 카고 모이어티이고,

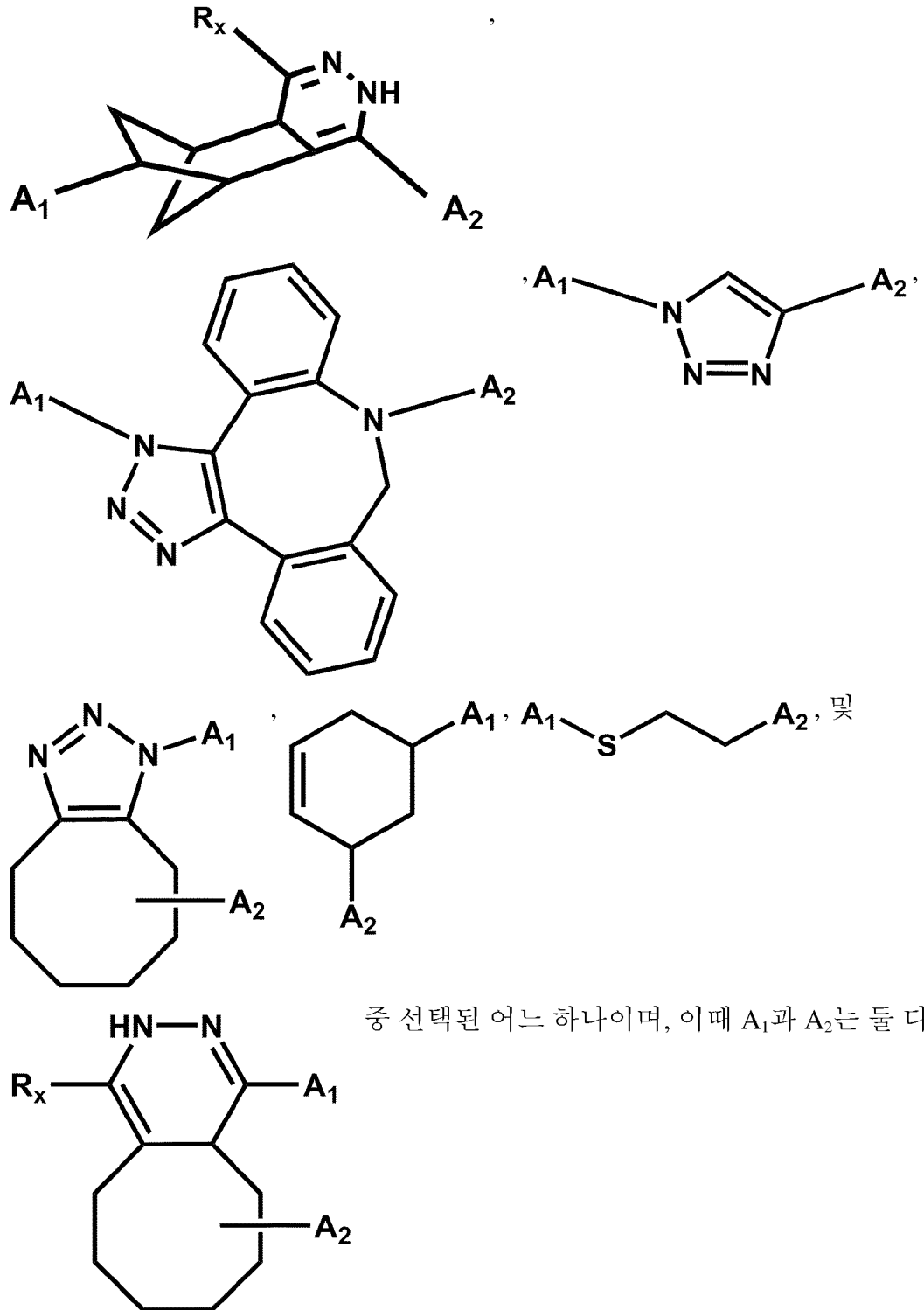
[1057] B는 제1 클릭화학작용기와 제2 클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조이며,

[1058] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이다. 상기 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 이에 대응되는 위치에 카고 모이어티가 콘จู게이트된 것이다.

[1059] 상기 카고 모이어티에 관한 내용은 '6. 페이로드'에 기재된 내용을 준용한다.

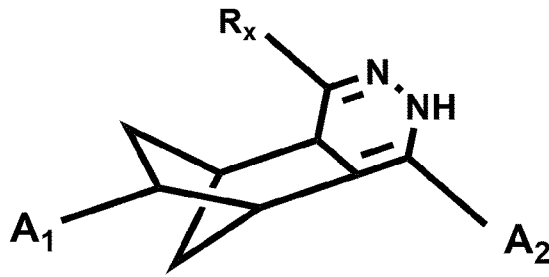
[1060] 특정한 실시예에서, B는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체,

알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나, 및 이의 파트너클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조일 수 있다. 나아가, B는

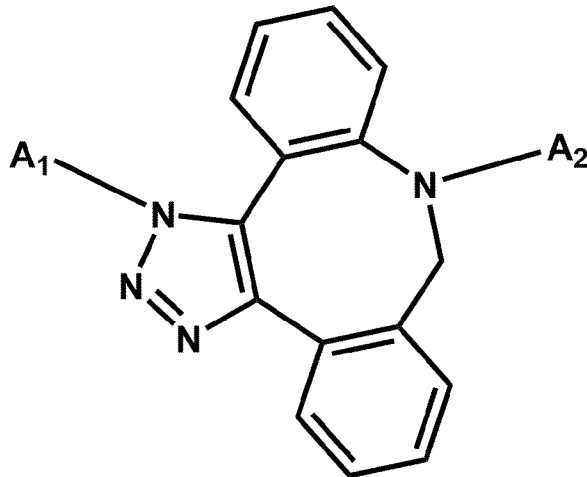


중 선택된 어느 하나이며, 이때 A_1 과 A_2 는 둘 다

같은 것과 연결되지 않도록 상기 카고 모이어티 또는 D_1 과 연결되고, R_x 는 H,

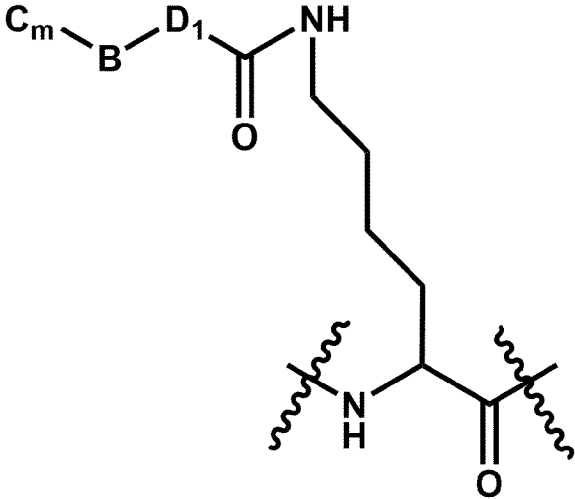


일 수 있다. 또는, 더 나아가, B는



일 수 있다.

- [1061] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.
- [1062] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다.
- [1063] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [1064]
- [1065] 본 출원은 하기 화학식 10-3의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다:
- [1066] [화학식 10-3]
- [1067] **G—P—S—V—F—L—F—P—P—(K)¹—P—(K)²—D—T—L—M—I**
(서열번호 25)
- [1068] 이때,
- [1069] G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는

트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한
 [1070] (K)"은 각각 독립적으로 C_m-B-D_1 이며, 이때

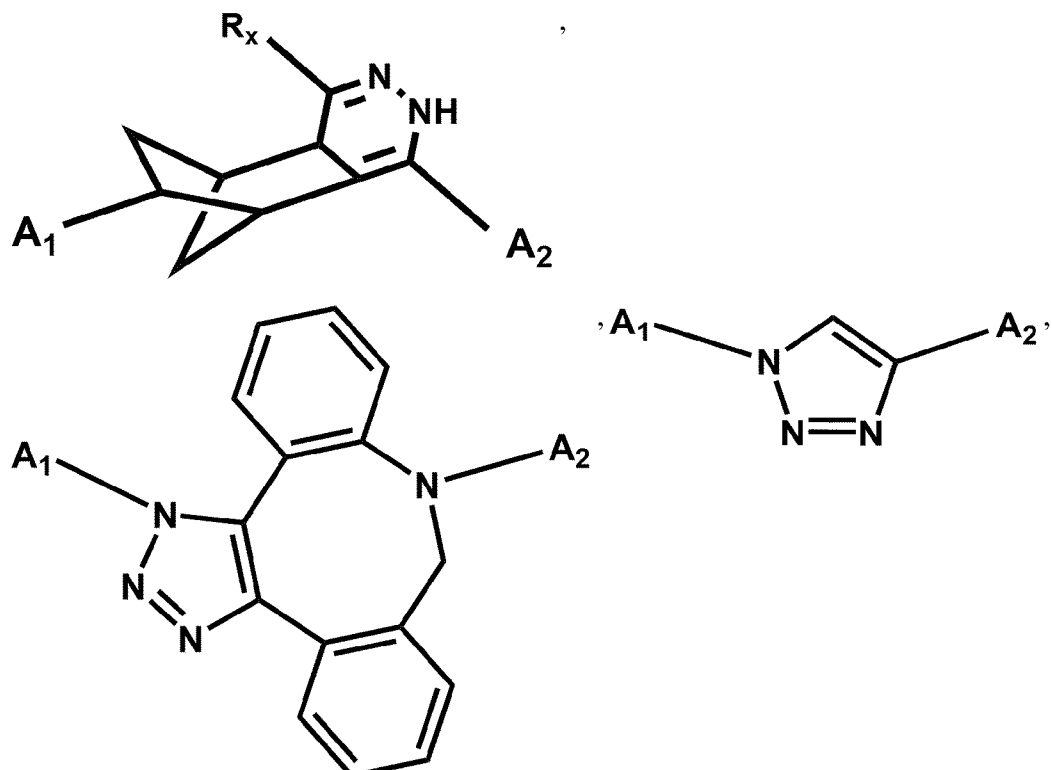
[1071] C_m 은 카고 모이어티이고,

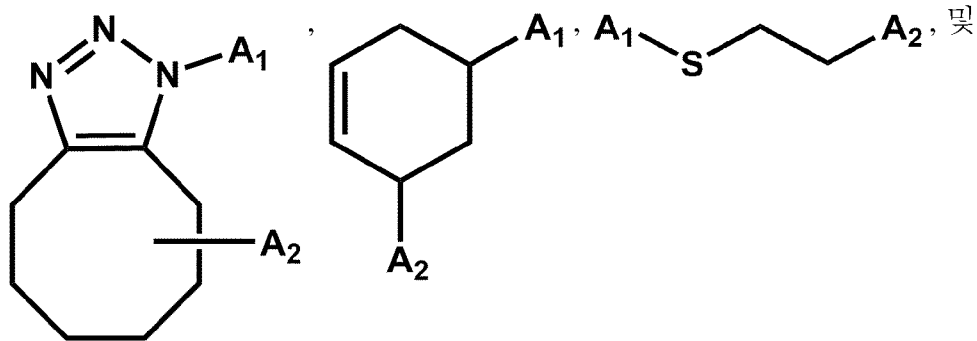
[1072] B는 제1 클릭화학작용기와 제2 클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조이며,

[1073] D_1 은 임의의 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌이다. 상기 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 이에 대응되는 위치에 카고 모이어티가 콘จู게이트된 것이다.

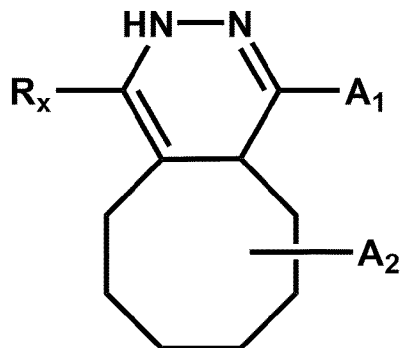
[1074] 상기 카고 모이어티에 관한 내용은 '6. 페이로드'에 기재된 내용을 준용한다.

[1075] 특정한 실시예에서, B는 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나, 및 이의 파트너클릭화학작용기의 클릭화학반응에 의하여 형성되는 구조일 수 있다. 나아가, B는



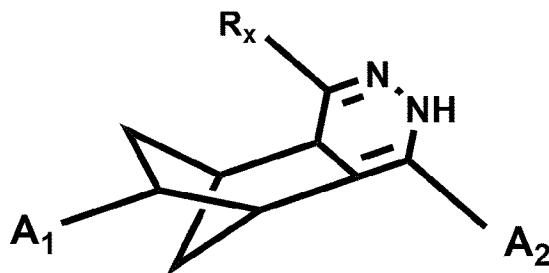


중 선택된 어느 하나이며, 이때 A₁과 A₂는 둘 다

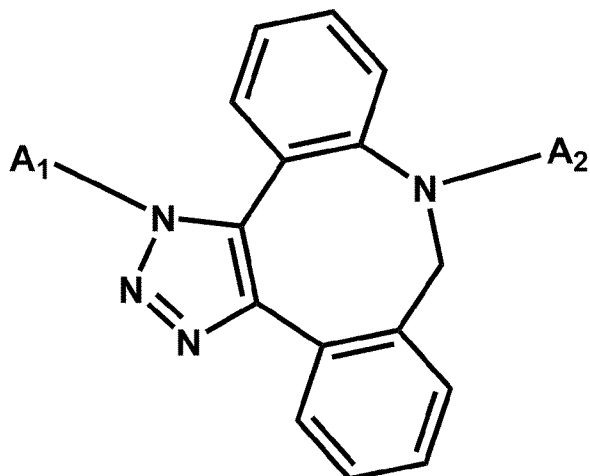


같은 것과 연결되지 않도록 상기 카고 모이어티 또는 D₁과 연결되고, Rx는 H, 할로젠, 및 C₁₋₃알킬로부터 선택될 수 있다. 더 나아가, B는

일 수 있다. 또는, 더 나아가, B는



일 수 있다.



[1076] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 나아가, D₁은 -CH₂OCH₂-일 수 있다. 또는 나아가, D₁은 공유결합일 수 있다.

[1077] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 인간 항체일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서,

상기 항체는 인간 외의 동물 항체일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 이뮤노글로불린 G (IgG)일 수 있다. 특정한 실시예에서, 상기 항체는 전장 항체 (whole antibody)일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 단편일 수 있다.

[1078] 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[1079]

[1080] 본 출원은 화학식 10-1, 10-2 및 10-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 이때, 화학식 10-1 내지 10-3에 관한 내용은 상기 설명과 같다.

[1081] 특정한 실시예에서, D₁은 공유결합일 수 있다.

[1082] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-2 및 10-3의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[1083] 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-1 및 10-3의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[1084] 특정한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 단편은 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-1 및 10-2의 아미노산 서열을 포함하지 않을 수 있다. 나아가, 상기 항체 또는 이의 단편은 두 개의 Fc 도메인 중 하나에서만 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 또는 나아가, 상기 항체는 두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[1085]

[1086] 7.1. 항체-약물 콘주게이트 (antibody drug conjugate; ADC)

[1087] 본 출원에 의하여 신규한 항체-약물 콘주게이트 (antibody drug conjugate; ADC)가 개시된다. 본 출원에 의한 ADC는 항체-페이로드 콘주게이트 중 페이로드가 약물 모이어티를 포함하는 것을 의미한다.

[1088] 본 출원은 본 출원에 의한 C_m-Ab에 있어, 카고 모이어티가 약물 모이어티를 포함하는 것을 제공한다.

- [1089] 특정한 실시예에서, 상기 카고 모이어티는 2개 이상의 약물 모이어티를 포함할 수 있다.
- [1090] 특정한 실시예에서, 상기 약물 모이어티는 항암제일 수 있다. 나아가, 상기 항암제는 DM1, DM3, DM4, 아브린, 리친 A, 슈도모나스 엑소독신, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 종양 괴사 인자, α 인터페론, β 인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 사이토카인, 아포토시스 유도 제제, 항-신혈관형성 제제, 림포카인, 탁세인, DNA-알킬화 제제, 안트라시클린, 튜블리신 유사체, 듀오카르마이신 유사체, 오리스타틴 E, 오리스타틴 F, 마이탄시노이드, 반응성 폴리에틸렌글리콜 잔기를 포함하는 세포독성 제제, 탁손, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, t. 콜키신, 독소루비신, 도노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 메토틱렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 디카르바진, 메클로레타민, 티오테파클로람부실, 메이팔란, 카르무스틴, 로무스틴, 시클로포스파미드, 부설판, 디브로모마니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 시스플라틴, 닥티노마이신, 블레오마이신, 안트라마이신, 칼리키아마이신, 아비라테론, 벤다무스틴, 보르테조미드, 카르보플라틴, 카바지탁셀, 다사티닙, 도세탁셀, 에피루비신, 엘로티닙, 에베롤리무스, 켄시타빈, 제피티닙, 이다루비신, 이마티닙, 히드록시유레아, 라파티닙, 류프로레틴, 멜팔란, 네다플라틴, 닐로티닙, 옥살리플라틴, 파조파닙, 페메트렉세드, 피코플라틴, 로미덱신, 사트라플라틴, 소라페닙, 베무라페닙, 수니티닙, 테니포사이트, 트리플라틴, 및 비노렐빈 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [1091] 특정한 실시예에서, 상기 카고 모이어티는 VC 링커를 포함할 수 있다.
- [1092]
- [1093] 7.2. 항체-페이로드 콘쥬게이트의 제조 방법
- [1094] 본 출원에 의하여 항체-페이로드 콘쥬게이트의 제조 방법이 개시된다.
- [1095] 본 출원은 H_1 -Ab와 C_m -H₂를 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 이때 H_1 -Ab에 관한 것은 5.1.을 준용하고, C_m -H₂에 관한 것은 6.을 준용한다. H_1 -Ab의 제1 클릭화학작용기와 C_m -H₂의 제2 클릭화학작용기가 서로 상보적이면, 즉 서로 파트너 클릭화학작용기로 기능한다면 클릭화학반응이 일어나 본 출원에 의한 항체-페이로드 콘쥬게이트를 제조할 수 있다. 클릭화학반응에 대한 내용은 앞서 '정의' 부분에서 충분히 설명된 바 있다. 클릭화학반응은 생물직교반응으로서 매우 반응이 빠르게 일어나고 강한 결합구조를 형성하는 장점이 있어 이하의 7.3. 및 7.4.와 같은 장점을 갖는다.
- [1096]
- [1097] 본 출원은 본 출원에 의한 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체와 본 출원에

의한 페이로드를 반응시킴을 포함하고, 페이로드의 H_2 는 상기 제1 클릭화학작용기와 상보적인 제2 클릭화학작용기인 것을 특징으로 하는 항체-페이로드 콘쥬게이트의 제조 방법을 제공한다.

[1098] 이때, 상기 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체는 5.1.에서 제공된 것을 준용하고, 상기 페이로드는 6.에서 제공된 것을 준용한다. 5.1.로부터 246번 라이신, 및/또는 248번 라이신에 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체가 모두 개시되었으므로, 246번 라이신, 및/또는 248번 라이신에 카고 모이어티가 콘쥬게이트된 항체-페이로드 콘쥬게이트 역시 충분히 재현 가능할 정도로 개시되었다고 보는 것이 상당하다 (7.의 화학식 10 및 10-1 내지 10-3 참조).

[1099]

[1100] 본 출원은 본 출원에 의한 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체; 및 본 출원에 의한 페이로드를 포함하고, 페이로드의 H_2 는 상기 제1 클릭화학작용기와 상보적인 제2 클릭화학작용기인 것을 특징으로 하는 항체-페이로드 콘쥬게이트의 제조용 키트를 제공한다.

[1101] 이때, 상기 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체는 5.1.에서 제공된 것을 준용하고, 상기 페이로드는 6.에서 제공된 것을 준용한다.

[1102]

[1103] 또는, 본 출원은 항체;

[1104] 본 출원에 의한 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제;

[1105] 본 출원에 의한 페이로드를 포함하는

[1106] 항체-페이로드 콘쥬게이트의 제조용 키트를 제공한다.

[1107] 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 또는 248번 라이신에 특이적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하기 위한 H_1-L_2 -SSFI일 수 있다. 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하기 위한 H_1-L_2 -SSFI일 수 있다. 또 다른 특정한 실시예에서, 상기 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는 본 출원에 의하여 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하기 위한 H_1-L_2 -SSFI일 수 있다.

[1108]

[1109] 또는, 본 출원은 항체;

[1110] 본 출원에 의한 링커;

[1111] 본 출원에 의한 위치-특이적 항체 인터랙툼; 및

[1112] 본 출원에 의한 페이로드를 포함하는

[1113] 항체-페이로드 콘쥬게이트의 제조용 키트를 제공한다.

[1114] 특정한 실시예에서, 상기 링커에 있어 D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이며, 상기 위치-특이적 항체 인터랙툼에 있어 D_3 는 C_x 알킬렌이고, 이때

이때 y 는 1 이상인 정수일 수 있다. 나아가, $1 \leq x+y \leq 5$ 일 수 있다. 또는 나아가, $6 \leq x+y \leq 8$ 일 수 있다. 또는 나아가, $9 \leq x+y \leq 12$ 일 수 있다.

[1115]

[1116] 7.3. 본 출원에 의한 항체-페이로드 콘쥬게이트는 생물직교반응을 이용하여 안정한 결합을 이룬다 (the conjugate of antibody and payload according to the present invention utilize biorthogonal reaction, forming a highly stable bond)

[1117] 본 출원에 의한 항체-페이로드 콘쥬게이트는 클릭화학반응에 의하여 형성된다. 클릭화학반응은 생체 내의 자연적인 생물화학 현상에 영향을 끼치지 않는 생물직교반응이다. 나아가, 생물직교반응에 의하여 형성되는 결합은 생체 내의 분해 효소들 (lyase)에 의해 인식되지 않는다. 이에 본 출원에 의한 항체-페이로드 콘쥬게이트는 생체 내에서 항체와 카고 모이어티가 매우 안정한 결합을 이루는 장점을 가지고 있다.

[1118]

[1119] 7.4. 본 출원에 의해 제조된 항체-페이로드 콘쥬게이트는 높은 균일성 및 수율을 갖는다 (The antibody comprising first functional group prepared according to the present invention has high uniformity and yield)

[1120] 상기 5.6.에서 설명하였듯이, 본 출원에 의한 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체는 높은 균일성 및 수율을 갖는다. 따라서, 이로부터 준비되는 항체-페이로드 콘쥬게이트 역시 높은 균일성 및 수율을 갖는 장점을 공유한다. 항체 콘쥬게이트가 균일한 성능을 가지기 위해서는 C_m -Ab의 균일성이 높아야 한다.

[1121] 공개번호 US20180141976A1 및 WO2018199337A1의 기술에 의하여 제조된 항체 콘쥬게이트의 경우 5.6.에서 살펴본 바와 같이 수율 및 균일성이 떨어지므로, 성능의 균일함에 부정적인 영향이 있을 수 있다.

[1122]

[1123] 7.5. 본 출원에 의한 항체-페이로드 콘쥬게이트는 FcRn 결합 위치가 가려지지 않으므로 항체의 기능이 저하되지 않는다 (The antibody comprising the first functional group according to the present invention does not have its FcRn binding site shielded, by which functions of the antibody are not decreased)

[1124] 본 출원에 의한 C_m -Ab는 상기 5.7. 및 5.8.에 의한 장점을 공유한다. 특히, 체내에서 이용되는 ADC의 경우 반감기가 증가되어 ADC의 약동학적특성 (pharmacokinetics; PK)을 크게 개선할 수 있다.

[1125] 공개번호 US20180141976A1의 기술에 의하여 제조된 ADC의 경우 최종 항체 표지 산물에 SSFI가 포함되어 있어 FcRn 결합 위치가 가려진다. 따라서 본 출원의 ADC는 해당 기술에 의한 ADC에 비하여 PK가 우수하다.

[1126]

[1127] 7.6. 본 출원에 의한 항체-약물 콘쥬게이트는 생체반응성이 높은 화학작용기를 포함하지 않아 안정하다 (the conjugate of antibody and payload according to the

present invention does not comprise highly bioreactive functional group, by which the conjugate is safe and stable)

[1128] 본 출원에 의한 C_m -Ab는 상기 5.9.에 의한 장점을 공유한다. 특히, 체내에서 이용되는 ADC의 경우 항체-약물 작용이 원활해짐으로써 약력학적특성 (pharmacodynamics; PD)을 크게 개선할 수 있다.

[1129] 공개번호 WO2018199337A1의 기술에 의하여 제조된 ADC의 경우 최종 항체 표지 산물에 티올, 히드록시, 카르복시 산, 인산, 아민 등의 부가적인 화학작용기가 포함되어있다. 따라서 본 출원의 ADC는 해당 기술에 의한 ADC에 비하여 PD가 우수하다.

[1130]

[1131] 8. 조성물

[1132] 본 출원에 의하여 항체를 포함하는 조성물이 개시된다. 이때 상기 항체는 본 출원에 의한 제1 화학작용기를 포함하는 항체일 수 있다. 또는, 상기 항체는 본 출원에 의한 항체-페이로드 콘쥬게이트일 수 있다. 나아가, 상기 항체는 본 출원에 의한 항체-약물 콘쥬게이트일 수 있다.

[1133] 본 출원에 의한 조성물은 조성물에 포함된 항체의 기능에 따라 다양한 용도로 사용될 수 있다. 예컨대, 제1 화학작용기 또는 카고 모이어티가 방사성 모이어티를 포함하는 경우 해당 조성물은 방사성 조영제 등으로 사용될 수 있다. 또는, 제1 화학작용기 또는 카고 모이어티가 형광 모이어티를 포함하는 경우, 엘라이자 (ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay) 등에 사용되는 라벨로 사용될 수 있다. 또는, 제1 화학작용기 또는 카고 모이어티가 약물 모이어티를 포함하는 경우, 약학적 조성물로 사용될 수 있다. 이때 해당 기술분야에서 통상적으로 사용하는 조성물의 구성요소들은 본 출원의 내용에 포함된다. 또한, 통상적으로 사용되는 해당 구성요소의 조성비 역시 본 출원의 내용에 포함된다.

[1134]

[1135] 본 출원은 본 출원에 의한 제1 화학작용기를 포함하는 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정한 실시예에서, 상기 제1 화학작용기를 포함하는 항체는 화학식 7, 7-1 내지 7-3, 8, 및 8-1 내지 8-3 중 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[1136] 또는, 본 출원은 본 출원에 의한 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정한 실시예에서, 상기 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체는 화학식 8, 및 화학식 8-1 내지 8-3 중 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[1137] 또는, 본 출원은 본 출원에 의한 항체-페이로드 콘쥬게이트를 포함하는 조성물을 제공한다. 이때, 상기 항체-페이로드 콘쥬게이트에 관한 내용은 상기 7.을 준용한다.

[1138] 또는, 본 출원은 본 출원에 의한 항체-약물 콘쥬게이트를 포함하는 조성물을 제공한다. 이때, 상기 항체-약물 콘쥬게이트에 관한 내용은 상기 7.1.을 준용한다.

[1139]

[1140] 약학적 조성물

[1141] 하기의 내용은 상기 조성물이 진단, 예방, 및/또는 치료 용도로 사용되는 약학적 조성물인 경우에 관한 것이다. 이하의 "약학적 조성물"의 기재에만 한정하여 본 출원에 의한 R_1 -Ab, H_1 -Ab, C_m -Ab, 및 ADC를 모두 '항체 또는 이의 단편'으로 혼용하여 표현하도록 한다.

[1142]

[1143] 본 출원은 본 출원에 의한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 나아가, 상기 약학적 조성물은 암 치료용 조성물일 수 있다. 더 나아가, 상기 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 심장암, 자궁경부암, 대장암, 직장암, 식도암, 섬유육종, 위암, 위장암, 두경부암, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 골수종, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 고환 생식세포암, 흉선종 및 흉선암 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더욱 나아가, 상기 암은 유방암일 수 있다.

[1144] 본 출원은 본 출원에 의한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학적 조성물을 대상에 투여함을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 나아가, 상기 치료 방법은 암의 치료 방법일 수 있다. 더 나아가, 상기 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 심장암, 자궁경부암, 대장암, 직장암, 식도암, 섬유육종, 위암, 위장암, 두경부암, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 골수종, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 고환 생식세포암, 흉선종 및 흉선암 중 선택된 어느 하나일 수 있다. 더욱 나아가, 상기 암은 유방암일 수 있다.

[1145] 항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학적 또는 멸균 조성물을 제조하기 위해, 본 출원의 항체 또는 이의 단편은 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합된다. 조성물은 추가로 암 (유방암, 결장직장암, 폐암, 다발성 골수종, 난소암, 간암, 위암, 췌장암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골육종, 편평 세포암종, 말초 신경초 종양 슈반세포종, 두경부암, 방광암, 식도암, 바렛 식도암, 교모세포종, 투명 세포 연부 조직 육종, 악성 중피종, 신경섬유종증, 신암, 흑색종, 전립선암, 양성 전립선 비대증 (BPH), 여성형유방증, 횡문근육종 및 자궁내막증)을 치료 또는 예방하는데 적합한 하나 이상의 다른 치료제를 함유할 수 있다.

[1146] 치료제 및 진단제의 제제는 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와, 예를 들어 동결건조 분말, 슬러리, 수용액, 로션 또는 현탁액의 형태로 혼합함으로써 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hardman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman,

et al. (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000] 참조).

- [1147] 구체적 실시양태에서, 본 출원의 항체-약물 콘쥬게이트의 임상적 서비스 형태 (CSF)는 ADC, 숙신산나트륨 및 폴리소르베이트 20을 함유하는 바이알 내에 있는 동결건조물이다. 동결건조물은 주사용수로 재구성될 수 있고, 용액은 ADC, 숙신산나트륨, 수크로스 및 폴리소르베이트 20을 약 5.0의 pH에서 포함한다. 순차적 정맥내 투여를 위해, 수득된 용액은 보통 담체 용액 내로 추가로 희석될 것이다.
- [1148] 치료를 위한 투여 요법을 선택하는 것은 물질의 혈청 또는 조직 교체율, 증상 수준, 물질의 면역원성 및 생물학적 매트릭스에서의 표적 세포의 접근성을 비롯한 여러 요인에 따라 달라진다. 특정 실시양태에서, 투여 요법은 허용되는 부작용 수준에 부합하도록 환자에 전달되는 치료제의 양을 최대화한다. 따라서, 전달되는 생물제제의 양은 부분적으로는 특정 물질 및 치료되는 상태의 중증도에 따라 달라진다. 항체, 시토카인 및 소분자의 적합한 용량을 선택하는 것에서의 지침이 입수가능하다 (예를 들어, 문헌 [Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert et al., *New Engl. J. Med.* 348:601-608, 2003; Milgrom et al., *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973, 1999; Slamon et al., *New Engl. J. Med.* 344:783-792, 2001; Beniaminovitz et al., *New Engl. J. Med.* 342:613-619, 2000; Ghosh et al., *New Engl. J. Med.* 348:24-32, 2003; Lipsky et al., *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602, 2000] 참조).
- [1149] 적절한 용량은 예를 들어, 치료에 영향을 미치는 것으로 관련 기술분야에 공지되어 있거나 그러한 것으로 의심되거나, 또는 치료에 영향을 미칠 것으로 예측되는 파라미터 또는 인자를 사용하여 임상적에 의해 결정된다. 일반적으로, 용량은 최적 용량보다 다소 적은 양에서 시작하며, 그후 임의의 부정적 부작용에 비해 바람직하거나 최적의 효과가 달성될 때까지 소량 증분으로 증가시킨다. 중요한 진단 척도는, 예를 들어 염증의 증상 또는 생산된 염증성 시토카인의 수준을 포함한다.
- [1150] 본 출원의 약학적 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 없으면서 특정한 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양이 달성되도록 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 본 출원의 특정한 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정한 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용되는 특정한 조성물과 조합 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적 건강 및 이전 병력 및 의료

- 분야에 공지된 다른 요인을 비롯한 다양한 약동학 요인에 따라 결정될 것이다.
- [1151] 본 출원의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물은 연속 주입에 의해 또는, 예를 들어 1일, 1주의 간격으로, 또는 주당 1-7회, 격주 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 5주마다 1회, 6주마다 1회, 7주마다 1회 또는 8주마다 1회의 용량으로 제공될 수 있다. 용량은 정맥내, 피하, 국부, 경구, 비강내, 직장, 근육내, 뇌내, 또는 흡입에 의해 제공될 수 있다. 특정 용량 프로토콜은 유의한 바람직하지 않은 부작용을 방지하는 최대 용량 또는 투여 빈도를 수반하는 것이다.
- [1152] 본 출원의 항체 또는 이의 단편에 대해, 환자에게 투여되는 투여량은 0.0001 mg/kg 내지 100 mg/kg (환자 체중)일 수 있다. 투여량은 0.0001 mg/kg 내지 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 5 mg/kg, 0.0001 내지 2 mg/kg, 0.0001 내지 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.5 mg/kg, 0.0001 mg/kg 내지 0.25 mg/kg, 0.0001 내지 0.15 mg/kg, 0.0001 내지 0.10 mg/kg, 0.001 내지 0.5 mg/kg, 0.01 내지 0.25 mg/kg 또는 0.01 내지 0.10 mg/kg (환자 체중)일 수 있다. 본 출원의 항체 또는 이의 단편의 투여량은 환자의 체중 (킬로그램 (kg))에 투여되는 용량 (mg/kg)을 곱하는 것을 이용하여 계산될 수 있다.
- [1153] 본 출원의 항체 또는 이의 단편의 투여가 반복될 수 있고, 투여는 적어도 1일, 2일, 3일, 5일, 10일, 15일, 30일, 45일, 2개월, 75일, 3개월, 또는 적어도 6개월 간격일 수 있다. 구체적 실시양태에서, 본 출원의 항체 또는 이의 단편의 투여는 3주마다 반복된다.
- [1154] 치료될 상태, 환자의 전반적인 건강, 투여 방법 경로 및 용량, 및 부작용의 중증도와 같은 요인들에 따라 특정한 환자에 대한 유효량이 변할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Maynard et al., A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001] 참조).
- [1155] 투여 경로는, 예를 들어 국소 또는 피부 적용에 의해, 정맥내, 복강내, 뇌내, 근육내, 안내, 동맥내, 뇌척수내, 병변내 주사 또는 주입에 의해, 또는 지속 방출 시스템 또는 이식물에 의해 이루어질 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Sidman et al., Biopolymers 22:547-556, 1983; Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980]; 미국 특허 번호 6,350,466 및 6,316,024 참조). 필요한 경우에, 조성물은 또한 가용화제 및 국부 마취제, 예컨대 주사 부위의 통증을 완화하는 리도카인을 포함할 수 있다. 또한, 예를 들어 흡입기 또는 네블라이저의 사용, 및 에어로졸화제를 사용한 제제화에 의한 폐 투여도 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540 및 4,880,078; 및 PCT 공개 번호 WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 및 WO 99/66903을 참조하고, 이들 각각은 본원에 전문이

참조로 포함된다.

- [1156] 또한, 본 출원의 조성물은 관련 기술분야에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 통상의 기술자가 인지하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 본 출원의 항체 또는 이의 단편에 대한 선택된 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피내, 복막내, 피하, 척수 또는 기타 비경구 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 것을 포함한다. 비경구 투여는 경장 및 국소 투여 이외의 다른, 통상적으로 주사에 의한 투여 방식을 나타내고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 대안적으로, 본 출원의 조성물은 비-비경구 경로를 통해, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어, 비강내, 경구, 질, 직장, 설하 또는 국부 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 출원의 항체 또는 이의 단편은 주입에 의해 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 출원의 항체 또는 이의 단편은 피하 투여된다.
- [1157] 본 출원의 항체 또는 이의 단편이 제어 방출 또는 지연 방출 시스템에서 투여되는 경우, 제어 또는 지연 방출을 달성하기 위해 펌프가 사용될 수 있다 (문헌 [Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20, 1987; Buchwald et al., *Surgery* 88:507, 1980; Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574, 1989] 참조). 본 출원의 요법의 제어 또는 지속 방출을 달성하기 위해 중합체 물질이 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1983] 참조; 또한 문헌 [Levy et al., *Science* 228:190, 1985; During et al., *Ann. Neurol.* 25:351, 1989; Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105, 1989]; 미국 특허 번호 5,679,377; 미국 특허 번호 5,916,597; 미국 특허 번호 5,912,015; 미국 특허 번호 5,989,463; 미국 특허 번호 5,128,326; PCT 공개 번호 WO 99/15154; 및 PCT 공개 번호 WO 99/20253 참조). 지속 방출 제제에 사용된 중합체의 예는 폴리(2-히드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드 (PLG), 폴리무수물, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드 (PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLGA) 및 폴리오르토에스테르를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 지속 방출 제제에 사용되는 중합체는 불활성이고, 여과가능한 불순물이 없고, 저장, 멸균 및 생분해성에 대해 안정하다. 제어 또는 지연 방출 시스템이 예방 또는 치료 표적에 인접하게 놓일 수 있고, 따라서 전신 용량의 일부만을 필요로 한다 (예를 들어, 문헌 [Goodson, in Medical Applications of Controlled Release,

supra, vol. 2, pp. 115-138, 1984] 참조).

- [1158] 문헌 [Langer, Science 249:1527-1533, 1990]의 리뷰에서 제어 방출 시스템이 논의된다. 통상의 기술자에게 공지된 임의의 기술을 본 출원의 하나 이상의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 지속 방출 제제를 생산하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,526,938, PCT 공개 WO 91/05548, PCT 공개 WO 96/20698, 문헌 [Ning et al., Radiotherapy & Oncology 39:179-189, 1996; Song et al., PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, 1995; Cleek et al., Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997; and Lam et al., Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997]을 참조하고, 이들 각각은 본원에 전문이 참조로 포함된다.
- [1159] 본 출원의 항체 또는 이의 단편이 국소로 투여되는 경우에, 이는 연고, 크림, 경피 패치, 로션, 젤, 샴푸, 스프레이, 에어로졸, 용액, 에멀전 형태, 또는 통상의 기술자에게 널리 공지된 다른 형태로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)]을 참조한다. 비-분무가능한 국소 투여 형태의 경우, 국소 적용에 적합한 담체 또는 하나 이상의 부형제를 포함하고 몇몇 경우에 물보다 큰 동적 점도를 갖는 점성 내지 반고체 또는 고체 형태가 일반적으로 사용된다. 적합한 제제는, 원하는 경우에 멸균되거나 예를 들어 삼투압과 같은 다양한 특성에 영향을 주는 보조제 (예를 들어, 보존제, 안정화제, 습윤제, 완충제, 또는 염)와 혼합되는 용액, 현탁액, 에멀전, 크림, 연고, 분말, 도찰제, 살브 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 적합한 국소 투여 형태는 몇몇 경우에 활성 성분이 고체 또는 액체 불활성 담체와 조합되어 압축 휘발물질 (예를 들어, 기체상 추진제, 예컨대 프레온)의 혼합물에 또는 압착병에 충전되는 분무가능한 에어로졸 제제를 포함한다. 보습제 또는 함습제가 또한 원하는 경우에 약학적 조성물 및 투여 형태에 첨가될 수 있다. 이러한 추가의 성분의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [1160] 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물이 비강 내로 투여되는 경우, 이는 에어로졸 형태, 스프레이, 미스트 내에 또는 점적제의 형태로 제제화될 수 있다. 특히, 본 출원에 따라 사용하기 위한 예방제 또는 치료제는 적합한 추진제 (예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체)를 사용하여 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 제공 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우에, 투여 단위는 계량된 양을 전달하기 위해 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한, 캡슐 및 카트리지 (예를 들어, 젤라틴으로 구성됨)는 화합물의 분말 혼합물 및 적합한 분말 기제, 예컨대 락토스 또는 전분을 함유하여 제제화될 수 있다.
- [1161] 제2 치료제, 예를 들어 시토카인, 스테로이드, 화학요법제, 항생제, 또는 방사선과 함께 공투여하거나 치료하기 위한 방법은 관련 기술분야에 공지되어

있다 (예를 들어, 문헌 [Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.] 참조). 유효량의 치료제는 증상을 적어도 10%; 적어도 20%; 적어도 약 30%; 적어도 40%, 또는 적어도 50% 감소시킬 수 있다.

- [1162] 본 출원의 항체 또는 이의 단편과 조합되어 투여될 수 있는 추가적인 요법 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)은 본 출원의 항체 또는 이의 단편과 5분 미만의 간격, 30분 미만의 간격, 1시간 간격, 약 1시간 간격, 약 1 내지 약 2시간 간격, 약 2시간 내지 약 3시간 간격, 약 3시간 내지 약 4시간 간격, 약 4시간 내지 약 5시간 간격, 약 5시간 내지 약 6시간 간격, 약 6시간 내지 약 7시간 간격, 약 7시간 내지 약 8시간 간격, 약 8시간 내지 약 9시간 간격, 약 9시간 내지 약 10시간 간격, 약 10시간 내지 약 11시간 간격, 약 11시간 내지 약 12시간 간격, 약 12시간 내지 18시간 간격, 18시간 내지 24시간 간격, 24시간 내지 36시간 간격, 36시간 내지 48시간 간격, 48시간 내지 52시간 간격, 52시간 내지 60시간 간격, 60시간 내지 72시간 간격, 72시간 내지 84시간 간격, 84시간 내지 96시간 간격, 또는 96시간 내지 120시간 간격으로 투여될 수 있다. 2종 이상의 요법제는 동일한 환자 방문 내에 투여될 수 있다.
- [1163] 특정 실시양태에서, 본 출원의 항체 또는 이의 단편은 생체내 적합한 분포를 확실히 하도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽 (BBB)은 다수의 고도의 친수성 화합물을 제외한다. 본 출원의 치료 화합물이 (원하는 경우에) BBB를 확실히 횡단하도록 하기 위해서는, 이들을 예를 들어 리포솜 내에 제제화할 수 있다. 리포솜 제조 방법에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331을 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관 내로 선택적으로 수송되어 표적화 약물 전달을 증진시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685] 참조). 예시적인 표적화 모이어티는 폴레이트 또는 비오틴 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,416,016 (Low et al.) 참조); 만노시드 (문헌 [Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]); 항체 (문헌 [Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]); 계면활성제 단백질 A 수용체 (문헌 [Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233:134]; p 120 (문헌 [Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:9090])를 포함하며; 또한 문헌 [also K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273]을 참조한다.
- [1164] 본 출원은 본 출원의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 단독으로 또는 다른 요법과 조합하여 투여하기 위한 프로토콜을 제공한다. 본 출원의 조합 요법의 요법제 (예를 들어, 예방제 또는

치료제)는 대상체에게 공동으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 본 출원의 조합 요법의 요법제 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 또한 주기적으로 투여될 수 있다. 주기적 요법은 소정의 기간 동안의 제1 요법제 (예를 들어, 제1 예방제 또는 치료제)의 투여, 이어서 소정의 기간 동안의 제2 요법제 (예를 들어, 제2 예방제 또는 치료제)의 투여 및 상기 순차적인 투여의 반복, 즉 요법제 (예를 들어, 작용제) 중 하나에 대한 내성의 발생을 감소시키고/거나, 요법제 (예를 들어, 작용제) 중 하나의 부작용을 방지 또는 감소시키고/거나, 요법제의 효능을 개선시키기 위한 순환을 포함한다.

[1165] 본 출원의 조합 요법의 요법제 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 대상체에게 공동으로 투여할 수 있다.

[1166] "공동으로"라는 용어는 요법들 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)을 정확히 동시에 투여하는 것에 한정되지 않고, 그보다는 본 출원의 항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학적 조성물이 대상체에게 순서대로, 및 본 출원의 항체가 다른 요법(들)과 함께 이들이 다르게 투여된 경우보다 증가된 이익을 제공하도록 작용할 수 있는 시간 간격으로 투여되는 것을 의미한다. 예를 들어, 각각의 요법제는 동시에 또는 상이한 시점에서 임의의 순서로 순차적으로 대상체에게 투여될 수 있지만; 동시에 투여되지 않을 경우에도, 이들은 목적하는 치료 또는 예방 효과를 제공하기 위해 충분히 가까운 시간 간격으로 투여되어야 한다. 각각의 요법제는 임의의 적절한 형태로 및 임의의 적합한 경로에 의해 대상체에게 개별 투여될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 요법제 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 대상체에게 15분 미만, 30분 미만, 1시간 미만, 약 1시간, 약 1 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 3시간, 약 3시간 내지 약 4시간, 약 4시간 내지 약 5시간, 약 5시간 내지 약 6시간, 약 6시간 내지 약 7시간, 약 7시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 9시간, 약 9시간 내지 약 10시간, 약 10시간 내지 약 11시간, 약 11시간 내지 약 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 또는 1주의 간격으로 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 2종 이상의 요법제 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)는 동일한 환자 방문 내에 투여된다.

[1167] 조합 요법의 예방제 또는 치료제는 대상체에게 동일한 약학적 조성물 내에서 투여될 수 있다. 대안적으로, 조합 요법의 예방제 또는 치료제는 대상체에게 개별 약학적 조성물 내에서 공동으로 투여할 수 있다. 예방제 또는 치료제는 대상체에게 동일한 또는 상이한 투여 경로로 투여될 수 있다.

[1168]

[1169] 실험예

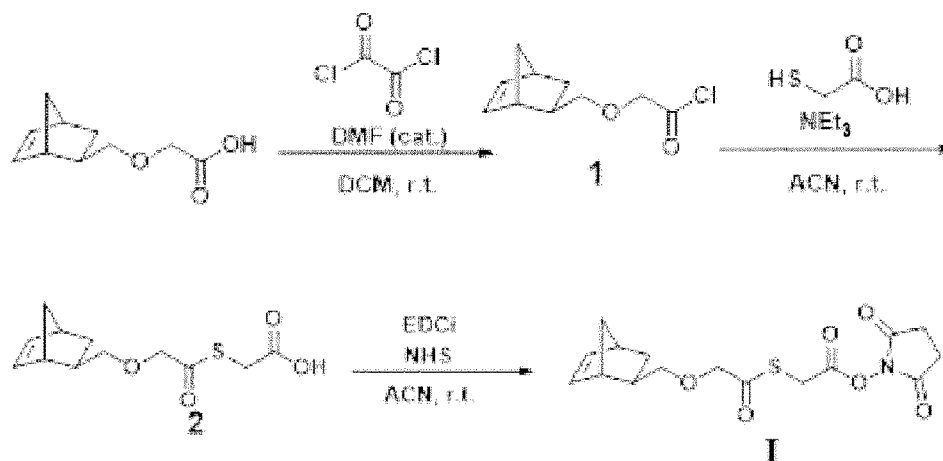
[1170] 1. 항체에 대한 위치특이적 제1 클릭화학작용기 전달용 제제를 제조하기 위한 화합물들의 제조예

[1171] 1.1. 링커 (H_1-L_1)의 합성 및 구조 확인

[1172] 1.1.1.: 화합물 I (SO1 Linker: NHS & Norbornene)

[1173] [반응식 6]

[1174]



[1175] 화합물 I의 합성 (반응식 6, 도 15)

[1176] 화합물 1의 합성

[1177] 2-(바이사이클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일메톡시)아세트산 2 g (10.98 mmol, 1.0 eq)을 DCM 50 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 DMF 0.085 mL (1.098 mmol, 0.1 eq), Oxalyl chloride 1.91 mL (21.96 mmol, 2.0 eq)를 천천히 적가하였다. 반응 용액을 3 시간 동안 교반한 뒤, 감압 농축하여 목적 화합물을 1.97 g 획득하였다 (yield: 90%).

[1178]

[1179] 화합물 2의 합성

[1180] 1.97 g (9.88 mmol, 1.0 eq)의 화합물 1을 Acetonitrile (ACN) 20 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 Thioglycolic acid 0.68 mL (9.88 mmol, 1.0 eq), Triethylamine 2.06 mL (14.82 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하였다. 18 시간 동안 교반시킨 후 반응 용액을 감압 농축하고 물을 추가하여 Ethylacetate (EA)로 3회 추출하였다. 황산 마그네슘을 이용하여 유기 층을 건조하고 감압 농축한 뒤 컬럼크로마토그래피 (DCM:MeOH = 10:1)를 이용하여 정제하였고, 목적 화합물을 2.05 g (yield: 79%)를 획득하였다.

[1181] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.15 - 6.01 (m, 2H), 4.20 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 3.77 - 3.71 (m, 2H), 3.68 - 3.57 (m, 1H), 3.56 - 3.45 (m, 1H), 2.84 (s, 2H), 1.81 - 1.69 (m, 2H), 1.30 (ddd, J = 19.8, 14.5, 8.6 Hz, 4H), 1.15 (ddd, J = 16.0, 7.6, 3.3 Hz, 1H).

[1182]

[1183] 화합물 I의 합성

[1184] 2.05 g (7.81 mmol, 1.0 eq)의 화합물 2를 ACN 50 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) 2.76 g (14.44 mmol, 1.8 eq), N-hydroxysuccinimide (NHS) 2.21 g (19.25 mmol, 2.46 eq)를 첨가하였다. 반응 용액을 18 시간 동안 교반한 뒤, 감압 농축하고 물을 추가하여

EA로 3회 추출하였다. 유기 층을 회수하여 황산마그네슘으로 건조하고 감압 농축한 뒤 잔류물을 실리카겔 컬럼 상에서 크로마토그래피 (EA:Hex = 2:1)로 정제하였고, 목적 화합물을 2.7 g (yield: 98%)을 수득하였다.

[1185] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.15 - 6.03 (m, 2H), 4.45 (s, 1H), 4.21 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.65 (dd, J = 12.0, 7.3 Hz, 1H), 3.52 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 2.83 (dd, J = 24.4, 11.8 Hz, 6H), 1.81 - 1.67 (m, 1H), 1.30 (dq, J = 27.0, 9.5 Hz, 4H), 1.16 (ddd, J = 15.3, 7.4, 3.8 Hz, 1H).

[1186]

[1187] 화합물 I의 구조 확인

[1188] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.15 - 6.03 (m, 2H), 4.45 (s, 1H), 4.21 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.65 (dd, J = 12.0, 7.3 Hz, 1H), 3.52 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 2.83 (dd, J = 24.4, 11.8 Hz, 6H), 1.81 - 1.67 (m, 1H), 1.30 (dq, J = 27.0, 9.5 Hz, 4H), 1.16 (ddd, J = 15.3, 7.4, 3.8 Hz, 1H).

[1189]

[1190] LRMS (ESI): m/z 371.2 [$\text{M} + \text{NH}_4^+$]

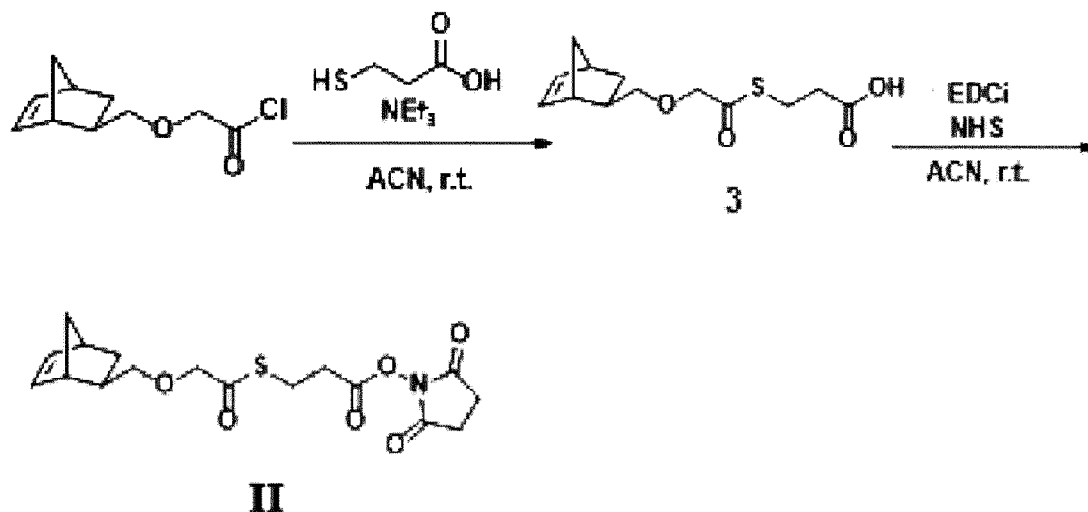
[1191] 질량 분석을 통해 화합물 I을 확인하였으며, 그 결과를 도 16에 도시하였다.

[1192]

[1193] 1.1.2. 화합물 II (SO₂ Linker: NHS & Norbornene)

[1194] [반응식 7]

[1195]



[1196] 화합물 II의 합성 (반응식 7, 도 17)

[1197] 화합물 3의 합성

[1198] 0.55 g (2.33 mmol, 1.0 eq)의 화합물 1을 Acetonitrile (ACN) 5 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 3-Mercaptopropionic acid 0.2 mL (2.33 mmol, 1.0 eq), Triethylamine 0.49 mL (3.49 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하였다. 11 시간 동안 교반시킨 후 반응 용액을 감압 농축하고 물을 추가하여 Ethyl acetate (EA)로 3회 추출하였다. 황산 마그네슘을 이용하여 유기층을 건조하고 감압 농축한 뒤

실리카겔 컬럼크로마토그래피 (DCM:MeOH = 10:1)를 이용하여 정제하였고, 목적 화합물을 0.56 g (yield: 89%)를 획득하였다.

[1199]

[1200] 화합물 II의 합성

[1201] 0.56 g (2.07 mmol, 1.0 eq)의 화합물 3을 Acetonitrile (ACN) 10 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) 0.81 g (4.21 mmol, 2.0 eq), N-hydroxysuccinimide (NHS) 0.65 g (5.61 mmol, 2.7 eq)를 첨가하였다. 반응 용액을 12 시간 동안 교반한 뒤, 감압 농축하고 물을 추가하여 EA로 3회 추출하였다. 유기층을 황산마그네슘으로 건조하고 감압 농축한 뒤 잔류물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (EA:Hex = 2:1)를 이용하여 정제하였고, 목적 화합물을 0.63 g (yield: 83%)을 수득하였다.

[1202]

[1203] 화합물 II의 구조 확인

[1204] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.16-6.14 (m, 2H), 4.45 (s, 1H), 4.21 - 4.08 (m, 1H), 3.69 - 3.58 (m, 1H), 3.51 (dt, $J = 14.5, 8.9$ Hz, 1H), 3.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.96 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.79-2.83 (m, 6H), 1.81 - 1.67 (m, 1H), 1.37 - 1.21 (m, 4H), 1.13-1.18 (m, 1H).

[1205] LRMS (ESI): m/z 385.1 [$\text{M} + \text{NH}_4^+$]

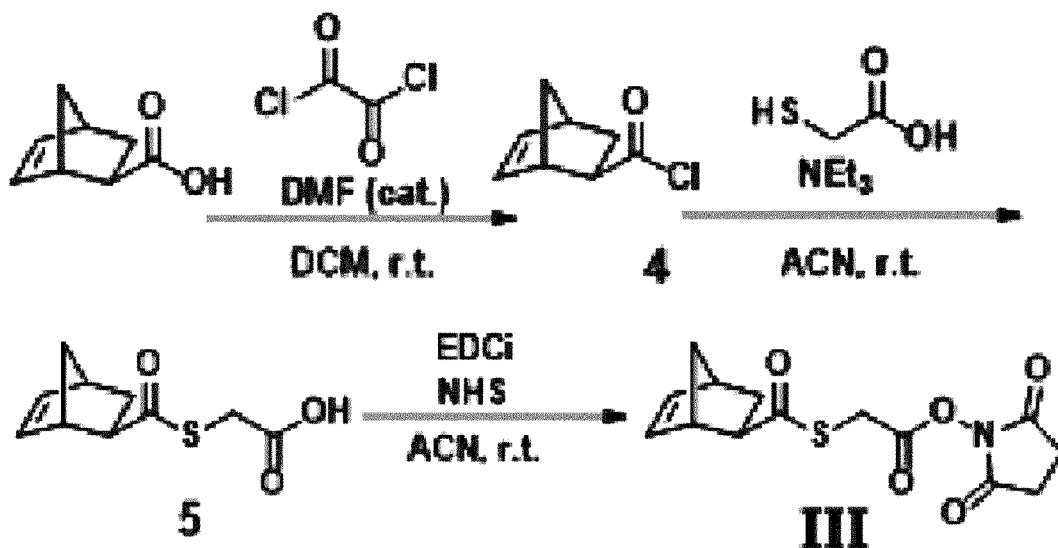
[1206] 질량 분석을 통해 화합물 II를 확인하였으며, 그 결과를 도 18에 도시하였다.

[1207]

[1208] 1.1.3. 화합물 III (SO₃ Linker: NHS & Norbornene)

[1209] [반응식 8]

[1210]



[1211] 화합물 III의 합성 (반응식 8, 도 19)

[1212] 화합물 4의 합성

[1213] exo-5-Norbornenecarboxylic acid 0.5 g (3.62 mmol, 1.0 eq)을 DCM 20 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 DMF 0.028 mL (0.37 mmol, 0.94 eq), Oxalyl

chloride 0.63 mL (7.24 mmol, 2.0 eq)를 천천히 적가하였다. 반응 용액을 3 시간 동안 교반한 뒤, 감압 농축하여 목적 화합물을 0.47 g 획득하였다 (yield: 83%).

[1214]

[1215] 화합물 5의 합성

[1216] 0.47 g (3.0 mmol, 1.0 eq)의 화합물 4를 Acetonitrile (ACN) 15 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 Thioglycolic acid 0.21 mL (3.0 mmol, 1.0 eq), Triethylamine 0.63 mL (4.5 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하였다. 18 시간 동안 교반시킨 후 반응 용액을 감압 농축하고 물을 추가하여 Ethylacetate (EA)로 3회 추출하였다. 황산마그네슘을 이용하여 유기 층을 건조하고 감압 농축한 뒤 컬럼크로마토그래피 (DCM:MeOH = 10:1)를 이용하여 정제하였고, 목적 화합물을 0.3 g (yield: 47%)를 획득하였다.

[1217] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.82 (brs, 1H), 6.24 - 6.07 (m, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.12 (s, 1H), 2.97 (s, 1H), 2.54 (dd, $J = 9.0, 4.7$ Hz, 1H), 2.04 - 1.87 (m, 1H), 1.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 1.48 - 1.35 (m, 2H).

[1218]

[1219] 화합물 III의 합성

[1220] 0.26 g (1.22 mmol, 1.0 eq)의 화합물 5를 Acetonitrile (ACN) 15 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) 0.35 g (1.83 mmol, 1.5 eq), N-hydroxysuccinimide (NHS) 0.28g (2.44 mmol, 2.0 eq)를 첨가하였다. 반응 용액을 3 시간 동안 교반한 뒤, 감압 농축하고 물을 추가하여 EA로 3회 추출하였다. 유기 층을 회수하여 황산마그네슘으로 건조하고 감압 농축한 뒤 잔류물을 실리카겔 컬럼 상에서 크로마토그래피 (EA:Hex = 2:1)로 정제하였고, 목적 화합물을 0.32 g (yield: 85%)을 수득하였다.

[1221]

[1222] 화합물 III의 구조 확인

[1223] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.21 (dd, $J = 5.5, 3.0$ Hz, 1H), 6.15 (dd, $J = 5.5, 3.1$ Hz, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.15 (s, 1H), 2.98 (s, 1H), 2.86 (s, 4H), 2.54 (dd, $J = 9.2, 4.6$ Hz, 1H), 2.02 (dt, $J = 11.9, 4.0$ Hz, 1H), 1.59 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 1.46 - 1.36 (m, 2H).

[1224] LCMS (ESI): m/z 332.16 [$\text{M} + \text{Na}^+$]

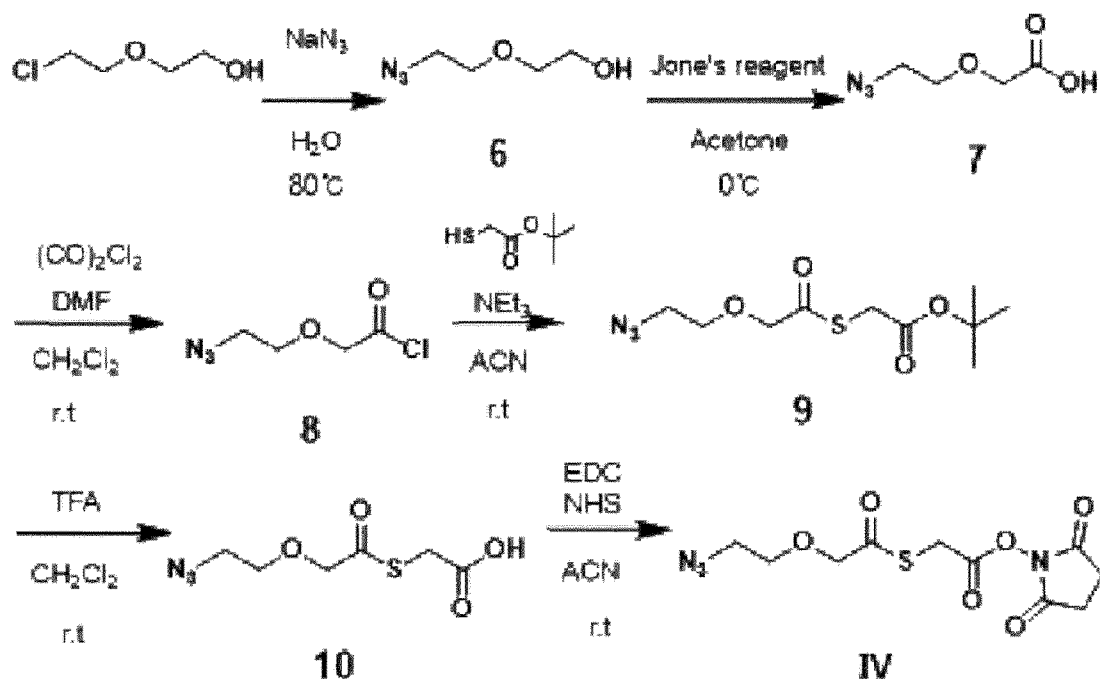
[1225] 질량 분석을 통해 화합물 III를 확인하였으며, 그 결과를 도 20에 도시하였다.

[1226]

[1227] 1.1.4. 화합물 IV (SO₄ Linker: NHS & azide)

[1228] [반응식 9]

[1229]



[1230] 화합물 IV의 합성 (반응식 9, 도 21 및 22)

[1231] 화합물 6의 합성

[1232] 2-(2-chloroethoxy)ethanol (2 ml, 18.94 mmol)을 증류수 (12 ml)에 녹인 후 NaN₃ (3.08 g, 47.35 mmol, 2.5 eq)를 넣고 80°C에서 16시간동안 교반시킨다. 실온으로 식힌 후 반응혼합물을 5% NaOH(aq) (20 ml)에 붓고 10분정도 교반시킨다. 반응혼합물을 diethyl ether로 3회추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 건조하여 필터한다. 여액을 감압농축하여 목적 화합물을 2.47 g (yield: 99%)를 획득하였다.

[1233]

[1234] 화합물 7의 합성

[1235] 2.47 g (18.84 mmol)의 화합물 6을 Acetone (50 ml)에 녹인 후 0°C에서 1M jone's reagent (75.36 ml, 75.36 mmol, 4 eq)를 천천히 넣는다. 반응혼합물을 0°C에서 3시간동안 교반한 후 실온으로 올린 뒤 10분정도 교반한다. 반응혼합물을 Ethyl acetate(EA)로 3회 추출하고 유기층을 황산마그네슘으로 건조하여 필터하였다. 필터한 여액을 감압농축시켜 목적 화합물을 2.69 g (yield: 98%)를 획득하였다.

[1236]

[1237] 화합물 8의 합성

[1238] 2.69 g (18.57 mmol, 1.0 eq)의 화합물 7을 DCM 50 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 DMF 0.1 mL (1.29 mmol, 0.07 eq), Oxalyl chloride 2.43 mL (27.86 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하였다. 반응 용액을 3 시간 동안 교반한 뒤, 감압 농축하여 목적 화합물을 2.42 g 획득하였다 (yield: 80%).

[1239]

[1240] 화합물 9의 합성

[1241] 0.88 g (5.40 mmol, 1.0 eq)의 화합물 8을 DCM 30 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 *tert*-butyl 2-mercaptoacetate 0.8 g (5.40 mmol, 1.0 eq), *N,N*-Diisopropylethylamine 1.41 mL (8.10 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하였다. 2 시간 동안 교반시킨 후 반응 혼합물을 감압 농축하고 물을 추가하여 Dichloromethane (DCM)으로 3회 추출하였다. 황산 마그네슘을 이용하여 유기층을 건조하고 감압 농축한 뒤 컬럼크로마토그래피 (Hex:EA = 5:1)를 이용하여 정제하였고, 목적 화합물을 0.73 g (yield: 49%)를 획득하였다.

[1242]

[1243] 화합물 10의 합성

[1244] 0.73 g (2.66 mmol, 1 eq)의 화합물 9를 DCM 10 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 trifluoroacetic acid 10 mL (129.8 mmol, 48 eq)을 천천히 적가하였다. 8시간 동안 교반시킨 후 반응용액을 감압농축하여 목적화합물을 0.40 g (yield: 70%)를 획득하였다.

[1245]

[1246] 화합물 IV의 합성

[1247] 1.97 g (9.0 mmol, 1.0 eq)의 화합물 10을 Acetonitrile (ACN) 25 mL에 용해시킨 후, 상온에서 교반하면서 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) 2.58 g (13.5 mmol, 1.5 eq), *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 2.07 g (18.0 mmol, 2.0 eq)를 첨가하였다. 반응 용액을 3 시간 동안 교반한 뒤, 감압 농축하고 물을 추가하여 EA로 3회 추출하였다. 유기 층을 회수하여 황산마그네슘으로 건조하고 감압 농축한 뒤 잔류물을 실리카겔 컬럼 상에서 크로마토그래피 (EA:Hex = 2:1)로 정제하였고, 목적 화합물을 1.03 g (yield: 36%)을 수득하였다.

[1248]

[1249] 화합물 IV의 구조 확인

[1250] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.30 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.87 - 3.75 (m, 2H), 3.55 - 3.47 (m, 2H), 2.86 (s, 4H).

[1251] LRMS (ESI): *m/z* 334.0 [M+ NH₄⁺]

[1252]

[1253] 질량 분석을 통해 화합물 IV를 확인하였으며, 그 결과를 도 23에 도시하였다.

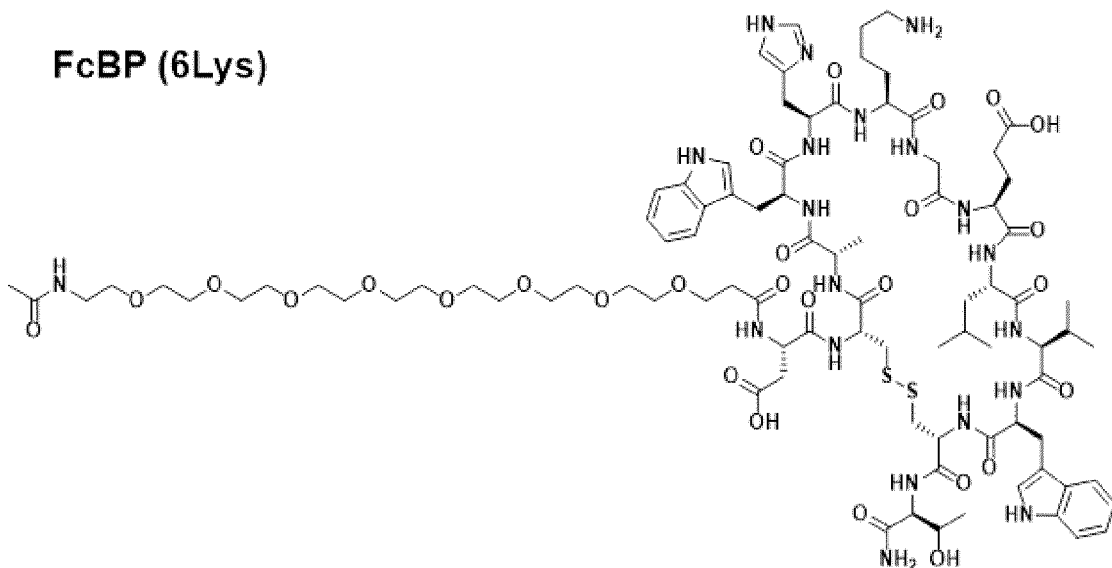
[1254]

[1255] 1.2. 위치-특이적 Fc 인터랙툼 (SSFI)의 합성 및 구조 확인

[1256] 1.2.1. SSFI (Xa₁이 라이신인 경우) 합성 및 구조 확인

[1257] SSFI (6Lys)의 합성

[1258]

FcBP (6Lys)

[1259] 사용된 Fmoc 아미노산 목록 및 도입순서

[1260] Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH.

[1261]

[1262] 제조 방법

[1263] (a) 아미노산 도입

[1264] 하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole에 기초하였다. 0.5 g의 Clear amide resin (0.48 mmole/g, PeptideInternational, 미국)를 합성 반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩타이드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다.

[1265] Fmoc-아미노산을 활성화하여 Clear amide resin에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다.

[1266] Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 2 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 그리고 174 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.

[1267] 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1회 더 반복하거나 20% Ac_2O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 목표한 펩타이드 서열이 완성될 때까지 반복하여 진행하였다.

[1268] (b) H-PEG8-OH의 도입

[1269] 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 H-PEG₈-OH를 도입하기 위하여 1

mL 0.5 M Fmoc-N-amido-dPEG8-acid in DMF 용액, 1 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 1 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 그리고 87 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 반응 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.

[1270] 반응의 진행은 카이저 시험법으로 확인하였으며, 미반응 아민이 남아있는 것으로 판단되면 반응 시간을 1 ~ 3시간 더 연장하거나 반응액을 비우고 상기의 반응 과정을 다시 반복하였다. N-말단의 Fmoc 보호기의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF를 사용하여 수행한 다음, 펩타이드가 부착된 레진을 건조하고 중량을 측정하였다.

[1271] (c) 상기 (b) 과정에서 준비한 펩타이드가 부착된 수지 250 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT (94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 mL과 함께 실온에서 120 분간 교반하여 레진에서 펩타이드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩타이드를 침전시켰다. 침전된 펩타이드를 에테르로 3 회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% ACN 함유 물에 녹인 다음 6 시간 동안 교반한 다음 농축하였다.

[1272] 농축액을 5%-DMSO-20%-ACN 함유 0.01 M ammonium acetate buffer (pH 6.5) 용액에 0.1 mg/mL 농도로 녹인 다음 공기 노출된 상태로 3 일 동안 교반하였다. 이황화 결합 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며, 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결건조하여 펩타이드 침전물을 얻었다.

[1273] (d) 정제

[1274] 상기 (c) 과정에서 동결건조하여 얻은 펩타이드 침전물을 하기 표 4에 기재된 prep-LC 1차 정제 조건에서 분리한 다음 하기 표 5에 기재된 prep-LC 2차 정제 조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩타이드는 각각 90% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩타이드의 분자량을 LC/MS 질량 분석기로 확인하였다.

[1275] H-PEG8-Asp-Cys*-Ala-Trp-His-Lys-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys*-Thr-NH₂ (Cys*: 이황화 결합 위치)

[1276] <표 4> Prep-LC 1차 정제조건

Prep-LC 1차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-20% ACN / 0.1% TFA in 80% ACN		
구배	0 min → 30 min : B 0% → B 100%		
유속	17 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1277]

<표 5> Prep-LC 2차 정제조건

Prep-LC 2차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-30% ACN / 0.1% TFA in 70% ACN		
구배	0 min $\rightarrow$ 30 min : B 0% $\rightarrow$ B 100%		
유속	15 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1278] SSFI (6Lys)의 구조 확인

[1279] 매트릭스 보조 레이저 탈착 / 이온화(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 질량 분석에 의한 분자량 측정을 통해 SSFI(6Lys)의 합성을 확인하였음

[1280] 측정 장비 : Ultraflexxtreme (Bruker)

[1281] 측정 matrix : CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) & DHB(2,5-Dihydroxybenzoic acid)

[1282] Calculated molecular weight : 2010.29 g/mol

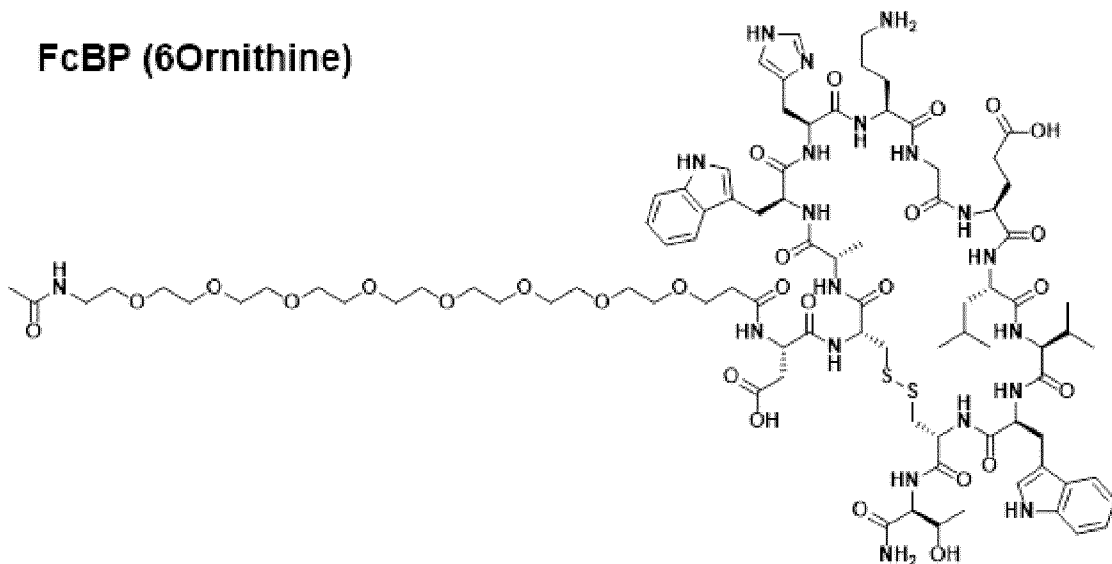
[1283] Measured molecular weight (M+H)⁺ : 2011.89 g/mol

[1284] SSFI(6Lys)에 대한 질량 분석 결과를 도 24에 도시하였다.

[1285]

[1286] 1.2.2. SSFI (Xa₁이 오르니틴인 경우) 합성 및 구조 확인

[1287]

FcBP (6Ornithine)

[1288] SSFI (6Orn)의 합성

[1289] 사용된 Fmoc 아미노산 목록 및 도입순서

[1290] Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH,

Fmoc-Asp(tBu)-OH,

[1291]

[1292] 제조 방법

[1293] 제조 방법

[1294] (a) 아미노산 도입

[1295] 하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole에 기초하였다. 0.5 g의 Clear amide resin (0.48 mmole/g, PeptideInternational, 미국)를 합성 반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩타이드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다.

[1296] Fmoc-아미노산을 활성화하여 Clear amide resin에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다.

[1297] Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 2 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 그리고 174 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.

[1298] 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1회 더 반복하거나 20% Ac_2O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 목표한 펩타이드 서열이 완성될 때까지 반복하여 진행하였다.

[1299] (b) H-PEG8-OH의 도입

[1300] 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 H-PEG₈-OH를 도입하기 위하여 1 mL 0.5 M Fmoc-N-amido-dPEG8-acid in DMF 용액, 1 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 1 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 그리고 87 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 반응 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.

[1301] 반응의 진행은 카이저 시험법으로 확인하였으며, 미반응 아민이 남아있는 것으로 판단되면 반응 시간을 1 ~ 3시간 더 연장하거나 반응액을 비우고 상기의 반응 과정을 다시 반복하였다. N-말단의 Fmoc 보호기의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF를 사용하여 수행한 다음, 펩타이드가 부착된 레진을 건조하고 중량을 측정하였다.

[1302] (c) 상기 (b) 과정에서 준비한 펩타이드가 부착된 수지 250 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT (94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 mL과 함께 실온에서 120 분간 교반하여 레진에서 펩타이드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩타이드를 침전시켰다. 침전된 펩타이드를 에테르로 3 회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% ACN 함유 물에 녹인 다음 6 시간 동안 교반한 다음 농축하였다.

[1303] 농축액을 5%-DMSO-20%-ACN 함유 0.01 M ammonium acetate buffer (pH 6.5) 용액에 0.1 mg/mL 농도로 녹인 다음 공기 노출된 상태로 3 일 동안 교반하였다.

이황화 결합 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며, 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결건조하여 펩타이드 침전물을 얻었다.

[1304] (d) 정제

[1305] 상기 (c) 과정에서 동결건조하여 얻은 펩타이드 침전물을 하기 표 6에 기재된 prep-LC 1차 정제 조건에서 분리한 다음 하기 표 7에 기재된 prep-LC 2차 정제 조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩타이드는 각각 90% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩타이드의 분자량을 LC/MS 질량 분석기로 확인하였다.

[1306] H-PEG8-Asp-Cys*-Ala-Trp-His-Orn-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys*-Thr-NH₂ (Cys* : 이황화 결합 위치)

[1307] <표 6> prep-LC 1차 정제 조건

Prep-LC 1차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 µm OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-20% ACN / 0.1% TFA in 80% ACN		
구배	0 min → 30 min : B 0% → B 100%		
유속	17 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1308] <표 7> prep-LC 2차 정제 조건

Prep-LC 2차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 µm OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-30% ACN / 0.1% TFA in 70% ACN		
구배	0 min → 30 min : B 0% → B 100%		
유속	15 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1309] SSFI (6Orn)의 구조 확인

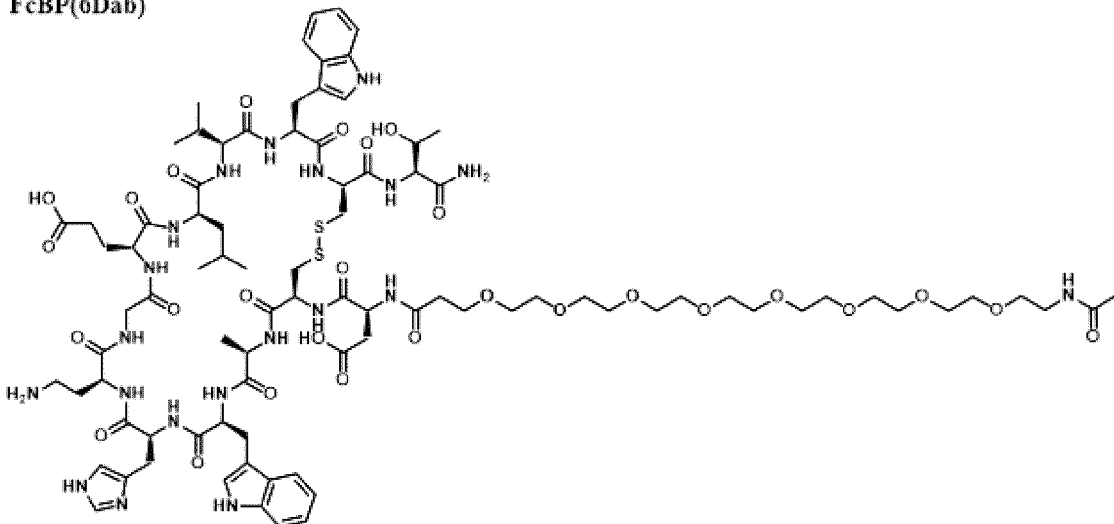
[1310] 매트릭스 보조 레이저 탈착 / 이온화(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 질량 분석에 의한 분자량 측정을 통해 SSFI(6Ornithine)의 합성을 확인하였음

[1311] 측정 장비 : Ultraflex extreme (Bruker)

[1312] 측정 matrix : CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) & DHB(2,5-Dihydroxybenzoic acid)

[1313] Calculated molecular weight : 1996.26 g/mol

- [1314] Measured molecular weight ($M+2H$)²⁺ : 999.13 g/mol
- [1315] SSFI(6Orn)에 대한 질량 분석 결과를 도 25에 도시하였다.
- [1316] 1.2.3. SSFI (Xa₁이 디아미노뷰티릭산 (Dab)인 경우) 합성 및 구조 확인
- [1317] **FcBP(6Dab)**



- [1318] SSFI (6Dab)의 합성
- [1319] 사용된 Fmoc 아미노산 목록 및 도입순서
- [1320] Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH,
- [1321]
- [1322] 제조 방법
- [1323] 제조 방법
- [1324] (a) 아미노산 도입
- [1325] 하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole에 기초하였다. 0.5 g의 Clear amide resin (0.48 mmole/g, PeptideInternational, 미국)를 합성 반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩타이드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다.
- [1326] Fmoc-아미노산을 활성화하여 Clear amide resin에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다.
- [1327] Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 2 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 그리고 174 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.
- [1328] 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1회 더 반복하거나 20% Ac₂O 함유 DMF 용액으로 캡핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에

DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 목표한 펩타이드 서열이 완성될 때까지 반복하여 진행하였다.

[1329] (b) H-PEG8-OH의 도입

[1330] 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 H-PEG₈-OH를 도입하기 위하여 1 mL 0.5 M Fmoc-N-amido-dPEG8-acid in DMF 용액, 1 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 1 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 그리고 87 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 반응 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.

[1331] 반응의 진행은 카이저 시험법으로 확인하였으며, 미반응 아민이 남아있는 것으로 판단되면 반응 시간을 1 ~ 3시간 더 연장하거나 반응액을 비우고 상기의 반응 과정을 다시 반복하였다. N-말단의 Fmoc 보호기의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF를 사용하여 수행한 다음, 펩타이드가 부착된 레진을 건조하고 중량을 측정하였다.

[1332] (c) 상기 (b) 과정에서 준비한 펩타이드가 부착된 수지 250 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT (94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 mL과 함께 실온에서 120 분간 교반하여 레진에서 펩타이드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩타이드를 침전시켰다. 침전된 펩타이드를 에테르로 3 회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% ACN 함유 물에 녹인 다음 6 시간 동안 교반한 다음 농축하였다.

[1333] 농축액을 5%-DMSO-20%-ACN 함유 0.01 M ammonium acetate buffer (pH 6.5) 용액에 0.1 mg/mL 농도로 녹인 다음 공기 노출된 상태로 3 일 동안 교반하였다. 이황화 결합 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며, 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결건조하여 펩타이드 침전물을 얻었다.

[1334] (d) 정제

[1335] 상기 (c) 과정에서 동결건조하여 얻은 펩타이드 침전물을 하기 표 8에 기재된 prep-LC 1차 정제 조건에서 분리한 다음 하기 표 9에 기재된 prep-LC 2차 정제 조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩타이드는 각각 90% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩타이드의 분자량을 LC/MS 질량 분석기로 확인하였다.

[1336] H-PEG8-Asp-Cys*-Ala-Trp-His-Dab-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys*-Thr-NH₂ (Cys* : 이황화 결합 위치)

[1337]

<표 8> prep-LC 1차 정제 조건

Prep-LC 1차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-20% ACN / 0.1% TFA in 80% ACN		
구배	0 min $\rightarrow$ 30 min : B 0% $\rightarrow$ B 100%		
유속	17 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1338]

<표 9> prep-LC 2차 정제 조건

Prep-LC 2차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-30% ACN / 0.1% TFA in 70% ACN		
구배	0 min $\rightarrow$ 30 min : B 0% $\rightarrow$ B 100%		
유속	15 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1339] SSFI (6Dab)의 구조 확인

[1340] 매트릭스 보조 레이저 탈착 / 이온화(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 질량 분석에 의한 분자량 측정을 통해 SSFI(6Dab)의 합성을 확인하였음

[1341] 측정 장비 : Ultraflexxtreme (Bruker)

[1342] 측정 matrix : CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) & DHB(2,5-Dihydroxybenzoic acid)

[1343] Calculated molecular weight : 1982.24 g/mol

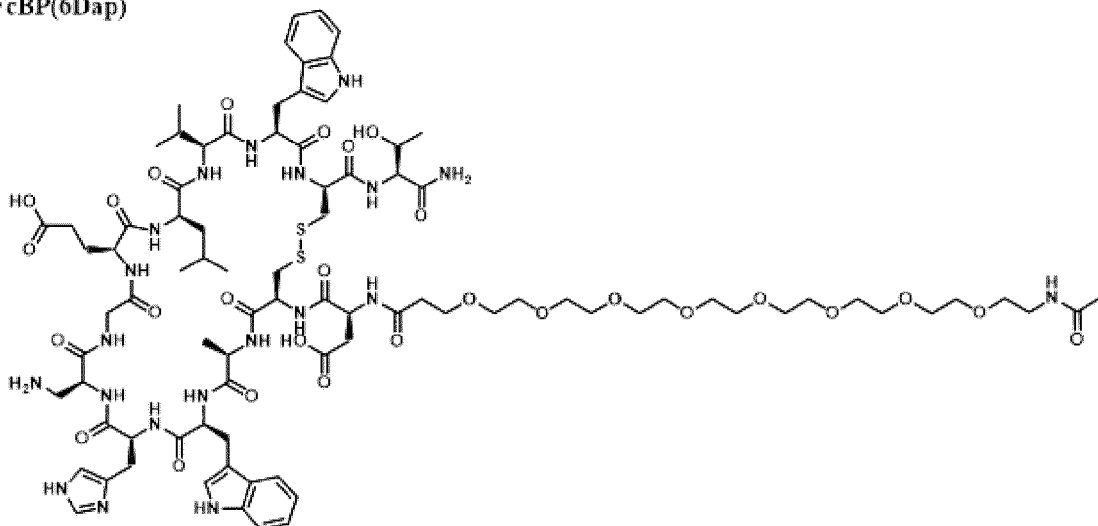
[1344] Measured molecular weight ($M+2H$)²⁺ : 992.33 g/mol

[1345] SSFI(6Dab)에 대한 질량 분석 결과를 도 26에 도시하였다.

[1346]

[1347] 1.2.4. SSFI (Xa₁이 Dap (diaminopropionic acid)인 경우) 합성 및 구조 확인

[1348] FcBP(6Dap)



[1349] SSFI (6Dap)의 합성

[1350] Sequence: Nor.-PEG8-DCAWHA(beta amino alanine, Dap)GELVWCT-CONH₂

[1351]

[1352] 사용된 Fmoc 아미노산 목록 및 도입순서

[1353] Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Dap(Boc)-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH,

[1354]

[1355] 제조 방법

[1356] (a) 아미노산 도입

[1357] 하기 과정에서 사용된 시약의 양은 0.25 mmole에 기초하였다. 0.5 g의 Clear amide resin (0.48 mmole/g, PeptideInternational, 미국)를 합성 반응기에 넣고, 각각의 Fmoc-아미노산 블록 1 mmole의 무게를 달아 펩타이드 아미노산 서열 순서대로 C-말단에서부터 N-말단까지 준비하였다.

[1358] Fmoc-아미노산을 활성화하여 Clear amide resin에 활성화된 잔기를 부착하는 반응을 C-말단 아미노산부터 순차적으로 진행하였다.

[1359] Fmoc의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF에서 수행하였고 잔기의 활성화 및 도입은 서열에 맞추어 준비한 아미노산을 2 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 2 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 그리고 174 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.

[1360] 도입 반응의 확인은 카이저 시험법으로 수행하였으며 미반응으로 확인되면 도입 반응을 1회 더 반복하거나 20% Ac₂O 함유 DMF 용액으로 캐핑을 실시하였다. 각 도입 반응과 Fmoc 제거 과정에서 다음 단계로 넘어가기 전에 DMF와 DCM으로 수지를 충분히 세척하였다. 이러한 과정은 목표한 펩타이드 서열이 완성될 때까지 반복하여 진행하였다.

- [1361] (b) H-PEG8-OH의 도입
- [1362] 아미노산 도입이 모두 끝난 다음에 N-말단에 H-PEG₈-OH를 도입하기 위하여 1 mL 0.5 M Fmoc-N-amido-dPEG8-acid in DMF 용액, 1 mL 0.5 M HBTU 함유 DMF 용액, 1 mL 0.5 M HOBt 함유 DMF 용액, 그리고 87 μ L DIPEA와 5 분간 혼합한 다음 반응 레진이 담긴 반응기에 부어 2 시간 동안 혼합하였다.
- [1363] 반응의 진행은 카이저 시험법으로 확인하였으며, 미반응 아민이 남아있는 것으로 판단되면 반응 시간을 1 ~ 3시간 더 연장하거나 반응액을 비우고 상기의 반응 과정을 다시 반복하였다. N-말단의 Fmoc 보호기의 제거는 20% 피페리딘 함유 DMF를 사용하여 수행한 다음, 펩타이드가 부착된 레진을 건조하고 중량을 측정하였다.
- [1364] (c) 상기 (b) 과정에서 준비한 펩타이드가 부착된 수지 250 mg을 TFA, TIS, 물 그리고 EDT (94:1.0:2.5:2.5)의 혼합액 2 mL과 함께 실온에서 120 분간 교반하여 레진에서 펩타이드를 절단하였다. 절단 혼합물을 여과하고 여과액을 질소 가스로 절반 가량 농축한 다음 에테르를 부어 펩타이드를 침전시켰다. 침전된 펩타이드를 에테르로 3 회 더 세척하고 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 침전을 0.1% TFA-30% ACN 함유 물에 녹인 다음 6 시간 동안 교반한 다음 농축하였다.
- [1365] 농축액을 5%-DMSO-20%-ACN 함유 0.01 M ammonium acetate buffer (pH 6.5) 용액에 0.1 mg/mL 농도로 녹인 다음 공기 노출된 상태로 3 일 동안 교반하였다. 이황화 결합 형성 반응의 진행은 HPLC로 관측하였으며, 더 이상 진행하지 않는 것으로 판단되면 반응액을 동결건조하여 펩타이드 침전물을 얻었다.
- [1366] (d) 정제
- [1367] 상기 (c) 과정에서 동결건조하여 얻은 펩타이드 침전물을 하기 표 10에 기재된 prep-LC 1차 정제 조건에서 분리한 다음 하기 표 11에 기재된 prep-LC 2차 정제 조건으로 추가 정제하고 동결 건조하였다. 얻어진 펩타이드는 각각 90% 이상의 순도임을 분석용 HPLC로 확인하였으며, 합성한 펩타이드의 분자량을 LC/MS 질량 분석기로 확인하였다.
- [1368] H-PEG8-Asp-Cys*-Ala-Trp-His-Dap-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys*-Thr-NH₂ (Cys* : 이황화 결합 위치)

[1369] <표 10> prep-LC 1차 정제 조건

Prep-LC 1차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-20% ACN / 0.1% TFA in 80% ACN		
구배	0 min → 30 min : B 0% → B 100%		
유속	17 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1370]

<표 11> prep-LC 2차 정제 조건

Prep-LC 2차 정제조건			
장비명	Waters 2525 pump, Waters 2487 UV detector		
컬럼	Waters, XBridge Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm		
이동상 A/B	0.1% TFA-30% ACN / 0.1% TFA in 70% ACN		
구배	0 min $\rightarrow$ 30 min : B 0% $\rightarrow$ B 100%		
유속	15 mL/min	검출파장	UV 280 nm

[1371] SSFI (6Dap)의 구조 확인

[1372] 측정 장비 : Quattro premier xe (Waters)

[1373] Calculated molecular weight : 1968.21 g/mol

[1374] Measured molecular weight (M+2H)²⁺ : 984.71 g/mol

[1375] SSFI(6Dap)에 대한 질량 분석 결과를 도 27에 도시하였다.

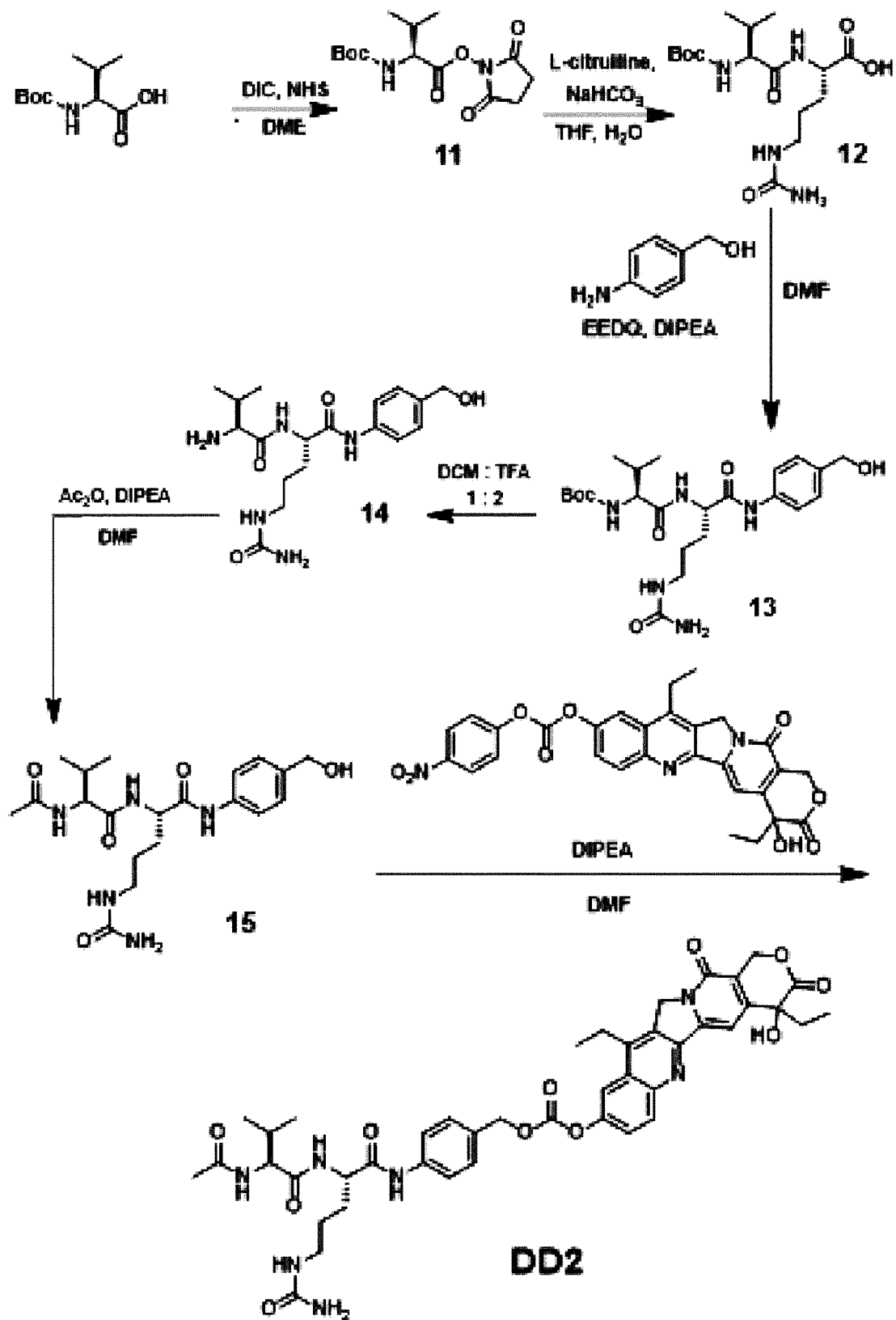
[1376]

[1377] 1.3. VC 링커 합성 및 구조 확인

[1378] 1.3.1. VC 링커 (DD2) 합성 및 구조 확인

[1379] [반응식 10]

[1380] Synthesis of DD2



[1381] VC 링커 (DD2)의 합성

[1382] 화합물 11의 합성

[1383] Fmoc-Val-OH 5 g (14.7 mmol, 1.0 eq)과 N-hydroxysuccinimide (NHS) 1.7 g (14.7 mmol, 1.0 eq)을 Dimethoxyethane (DME) 140 mL에 녹여 교반시킨다. N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) 2.5 mL (16.2 mmol, 1.1 eq)를 0 °C에서 천천히 적가하여 16 시간동안 교반시켰다. 반응 용액에 부유물을 감압필터하여 제거하였고, 여과액을 감압 농축하였다. 잔류물을 아세톤에 녹여 냉장고에 4 시간동안 저온 보관한 뒤, 다시 생긴 부유물을 감압 필터하여 제거하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. (crude yield : 5.5 g, 86%). TLC (EA:Hex = 1:1); $R_f = 0.5$

[1384]

[1385] 화합물 12의 합성

[1386] 2.0 g (11.5 mmol, 1.0 eq)의 L-citrulline을 Tetrahydrofuran (THF)과 물의 1:1 혼합 용액 100 mL에 녹여 교반시킨다. 탄산수소나트륨 988 mg을 첨가하여 교반시킨 후, 5.0 g의 화합물 8 (11.5 mmol, 1.0 eq)을 아세톤 80 mL에 녹여 반응 용액에 천천히 적가하여 교반시켰다. 21 시간 동안 교반시킨 후 감압농축하여 유기 용매를 제거하였다. 수층에 Ethyl acetate (EA)를 넣어 씻어준 후, 2 N HCl을 천천히 적가하여 pH 3까지 적정하였고, EA를 넣어 침전물을 유기층으로 추출하였다. 이후 유기층을 포화 소금용액과 황산나트륨으로 건조하였고 정제없이 다음 반응에 사용하였다 (crude yield : 5.6 g, 98%). TLC (DCM:MeOH = 10:1, formic acid 1 drop); $R_f = 0.1$

[1387]

[1388] 화합물 13의 합성

[1389] 10% piperidine in N,N-Dimethylformamide (DMF) 50 mL을 2.84 g (5.72 mmol, 1.0 eq)의 화합물 12에 천천히 적가하여 교반시킨다. 4 시간 뒤, 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하고, 잔류물을 물에 녹여 생긴 부유물을 감압 필터를 통해 제거하였다. 수층을 농축하여 목적화합물을 획득하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.01$

[1390]

[1391] 화합물 14의 합성

[1392] 54 mg (0.22 mmol, 1.0 eq)의 화합물 10을 DMF 2 mL에 녹인 후, N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) 0.05 mL (0.264 mmol, 1.2 eq)를 천천히 적가하였다. 물 2 mL을 추가하여 화합물 13을 완전히 녹여준 뒤 Acetic anhydride 0.05 mL (0.528 mmol, 2.4 eq)를 상온에서 천천히 적가하였다. 3 시간 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고, 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.05$

[1393]

[1394] 화합물 15의 합성

[1395] 1 g (3.16 mmol, 1.0 eq)의 화합물 14를 DCM과 Methanol의 2:1 혼합 용액 30 mL에 녹이고 N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) 868 mg

(3.48 mmol, 1.1 eq)를 첨가하여 교반시켰다. 4-aminobenzylalcohol 451 mg (3.66 mmol, 1.16 eq)를 첨가하여 5 시간 동안 교반시켜주었다. 감압 농축하여 반응 용액을 제거하였고 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였고 419 mg을 획득하였다 (yield : 32%). TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.1

[1396]

[1397] 화합물 DD2의 합성

[1398] 105 mg (0.25 mmol, 1.0 eq)의 화합물 15를 DMF 10 mL에 녹인 용액에 Phenol-activated SN38 109 mg (0.3 mmol, 1.2 eq)과 DIPEA 0.06 mL (0.33 mmol, 1.3 eq)를 천천히 적가하였다. 20 시간 동안 교반시킨 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였다. 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.2

[1399]

[1400] VC 링커 (DD2)의 구조 확인

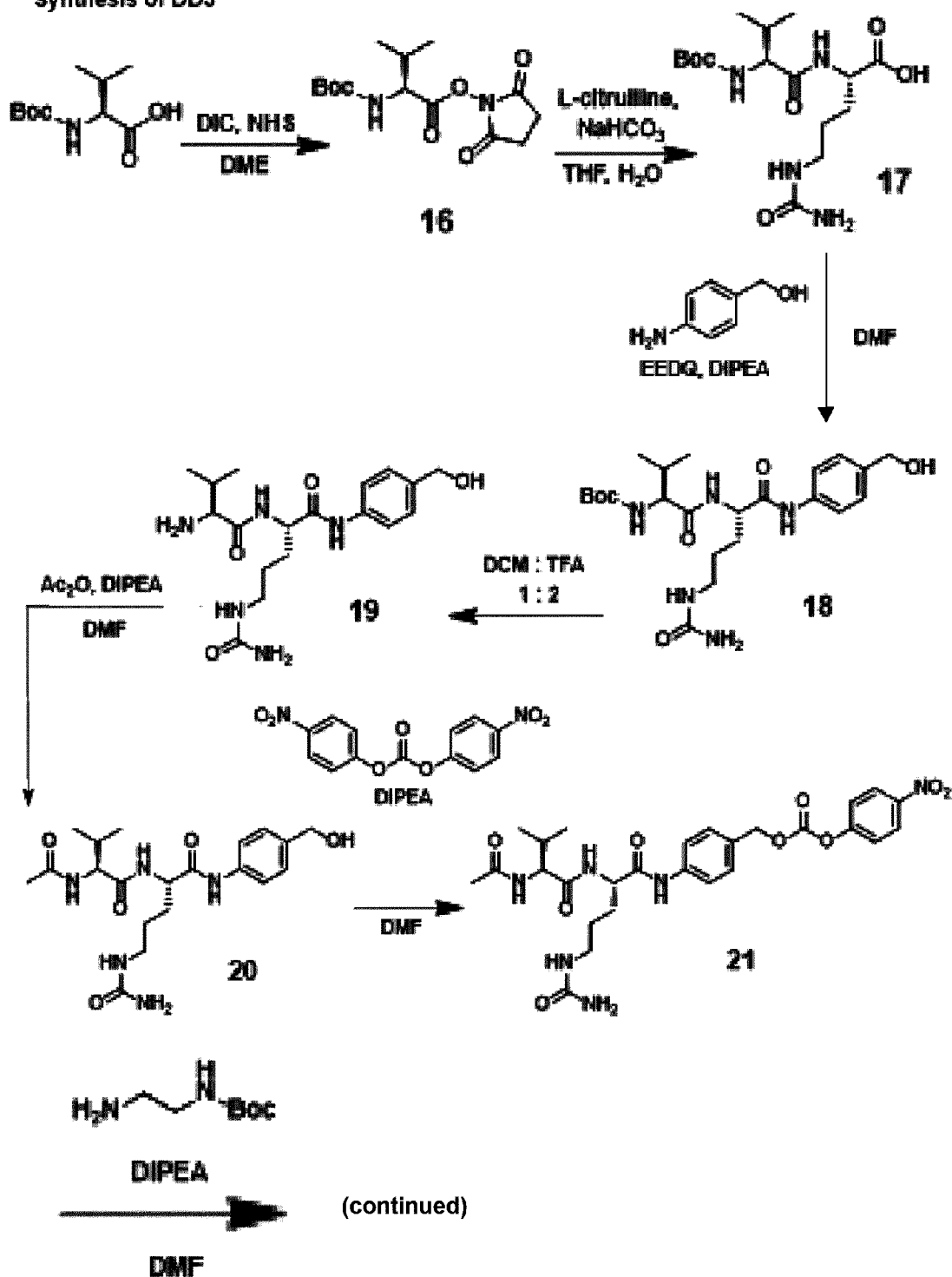
[1401] LRMS (ESI): m/z 840.4 [M+H⁺]

[1402] 그 결과를 도 28에 도시하였다.

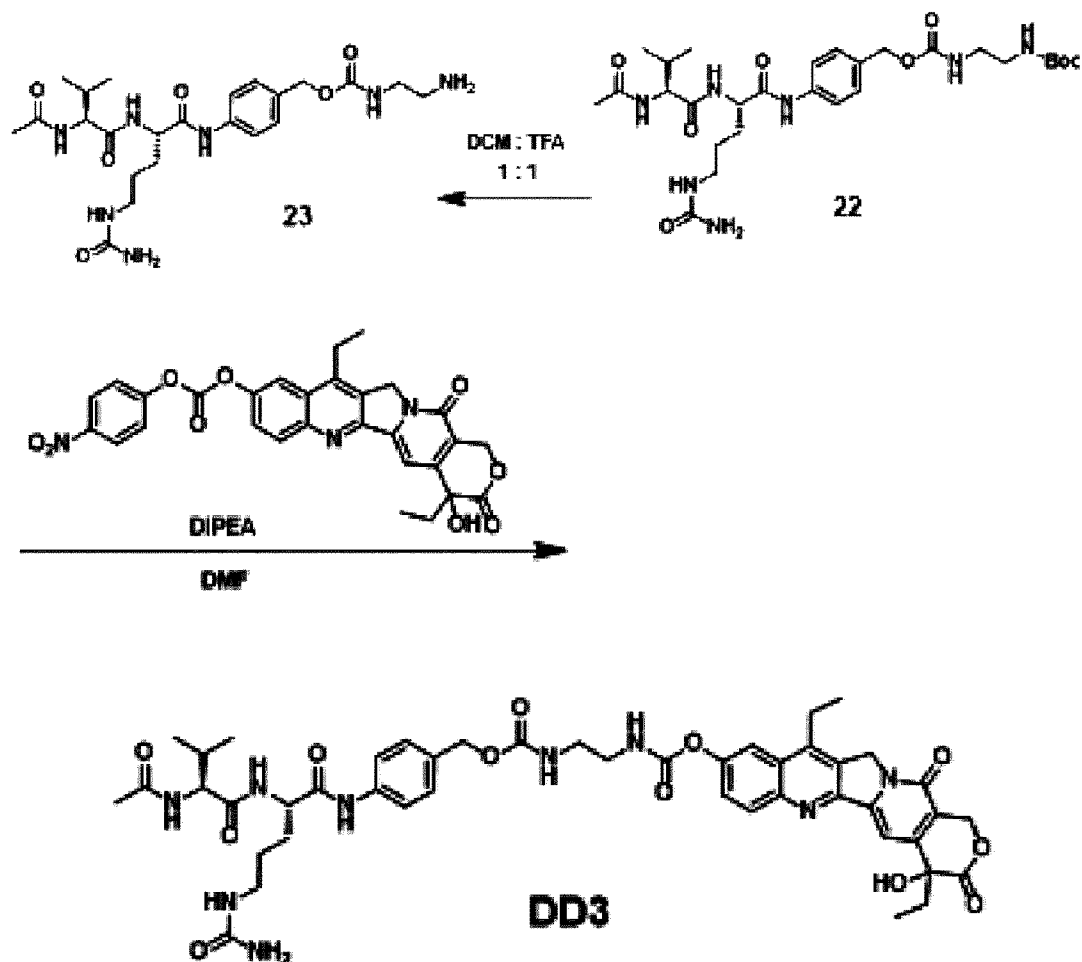
[1403]

[1404] 1.3.2. VC 링커 (DD3) 합성 및 구조 확인

[1405] [반응식 11]

[1406] **Synthesis of DD3**

[1407]



VC 링커 (DD3)의 합성

[1408] 화합물 16의 합성

[1409] Fmoc-Val-OH 5 g (14.7 mmol, 1.0 eq)과 N-hydroxysuccinimide (NHS) 1.7 g (14.7 mmol, 1.0 eq)을 Dimethoxyethane (DME) 140 mL에 녹여 교반시킨다.

N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) 2.5 mL (16.2 mmol, 1.1 eq)를 0 °C에서 천천히 적가하여 16 시간동안 교반시켰다. 반응 용액에 부유물을 감압필터하여 제거하였고, 여과액을 감압 농축하였다. 잔류물을 아세톤에 녹여 냉장고에 4 시간동안 저온 보관한 뒤, 다시 생긴 부유물을 감압 필터하여 제거하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. (crude yield : 5.5 g, 86%). TLC (EA:Hex = 1:1); $R_f = 0.5$

[1410]

[1411] 화합물 17의 합성

[1412] 2.0 g (11.5 mmol, 1.0 eq)의 L-citrulline을 Tetrahydrofuran (THF)과 물의 1:1 혼합 용액 100 mL에 녹여 교반시킨다. 탄산수소나트륨 988 mg을 첨가하여 교반시킨 후, 5.0 g의 화합물 16 (11.5 mmol, 1.0 eq)을 아세톤 80 mL에 녹여 반응 용액에 천천히 적가하여 교반시켰다. 21 시간 동안 교반시킨 후 감압농축하여 유기 용매를 제거하였다. 수층에 Ethyl acetate (EA)를 넣어 씻어준 후, 2 N HCl을

천천히 적가하여 pH 3까지 적정하였고, EA를 넣어 침전물을 유기층으로 추출하였다. 이후 유기층을 포화 소금용액과 황산나트륨으로 건조하였고 정제없이 다음 반응에 사용하였다 (crude yield : 5.6 g, 98%). TLC (DCM:MeOH = 10:1, formic acid 1 drop); R_f = 0.1

[1413]

[1414] 화합물 18의 합성

[1415] 10% piperidine in N,N-Dimethylformamide (DMF) 50 mL을 2.84 g (5.72 mmol, 1.0 eq)의 화합물 17에 천천히 적가하여 교반시킨다. 4 시간 뒤, 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하고, 잔류물을 물에 녹여 생긴 부유물을 감압 필터를 통해 제거하였다. 수층을 농축하여 목적화합물을 획득하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.01

[1416]

[1417] 화합물 19의 합성

[1418] 54 mg (0.22 mmol, 1.0 eq)의 화합물 18를 DMF 2 mL에 녹인 후, N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) 0.05 mL (0.264 mmol, 1.2 eq)를 천천히 적가하였다. 물 2 mL을 추가하여 화합물 15를 완전히 녹여준 뒤 Acetic anhydride 0.05 mL (0.528 mmol, 2.4 eq)를 상온에서 천천히 적가하였다. 3 시간 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고, 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.05

[1419]

[1420] 화합물 20의 합성

[1421] 1 g (3.16 mmol, 1.0 eq)의 화합물 19를 DCM과 Methanol의 2:1 혼합 용액 30 mL에 녹이고 N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) 868 mg (3.48 mmol, 1.1 eq)를 첨가하여 교반시켰다. 4-aminobenzylalcohol 451 mg (3.66 mmol, 1.16 eq)를 첨가하여 5 시간 동안 교반시켜주었다. 감압 농축하여 반응 용액을 제거하였고 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였고 419 mg을 획득하였다 (yield : 32%). TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.1

[1422]

[1423] 화합물 21의 합성

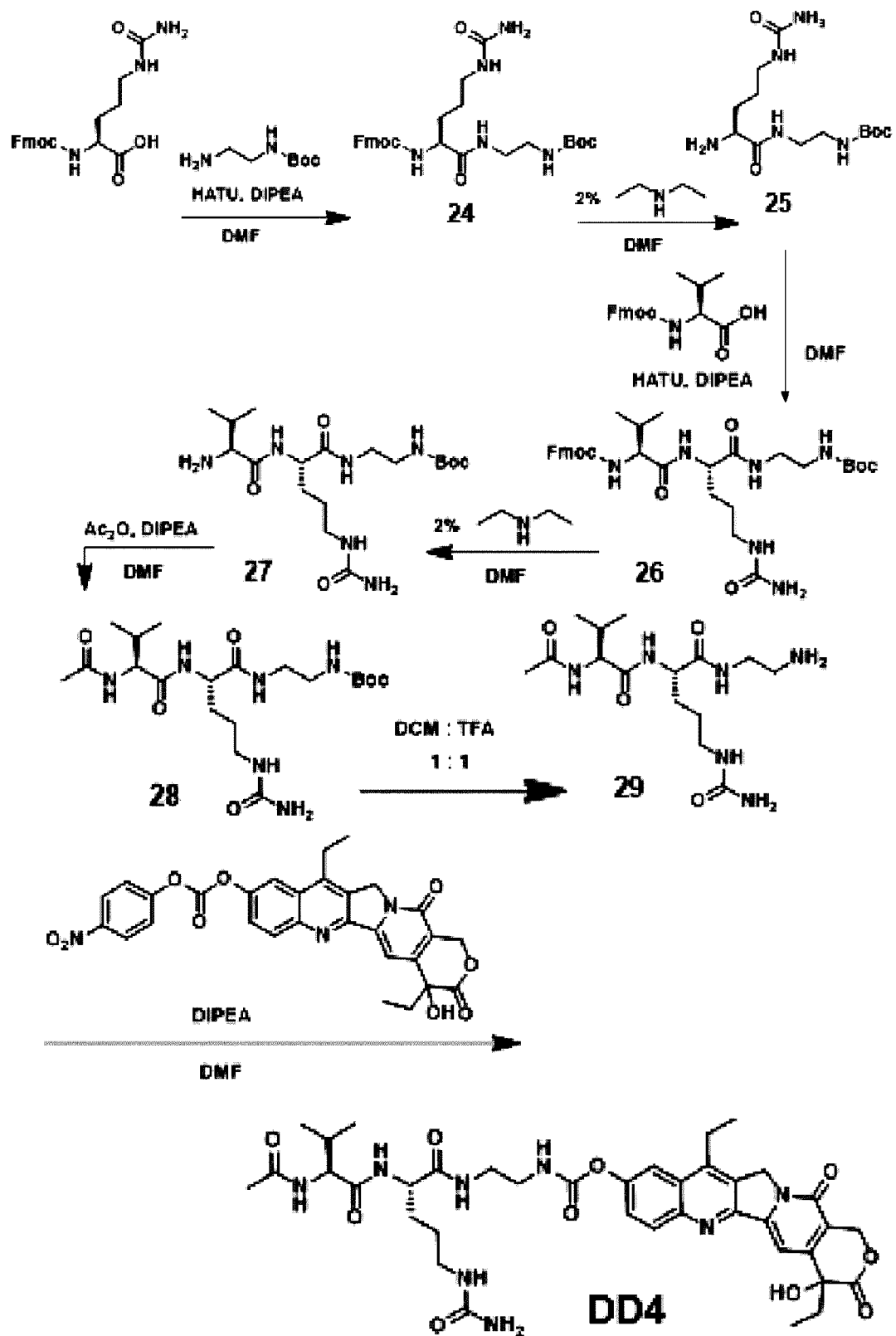
[1424] 240 mg (0.55 mmol, 1.0 eq)의 화합물 20을 DMF 10 mL에 녹이고 DIPEA 0.3 mL (1.65 mmol, 3.0 eq)를 천천히 적가하여 교반시켜주었다. 이후, bis-(4-aminophenyl) carbonate 509 mg (1.65 mmol, 3.0 eq)를 첨가하여 반응을 진행하였다. 3 시간 후 감압 농축하여 반응 용액을 제거하였고, 디에틸에테르를 첨가하여 목적화합물을 침전시켜 감압 필터하였다. 획득한 목적화합물은 정제없이 다음 반응에 사용하였다.

[1425]

[1426] 화합물 22의 합성

- [1427] 33 mg (0.06 mmol, 1.0 eq)의 화합물 21을 DMF에 5 mL에 녹이고 1-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-2-aminoethane 16 mg (0.08 mmol, 1.3 eq)과 DIPEA 0.02 mL (0.08 mmol, 1.3 eq)를 천천히 적가하여 교반시켜주었다. 7 시간 동안 교반시킨 후 감압 농축하여 반응 용액을 제거하였고 디에틸에테르를 첨가하여 목적화합물을 침전시켜 감압 필터하였다. 획득한 목적화합물은 정제없이 다음 반응에 사용하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.1
- [1428]
- [1429] 화합물 23의 합성
- [1430] 17 mg (0.03 mmol, 1.0 eq)의 화합물 22를 DCM 1 mL에 녹인 후 Trifluoroacetic acid (TFA) 1 mL를 0 °C에서 천천히 적가하였다. 30 분 동안 0 °C에서 교반시킨 후, 상온에서 30 분 동안 교반시켜 반응을 진행하였다. 이후 DCM과 같이 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고 3 회 반복하였다. 농축된 물질을 고진공하에서 건조하였고 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하여 13 mg의 목적화합물을 획득하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.01
- [1431]
- [1432] 화합물 DD3의 합성
- [1433] 13 mg (0.03 mmol, 1.0 eq)의 화합물 23을 DMF 3 mL에 녹인 용액에 DIPEA 0.01 mL (0.04 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하고 22 mg (0.04 mmol, 1.5 eq)의 Phenol-activated SN38를 첨가하였다. 1 시간 동안 교반시킨 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였다. 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.2
- [1434]
- [1435] VC 링커 (DD3)의 구조 확인
- [1436] LRMS (ESI): m/z 926.4 [M+H⁺]
- [1437] 그 결과를 도 29에 도시하였다.
- [1438]
- [1439] 1.3.3. VC 링커 (DD4) 합성 및 구조 확인
- [1440] [반응식 12]

[1441] Synthesis of DD4



[1442] VC 링커 (DD4)의 합성

[1443] 화합물 24의 합성

- [1444] Fmoc-Val-OH 5 g (14.7 mmol, 1.0 eq)과 N-hydroxysuccinimide (NHS) 1.7 g (14.7 mmol, 1.0 eq)을 Dimethoxyethane (DME) 140 mL에 녹여 교반시킨다.
N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) 2.5 mL (16.2 mmol, 1.1 eq)를 0 °C에서 천천히 적가하여 16 시간동안 교반시켰다. 반응 용액에 부유물을 감압필터하여 제거하였고, 여과액을 감압 농축하였다. 잔류물을 아세톤에 녹여 냉장고에 4 시간동안 저온 보관한 뒤, 다시 생긴 부유물을 감압 필터하여 제거하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. (crude yield : 5.5 g, 86%). TLC (EA:Hex = 1:1); $R_f = 0.5$
- [1445]
- [1446] 화합물 25의 합성
- [1447] 2.0 g (11.5 mmol, 1.0 eq)의 L-citrulline을 Tetrahydrofuran (THF)과 물의 1:1 혼합 용액 100 mL에 녹여 교반시킨다. 탄산수소나트륨 988 mg을 첨가하여 교반시킨 후, 5.0 g의 화합물 21 (11.5 mmol, 1.0 eq)을 아세톤 80 mL에 녹여 반응 용액에 천천히 적가하여 교반시켰다. 21 시간 동안 교반시킨 후 감압농축하여 유기 용매를 제거하였다. 수층에 Ethyl acetate (EA)를 넣어 씻어준 후, 2 N HCl을 천천히 적가하여 pH 3까지 적정하였고, EA를 넣어 침전물을 유기층으로 추출하였다. 이후 유기층을 포화 소금용액과 황산나트륨으로 건조하였고 정제없이 다음 반응에 사용하였다 (crude yield : 5.6 g, 98%). TLC (DCM:MeOH = 10:1, formic acid 1 drop); $R_f = 0.1$
- [1448]
- [1449] 화합물 26의 합성
- [1450] 10% piperidine in N,N-Dimethylformamide (DMF) 50 mL을 2.84 g (5.72 mmol, 1.0 eq)의 화합물 25에 천천히 적가하여 교반시킨다. 4 시간 뒤, 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하고, 잔류물을 물에 녹여 생긴 부유물을 감압 필터를 통해 제거하였다. 수층을 농축하여 목적화합물을 획득하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.01$
- [1451]
- [1452] 화합물 27의 합성
- [1453] 54 mg (0.22 mmol, 1.0 eq)의 화합물 26을 DMF 2 mL에 녹인 후, N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) 0.05 mL (0.264 mmol, 1.2 eq)를 천천히 적가하였다. 물 2 mL을 추가하여 화합물 23을 완전히 녹여준 뒤 Acetic anhydride 0.05 mL (0.528 mmol, 2.4 eq)를 상온에서 천천히 적가하였다. 3 시간 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고, 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.05$
- [1454]
- [1455] 화합물 28의 합성
- [1456] 300 mg (0.95 mmol, 1.0 eq)의 화합물 27를 DMF 6 mL에 녹인 후, 550 mg (1.43 mmol, 1.5 eq)의

1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU)를 첨가하였다. 이후 DIPEA 0.25 mL (1.43 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하였고, 1-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-2-aminoethane 230 mg (1.43 mmol, 1.5 eq)을 DMF 3.5 mL에 녹여 상온에서 천천히 적가하였다. 7 시간 후 Ethyl acetate (EA)를 이용하여 반응 용액을 묽혀주었고, 포화 탄산수소나트륨 용액을 사용하여 유기층을 씻어주었다. 이후 포화 소금용액과 황산나트륨을 사용하여 건조하였고, 여과하여 목적화합물을 획득하였다. 획득한 목적화합물은 정제없이 다음 반응에 사용되었다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.5

[1457]

[1458] 화합물 29의 합성

[1459] 화합물 28을 DCM과 TFA의 2:1 혼합 용액에 녹인 후, 0 °C에서 반응을 진행하였다. 이후 DCM과 같이 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고 3 회 반복하였다. 잔류물을 고진공하에서 건조하였고 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하여 370 mg의 목적화합물을 획득하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.01

[1460]

[1461] 화합물 DD4의 합성

[1462] 50 mg (0.14 mmol, 1.0 eq)의 화합물 26을 DMF 3 mL에 녹인 용액에 DIPEA 0.03 mL (0.17 mmol, 1.2 eq)를 천천히 적가하고, 107 mg (0.21 mmol, 1.5 eq)의 Phenol-activated SN38를 첨가하였다. 1 시간 동안 교반시킨 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고, 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.1

[1463]

[1464] VC 링커 (DD4)의 구조 확인

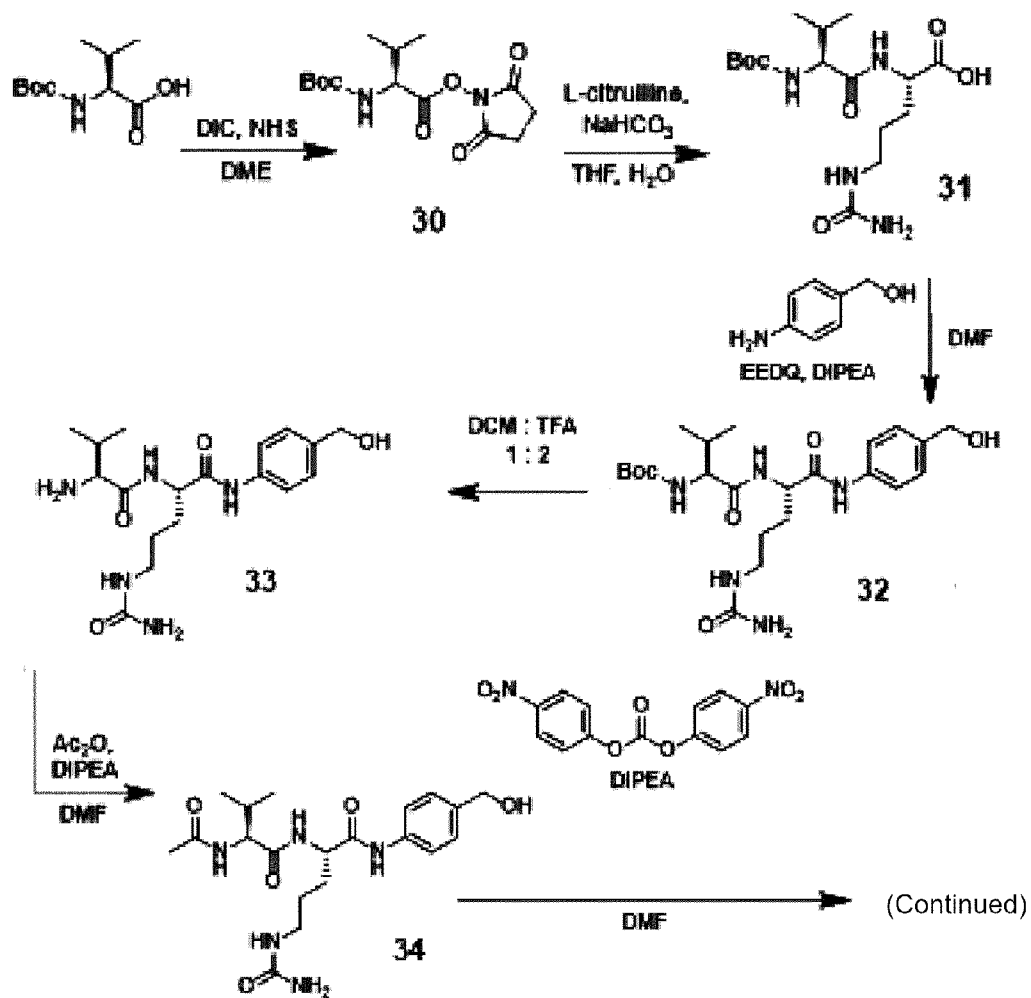
[1465] LRMS (ESI): m/z 777.3 [M+H⁺]

[1466] 그 결과를 도 30에 도시하였다.

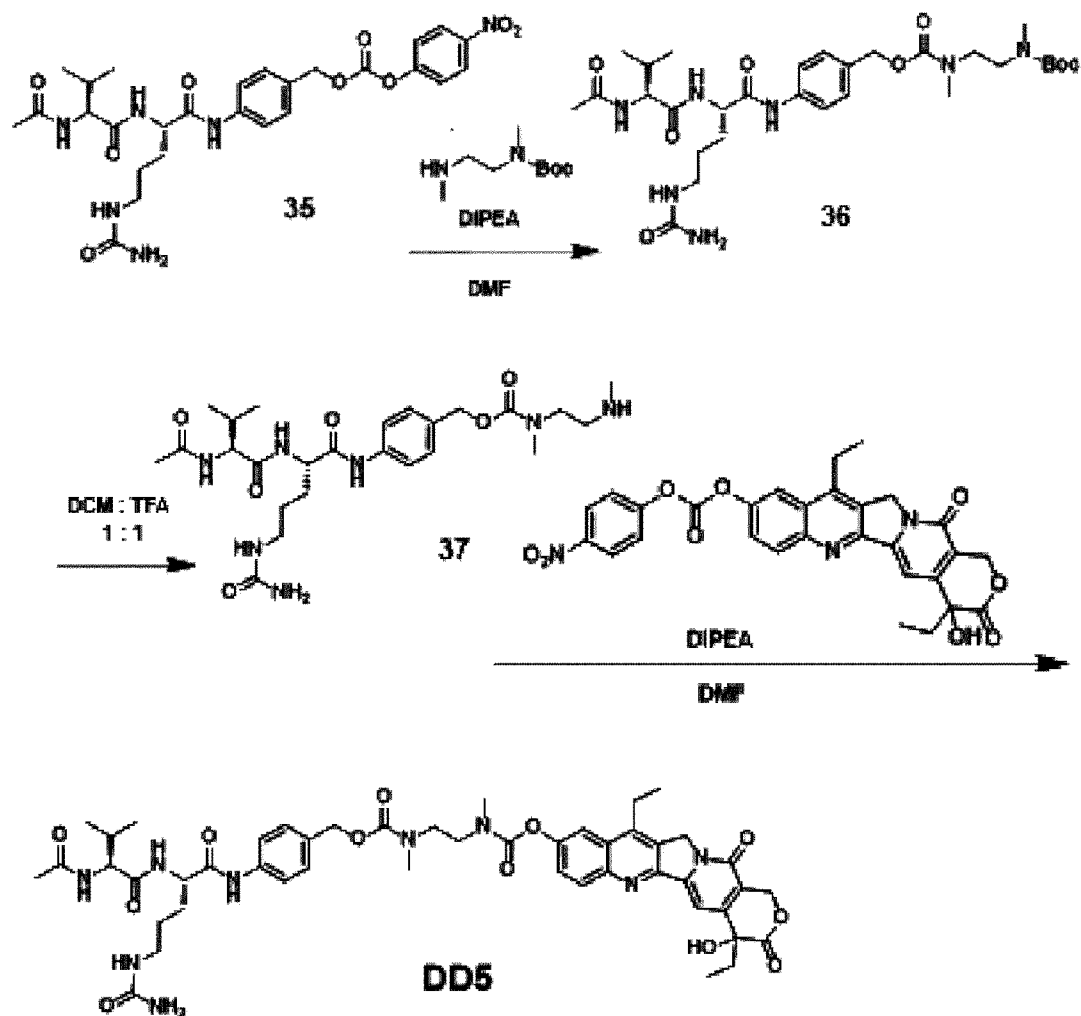
[1467]

[1468] 1.3.4. VC 링커 (DD5) 합성 및 구조 확인

[1469] [반응식 13]

[1470] **Synthesis of DD5**

[1471]



[1472] VC 링커 (DD5)의 합성

[1473] 화합물 30의 합성

[1474] Fmoc-Val-OH 5 g (14.7 mmol, 1.0 eq)과 N-hydroxysuccinimide (NHS) 1.7 g (14.7 mmol, 1.0 eq)을 Dimethoxyethane (DME) 140 mL에 녹여 교반시킨다. N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) 2.5 mL (16.2 mmol, 1.1 eq)를 0 °C에서 천천히 적가하여 16 시간동안 교반시켰다. 반응 용액에 부유물을 감압필터하여 제거하였고, 여과액을 감압 농축하였다. 잔류물을 아세톤에 녹여 냉장고에 4 시간동안 저온 보관한 뒤, 다시 생긴 부유물을 감압 필터하여 제거하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. (crude yield : 5.5 g, 86%). TLC (EA:Hex = 1:1); $R_f = 0.5$

[1475]

[1476] 화합물 31의 합성

[1477] 2.0 g (11.5 mmol, 1.0 eq)의 L-citrulline을 Tetrahydrofuran (THF)과 물의 1:1 혼합 용액 100 mL에 녹여 교반시킨다. 탄산수소나트륨 988 mg을 첨가하여 교반시킨 후, 5.0 g의 화합물 30 (11.5 mmol, 1.0 eq)을 아세톤 80 mL에 녹여 반응 용액에

천천히 적가하여 교반시켰다. 21 시간 동안 교반시킨 후 감압농축하여 유기 용매를 제거하였다. 수층에 Ethyl acetate (EA)를 넣어 씻어준 후, 2 N HCl을 천천히 적가하여 pH 3까지 적정하였고, EA를 넣어 침전물을 유기층으로 추출하였다. 이후 유기층을 포화 소금용액과 황산나트륨으로 건조하였고 정제없이 다음 반응에 사용하였다 (crude yield : 5.6 g, 98%). TLC (DCM:MeOH = 10:1, formic acid 1 drop); R_f = 0.1

[1478]

[1479] 화합물 32의 합성

[1480] 10% piperidine in N,N-Dimethylformamide (DMF) 50 mL을 2.84 g (5.72 mmol, 1.0 eq)의 화합물 31에 천천히 적가하여 교반시킨다. 4 시간 뒤, 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하고, 잔류물을 물에 녹여 생긴 부유물을 감압 필터를 통해 제거하였다. 수층을 농축하여 목적화합물을 획득하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.01

[1481]

[1482] 화합물 33의 합성

[1483] 54 mg (0.22 mmol, 1.0 eq)의 화합물 29를 DMF 2 mL에 녹인 후, N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) 0.05 mL (0.264 mmol, 1.2 eq)를 천천히 적가하였다. 물 2 mL을 추가하여 화합물 32를 완전히 녹여준 뒤 Acetic anhydride 0.05 mL (0.528 mmol, 2.4 eq)를 상온에서 천천히 적가하였다. 3 시간 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고, 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.05

[1484]

[1485] 화합물 34의 합성

[1486] 1 g (3.16 mmol, 1.0 eq)의 화합물 33을 DCM과 Methanol의 2:1 혼합 용액 30 mL에 녹이고 N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) 868 mg (3.48 mmol, 1.1 eq)를 첨가하여 교반시켰다. 4-aminobenzylalcohol 451 mg (3.66 mmol, 1.16 eq)를 첨가하여 5 시간 동안 교반시켜주었다. 감압 농축하여 반응 용액을 제거하였고 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였고 419 mg을 획득하였다 (yield : 32%). TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.1

[1487]

[1488] 화합물 35의 합성

[1489] 240 mg (0.55 mmol, 1.0 eq)의 화합물 34를 DMF 10 mL에 녹이고 DIPEA 0.3 mL (1.65 mmol, 3.0 eq)를 천천히 적가하여 교반시켜주었다. 이후, bis-(4-aminophenyl) carbonate 509 mg (1.65 mmol, 3.0 eq)를 첨가하여 반응을 진행하였다. 3 시간 후 감압 농축하여 반응 용액을 제거하였고, 디에틸에테르를 첨가하여 목적화합물을 침전시켜 감압 필터하였다. 획득한 목적화합물은 정제없이 다음 반응에 사용하였다.

[1490]

[1491] 화합물 36의 합성

[1492] 33 mg (0.06 mmol, 1.0 eq)의 화합물 35를 DMF에 5 mL에 녹이고 N-[(tert-Butoxy)carbonyl]-N,N'-dimethylethylenediamine 16 mg (0.08 mmol, 1.3 eq)과 DIPEA 0.02 mL (0.08 mmol, 1.3 eq)를 천천히 적가하여 교반시켜주었다. 7 시간 동안 교반시킨 후 감압 농축하여 반응 용액을 제거하였고 디에틸에테르를 첨가하여 목적화합물을 침전시켜 감압 필터하였다. 획득한 목적화합물은 정제없이 다음 반응에 사용하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.1

[1493]

[1494] 화합물 37의 합성

[1495] 17 mg (0.03 mmol, 1.0 eq)의 화합물 36을 DCM 1 mL에 녹인 후 Trifluoroacetic acid (TFA) 1 mL를 0 °C에서 천천히 적가하였다. 30 분 동안 0 °C에서 교반시킨 후, 상온에서 30 분 동안 교반시켜 반응을 진행하였다. 이후 DCM과 같이 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고 3 회 반복하였다. 농축된 물질을 고진공하에서 건조하였고 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하여 13 mg의 목적화합물을 획득하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.01

[1496]

[1497] 화합물 DD5의 합성

[1498] 13 mg (0.03 mmol, 1.0 eq)의 화합물 37을 DMF 3 mL에 녹인 용액에 DIPEA 0.01 mL (0.04 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하고 22 mg (0.04 mmol, 1.5 eq)의 Phenol-activated SN38를 첨가하였다. 1 시간 동안 교반시킨 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였다. 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.2

[1499]

[1500] 3-4-2: VC 링커 (DD5)의 구조 확인

[1501] LRMS (ESI): m/z 954.4 [M+H⁺]

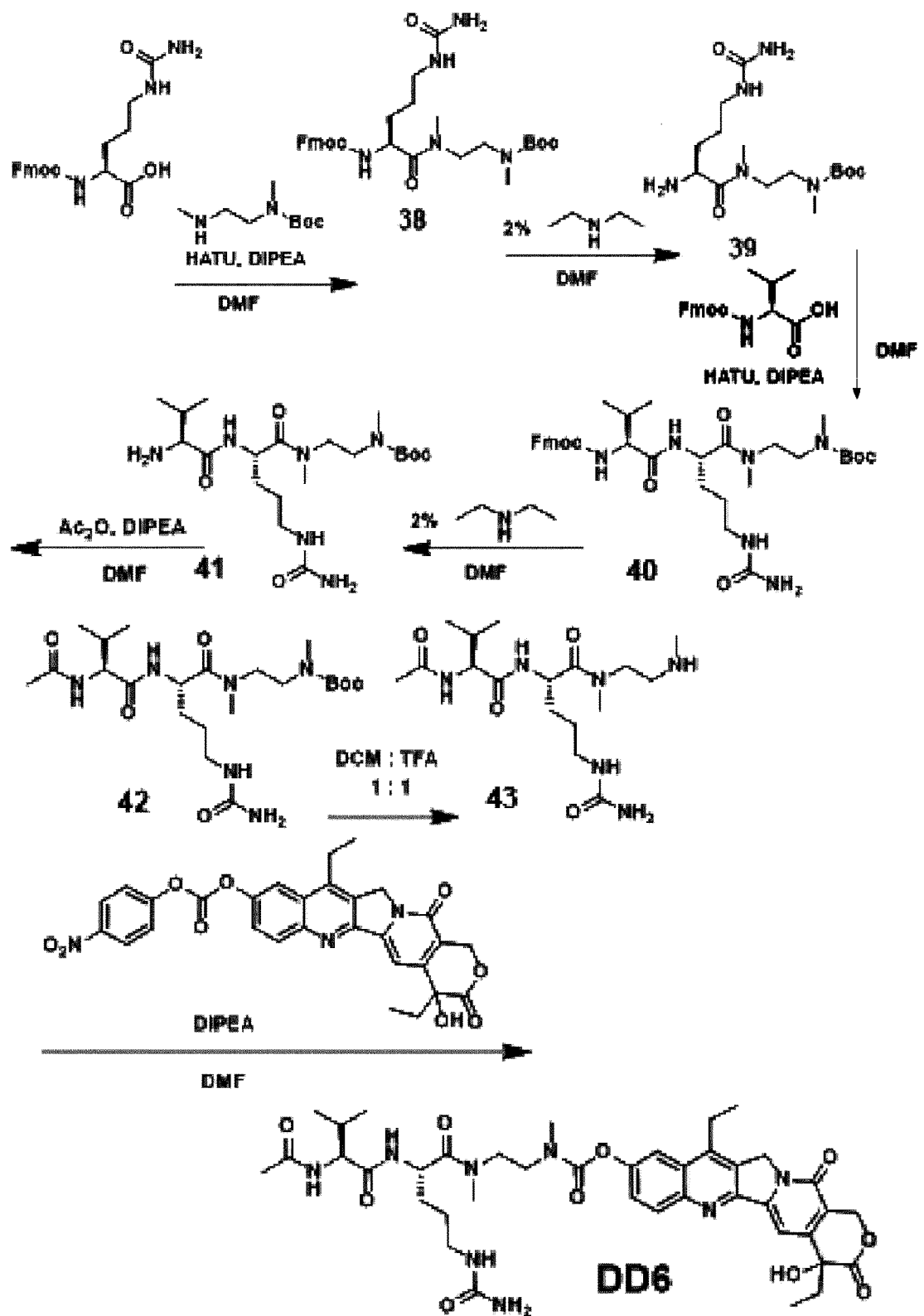
[1502] 그 결과를 도 31에 도시하였다.

[1503]

[1504] 1.3.5. VC 링커 (DD6) 합성 및 구조 확인

[1505] [반응식 14]

[1506] Synthesis of DD6



[1507] VC 링커 (DD6)의 합성

[1508] 화합물 38의 합성

- [1509] Fmoc-Val-OH 5 g (14.7 mmol, 1.0 eq)과 N-hydroxysuccinimide (NHS) 1.7 g (14.7 mmol, 1.0 eq)을 Dimethoxyethane (DME) 140 mL에 녹여 교반시킨다.
N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIC) 2.5 mL (16.2 mmol, 1.1 eq)를 0 °C에서 천천히 적가하여 16 시간동안 교반시켰다. 반응 용액에 부유물을 감압필터하여 제거하였고, 여과액을 감압 농축하였다. 잔류물을 아세톤에 녹여 냉장고에 4 시간동안 저온 보관한 뒤, 다시 생긴 부유물을 감압 필터하여 제거하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. (crude yield : 5.5 g, 86%). TLC (EA:Hex = 1:1); $R_f = 0.5$
- [1510]
- [1511] 화합물 39의 합성
- [1512] 2.0 g (11.5 mmol, 1.0 eq)의 L-citrulline을 Tetrahydrofuran (THF)과 물의 1:1 혼합 용액 100 mL에 녹여 교반시킨다. 탄산수소나트륨 988 mg을 첨가하여 교반시킨 후, 5.0 g의 화합물 38 (11.5 mmol, 1.0 eq)를 아세톤 80 mL에 녹여 반응 용액에 천천히 적가하여 교반시켰다. 21 시간 동안 교반시킨 후 감압농축하여 유기 용매를 제거하였다. 수층에 Ethyl acetate (EA)를 넣어 씻어준 후, 2 N HCl을 천천히 적가하여 pH 3까지 적정하였고, EA를 넣어 침전물을 유기층으로 추출하였다. 이후 유기층을 포화 소금용액과 황산나트륨으로 건조하였고 정제없이 다음 반응에 사용하였다 (crude yield : 5.6 g, 98%). TLC (DCM:MeOH = 10:1, formic acid 1 drop); $R_f = 0.1$
- [1513]
- [1514] 화합물 40의 합성
- [1515] 10% piperidine in N,N-Dimethylformamide (DMF) 50 mL을 2.84 g (5.72 mmol, 1.0 eq)의 화합물 39에 천천히 적가하여 교반시킨다. 4 시간 뒤, 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하고, 잔류물을 물에 녹여 생긴 부유물을 감압 필터를 통해 제거하였다. 수층을 농축하여 목적화합물을 획득하였고, 정제없이 다음 반응에 사용하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.01$
- [1516]
- [1517] 화합물 41의 합성
- [1518] 54 mg (0.22 mmol, 1.0 eq)의 화합물 40을 DMF 2 mL에 녹인 후, N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) 0.05 mL (0.264 mmol, 1.2 eq)를 천천히 적가하였다. 물 2 mL을 추가하여 화합물 37을 완전히 녹여준 뒤 Acetic anhydride 0.05 mL (0.528 mmol, 2.4 eq)를 상온에서 천천히 적가하였다. 3 시간 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고, 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.05$
- [1519]
- [1520] 화합물 42의 합성
- [1521] 300 mg (0.95 mmol, 1.0 eq)의 화합물 41을 DMF 6 mL에 녹인 후, 550 mg (1.43 mmol, 1.5 eq)의

1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU)를 첨가하였다. 이후 DIPEA 0.25 mL (1.43 mmol, 1.5 eq)를 천천히 적가하였고, N-[(tert-Butoxy)carbonyl]-N,N'-dimethylethylenediamine 230 mg (1.43 mmol, 1.5 eq)을 DMF 3.5 mL에 녹여 상온에서 천천히 적가하였다. 7 시간 후 Ethyl acetate (EA)를 이용하여 반응 용액을 묽혀주었고, 포화 탄산수소나트륨 용액을 사용하여 유기층을 씻어주었다. 이후 포화 소금용액과 황산나트륨을 사용하여 건조하였고, 여과하여 목적화합물을 획득하였다. 획득한 목적화합물은 정제없이 다음 반응에 사용되었다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.5$

[1522]

[1523] 화합물 43의 합성

[1524] 화합물 42를 DCM과 TFA의 2:1 혼합 용액에 녹인 후, 0 °C에서 반응을 진행하였다. 이후 DCM과 같이 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고 3 회 반복하였다. 잔류물을 고진공하에서 건조하였고 역상 컬럼크로마토그래피를 이용하여 목적화합물을 정제하여 370 mg의 목적화합물을 획득하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.01$

[1525]

[1526] 화합물 DD6의 합성

[1527] 50 mg (0.14 mmol, 1.0 eq)의 화합물 43을 DMF 3 mL에 녹인 용액에 DIPEA 0.03 mL (0.17 mmol, 1.2 eq)를 천천히 적가하고, 107 mg (0.21 mmol, 1.5 eq)의 Phenol-activated SN38를 첨가하였다. 1 시간 동안 교반시킨 후 감압 농축을 통하여 반응 용액을 제거하였고, 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 통하여 목적 화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 10:1); $R_f = 0.1$

[1528]

[1529] VC 링커 (DD6)의 구조 확인

[1530] LRMS (ESI): m/z 805.5 [M+H⁺]

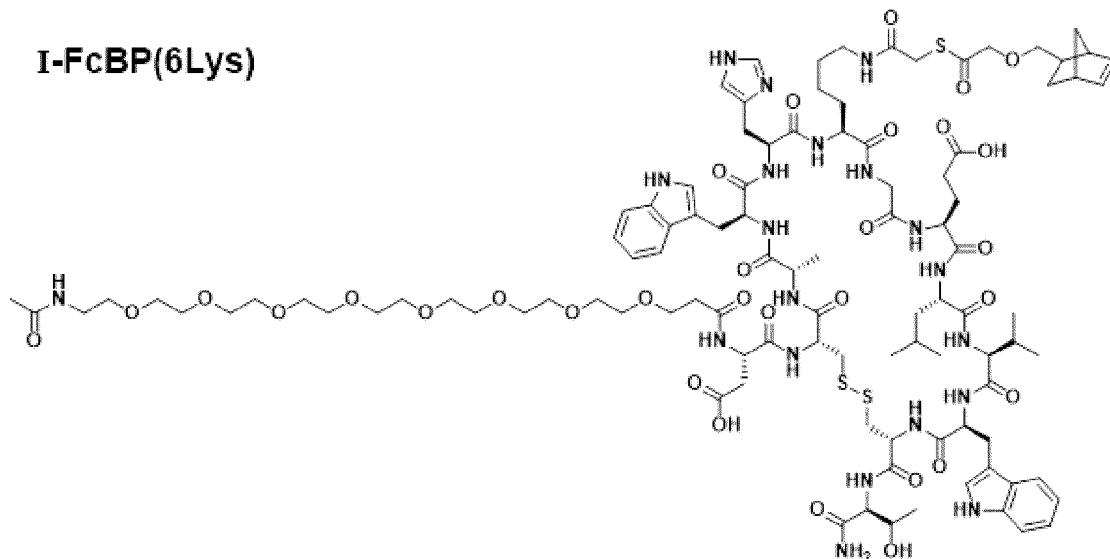
[1531] 그 결과를 도 32에 도시하였다.

[1532]

[1533] 2. 항체에 대한 위치특이적 제1 클릭화학작용기 전달용 제제 (H₁-L₂-SSFI)의 준비

[1534] 2.1. 화합물 I-SSFI (Xa₁이 라이신인 경우)의 합성 및 구조 확인

[1535]

I-FcBP(6Lys)**Exact Mass: 2246.99**

[1536] 화합물 I-SSFI(Lys)의 합성 방법

[1537] 화합물 I-SSFI의 합성은 DMF에서 수행하였고 SSFI에 화합물 I을 도입하기 위해 7.3 μmol 의 SSFI에 3 당량의 DIPEA와 8.4 μmol 의 화합물 I을 녹여 교반하였다.

[1538] 반응의 종결을 확인한 후 반응 용액을 농축하였으며, Preparative-HPLC를 통하여 화합물 I-SSFI의 정제를 시도하였다. 정제 후 동결 건조를 통하여 물질을 확보하였고, 12 mg을 확보하였다 (Purity; >95% up (HPLC), yield: 71%).

[1539]

[1540] 화합물 I-SSFI 의 구조 확인

[1541] 측정 장비 : Waters quattro premier xe

[1542] Calculated molecular weight : 2246.99 g/mol

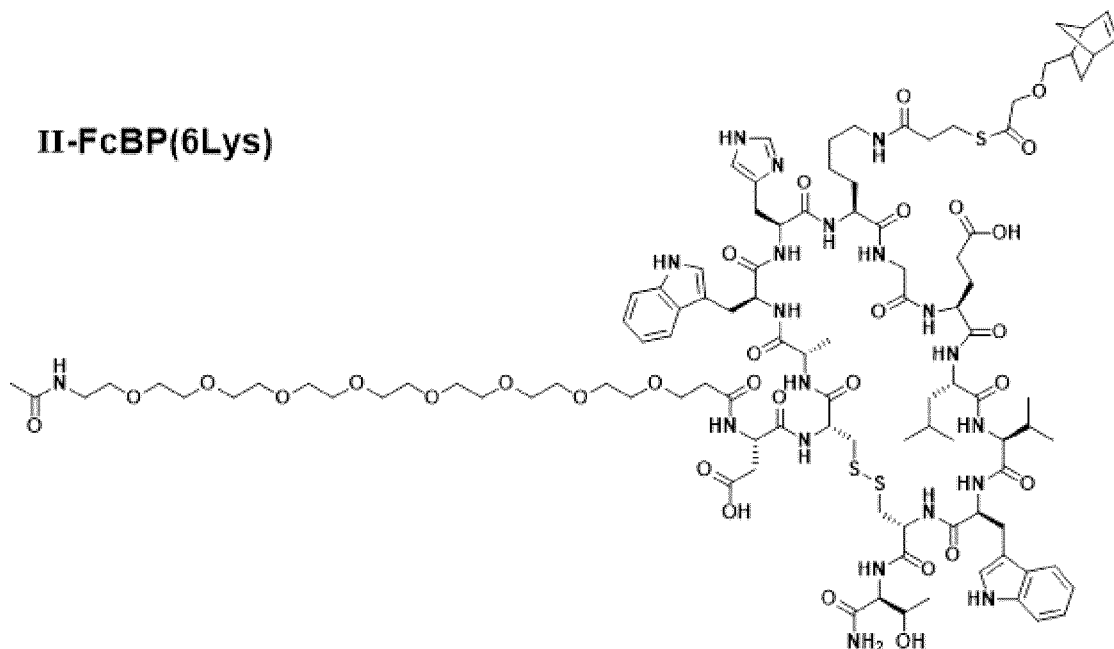
[1543] Measured molecular weight ($M/2+H$)²⁺ : 1124.90 g/mol

[1544] 상기 결과를 도 33에 도시하였다.

[1545]

[1546] 2.2. 화합물 II-SSFI (Xa₁이 라이신인 경우)의 합성 및 구조 확인

[1547]

II-FcBP(6Lys)**Exact Mass: 2261.01**

[1548] 화합물 II-SSFI(Lys)의 합성 방법

[1549] 화합물 II-SSFI의 합성은 DMF에서 수행하였고 SSFI에 화합물 II를 도입하기 위해 7.3 μmol 의 SSFI에 3 당량의 DIPEA와 8.4 μmol 의 화합물 II를 녹여 교반하였다.

[1550] 반응의 종결을 확인한 후 반응 용액을 농축하였으며, Preparative-HPLC를 통하여 화합물 II-SSFI의 정제를 시도하였다. 정제 후 동결 건조를 통하여 물질을 확보하였고, 13 mg을 확보하였다 (Purity; >95% up (HPLC), yield: 78%).

[1551]

[1552] 화합물 II-SSFI(Lys)의 구조 확인

[1553] 측정 장비 : Ultraflex extreme (Bruker)

[1554] 측정 matrix : CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) & DHB(2,5-Dihydroxybenzoic acid)

[1555] Calculated molecular weight : 2261.01 g/mol

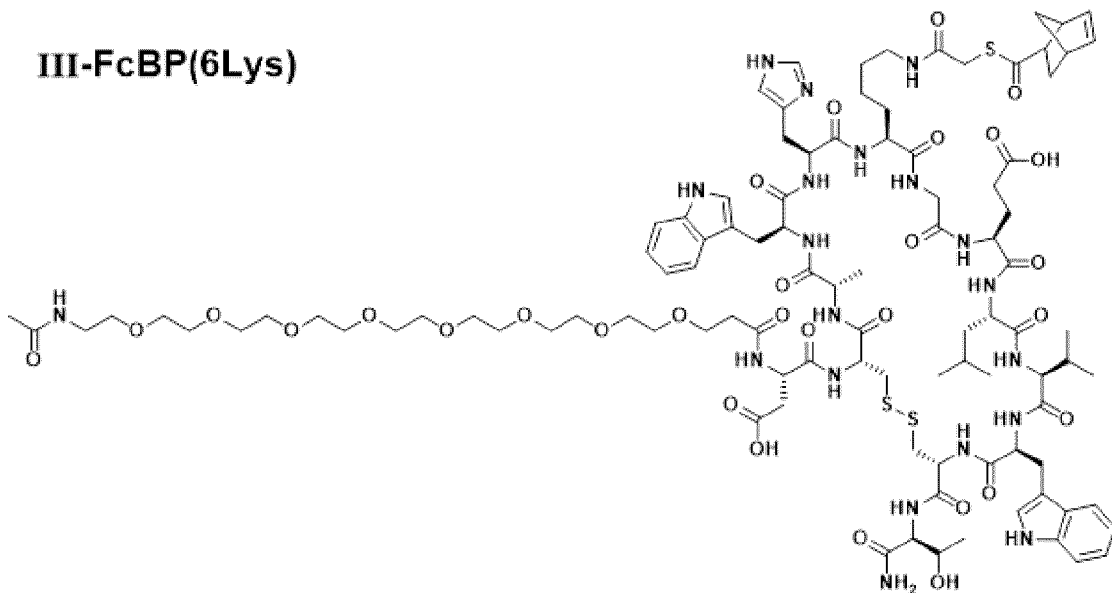
[1556] Measured molecular weight ($M/2+H$)²⁺ : 2263.26 g/mol

[1557] 상기 결과를 도 34에 도시하였다.

[1558]

[1559] 2.3. 화합물 III-SSFI (Xa₁이 라이신인 경우)의 합성 및 구조 확인

[1560]

III-FcBP(6Lys)**Exact Mass: 2202.97**

[1561] 화합물 III-SSFI(Lys)의 합성 방법

[1562] 화합물 III-SSFI의 합성은 DMF에서 수행하였고 SSFI에 화합물 III를 도입하기 위해 7.3 μmol 의 SSFI에 3 당량의 DIPEA와 8.4 μmol 의 화합물 III를 녹여 교반하였다.

[1563] 반응의 종결을 확인한 후 반응 용액을 농축하였으며, Preparative-HPLC를 통하여 화합물 III-SSFI의 정제를 시도하였다. 정제 후 동결 건조를 통하여 물질을 확보하였고, 12 mg을 확보하였다 (Purity; >95% up (HPLC), yield: 75%).

[1564]

[1565] 화합물 III-SSFI(Lys)의 구조 확인

[1566] 측정 장비 : Waters quattro premier xe

[1567] Calculated molecular weight : 2202.97 g/mol

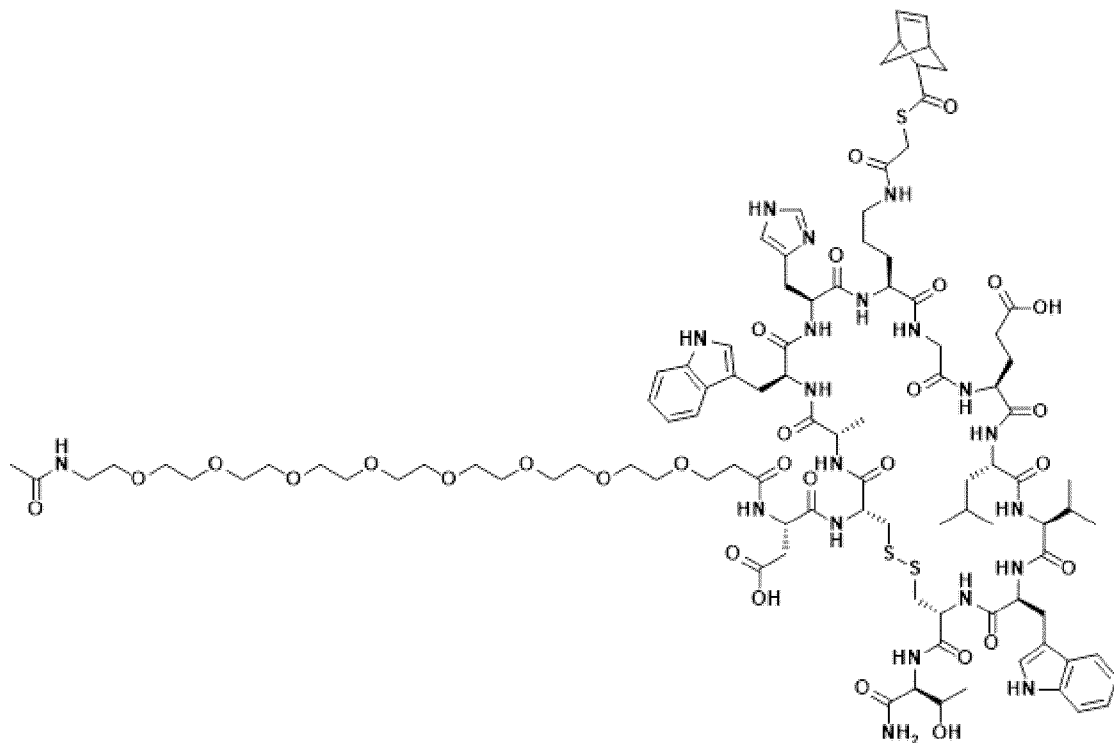
[1568] Measured molecular weight ($M/2+H$)²⁺ : 1103.64 g/mol

[1569] 상기 결과를 도 35에 도시하였다.

[1570]

[1571] 2.4. 화합물 III-SSFI (Xa₁이 Ornithine인 경우)의 합성 및 구조 확인

[1572]

**Exact Mass: 2188.95**

[1573] 화합물 III-SSFI(Orn)의 합성 방법

[1574] 화합물 III-SSFI의 합성은 DMF에서 수행하였고 SSFI에 화합물 III를 도입하기 위해 7.3 μmol 의 SSFI에 3 당량의 DIPEA와 8.4 μmol 의 화합물 III를 녹여 교반하였다.

[1575] 반응의 종결을 확인한 후 반응 용액을 농축하였으며, Preparative-HPLC를 통하여 화합물 III-SSFI의 정제를 시도하였다. 정제 후 동결 건조를 통하여 물질을 확보하였고, 14 mg을 확보하였다 (Purity; >95% up (HPLC), yield: 87%).

[1576]

[1577] 화합물 III-SSFI(Orn)의 구조 확인

[1578] 측정 장비 : Waters quattro premier xe

[1579] Calculated molecular weight : 2188.97 g/mol

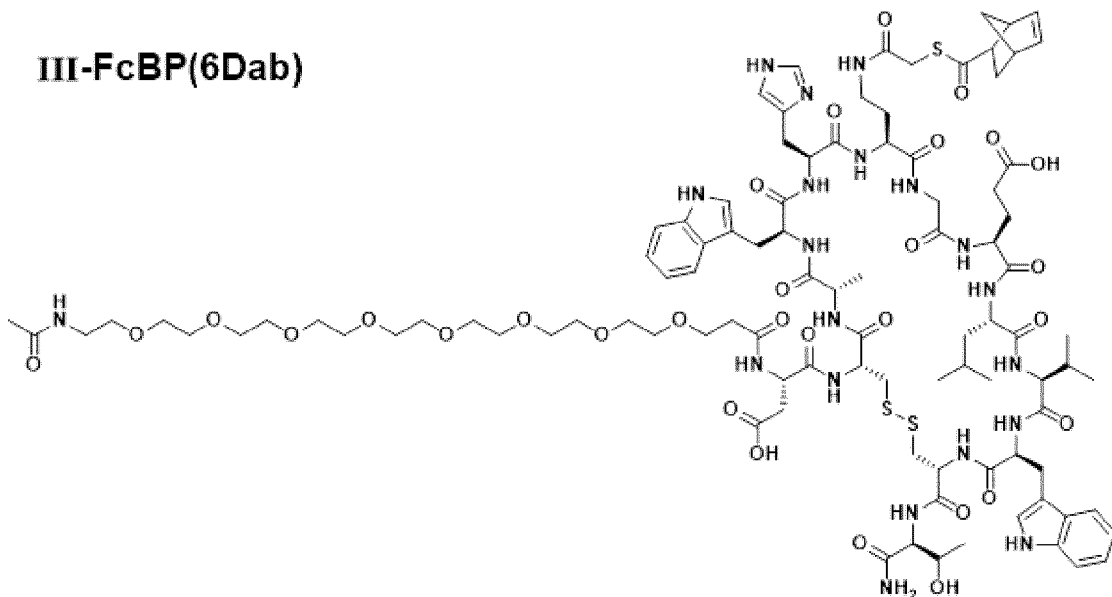
[1580] Measured molecular weight ($M/2+H$)²⁺ : 1096.64 g/mol

[1581] 상기 결과를 도 36에 도시하였다.

[1582]

[1583] 2.5. 화합물 III-SSFI (X_{a1} 이 2,4-Diaminobutanoic acid (Dab)인 경우)의 합성 및 구조 확인

[1584]

III-FcBP(6Dab)**Exact Mass: 2174.94**

[1585] 화합물 III-SSFI(Dab)의 합성 방법

[1586] 화합물 III-SSFI의 합성은 DMF에서 수행하였고 SSFI에 화합물 III를 도입하기 위해 7.3 μmol 의 SSFI에 3 당량의 DIPEA와 8.4 μmol 의 화합물 III를 녹여 교반하였다.

[1587] 반응의 종결을 확인한 후 반응 용액을 농축하였으며, Preparative-HPLC를 통하여 화합물 III-SSFI의 정제를 시도하였다. 정제 후 동결 건조를 통하여 물질을 확보하였고, 12 mg을 확보하였다 (Purity; >95% up (HPLC), yield: 75%).

[1588]

[1589] 화합물 III-SSFI(Dab)의 구조 확인

[1590] 측정 장비 : Waters quattro premier xe

[1591] Calculated molecular weight : 2174.94 g/mol

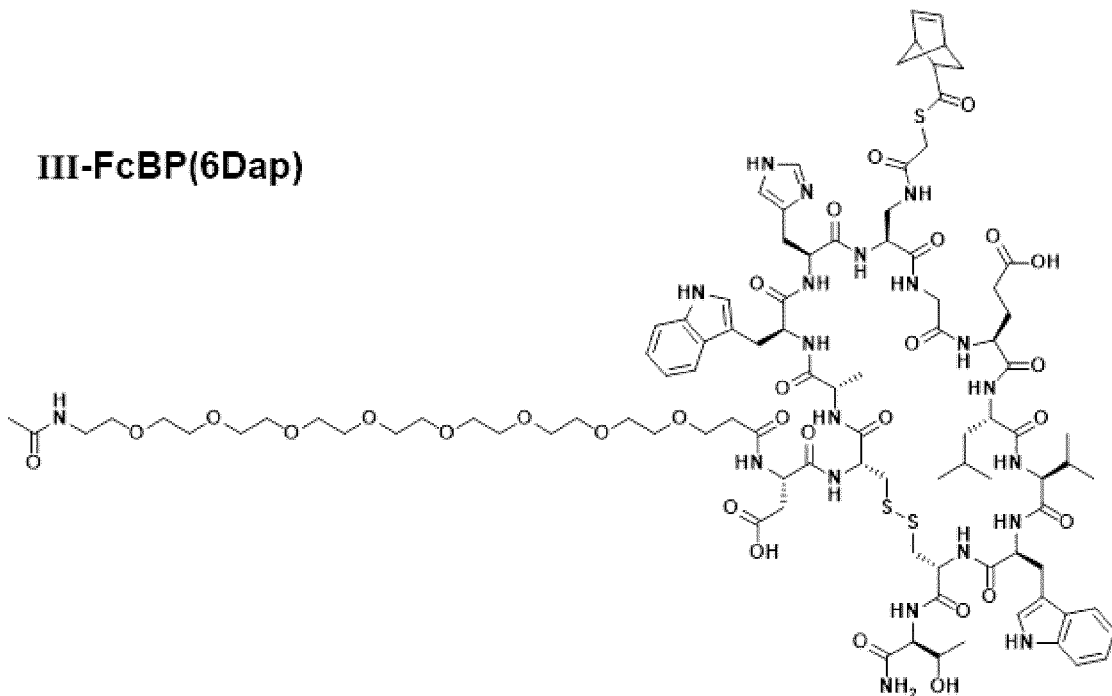
[1592] Measured molecular weight ($M/2+H$)²⁺ : 1089.94 g/mol

[1593] 상기 결과를 도 37에 도시하였다.

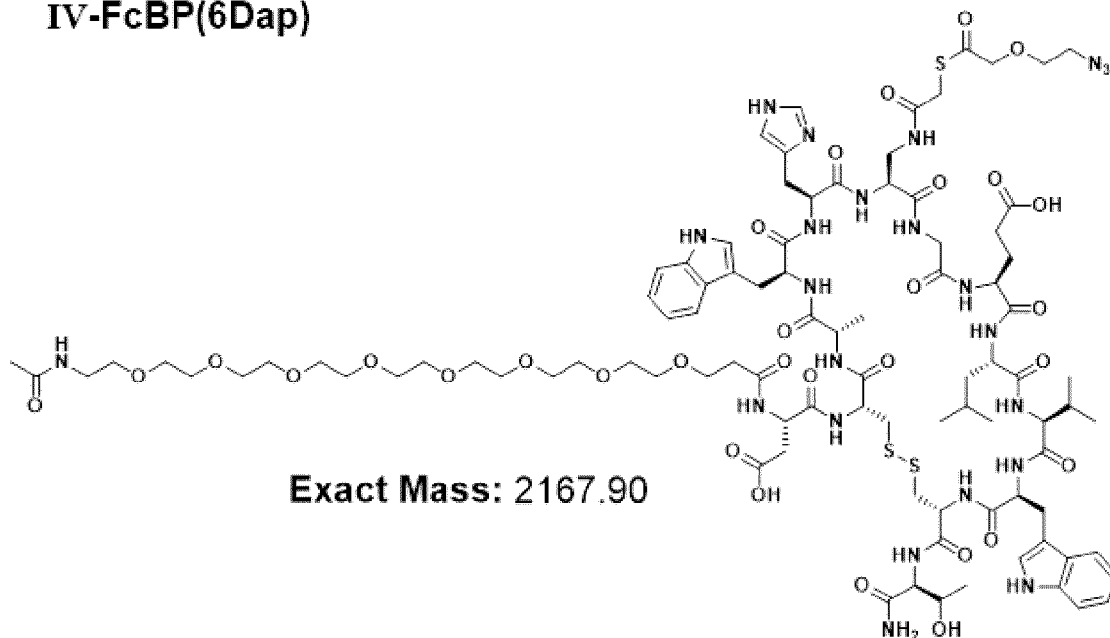
[1594]

[1595] 2.6. 화합물 III-SSFI (Xa₁이 2,3-Diaminopropionic acid (Dap)인 경우)의 합성 및 구조 확인

[1596]

III-FcBP(6Dap)**Exact Mass: 2160.92**

- [1597] 화합물 III-SSFI(Dap)의 합성 방법
- [1598] 화합물 III-SSFI의 합성은 DMF에서 수행하였고 SSFI에 화합물 III를 도입하기 위해 7.3 μmol 의 SSFI에 3 당량의 DIPEA와 8.4 μmol 의 화합물 III를 녹여 교반하였다.
- [1599] 반응의 종결을 확인한 후 반응 용액을 농축하였으며, Preparative-HPLC를 통하여 화합물 III-SSFI의 정제를 시도하였다. 정제 후 동결 건조를 통하여 물질을 확보하였고, 12 mg을 확보하였다 (Purity; >95% up (HPLC), yield: 75%).
- [1600]
- [1601] 화합물 III-SSFI(Dap)의 구조 확인
- [1602] 측정 장비 : Waters quattro premier xe
- [1603] Calculated molecular weight : 2160.92 g/mol
- [1604] Measured molecular weight ($M/2+H$)²⁺ : 1082.34 g/mol
- [1605] 상기 결과를 도 38에 도시하였다.
- [1606]
- [1607] 2.7. 화합물 IV-SSFI (Xa₁이 Dap인 경우) 합성 및 구조 확인

[1608] **IV-FcBP(6Dap)**

[1609] 화합물 IV-SSFI(Dap)의 합성 방법

[1610] 화합물 IV-SSFI의 합성은 DMF에서 수행하였고 SSFI에 화합물 IV를 도입하기 위해 7.3 μmol 의 SSFI에 3 당량의 DIPEA와 8.4 μmol 의 화합물 IV를 녹여 교반하였다.

[1611] 반응의 종결을 확인한 후 반응 용액을 농축하였으며, Preparative-HPLC를 통하여 화합물 IV-SSFI의 정제를 시도하였다. 정제 후 동결 건조를 통하여 물질을 확보하였고, 12 mg을 확보하였다 (Purity; >95% up (HPLC), yield: 76%).

[1612]

[1613] 화합물 IV-SSFI(Dap)의 구조 확인

[1614] 측정 장비 : Waters quattro premier xe

[1615] Calculated molecular weight : 2167.90 g/mol

[1616] Measured molecular weight ($M/2+H$)²⁺ : 1085.60 g/mol

[1617] 상기 결과를 도 39에 도시하였다.

[1618]

[1619] 3. 위치특이적으로 제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 합성 및 구조 확인

[1620] 3.1. Antibody-Norbornene의 합성

[1621] 트라스투주맙(trastuzumab)-Norbornene 합성 방법 (1)

[1622] 화합물 I-SSFI(Lys)를 이용한 도입 반응

[1623] Ab (246/248 Lys)-Norbornene의 합성은 buffer 상에서 화합물 I-SSFI(Lys)를 이용하여 진행하였다. 반응 buffer는 pH 7.4 1xPBS buffer (0.01% Tween 20)를 사용하였다. 항체 (Trastuzumab, 4 mg/mL)의 특정 위치에 Norbornene을 도입하기 위하여 항체 당 8 당량의 화합물 I-SSFI(Lys)를 넣고 상온에서 72 시간 반응을 진행하였으며, 반응 모니터링 및 종결은 HIC-HPLC를 이용하여 확인하였다. 항체에 노보넨 결합이 진행될수록 크로마토그램의 피크가 4분에서 4.5분과

5분대로 이동하는 것을 관찰함으로써, 반응의 진행정도를 확인하였다. pH 7.4 1xPBS buffer를 이용한 투석(dialysis, 3회) 및 크기배제크로마토그래피(size exclusion chromatography) 기법을 이용하여 정제를 진행하였다.

[1624] 반응 시간에 따른 trastuzumab과 화합물 I-SSFI(Lys)를 이용한 결합 반응 관찰은 도 40에 도시하였다.

[1625]

[1626] 트라스투주맙(trastuzumab)-Norbornene 합성 방법 (2)

[1627] 화합물 II-SSFI(Lys)를 이용한 도입 반응

[1628] Ab (246/248 Lys)-Norbornene의 합성은 buffer 상에서 화합물 II-SSFI(Lys)를 이용하여 진행하였다. 반응 buffer는 pH 7.4 1xPBS buffer (0.01% Tween 20)를 사용하였다. 항체 (Trastuzumab, 4 mg/mL)의 특정 위치에 Norbornene을 도입하기 위하여 항체 당 8 당량의 화합물 II-SSFI(Lys)를 넣고 상온에서 72 시간 반응을 진행하였으며, 반응 모니터링 및 종결은 HIC-HPLC를 이용하여 확인하였다. 항체에 노보넨 결합이 진행될수록 크로마토그램의 피크가 4분에서 4.5 분대로 이동하는 것을 관찰함으로써, 반응의 진행정도를 확인하였다. pH 7.4 1xPBS buffer를 이용한 투석(dialysis, 3회) 및 크기배제크로마토그래피(size exclusion chromatography) 기법을 이용하여 정제를 진행하였다.

[1629] 반응 시간에 따른 trastuzumab과 화합물 II-SSFI(Lys)를 이용한 결합 반응 관찰은 도 41에 도시하였다.

[1630]

[1631] 트라스투주맙(trastuzumab)-Norbornene 합성 방법 (3)

[1632] 화합물 III-SSFI(Dap, Dab, Orn, Lys)를 이용한 도입 반응

[1633] Ab (246/248 Lys)-Norbornene의 합성은 buffer 상에서 화합물 III-SSFI(Lys)를 이용하여 진행하였다. 반응 buffer는 pH 7.4 1xPBS buffer (0.01% Tween 20)를 사용하였다. 항체 (Herceptin, Trastuzumab, 4 mg/mL, 1 mL)의 특정 위치에 Norbornene을 도입하기 위하여 항체 당 10 당량의 III-SSFI(Dap, Dab, Orn, Lys)를 넣고 상온에서 28 시간 반응을 진행하였으며, 반응 모니터링 및 종결은 HIC-HPLC를 이용하여 확인하였다. 항체에 노보넨 접합이 진행될수록 크로마토그램의 피크가 6.2분에서 6.4~6.7분으로 이동하는 것을 관찰함으로써, 반응의 진행정도를 확인하였다. pH 7.4 1xPBS buffer를 이용한 투석(dialysis) 및 크기배제크로마토그래피(size exclusion chromatography) 기법을 이용하여 정제를 진행하였다.

[1634]

[1635] 화합물 III-SSFI(Dap, Dab, Orn, Lys)와 항체의 반응은 도 42에 도시하고 최종 결과물인 Ab(246/248)-Norbornene의 구조를 도 43에 도시하였다.

[1636] 반응 시간에 따른 trastuzumab과 화합물 III-SSFI(Dap)를 이용한 결합 반응 관찰은 도 44에 도시하였다.

[1637] 반응 시간에 따른 trastuzumab과 화합물 III-SSFI(Dab)를 이용한 결합 반응

관찰은 도 45에 도시하였다.

[1638] 반응 시간에 따른 trastuzumab과 화합물 III-SSFI(Orn)를 이용한 결합 반응 관찰은 도 46에 도시하였다.

[1639] 반응 시간에 따른 trastuzumab과 화합물 III-SSFI(Lys)를 이용한 결합 반응 관찰은 도 47에 도시하였다.

[1640]

[1641] 3.2. Antibody-azide의 합성

[1642] 트라스투주맵(trastuzumab)-azide 합성 방법 (4)

[1643] 화합물 IV-SSFI(Dap)를 이용한 도입 반응

[1644] Ab (246/248 Lys)-azide의 합성은 buffer 상에서 화합물 IV-SSFI(Dap)를 이용하여 진행하였다. 반응 buffer는 pH 7.4 1xPBS buffer (0.01% Tween 20)를 사용하였다. 항체 (Trastuzumab, 4 mg/mL)의 특정 위치에 azide를 도입하기 위하여 항체 당 10 당량의 화합물 IV-SSFI(Dap)를 넣고 상온에서 24 시간 반응을 진행하였으며, 반응 모니터링 및 종결은 HIC-HPLC를 이용하여 확인하였다. 항체에 노보넨 결합이 진행될수록 크로마토그램의 피크가 6분에서 6.3 분대로 이동하는 것을 관찰함으로써, 반응의 진행정도를 확인하였다. pH 7.4 1xPBS buffer를 이용한 투석(dialysis, 3회) 및 크기배제크로마토그래피(size exclusion chromatography) 기법을 이용하여 정제를 진행하였다.

[1645] 반응 시간에 따른 trastuzumab과 화합물 IV-SSFI(Dap)를 이용한 결합 반응 관찰은 도 48에 도시하였다.

[1646]

[1647] 3.3. 트라스투주맵(trastuzumab)-Norbornene의 구조 및 위치특이적결합 확인

[1648] 화합물 III-SSFI(Dap)에 의해 항체에 노보넨 링커가 결합된 항체-노보넨 복합체는 질량 분석법을 이용하여 확인되었다. 항체-노보넨 복합체를 IdeS 효소 처리 한 뒤, F(ab')₂와 Fc/2으로 노보넨이 항체의 어느 위치에 결합하는지 확인하였다. Ides Fc/2-노보넨 복합체의 경우, "Obs-Theo"의 값이 2991.68으로 나타났으며, 이는 N-glycan mass 값과 1개의 lysine이 떨어진 값과 분자량 120 Da에 해당하는 1개의 노보넨이 결합된 값을 고려할 경우, 정확하게 일치하는 것을 확인하였다 (High mass 분자량 분석 시, -0.10 은 system error로 간주됨). Ides_F(ab')₂의 경우, Observed mass spectrum은 detection 되었으나, 각 mass spectrum의 복잡성 때문에 one charge mass값 변환이 되지 않아 해당 mass 값을 얻을 수 없었다.

[1649] 항체-노보넨 결합에 의한 분자량 증가 스펙트럼은 도 49 및 도 50에 도시되었으며, 노보넨 컨주게이트에 의한 분자량 변화는 표 12와 같다.

[1650]

<표 12> 항체-노보넨 콘쥬게이트의 분자량 변화

Sample		Theoretical mass (peptide full seq.)	Observed mass	Δ mass (Obs-Theo) (continued-)
Trastuzumab	Ides Fc/2	23916.08	25231.10	1315.02
Trastuzumab-norbornene conjugate	Ides Fc/2	23916.08	25353.53	1437.45

(-continued) N-glcan (G0F/G0F)	C-term (-2K)	Norbornene conjugate	Δ mass	
1445.00	128	ND	-1.98	(G0F/-K)
1445.00	128	122	-1.55	(G0F/-K)

[1651] 또한, 트라스투주맙과의 MS/MS 스펙트럼 비교를 통해 항체-노보넨 복합체의 노보넨 결합 위치를 확인한 결과,

LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 서열의 K248 위치에 노보넨 분자가 결합한 것을 확인하였다. MS/MS의 크로마토그램은 도 51 내지 54에 도시하였으며, MS/MS 스펙트럼에 의한 서열 매칭 결과를 도 55에 도시하였다.

[1652]

[1653] 상기 분석을 위한 조건은 다음과 같다.

[1654]

[1655] UPLC 조건

[1656] 측정 장비 : Acquity UPLC I-Class system

[1657] 1. Column: : Thermo MAbPac™ RP 2.1X5mm

[1658] 2. Column Temp: 60 C

[1659] 3. Mobile phase

[1660] A. 0.1 % Formic acid in Water

[1661] B. 0.1 % Formic acid in Acetonitrile

[1662]

[1663] Mass spectroscopy 조건

[1664] 측정 장비 : LTQ Elite (Thermo)

[1665] Source type : HESI

[1666] Capillary Temp : 320C

[1667] Source Heater temp : 300C

[1668] Sheath Gas flow : 40.00

[1669] Aux Gas flow : 20.00

[1670] Sweep Gas flow : 5.00

[1671] Source voltage (KV) : 4.00

[1672] FTMS resolution : 120000

[1673] FTMS Mass range : 400~4000

[1674]

[1675] 3.4. 트라스투주맵(trastuzumab)-Azide의 구조 확인

[1676] 화합물 IV-SSFI(Dap)에 의해 항체에 아지드 링커가 결합된 항체-아지드 복합체는 질량 분석법을 이용하여 확인하였다. 트라스투주맵에 두 분자의 아지드 화합물이 결합되어 249 Da 만큼의 분자량 증가를 확인하였다. 측정된 트라스투주맵의 질량 스펙트럼은 도 56에 도시하였으며, 두 개의 아지드 분자가 결합된 항체-아지드 복합체의 질량 스펙트럼은 도 57에 도시하였다.

[1677]

[1678] 측정 장비: Ultraflex III (TOF/TOF)

[1679] Analysis mode: Linear mode

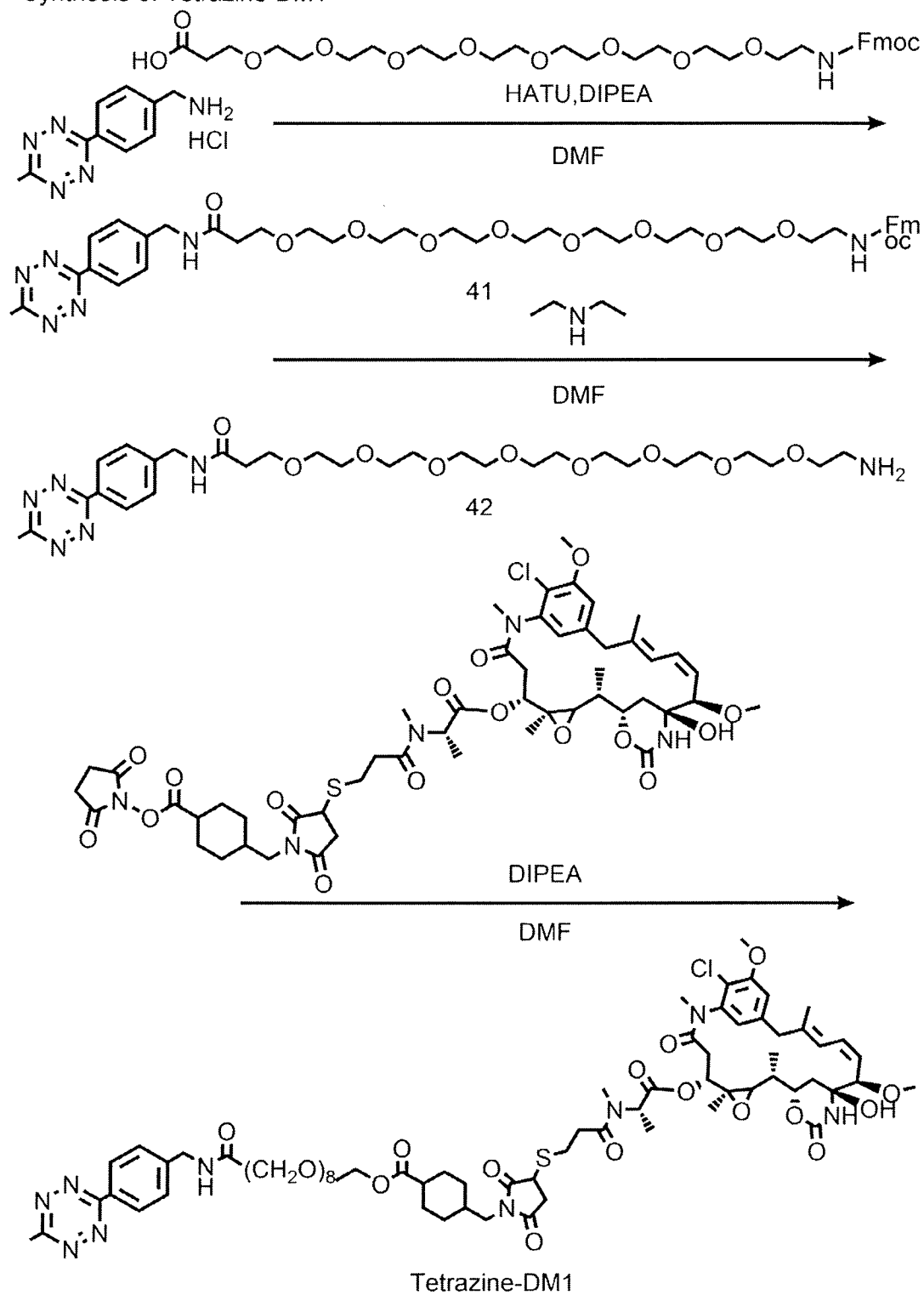
[1680] Polarity: Positive

[1681] Detection: m/z 2,000~300,000

[1682] Laser repetition rate: 100 Hz

- [1683] Number of shot: 1,000 shot
- [1684] Deflection: On, 5,000 Da
- [1685] Voltage: Ion Source kV, Ion Source II 23.00 kV, Lens 9.00 kV
- [1686] Calculated molecular weight : 148,271 g/mol
- [1687] Measured molecular weight : 148,262 g/mol
- [1688]
- [1689] 4. 항체-페이로드 콘쥬게이트의 합성 및 구조 확인
- [1690] 4.1. 페이로드 합성 방법 및 구조 확인
- [1691] [반응식 15]

[1692] Synthesis of Tetrazine-DM1



[1693] Tetrazine-DM1 합성 방법

[1694] 화합물 41의 합성

- [1695] Fmoc-PEG₈-OH 0.53 g (0.8 mmol, 1.0 eq)을 DMF 7 mL에 녹인 후 교반시킨 후 HATU 0.38 g (1.0 mmol, 1.25 eq)과 DIPEA 0.3 mL (1.7 mmol, 2.1 eq)을 천천히 적가하였다. Methyltetrazine-amine·HCl 0.205 g (0.86 mmol, 1.1 eq)을 적가하고 DIPEA 0.3 mL (1.7 mmol, 2.1 eq)을 천천히 적가하였다. 4 시간 동안 교반시킨 후 용매를 감압농축하여 제거하였고, 컬럼크로마토그래피 (5% MeOH in DCM)을 통하여 목적 화합물을 정제하였다. TLC (DCM:MeOH = 20:1); R_f = 0.3
- [1696]
- [1697] 화합물 42의 합성
- [1698] 0.527 g (0.62 mmol, 1.0 eq)의 화합물 41를 DMF 6 mL에 녹인 후 Diethylamine 0.3 mL을 천천히 적가하였다. 2.5 시간 동안 교반시킨 후 용매를 감압농축하여 제거하였고, 컬럼크로마토그래피 (DCM:MeOH:NH₄OH = 80:25:2.5)를 통하여 목적 화합물을 정제하였고, 0.273 g을 획득하였다 (yield : 70%). TLC (DCM:MeOH:NH₄OH = 80:25:2.5); R_f = 0.1
- [1699]
- [1700] Tetrazine-DM1의 합성
- [1701] 0.355 g (0.57 mmol, 1.5 eq)의 화합물 42를 DMF 25 mL에 녹인 후 교반시킨다. DM1-SMCC-NHS 0.405 g (0.38 mmol, 1.0 eq)를 넣어주고 DIPEA를 pH 9.0까지 천천히 적가한 뒤 2 시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 감압농축 한 뒤, 컬럼크로마토그래피 (10% MeOH in DCM)를 사용하여 목적 화합물을 정제하였고, 0.434 g 획득하였다 (yield: 73%). TLC (DCM:MeOH = 10:1); R_f = 0.5
- [1702]
- [1703] Tetrazine-DM1의 구조 확인
- [1704] LRMS (ESI): m/z 782.6 [M+2H⁺]
- [1705] 상기 결과를 도 58에 도시하였다.
- [1706]
- [1707] 4.2. 항체-페이로드 콘쥬게이트 합성 및 구조 확인
- [1708] 4.2.1. Antibody-Norbornene-Tetrazine-DM1
- [1709] Trastuzumab-Norbornene-Tetrazine-DM1 합성 방법 (1)
- [1710] 화합물 III-SSFI(Dap)를 이용한 Trastuzumab-Norbornene로의 Tetrazine-DM1 도입 반응
- [1711] 화합물 III-SSFI(Dap)에 의해 Norbornene 두 분자가 도입된 트라스투주맙(trastuzumab)을 이용하여 항체-페이로드 콘쥬게이트 제작을 수행하였다. 4.5 mg/mL 농도로 25 mL의 양을 이용하여 반응을 수행하였으며, 항체에 접합되어 있는 norbornene과의 생물직교반응(biorthogonal chemistry)을 위해 테트라진-PEG8-DM1 (Tetrazine-PEG8-DM1) 약물의 접합을 시도하였다. 항체 대비 40 당량의 약물을 사용하였으며, 접합 반응은 상온에서 24 시간 동안 pH 5.5 20 mM Histidine acetate 용액하에서 진행하였다. 접합 반응의 관찰은 HIC-HPLC를 통해 확인하였으며, 트라스투주맙에 노보넨 분자만 결합되어

나타나는 7.7분 대의 피크가 항체-노보넨 링커와 테트라진-PEG8-DM1 약물이 반응함에 따라 8.7 분(DAR 1)과 10.5분(DAR 2) 대로 변화하는 것을 관찰함으로써 항체-페이로드 콘쥬게이트 생성을 관찰하였다.

[1712] 생성물인 항체-페이로드 콘쥬게이트의 구조를 도 59에 도시하였으며, HIC-HPLC를 통한 반응 모니터링은 도 60에 도시하였다 (표 13).

[1713] <표 13> 항체-페이로드 콘쥬게이트의 생성 HIC-HPLC 반응 모니터링

Retention time	Composition
6.6 min	Trastuzumab
7.7 min	Trastuzumab-norbornene conjugate
8.7 min	Trastuzumab-DM1 conjugate (1 site, DAR1)
10.5 min	Trastuzumab-DM1 conjugate (2 site, DAR2)

[1714] Trastuzumab-Norbornene-Tetrazine-DM1 구조 확인 (2)

[1715] Trastuzumab-Norbornene에 Tetrazine-DM1이 결합된 항체 약물 콘쥬게이트는 질량 분석법을 이용하여 확인되었다. 항체 약물 콘쥬게이트를 IdeS 효소 처리 한 뒤, F(ab')₂와 Fc/2으로 tetrazine-DM1이 항체의 어느 위치에 결합하는지 확인하였다. Ides Fc/2-DM1 복합체의 경우, "Obs-Theo"의 값이 1673.5으로 나타났으며, 분자량 1688.80 Da에 해당하는 1개의 tetrazine-DM1이 결합된 값을 고려할 경우, 약물이 결합된 것을 확인하였다 (DM1 계열의 약물 분자량 분석 시, 탈수 반응이 관찰되기도 함). Ides_F(ab')₂의 경우, Observed mass spectrum은 detection 되었으나, 각 mass spectrum의 복잡성 때문에 one charge mass값 변환이 되지 않아 해당 mass 값을 얻을 수 없었다.

[1716] Trastuzumab-Norbornene- Tetrazine-DM1 결합에 의한 분자량 증가 스펙트럼은 도 61 및 도 62에 도시하였다.

[1717]

[1718] UPLC 조건

[1719] 측정 장비 : Acquity UPLC I-Class system

[1720] 1. Column: : Thermo MAbPac™ RP 2.1X5mm

[1721] 2. Column Temp: 60 C

[1722] 3. Mobile phase

[1723] A. 0.1 % Formic acid in Water

[1724] B. 0.1 % Formic acid in Acetonitrile

[1725]

[1726] Mass spectroscopy 조건

[1727] 측정 장비 : LTQ Elite (Thermo)

- [1728] Source type : HESI
- [1729] Capillary Temp : 320C
- [1730] Source Heater temp : 300C
- [1731] Sheath Gas flow : 40.00
- [1732] Aux Gas flow : 20.00
- [1733] Sweep Gas flow : 5.00
- [1734] Source voltage (KV) : 4.00
- [1735] FTMS resolution : 120000
- [1736] FTMS Mass range : 400~4000
- [1737]
- [1738] 5. 항체-약물 콘쥬게이트의 FcRn 결합 분석
- [1739] 본 특허에 의해 제작된 항체-약물 콘쥬게이트는 AbClick®Pro(앱클릭®프로)라고 명명하였다.
- [1740] 항체-약물 콘쥬게이트 (도 59 참조, AbClick®Pro (NC, DM1))의 항체 재순환 기능 여부를 확인하기 위해, 체내에서 항체 재순환과 밀접한 관련이 있는 신생아 Fc 수용체(FcRn, Fc receptor of neonate)와의 결합력을 분석하였다. 제작된 ADC와 FcRn의 반응 친화도(affinity)를 측정하기 위해 생분자반응분석기 (biomolecular interaction system) 중에 하나인 Octet (model : Octet QK384)을 사용하였다. 센서표면에 부착된 분자와 샘플 내의 분자가 상호작용하여 반응하는 정도에 따라 생기는 표면 변화에 의한 빛 반사 차이를 비표지로 인지함으로써 kinetic analysis를 수행하였다. 샘플은 Trastuzumab, Kadcyla와 AbClick®Pro (NC, DM1)을 이용하여 pH 6.0 조건에서 FcRn과의 결합력을 측정하였으며, 측정에 의한 KD 값은 각각 $1.12 \times 10^{-7}M$, $1.12 \times 10^{-7}M$ 과 $8.84 \times 10^{-8}M$ 로 AbClick®Pro가 Kadcyla 보다 우수하거나 동등한 결합력을 가지는 것으로 확인되었다 (표 14).

[1741] <표 14> 항체-약물 콘쥬게이트의 FcRn 결합 분석

pH 6.0	FcRn binding		
	KD_Kinetics (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/S)
Trastuzumab	1.12E-7	3.31E+05	3.69E-02
Kadcyla	1.12E-7	2.10E+05	2.37E-02
*AbClick® Pro	8.84E-8	2.26E+05	1.99E-02

- [1742] 6. 항체-약물 콘쥬게이트의 항원 결합 분석
- [1743] 효소결합면역흡착검사 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 분석을 통해 항체-약물 콘쥬게이트와 Her2 단백질의 결합 여부를 확인하였다. 항원 결합력 측정을 위한 항체-약물 콘쥬게이트는 Trastuzumab과 화합물

III-SSFI(Dap)에 의해 제작된 항체-노보넨 복합체를 사용하였으며, 항체-노보넨 복합체에 결합할 3종의 약물 구조는 도 63에 도시하였다.

[1744] 항원의 해리상수(Kd)는 Herceptin(Trastuzumab)에서는 약 98.6 pM, Kadcyla에서는 약 94.8 pM, AbClick®Pro (NC, DM1)에서는 약 121.4 pM, AbClick®Pro (VC, DM1)에서는 약 137.0 pM, AbClick®Pro (VC, MMAE)에서는 약 117.3 pM로 확인되었다. 상기 결과를 통해 약물의 결합자리가 제작된 ADC의 항원에 대한 결합력에 영향을 주지 않는 것으로 확인하였다.

[1745] 상기 항체-약물 콘쥬게이트의 항원 결합력 측정 그래프는 도 64에 도시하였다 (표 15).

[1746] <표 15> 항체-약물 콘쥬게이트의 항원 결합 분석

Antibody	K _D Value (binding affinity, pM)
Herceptin	98.6
Kadcyla	94.7
AbClick®Pro (NC,DM1)	121.4
AbClick®Pro (VC,DM1)	137.0
AbClick®Pro (VC,MMAE)	117.3

[1747]

[1748] 7. 항체-약물 콘쥬게이트의 혈장 안정성 확인

[1749] 효소결합면역흡착검사 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 분석을 통해 항체-약물 콘쥬게이트의 혈장에서의 안정성 여부를 확인하였다. 상온에서 쥐, 토끼, 사람 혈청에 대한 항체-약물 콘쥬게이트의 안정성을 검증하였다. Kadcyla® 군과 자체 제작한 ADC인 AbClick®Pro (NC, DM1)의 시간에 따른 Intact ADC(약물이 결합되어 있는 ADC) 잔존량의 패턴이 일치하는 것으로 확인되었다.

[1750] 상기 항체-약물 콘쥬게이트의 혈장 안정성 분석 결과는 도 65 내지 67에 도시하였다.

[1751]

[1752] 8. 항체-약물 콘쥬게이트 (AbClick®Pro)의 세포수준에서의 약효평가 (In vitro cytotoxicity test)

[1753] 암세포의 마커 표적마커 수준에 따라서 트라스투주맙을 이용한 항체-약물 콘쥬게이트 3종(ADC, AbClick®Pro series)의 효력 평가를 수행하였으며, 표적 항원인 Her2의 양성 발현 세포주는 NCI-N87, BT474를 음성세포주는 MDA-MB-468를 이용하여 세포 독성 실험을 진행하였다. Her2 과발현세포인

NCI-N87에서는 제작된 항체 약물 콘쥬게이트 3종(AbClick®Pro(NC, DM1), AbClick®Pro(VC, DM1), AbClick®Pro(VC, MMAE))을 농도별로 처리하여 관찰한 결과, IC50 값이 207.7 ng/mL, 93.9 ng/mL와 57.7 ng/mL을 나타내는 우수한 항암 효과를 확인하였다. 다른 Her2 과발현 세포주인 BT474에서는 제작된 항체 약물 콘쥬게이트 3종(AbClick®Pro(NC, DM1), AbClick®Pro(VC, DM1), AbClick®Pro(VC, MMAE))을 농도별로 처리하여 관찰한 결과, IC50 값이 47.7 ng/mL, 44.6 ng/mL와 1.09 ng/mL을 나타내는 우수한 항암 효과를 확인하였다. 상용화된 허셉틴 ADC인 캐싸일라 (Kadcyla)와 비교할 때 AbClick®Pro(VC, MMAE)는 동등이상의 세포 사멸 효과가 관찰되어 신규한 ADC로서의 효용을 확인할 수 있었다.

[1754] 상기 실험에 대한 결과는 도 68 내지 70에 도시하였다.

[1755]

[1756] 9. 항체-약물 콘쥬게이트 (AbClick®Pro)의 동물수준에서의 약효평가 (In vivo cytotoxicity test)

[1757] 표적 항원이 과발현 되어있는 NCI-N87 위암 세포주를 피하 이식하여 xenograft 모델을 제작하였으며, 4개의 그룹으로 분류하여 투여 물질에 대한 항암 효력 시험을 수행하였다. 본 실험에서 사용되는 BALB/c nude 마우스는 T 세포가 결핍되어 있어 암세포 이식이 용이하여 설치류를 이용한 항암 효력시험에 적절한 모델로 사용하였다.

[1758] (a) 세포주의 준비

[1759] 인체종양 세포주 (NCI-N87 cell line) 1 vial을 heat inactivation 된 10 % FBS (fetal bovine serum, Gibco, 10082-742)가 들어있는 RPMI1640 medium (Gibco, 22400-089)을 세포배양용 플라스크에 넣고 37°C 5 % CO₂ incubator에서 배양한다. PBS를 이용하여 washing하고, 2.5 % Trypsin-EDTA (Gibco, 15090)를 10 배 희석한 다음, 이를 첨가하여 세포를 분리한 후, 원심분리 (1,000 rpm, 5 분)하여 상층액을 버린 뒤, 새로운 배지로 세포 부유액을 얻는다. 현미경을 이용하여 viability를 확인한 다음, 1.25 x 10⁷ cells/mL의 농도로 배지와 matrigel을 1:1로 섞은 용액에 희석하여 세포주를 준비한다.

[1760] (b) 세포주의 이식

[1761] 세포주는 '4. 3) (4) 세포주의 준비'에 기술된 방법에 따라 준비한다. 세포주 준비 시 재현탁 (resuspension)시켜 균질화하며, 준비된 세포주는 즉시 동물에 투여하도록 한다. 세포주 이식 시, 동물의 등쪽 부위를 70 % 알코올로 소독하고, 엄지와 검지로 경배부의 피부를 잡아당겨 피부와 근육 사이에 공간을 만든 후 동물의 전방으로부터 엄지와 검지사이의 피하공간에 26 gauge needle이 장착된 주사침을 찔러 넣고 2.5 X 10⁶ cells/0.2 mL/head의 투여액량으로 피하 투여한다. 순화기간 중 건강한 동물을 선발하여 세포주 접종을 실시한 뒤, 세포주를 이식한 부위의 종양 크기가 약 100-150 mm³에 도달하였을 때, 순위화한 종양의 크기에 따라 각 군의 종양 크기가 최대한 균일하게 분포하도록 분배한다.

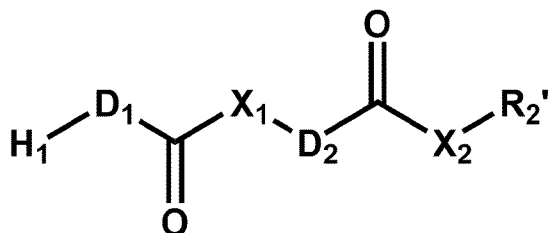
- [1762] (c) 시험군 구성, 투여량 및 투여방법 결정
- [1763] Cell line = NCI-N87
- [1764] Mouse type = BALB/c nude (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrljOri)
- [1765] Number of group = 5
- [1766] 투여 방법 = 정맥주사 (Intravenous injection, 26gauge needle syringe) 이용
- [1767] 투여량 = 5 mg/kg
- [1768] 투여 횟수 = 1 회/ 3 일, 3회 투여
- [1769] 관찰 기간 = 5주
- [1770] 그룹 1: PBS, 그룹 2: 허셉틴 (Herceptin, Trastuzumab), 그룹 3: 캐싸일라(Kadclyla), 그룹 4 : AbClick®Pro(NC, DM1), 그룹 5 : AbClick®Pro(VC, DM1), 그룹 6 : AbClick®Pro(VC, MMAE)
- [1771] (d) 관찰 및 검사 항목
- [1772] 일반증상
- [1773] 투여 및 관찰기간 동안 사망을 포함한 일반증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하고, 개체별로 기록한다. 일반증상이 악화된 개체는 격리한다.
- [1774] 체중
- [1775] 군분리일 또는 시험물질 투여개시일, 그 이후에는 2 회/주 측정한다.
- [1776] 종양 크기 측정
- [1777] 시험물질 투여개시일부터 2 회/주, 5 주간 측정한다. 캘리퍼스 (calipers)를 이용하여 종양의 장축 및 단축을 측정하고 다음의 계산식을 이용하여 종양 크기를 산출한다.
- [1778] 종양 크기 = $ab^2/2$ (a: 장축 길이, b: 단축 길이)
- [1779]
- [1780] (e) 결과
- [1781] 인산완충용액 (PBS)와 허셉틴 (Herceptin, trastuzumab)를 주사한 그룹은 5 주간의 관찰 기간동안 종양의 성장을 억제하는 경향을 나타내지 않았다. 본 출원에 의하여 제작한 AbClick®Pro 계열의 항체-약물 콘쥬게이트의 경우, 허셉틴에 비하여 종양 성장 억제 능력이 뛰어난 것으로 확인되어 ADC로서 성공적으로 기능하는 것을 확인하였다.
- [1782] 상기 관련 결과는 도 71 내지 72에 도시하였다.
- [1783]
- [1784] 10. 항체-약물 콘쥬게이트의 약물동태시험 (Pharmacokinetics, PK)
- [1785] AbClick®Pro에 의해 제작된 항체 약물 콘쥬게이트의 약물동태학적 특성 분석을 위해 효소결합면역흡착검사 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 분석을 통해 항체-약물 콘쥬게이트의 약물동태를 확인하였다. 제작된 ADC는 도 59에 나타난 AbClick®Pro(NC, DM1) 구조이며, 캐싸일라(Kadcyla)와의 비교 검증을 수행하였다. 동물 모델은 Rat(n=3)을 사용하였으며, 5 mg/kg ADC를 정맥 주사한

뒤 경과를 관찰하였다. 투여한 AbClick®Pro(NC, DM1)의 Intact ADC(약물이 결합되어 있는 온전한 ADC) 형태가 시간에 따라서 감소하는 것을 확인하였다. Kadcyla와 비교하였을 때 동등하거나 개선된 약물의 특성을 가진다고 판단하였다.

[1786] 상기 결과는 도 73에 도시하였다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물:
[화학식 2]



이때,

H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₁은 S이고,

D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₂는 O이고, R₂'은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐임.

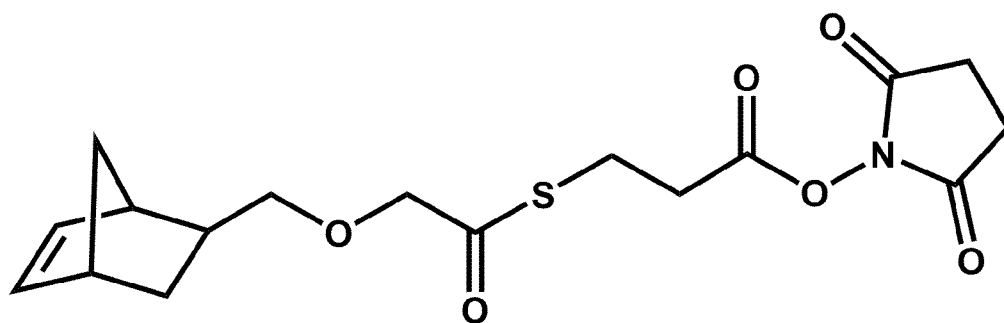
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
H₁은 말단 알킨, 아자이드, 스트레인된 알킨, 다이엔, 친다이엔체, 알켄, 티올, 및 테트라진 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물.

- [청구항 3] 제2항에 있어서,
H₁은 노르보넨, 테트라진, 아자이드 및 디벤조시클로옥신-아민 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물.

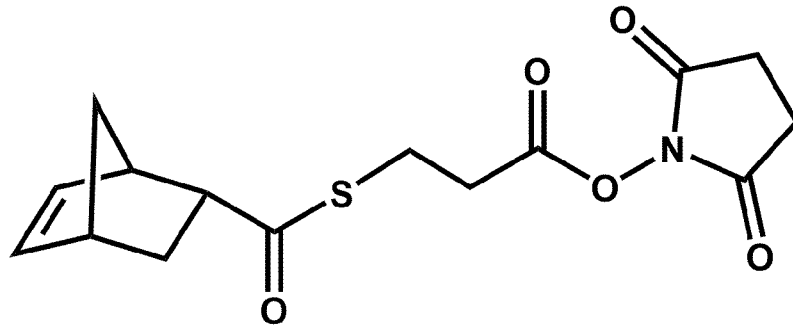
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
R₂'은 N-석시니미드인 것을 특징으로 하는 화합물.

- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 화학식 2는 하기 화학식 2-1, 2-2, 또는 2-3과 같은 것을 특징으로 하는 화합물:

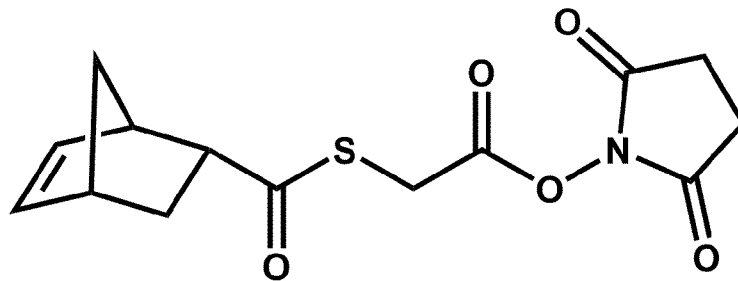
[화학식 2-1]



[화학식 2-2]



[화학식 2-3]



[청구항 6]

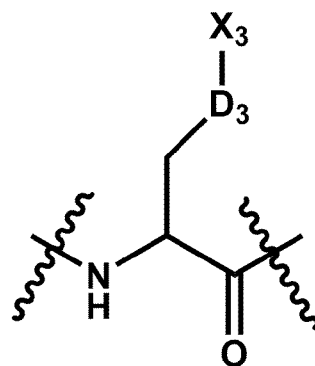
하기 화학식 4-2의 구조를 갖는 펩타이드:

[화학식 4-2]



이때,

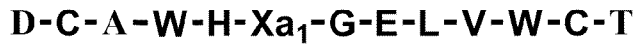
각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,
 C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산
 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판,
 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한
 Xa₁은

이고, 이때 D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이며 또한 X₃는 NH₂이고,

상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되며,
 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을
 보이고,

N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C
 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로
 서로 연결됨.

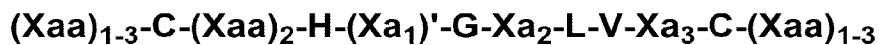
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
D₃는 공유결합, 메틸렌, 또는 에틸렌인 것을 특징으로 하는 펩타이드.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 화학식 4-2는 하기 화학식 4-6과 같은 것을 특징으로 하는 펩타이드:
[화학식 4-6]



이때,

D는 아스파르트산이고, A는 알라닌이며, E는 글루탐산이고, W는 트립토판이며, T는 트레오닌임.

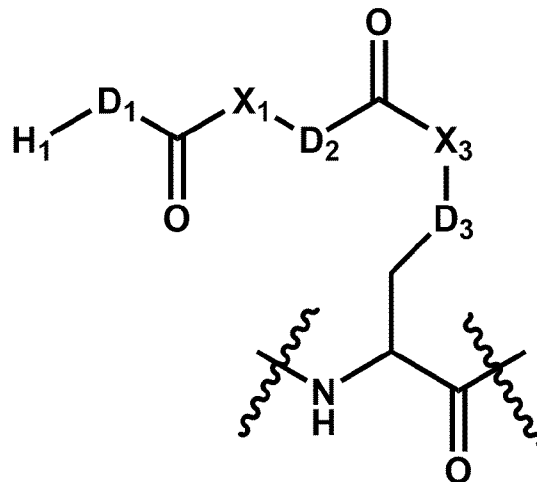
- [청구항 9] 하기 화학식 6-2의 구조를 갖는 펩타이드-화합물 콘주게이트:
[화학식 6-2]



이때,

각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이고, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, L은 류신이고, V는 발린이며, 또한 Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고, 또한 (Xa₁)'은

이며, 이때



H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

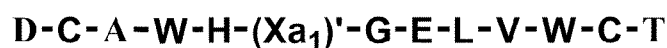
D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₁은 S이고, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며, D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고 또한 X₃는 NH이며,

상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되고, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이며,

N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결됨.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
(Xa₁)'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리가 약 11.668Å 보다 작은 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이고,
D₃는 C_x알킬렌이며,
이때, y는 1 이상인 정수이고, 1≤x+y≤5인 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
(Xa₁)'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리가 약 16.208Å 보다 큰 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트.
- [청구항 13] 제9항에 있어서,
D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이고,
D₃는 C_x알킬렌이며,
이때, y는 1 이상인 정수이고, 9≤x+y≤12인 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
D₂는 C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌인 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트.
- [청구항 15] 제9항에 있어서,
(Xa₁)'의 베타 탄소로부터 제1 카보닐 탄소까지의 거리가 약 11.668Å 이상이고 약 16.208Å 이하인 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트.
- [청구항 16] 제9항에 있어서,
D₂는 C_y알킬렌, C_y알케닐렌, 또는 C_y알키닐렌이고,
D₃는 C_x알킬렌이며,
이때, y는 1 이상인 정수이고, 6≤x+y≤8인 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트.
- [청구항 17] 제9항에 있어서,
상기 화학식 6-2는 하기 화학식 6-3과 같은 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물 콘주게이트:
[화학식 6-3]



이때,

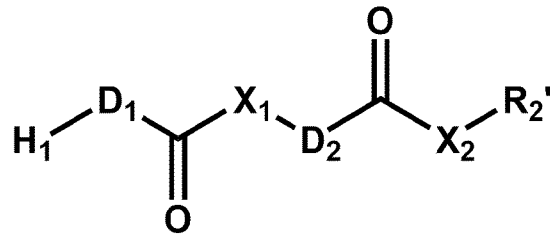
D는 아스파르트산이고, A는 알라닌이며, E는 글루탐산이고, W는 트립토판이며, T는 트레오닌임.

[청구항 18] 제9항에 있어서,

D₁은 공유결합이고 D₂는 메틸렌인 것을 특징으로 하는 펩타이드-화합물
콘쥬게이트.

[청구항 19] 하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물:

[화학식 2]



이때,

H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₁은 S이고, D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₂는 O이고, R₂'은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐인 것과

하기 화학식 4-2의 구조를 갖는 펩타이드:

[화학식 4-2]

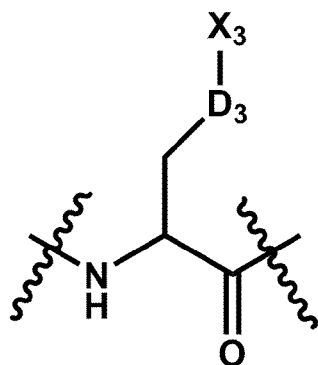


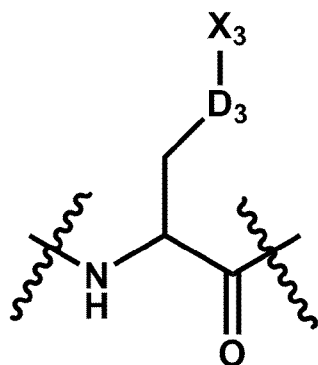
이때,

각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,

C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판,

나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

Xa₁은  이고, 이때 D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃



알킬렌이며 또한 X₃는 NH₂이고,

상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되며,
상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을
보이고,

N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C
말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로
서로 연결된 것을 반응시킴
을 포함하는

항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법.

[청구항 20]

제19항에 있어서,

D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고,

D_3 는 C_x 알킬렌이며,

이때, y 는 1 이상인 정수이고, $1 \leq x+y \leq 5$ 이며,

본 방법으로 제조된 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는
항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 248번 라이신에 특이적으로
제1 클릭화학작용기를 전달하는 것을 특징으로 하는

항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법.

[청구항 21]

제19항에 있어서,

D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고,

D_3 는 C_x 알킬렌이며,

이때, y 는 1 이상인 정수이고, $9 \leq x+y \leq 12$ 이며,

본 방법으로 제조된 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는
항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 246번 라이신에 특이적으로
제1 클릭화학작용기를 전달하는 것을 특징으로 하는

항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법.

[청구항 22]

제19항에 있어서,

D_2 는 C_y 알킬렌, C_y 알케닐렌, 또는 C_y 알키닐렌이고,

D_3 는 C_x 알킬렌이며,

이때, y 는 1 이상인 정수이고, $6 \leq x+y \leq 8$ 이며,

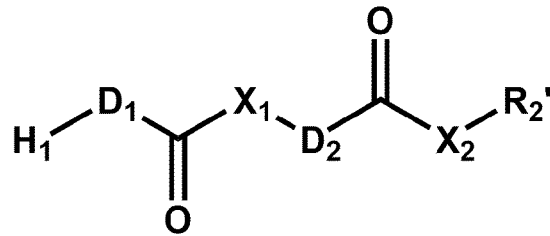
본 방법으로 제조된 항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제는
항체와 반응하여 상기 항체의 Fc 도메인의 246번 라이신 또는 248번
라이신에 선택적으로 제1 클릭화학작용기를 전달하는 것을 특징으로
하는

항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제의 제조 방법.

[청구항 23]

하기 화학식 2의 구조를 갖는 화합물:

[화학식 2]



이때,

H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₁은 S이고,

D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₂는 O이며, R₂'은 N-석시니미드, p-니트로페닐, 또는 펜타플루오로페닐인 것; 및

하기 화학식 4-2의 구조를 갖는 펩타이드:

[화학식 4-2]

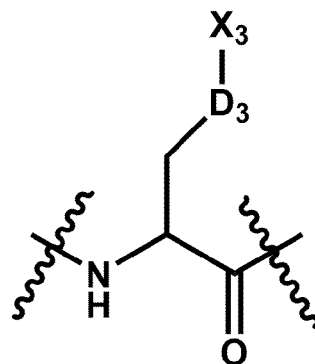


이때,

각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고,

C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이며, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이고, L은 류신이며, V는 발린이고, Xa₃는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한

Xa₁은 이고, 이때 D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃



알킬렌이며 또한 X₃는 NH₂이고,

상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되며, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이고,

N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C

말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된 것을 포함하는

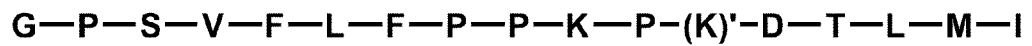
항체에 대한 제1 클릭화학작용기 전달용 제제 제조용 키트.

[청구항 24] 하기 화학식 8-1, 화학식 8-2, 및 화학식 8-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편:

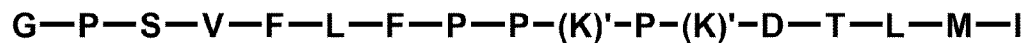
[화학식 8-1]



[화학식 8-2]

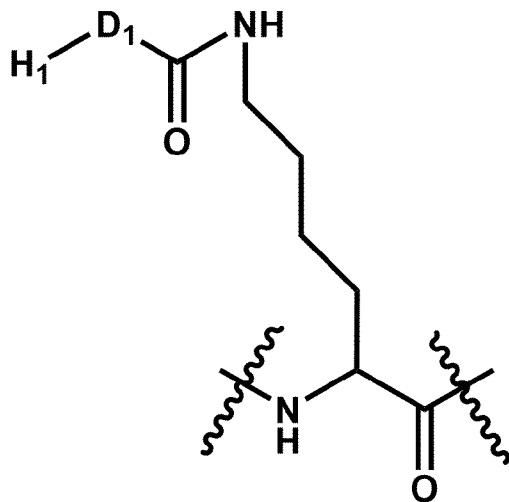


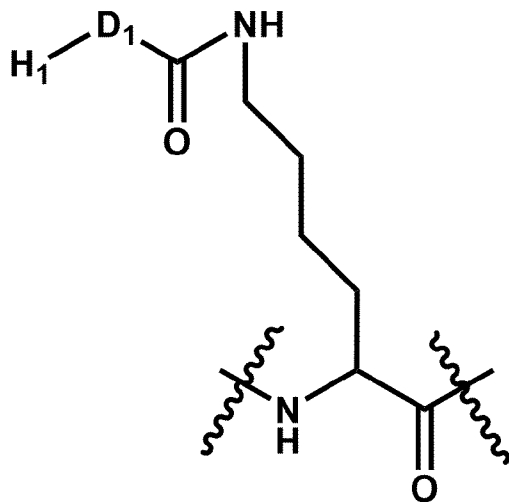
[화학식 8-3]



이때,

G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

(K)'은 이며, 이때



H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나임.

[청구항 25] 제24항에 있어서,

D₁은 공유결합인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.

[청구항 26] 제24항에 있어서,

상기 화학식 8-1의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 8-2 및 8-3의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.

[청구항 27] 제26항에 있어서,

두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.

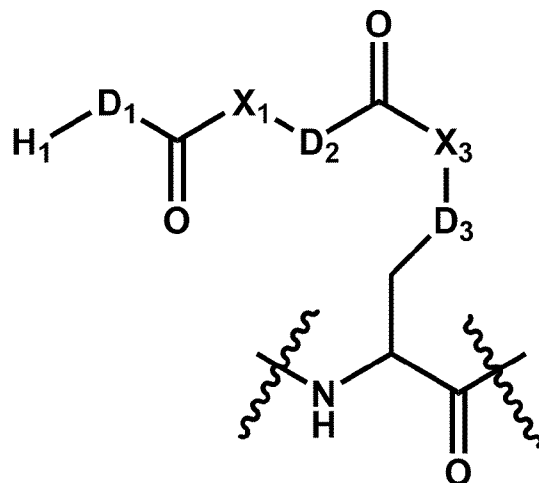
[청구항 28] 제24항에 있어서,

상기 화학식 8-2의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 8-1 및 8-3의

아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
[청구항 29] 제28항에 있어서,
두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
[청구항 30] 제24항에 있어서,
상기 화학식 8-3의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 8-1 및 8-2의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
[청구항 31] 제30항에 있어서,
두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 8-3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
[청구항 32] 하기 화학식 6-2의 구조를 갖는 펩타이드-화합물 콘쥬게이트:
[화학식 6-2]

(Xaa)₁₋₃-C-(Xaa)₂-H-(Xa₁)'-G-Xa₂-L-V-Xa₃-C-(Xaa)₁₋₃

이때,
 각각의 X_{aa} 는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이고, X_{a_2} 는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, L은 류신이고, V는 발린이며, 또한 X_{a_3} 는 트립토판, 나프틸알라닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되며, 또한 $(X_{a_1})'$ 은 O 이며, 이때



H₁은 제1 클릭화학작용기이고,
D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,
X₁은 S이고,
D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,
D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고 또한 X₃는 NH이며,
상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되고,
상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을

보이며,

N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된 것과

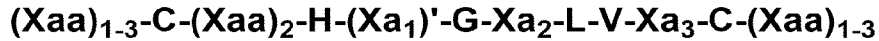
항체 또는 이의 단편을 반응시킴을 포함하는

제1 클릭화학작용기를 포함하는 항체 또는 이의 단편의 제조 방법.

[청구항 33]

하기 화학식 6-2의 구조를 갖는 펩타이드-화합물 콘주게이트:

[화학식 6-2]

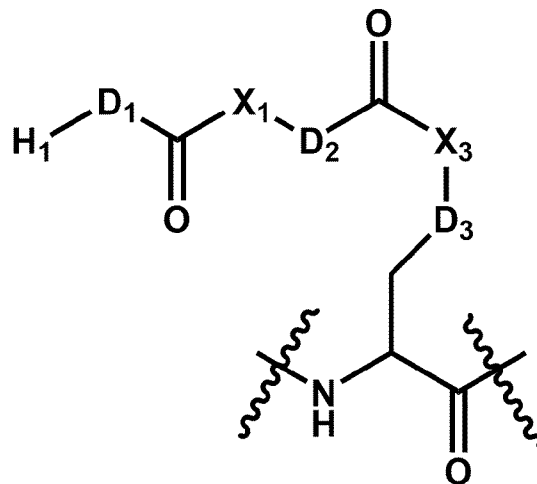


이때,

각각의 Xaa는 독립적으로 시스테인이 아닌 임의의 아미노산이고, C는 시스테인이며, H는 히스티딘이고, G는 글리신이고, Xa₂는 글루탐산 또는 아스파라긴이며, L은 류신이고, V는 발린이며, 또한 W는 트립토판이고, 또한

(Xa₁)'은

이며, 이때



H₁은 제1 클릭화학작용기이고,

D₁은 공유결합, C₁₋₄알킬렌, C₂₋₄알케닐렌, C₂₋₄알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

X₁은 S이고,

D₂는 C₁₋₇알킬렌, C₂₋₇알케닐렌, C₂₋₇알키닐렌, 및 C₃₋₈시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나이며,

D₃는 공유결합 또는 C₁₋₃알킬렌이고 또한 X₃는 NH이며,

상기 펩타이드는 13 이상 17 이하 개수의 아미노산 잔기로 구성되고, 상기 펩타이드는 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 대한 결합 활성을 보이며,

N 말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인과 C

말단으로부터 2 내지 4 아미노산만큼 떨어진 시스테인은 선택적으로 서로 연결된 것; 및



이때,

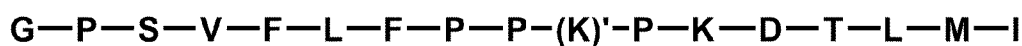
C_m 은 카고 모이어티이고,

H_2 는 상기 제1 클릭화학작용기와 상보적인 제2 클릭화학작용기인 것을 반응시킴을 포함하는

항체-약물 콘쥬게이트의 제조 방법.

[청구항 36] 하기 화학식 8-1, 화학식 8-2, 및 화학식 8-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편:

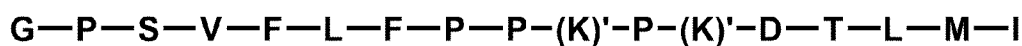
[화학식 8-1]



[화학식 8-2]

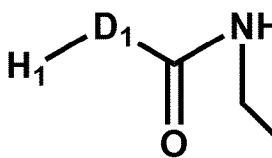


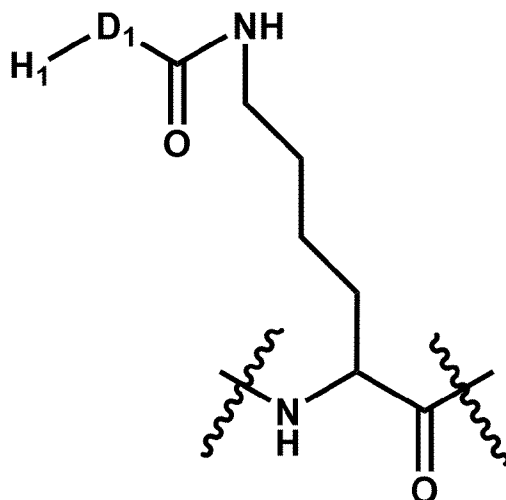
[화학식 8-3]



이때,

G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

(K)'은 이며, 이때

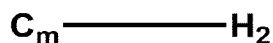


H_1 은 제1 클릭화학작용기이고,

D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나인 것; 및

하기 화학식 9의 구조를 갖는 화합물:

[화학식 9]



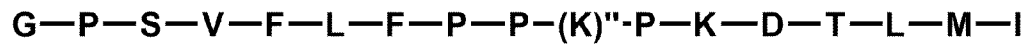
이때,

C_m 은 카고 모이어티이고,

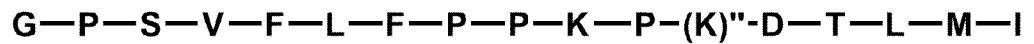
H_2 는 상기 제1 클릭화학작용기와 상보적인 제2 클릭화학작용기인 것을 포함하는 항체-약물 콘쥬게이트 제조용 키트.

[청구항 37] 하기 화학식 10-1, 화학식 10-2, 및 화학식 10-3 중 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 단편:

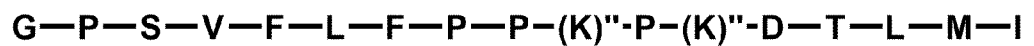
[화학식 10-1]



[화학식 10-2]



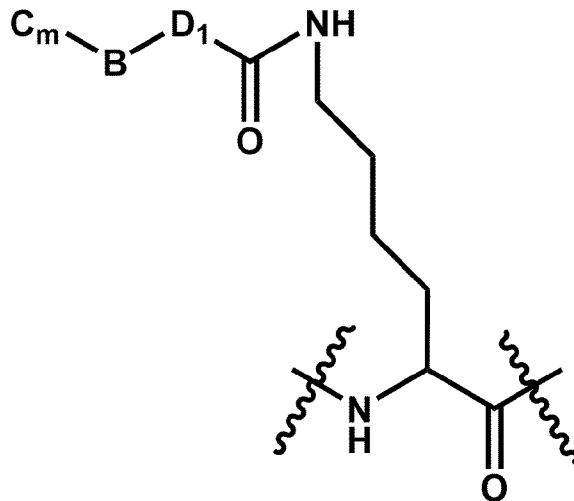
[화학식 10-3]



이때,

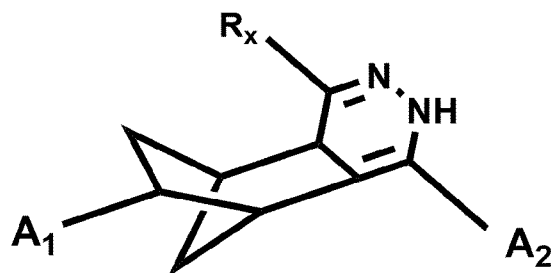
G는 글리신이고, P는 프롤린이며, S는 세린이고, V는 발린이며, F는 페닐알라닌이고, L은 류신이며, K는 라이신이고, D는 아스파르트산이며, T는 트레오닌이고, M은 메티오닌이며, I는 이소류신이고, 또한

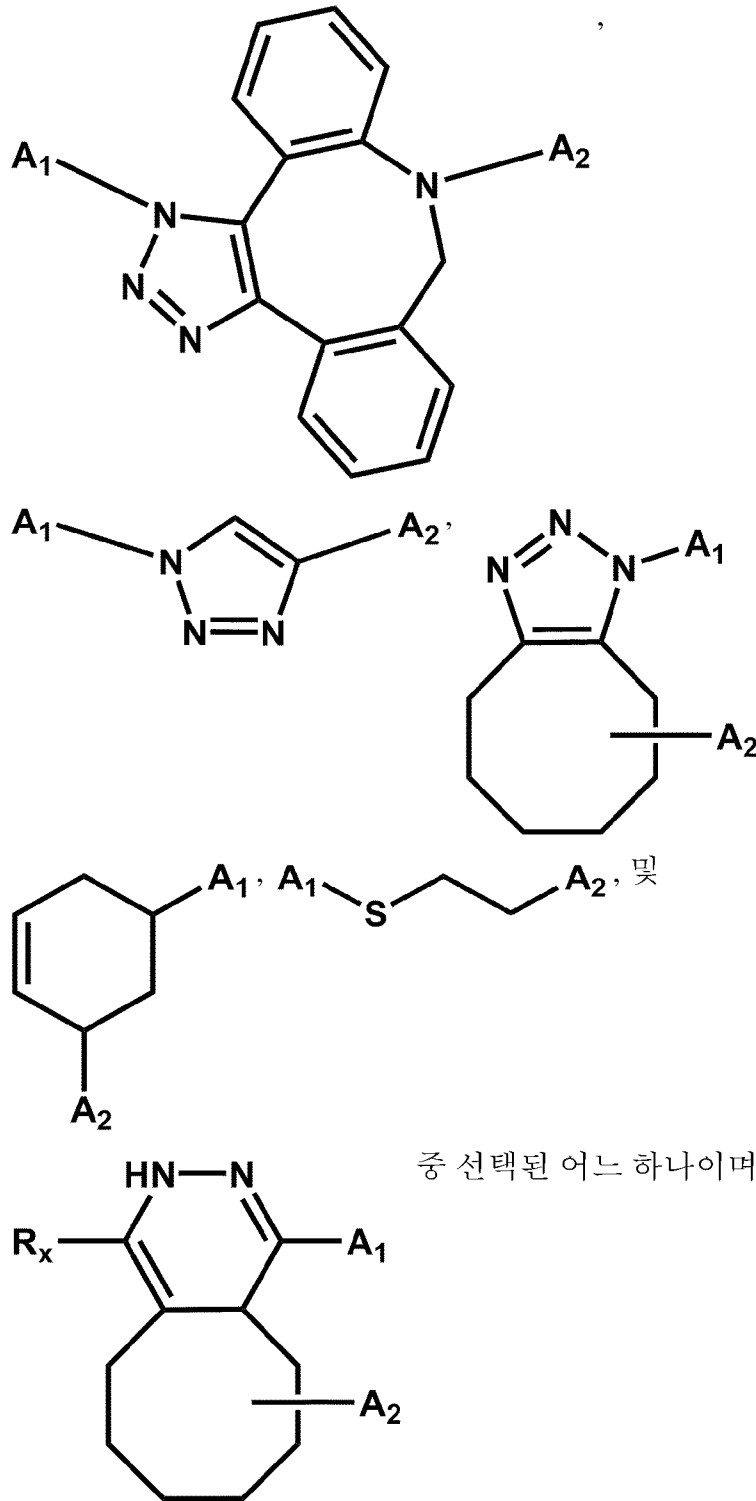
$(K)''$ 은 C_m-B-D_1 이며, 이때



C_m 은 카고 모이어티이고,

B는





다 같은 것과 연결되지 않도록 상기 카고 모이어티 또는 D_1 과 연결되고, R_x 는 H, 할로젠, 및 C_{1-3} 알킬로부터 선택되며, D_1 은 공유결합, C_{1-4} 알킬렌, C_{2-4} 알케닐렌, C_{2-4} 알키닐렌, 및 C_{3-8} 시클로알킬렌 중 선택된 어느 하나임.

[청구항 38]

제37항에 있어서,

상기 화학식 10-1의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-2 및

- 10-3의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 39] 제38항에 있어서,
두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 40] 제37항에 있어서,
상기 화학식 10-2의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-1 및 10-3의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 41] 제40항에 있어서,
두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-2의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 42] 제37항에 있어서,
상기 화학식 10-3의 아미노산 서열 만을 포함하고 상기 화학식 10-1 및 10-2의 아미노산 서열을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 43] 제42항에 있어서,
두 개의 Fc 도메인 중 두 개 모두에서 상기 화학식 10-3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 44] 제37항에 있어서,
상기 카고 모이어티는 약물 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 45] 제44항에 있어서,
상기 카고 모이어티는 2개 이상의 약물 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 46] 제44항에 있어서,
상기 약물 모이어티는 항암제인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.
- [청구항 47] 제46항에 있어서,
상기 항암제는 DM1, DM3, DM4, 아브린, 리친 A, 슈도모나스 엑소톡신, 콜레라 독소, 디프테리아 독소, 종양 괴사 인자, α 인터페론, β 인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 사이토카인, 아포토시스 유도 제제, 항-신혈관형성 제제, 림포카인, 탁세인, DNA-알킬화 제제, 안트라시클린, 튜블리신 유사체, 듀오카르마이신 유사체, 오리스타틴 E, 오리스타틴 F, 마이탄시노이드, 반응성 폴리에틸렌글리콜 잔기를 포함하는 세포독성 제제, 탁손, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, t. 콜키신, 독소루비신, 도노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론,

미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 메토틱세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 디카르바진, 메클로레타민, 티오테파클로람부실, 메이팔란, 카르무스틴, 로무스틴, 시클로포스파미드, 부설판, 디브로모마니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 시스플라틴, 닥티노마이신, 블레오마이신, 안트라마이신, 칼리키아마이신, 아비라테론, 벤다무스틴, 보르테조밋, 카르보플라틴, 카바지탁셀, 다사티닙, 도세탁셀, 에피루비신, 엘로티닙, 에베롤리무스, 켄시타빈, 제피티닙, 이다루비신, 이마티닙, 히드록시유레아, 라파티닙, 류프로레린, 멜팔란, 네다플라틴, 닐로티닙, 옥살리플라틴, 파조파닙, 페메트렉세드, 피코플라틴, 로미덱신, 사트라플라틴, 소라페닙, 베무라페닙, 수니티닙, 테니포사이트, 트리플라틴, 및 비노렐빈 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 단편.

- [청구항 48] 제46항에 의한 항체-약물 콘쥬게이트를 포함하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 49] 제48항에 있어서,
상기 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 심장암, 자궁경부암, 대장암, 직장암, 식도암, 섬유육종, 위암, 위장암, 두경부암, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 골수종, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 고환 생식세포 암, 흉선종 및 흉선암 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 50] 제49항에 있어서,
상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 51] 제46항에 의한 항체-약물 콘쥬게이트를 포함하는 약학적 조성물을 대상에 투여함을 포함하는 암의 치료 방법.
- [청구항 52] 제51항에 있어서,
상기 암은 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 심장암, 자궁경부암, 대장암, 직장암, 식도암, 섬유육종, 위암, 위장암, 두경부암, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 골수종, 난소암, 췌장암, 음경암, 전립선암, 고환 생식세포 암, 흉선종 및 흉선암 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암의 치료 방법.
- [청구항 53] 제52항에 있어서,
상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 암의 치료 방법.

[도 1]

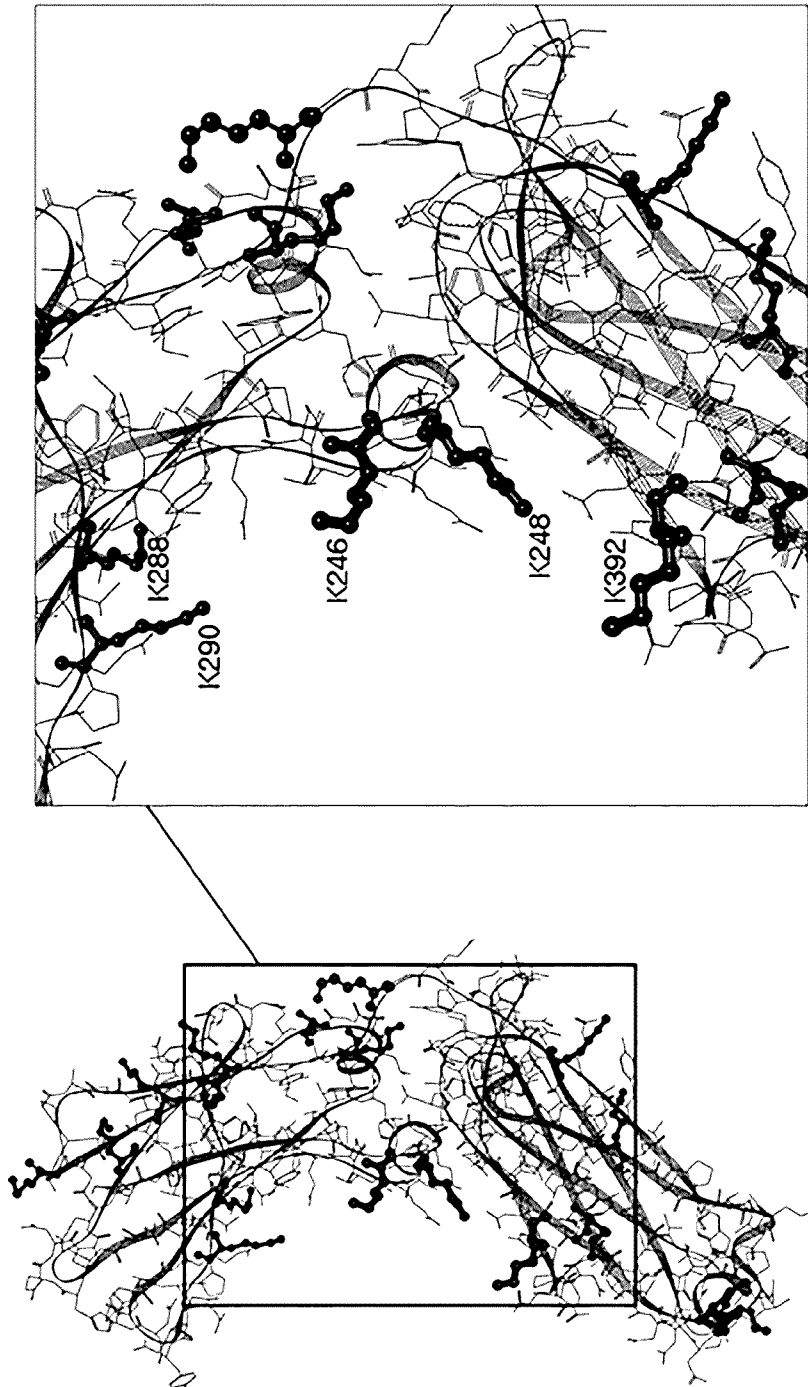
amino acid sequence :

G—P—S—V—F—L—F—P—P—K—P—K—D—T—L—M—I

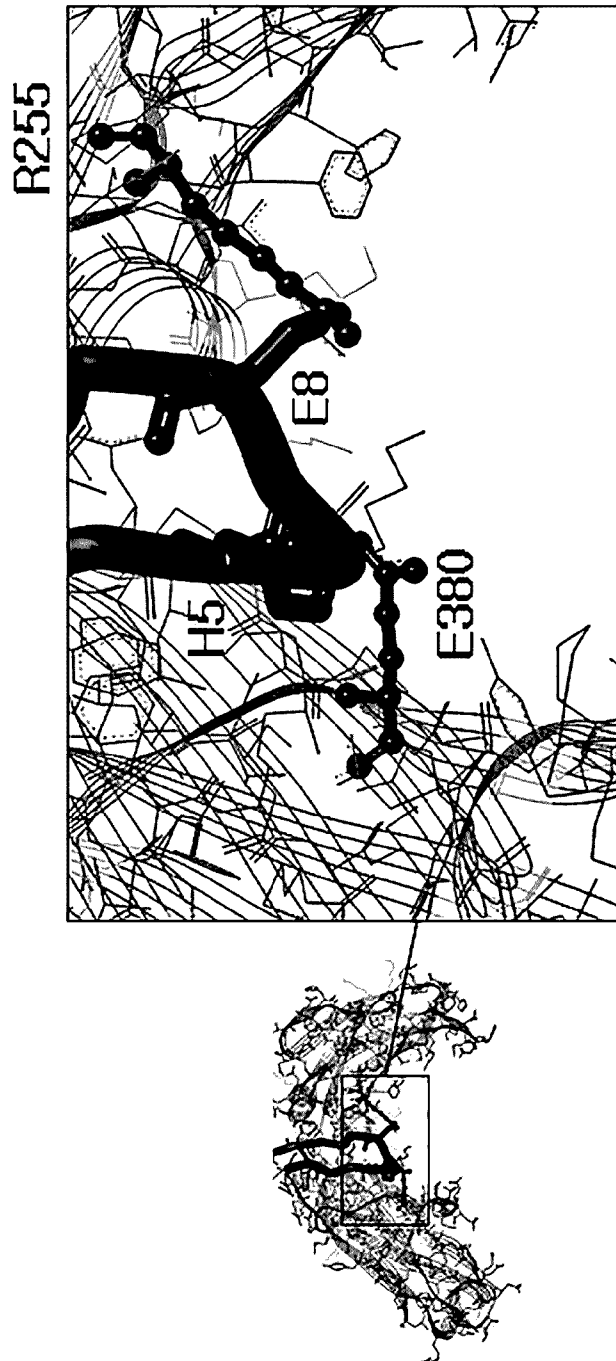
EU numbering
for heavy chain :

237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253

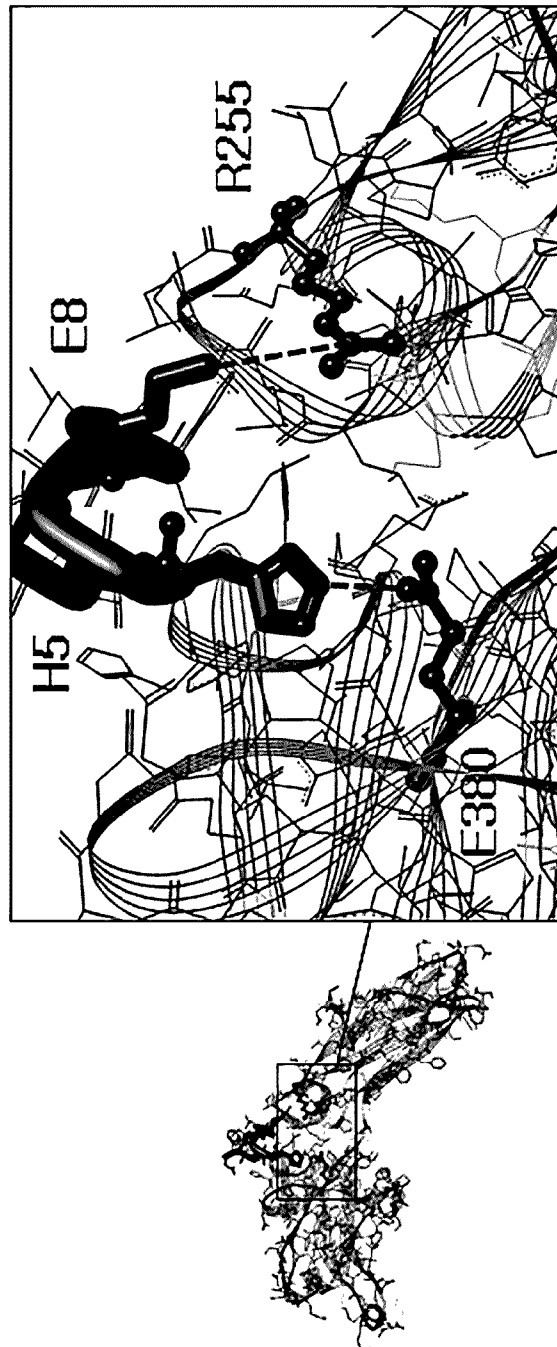
[도2]



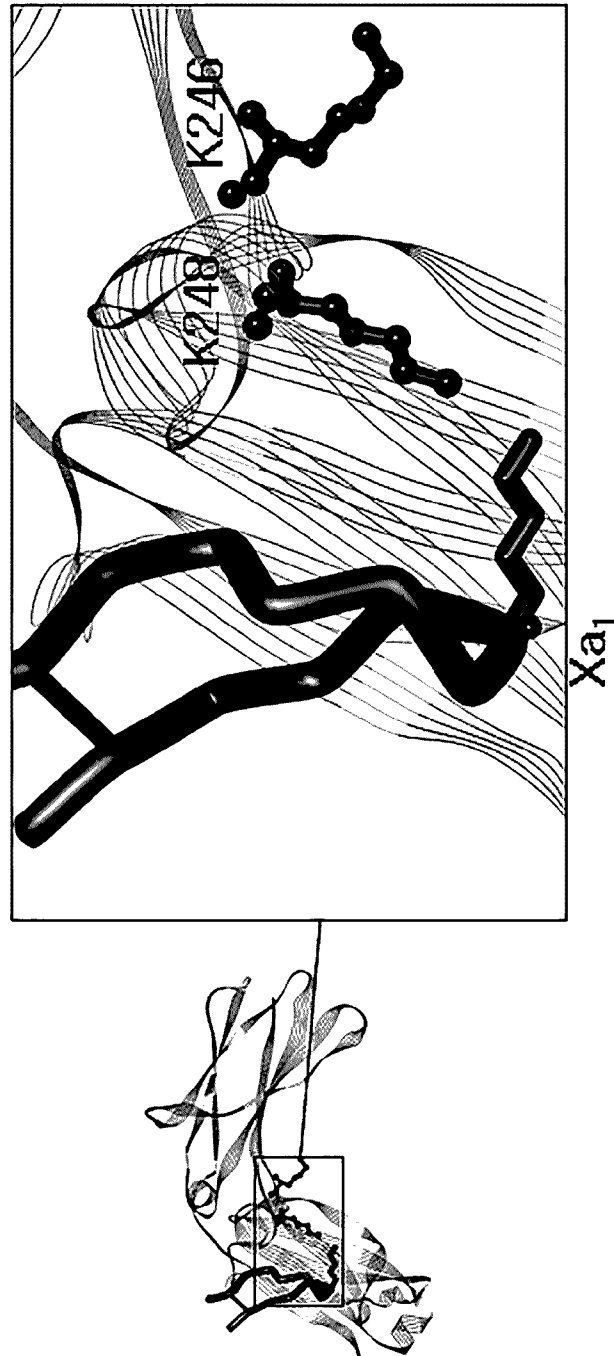
[도3]



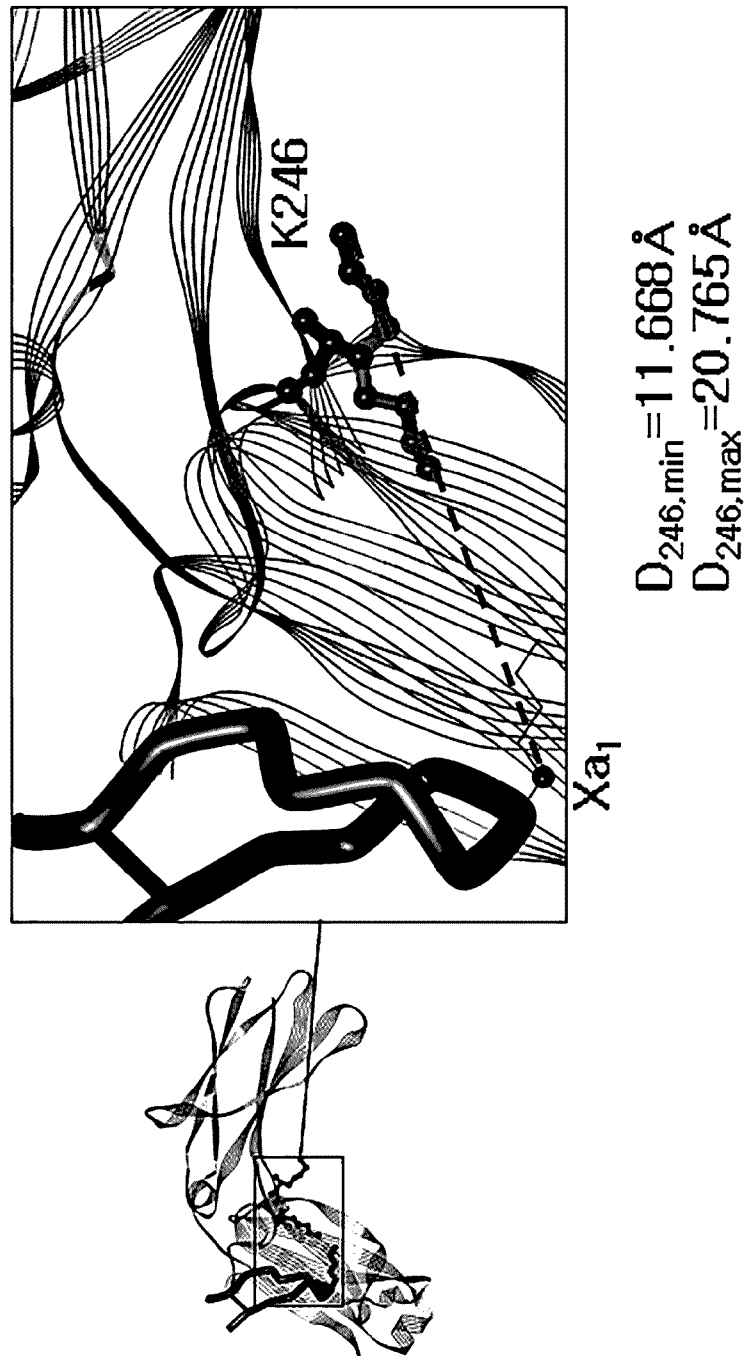
[도4]



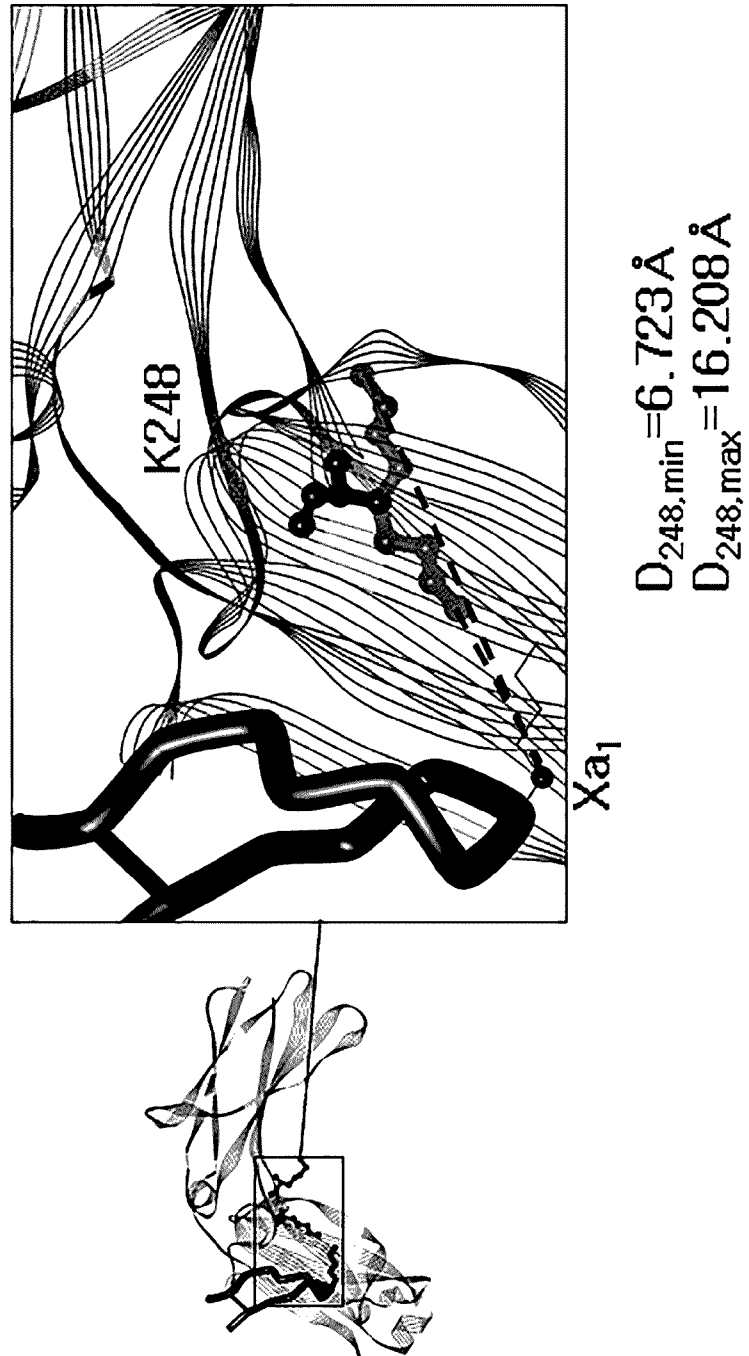
[도5]



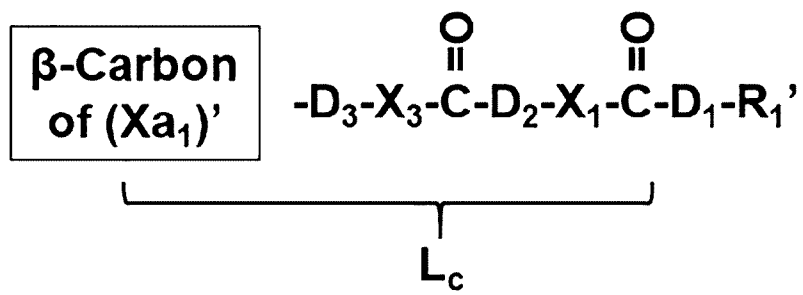
[도6]



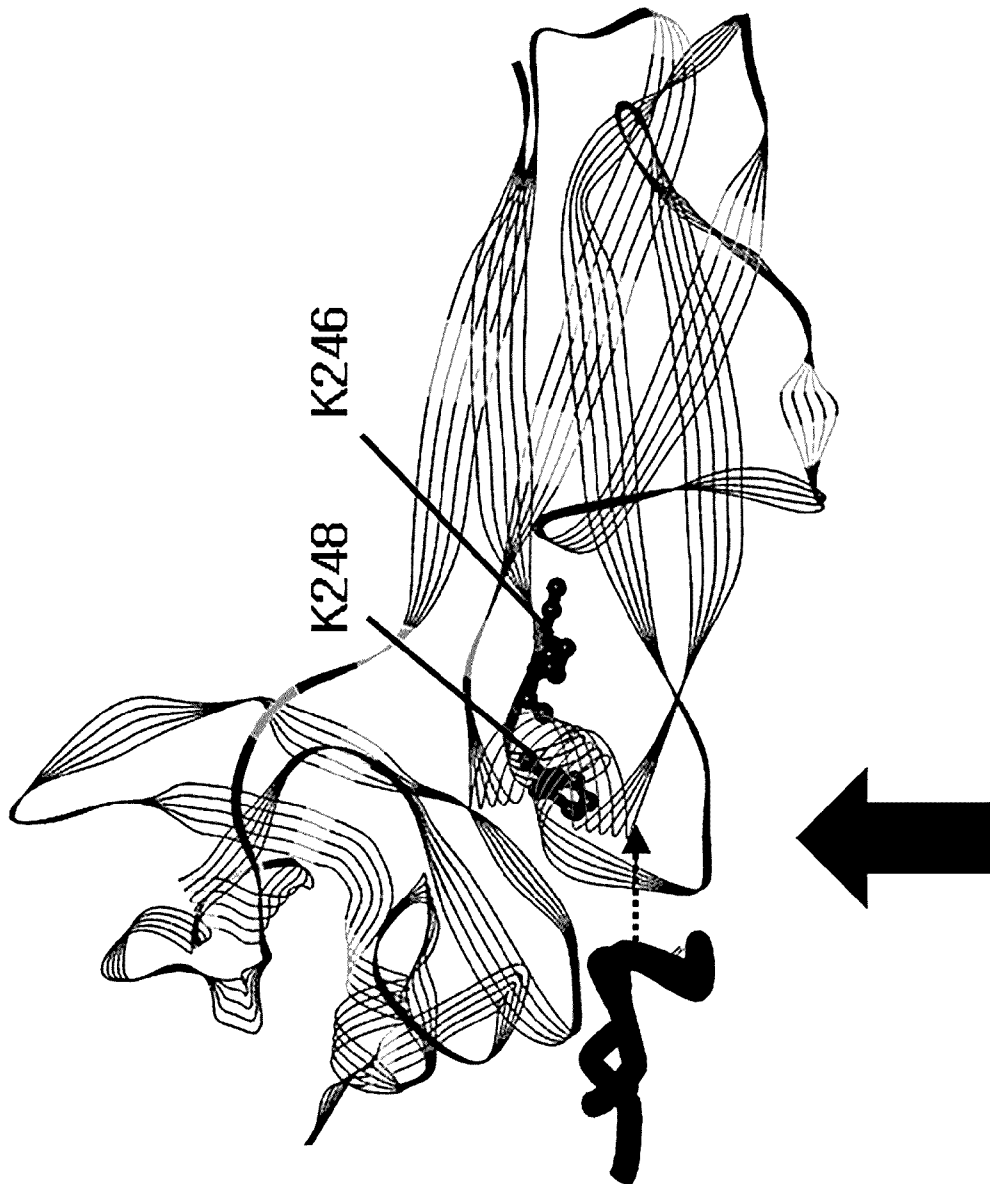
[도7]



[도8]

 $R_1'-L2-SSAI$ 

[도9]



[도10]

If L_c is shorter than $D_{246, \min}$



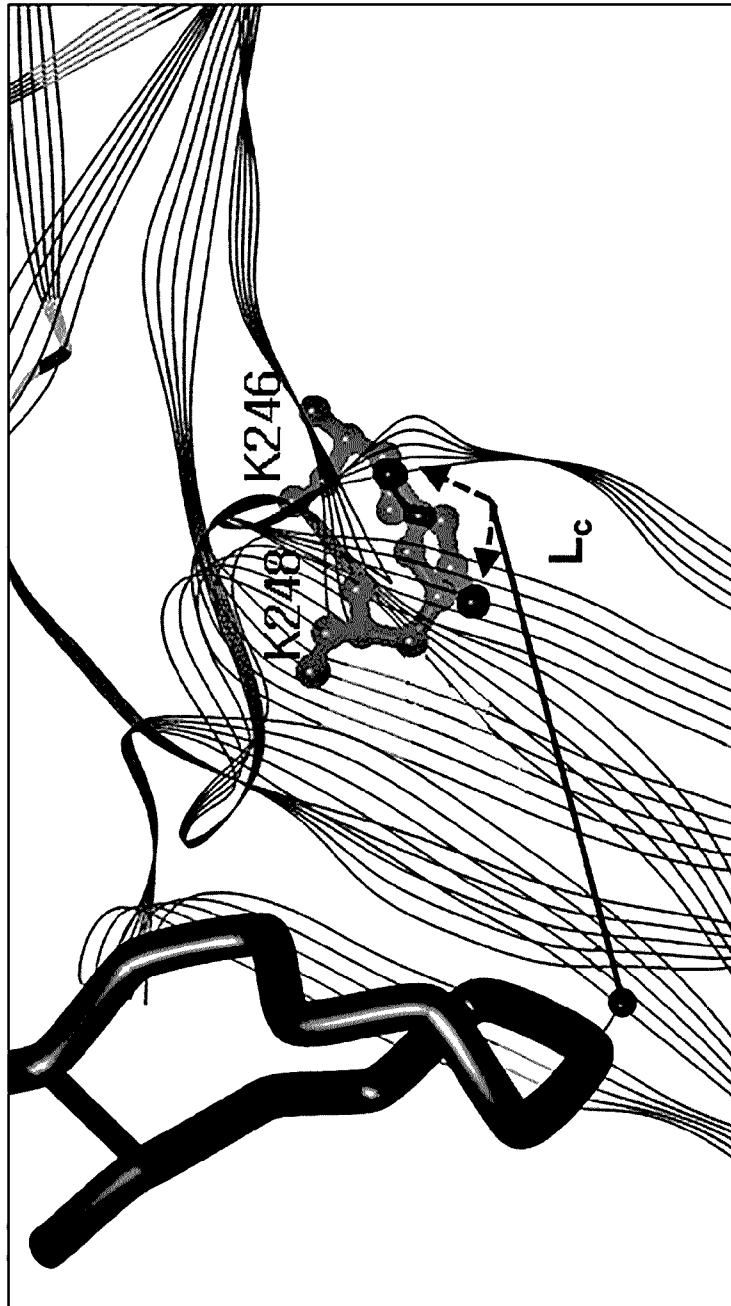
[도11]

If L_c is longer than $D_{248, \max}$

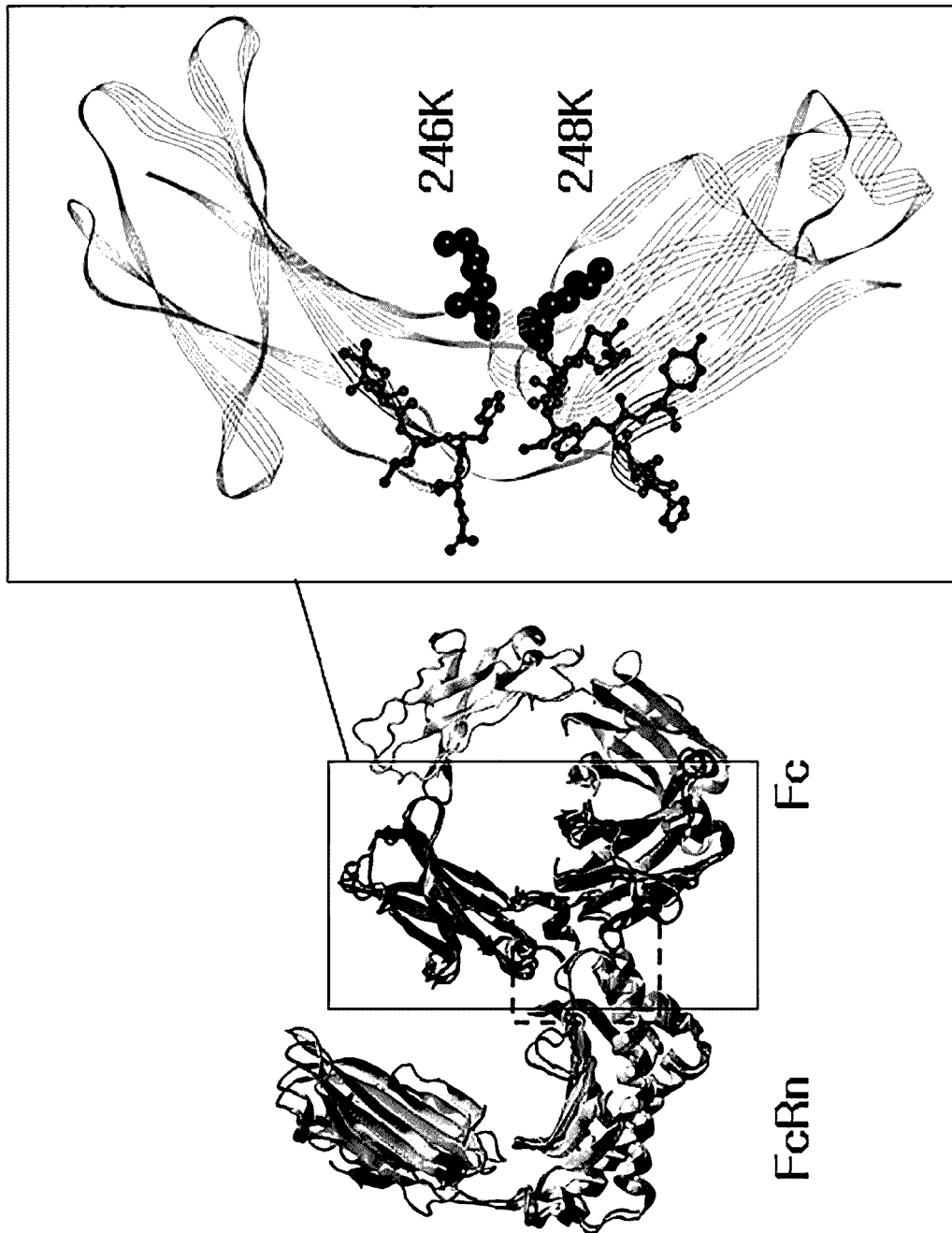


[도12]

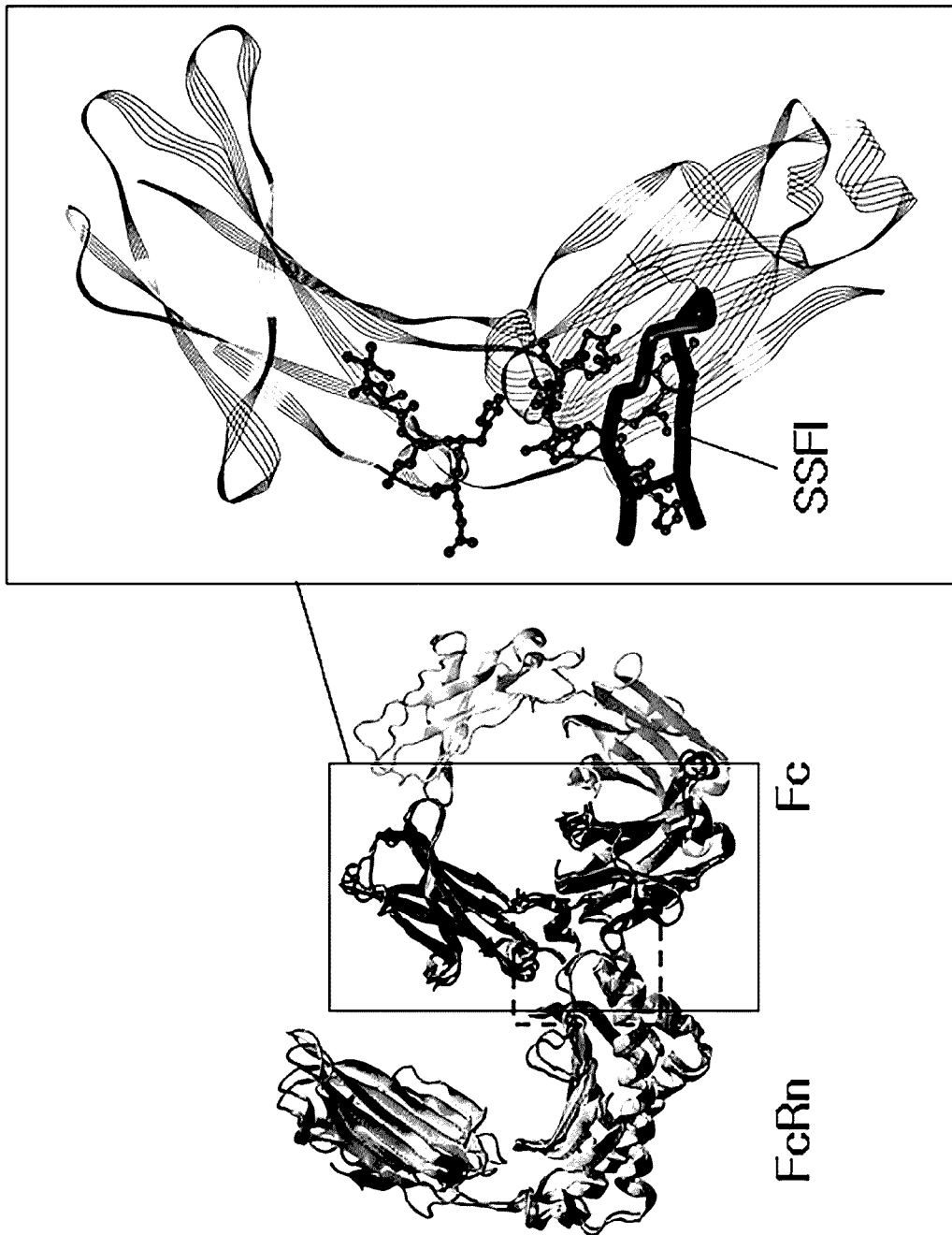
If L_c is between about $D_{246,\min}$ and about $D_{248,\max}$



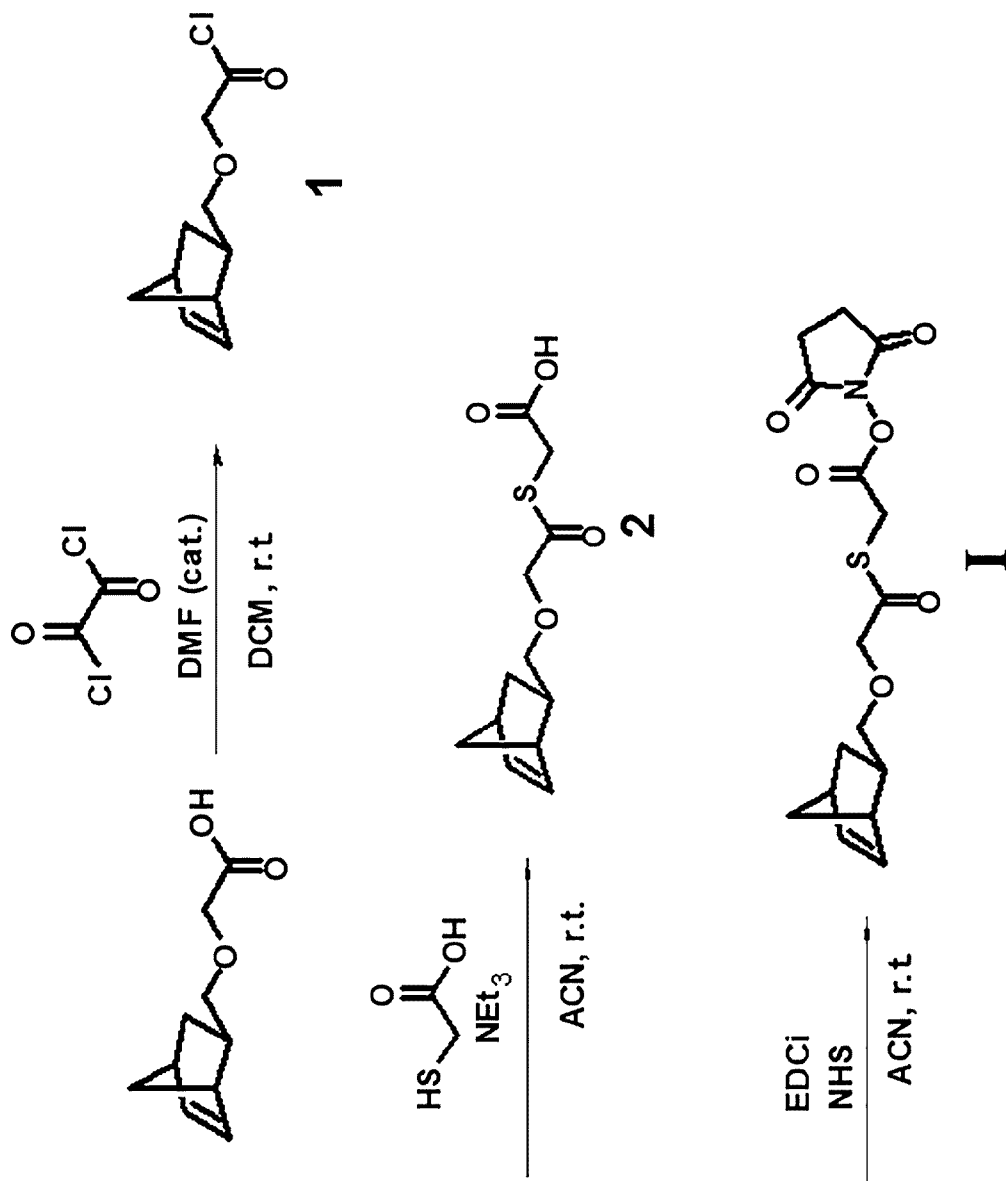
[도13]



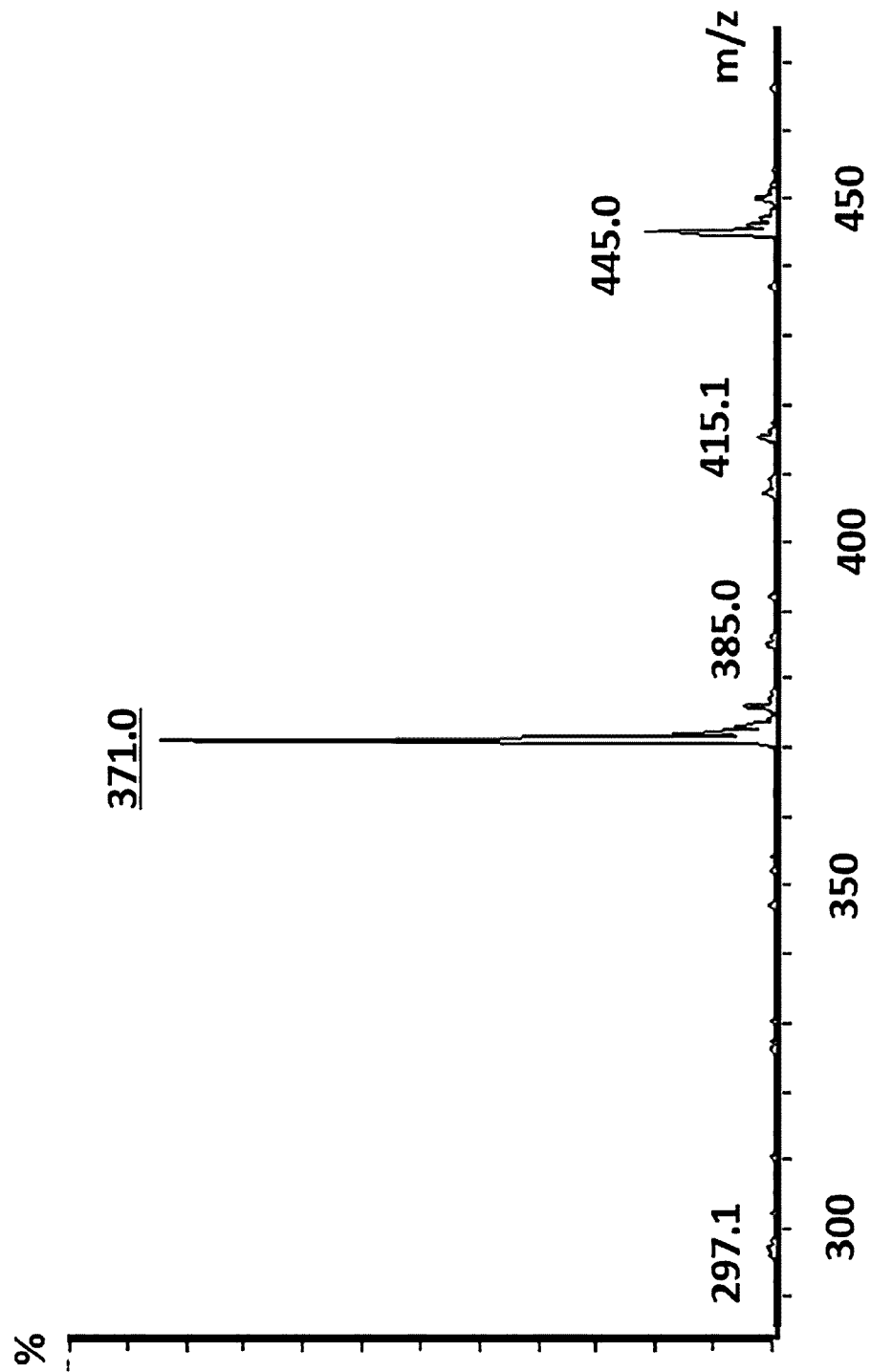
[도14]



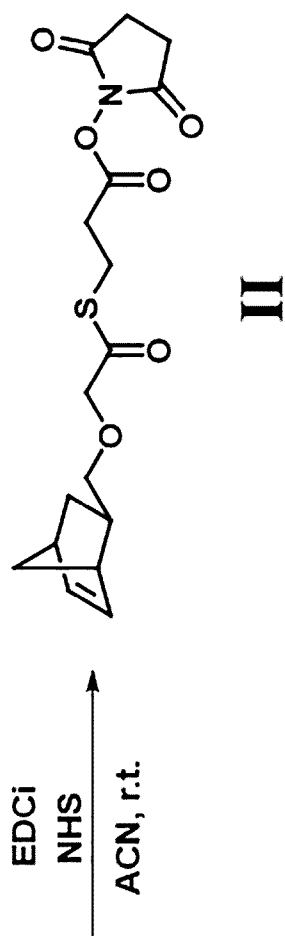
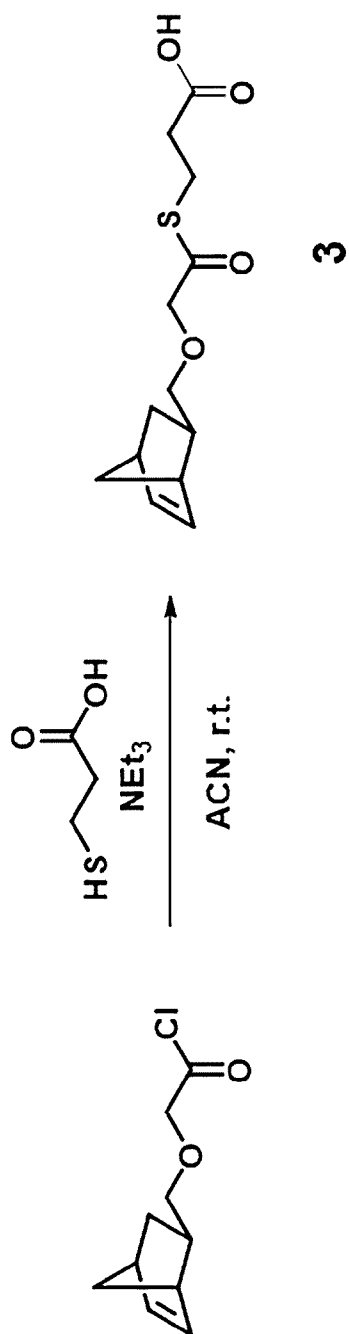
[도15]



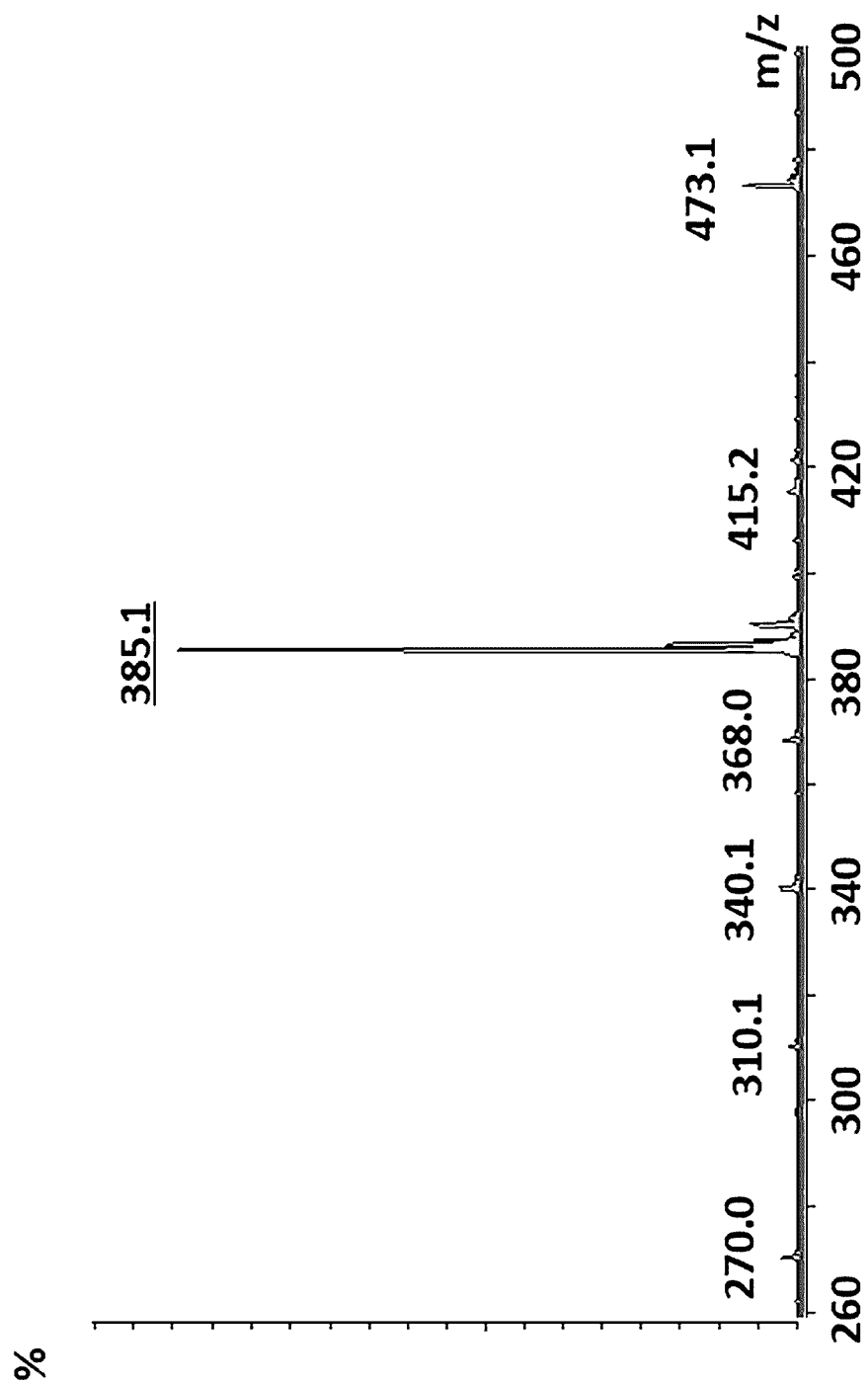
[도16]



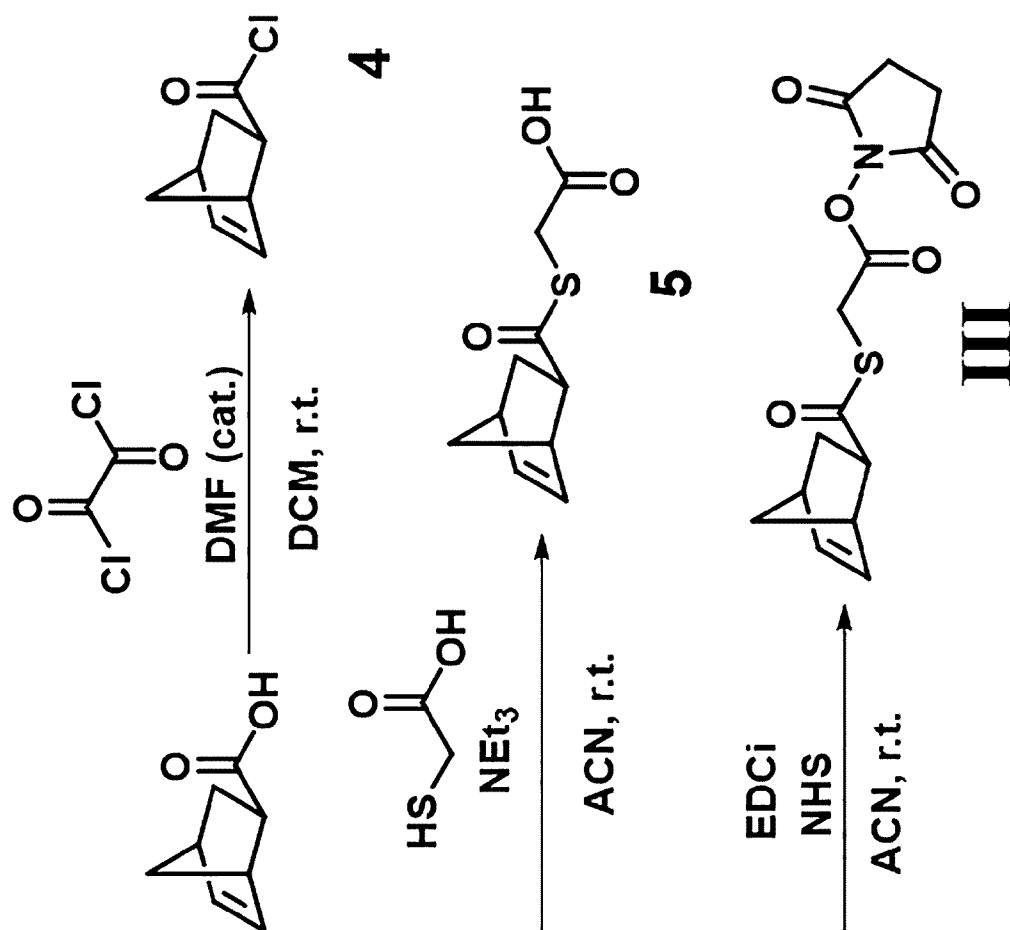
[도17]



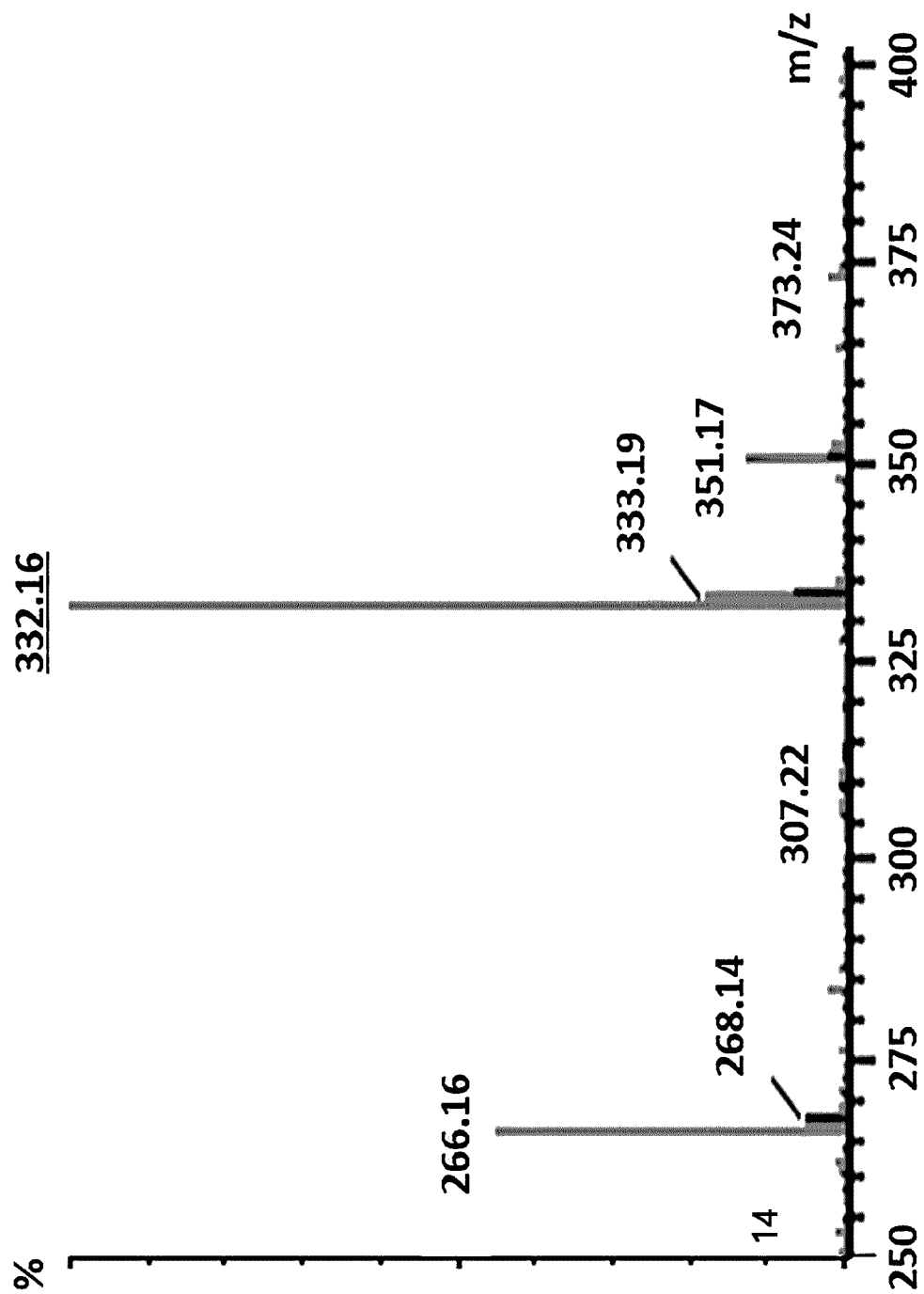
[도18]



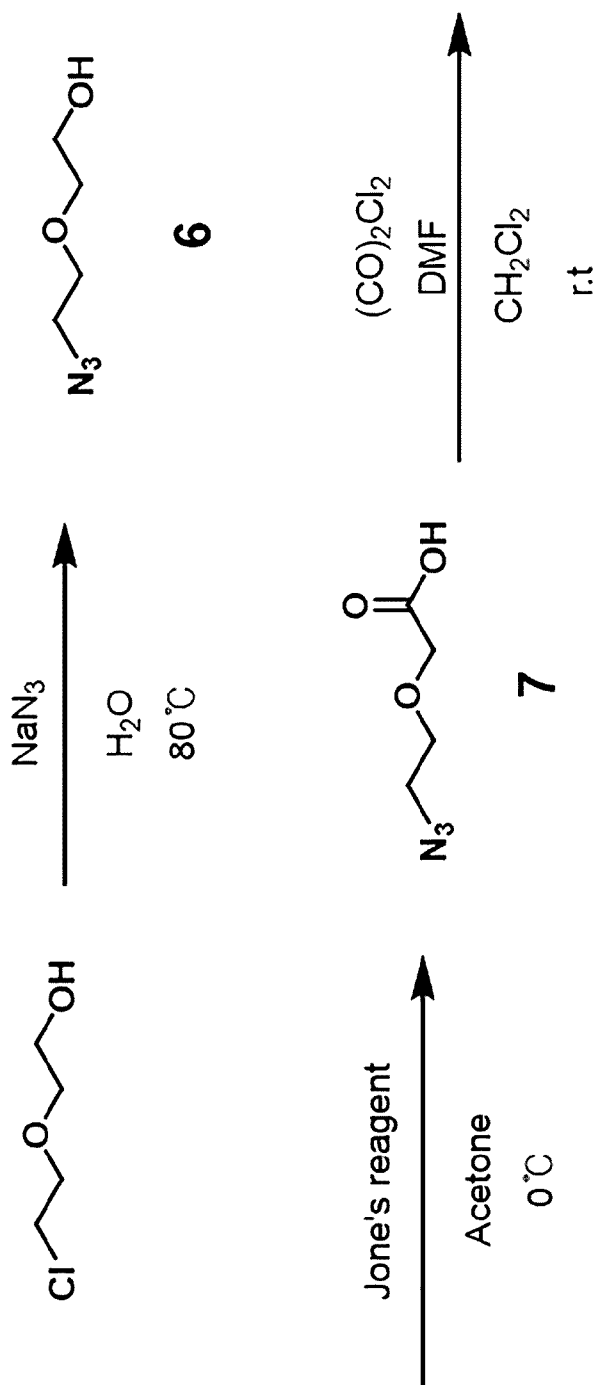
[도19]



[도20]

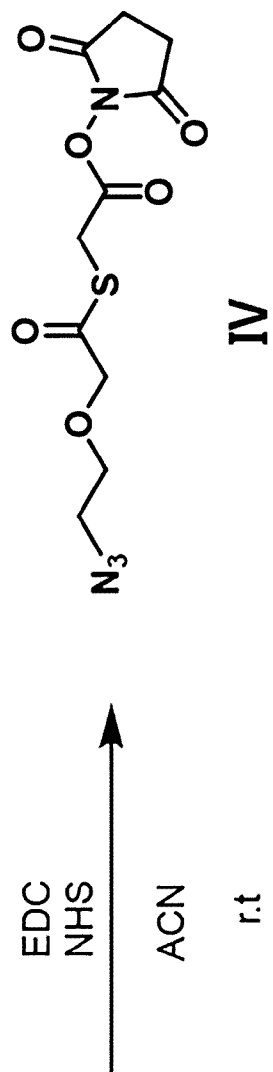


[도21]

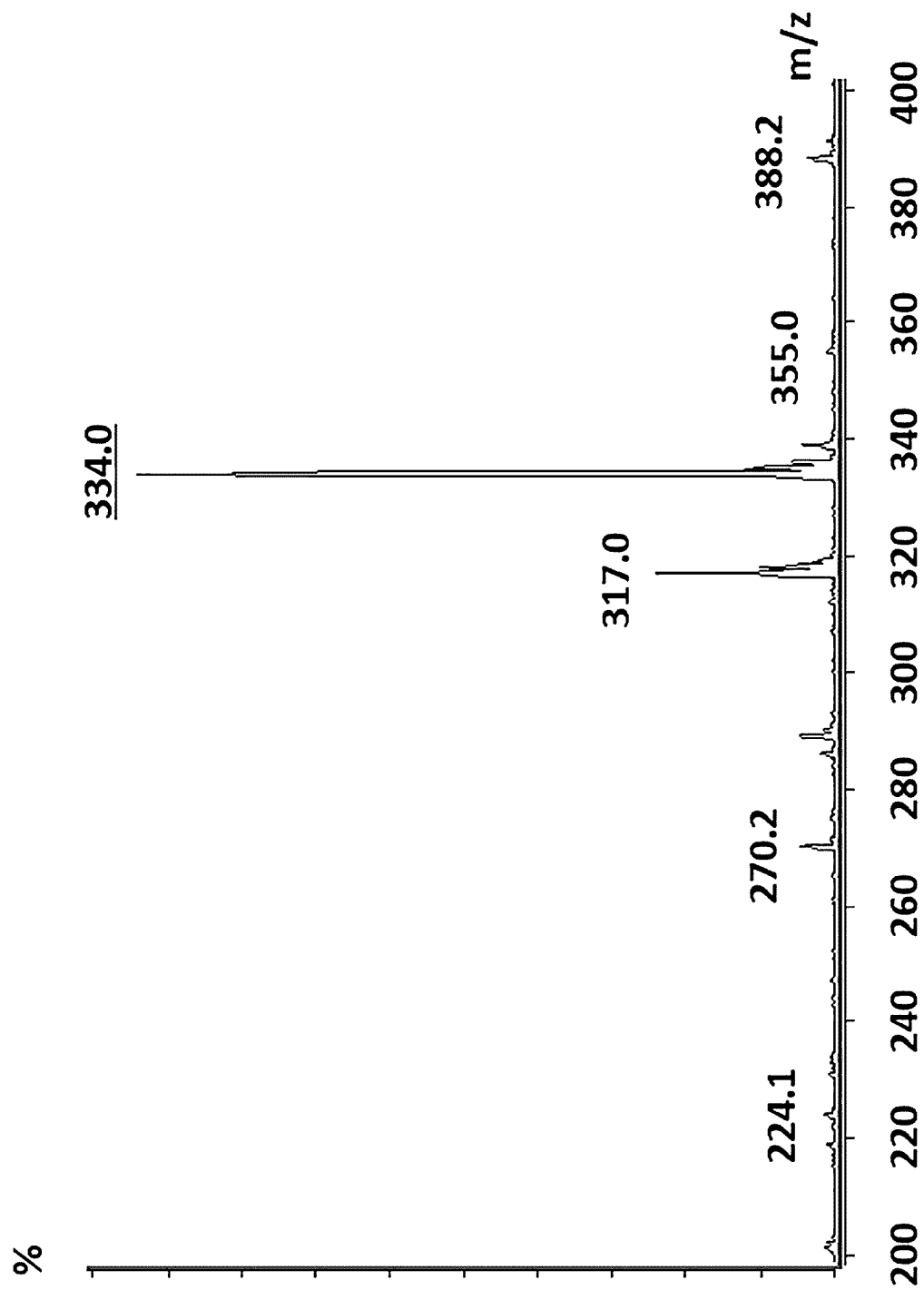


(Continued)

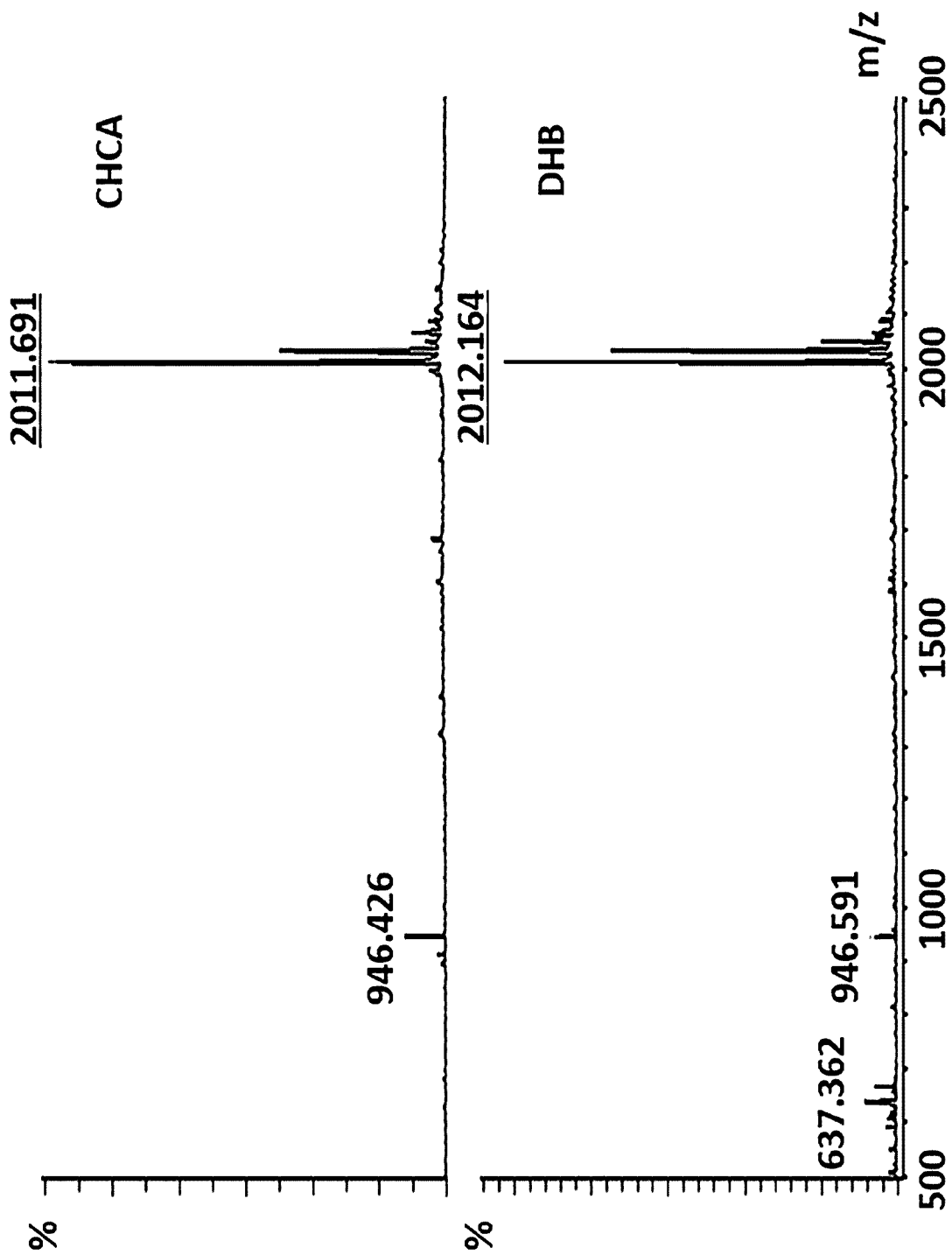
(Continued)



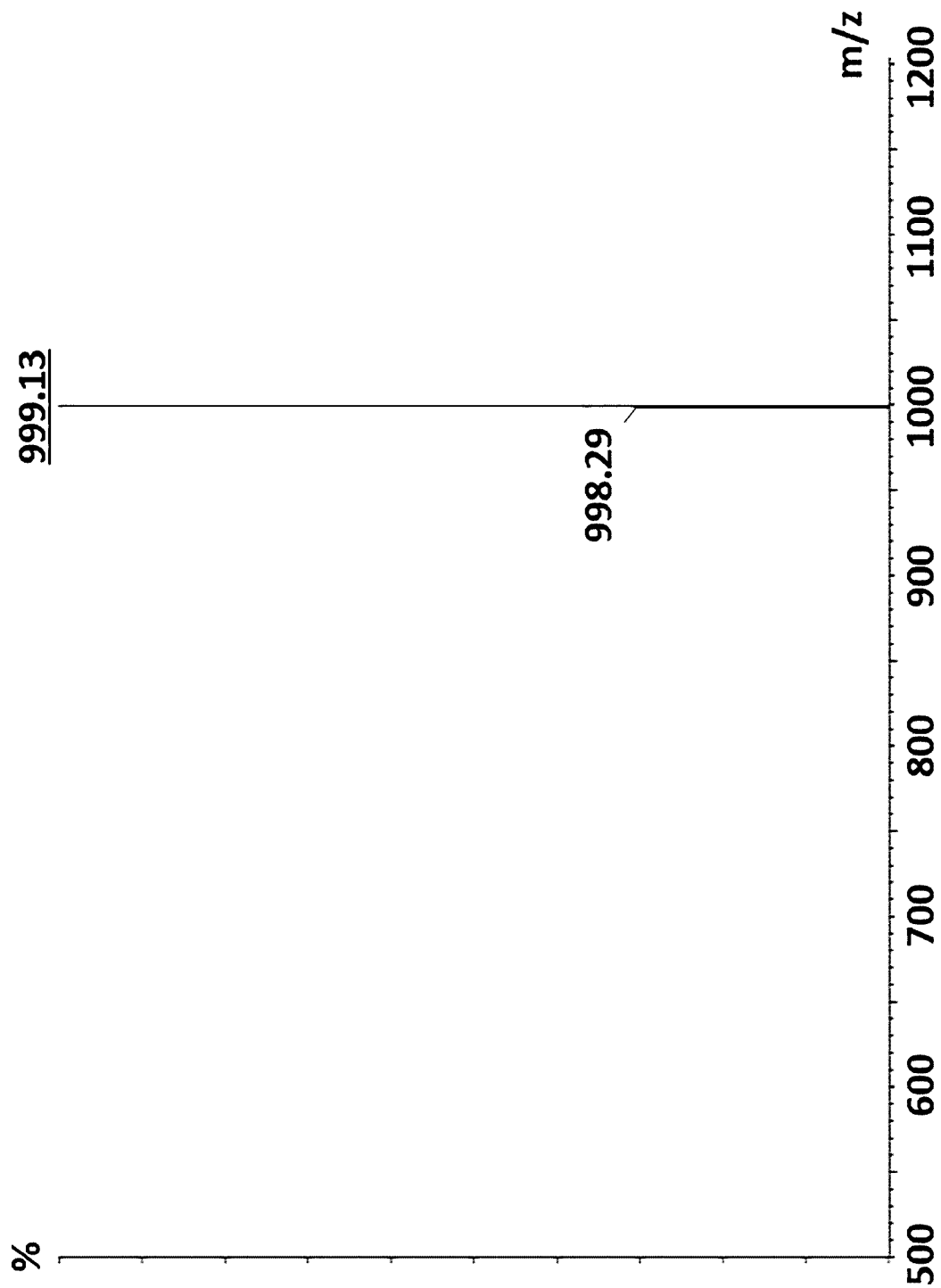
[도23]



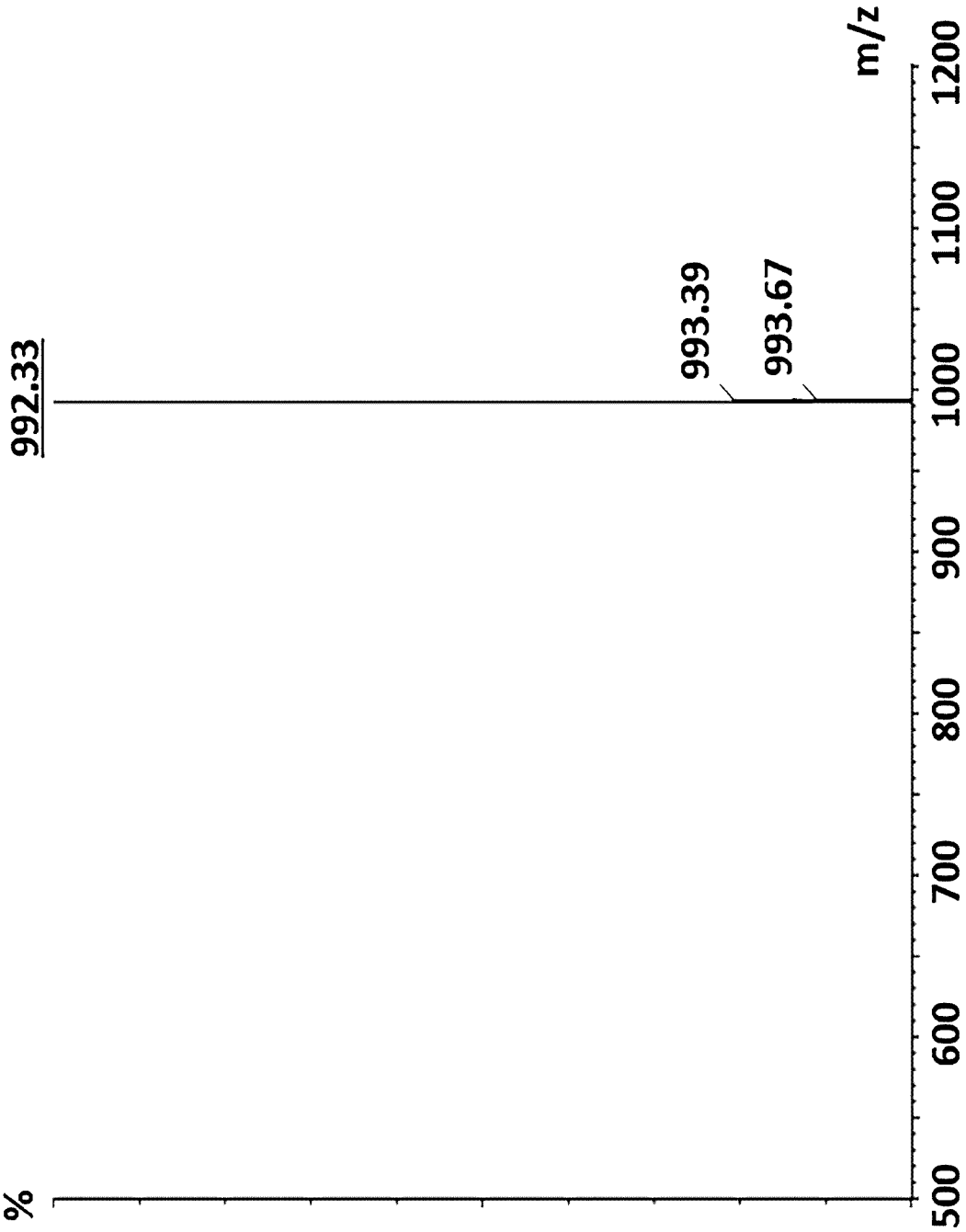
[도24]



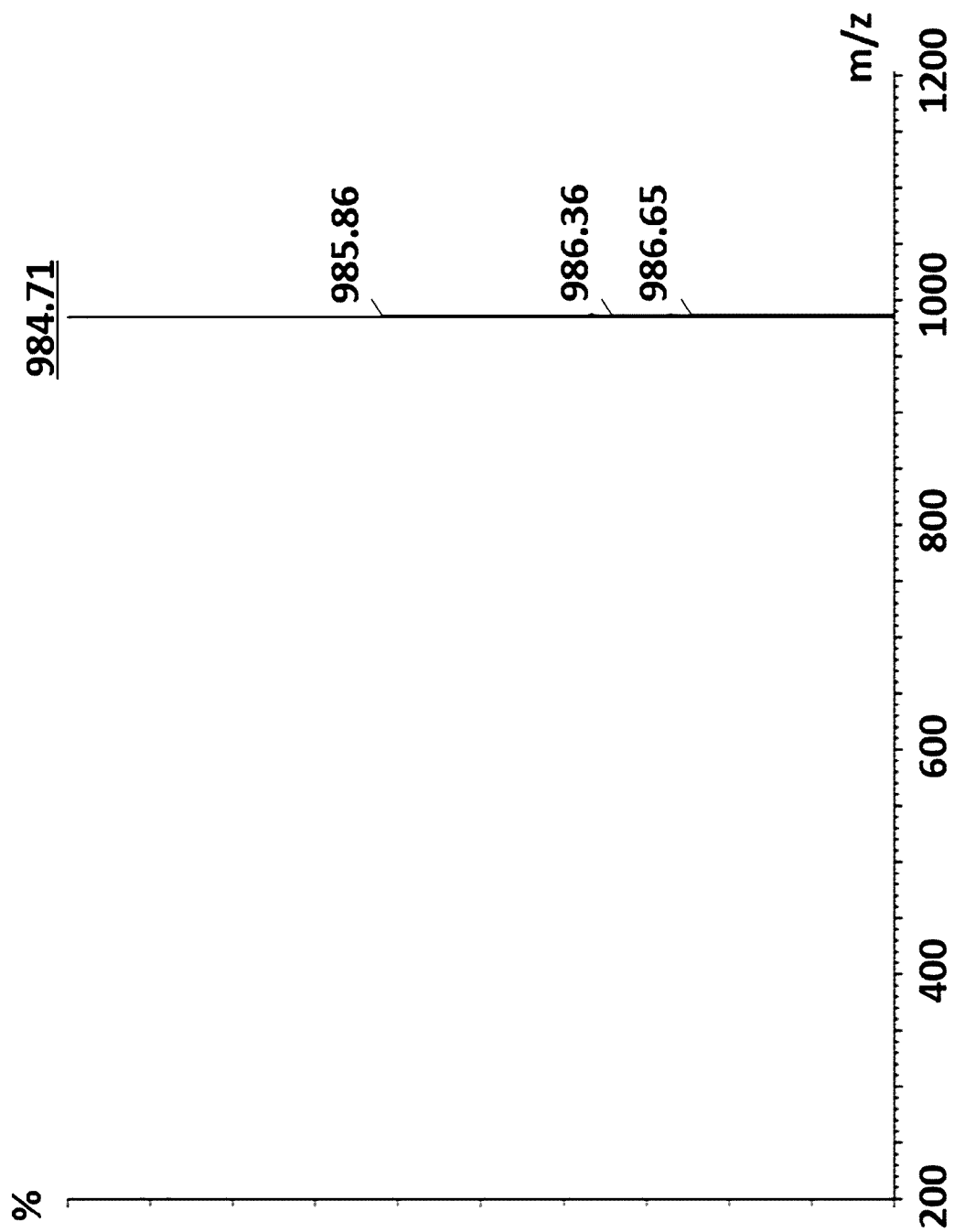
[도25]



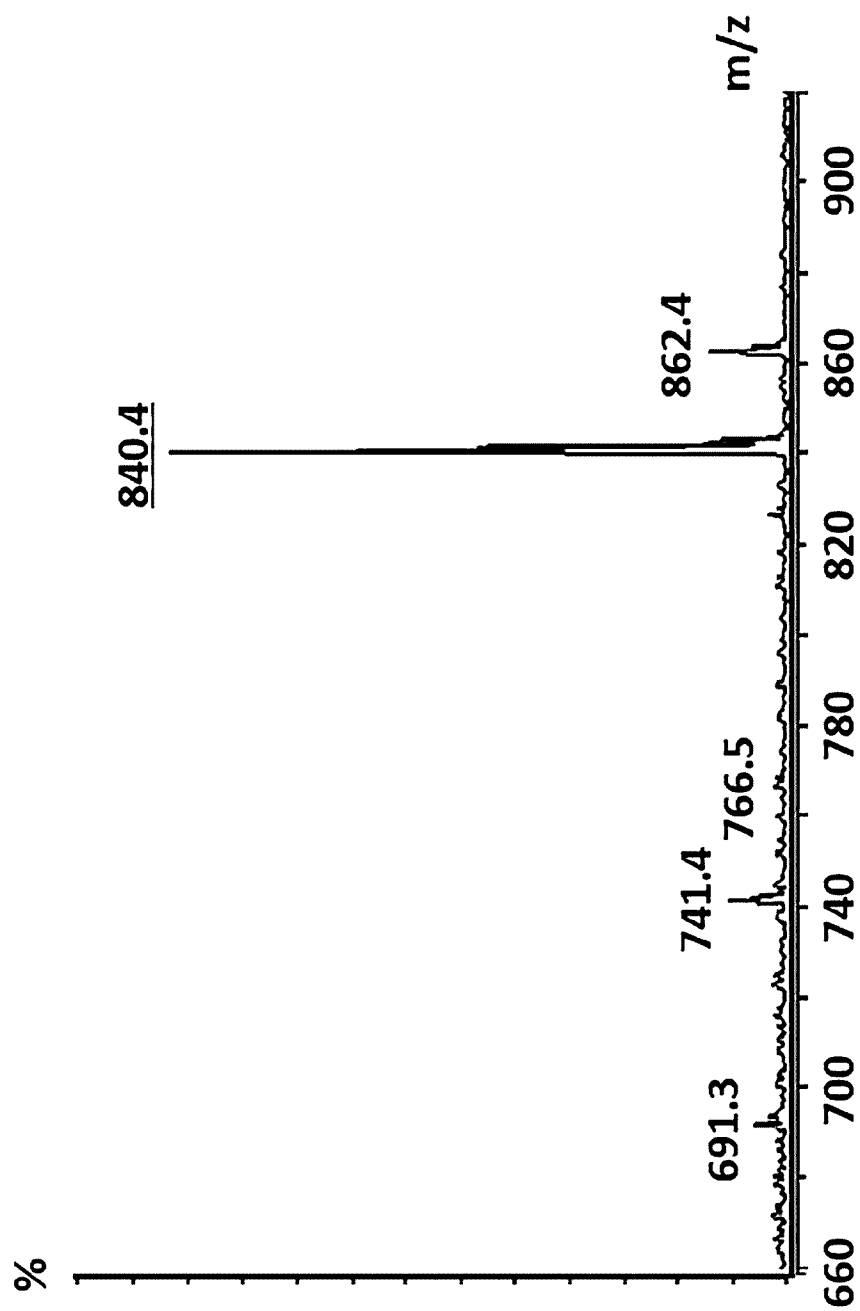
[도26]



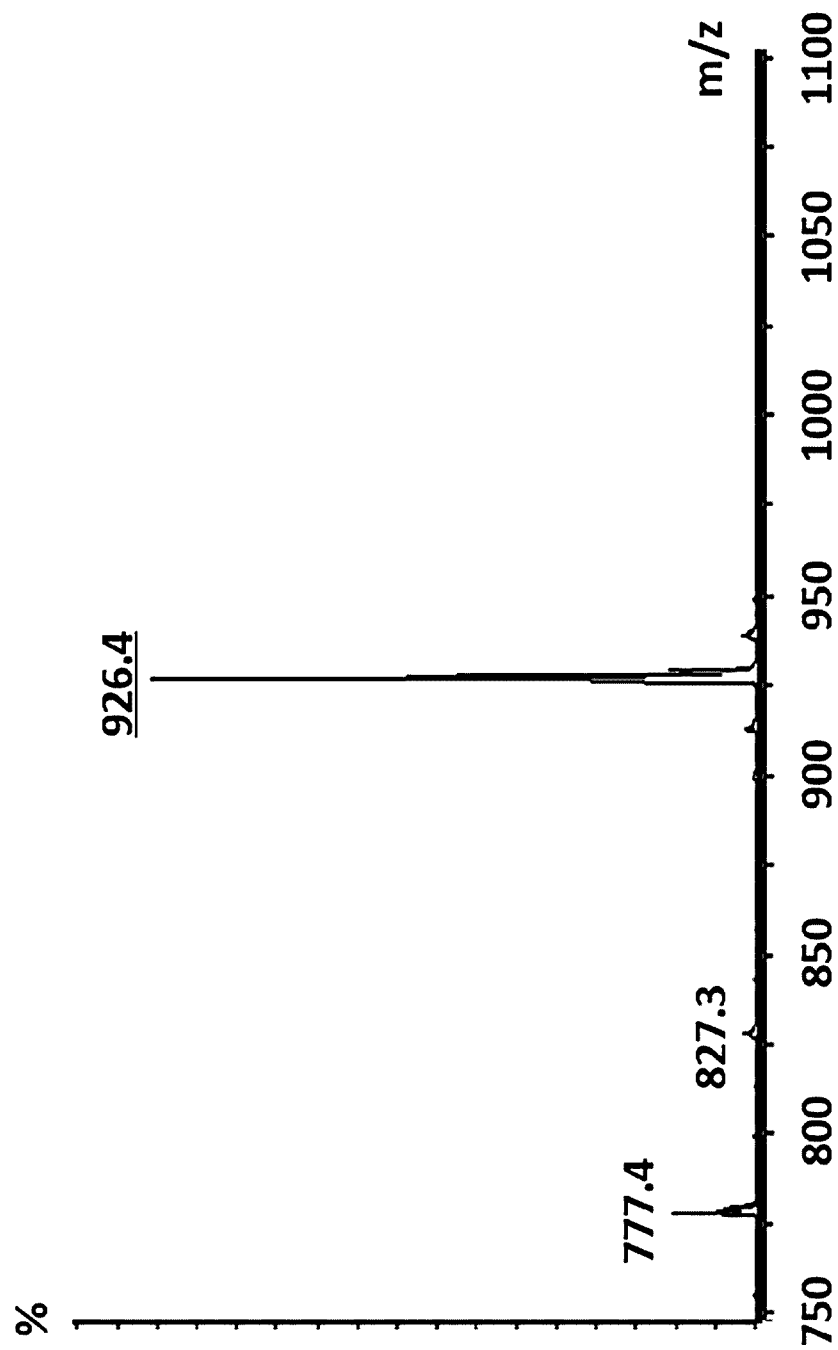
[도27]



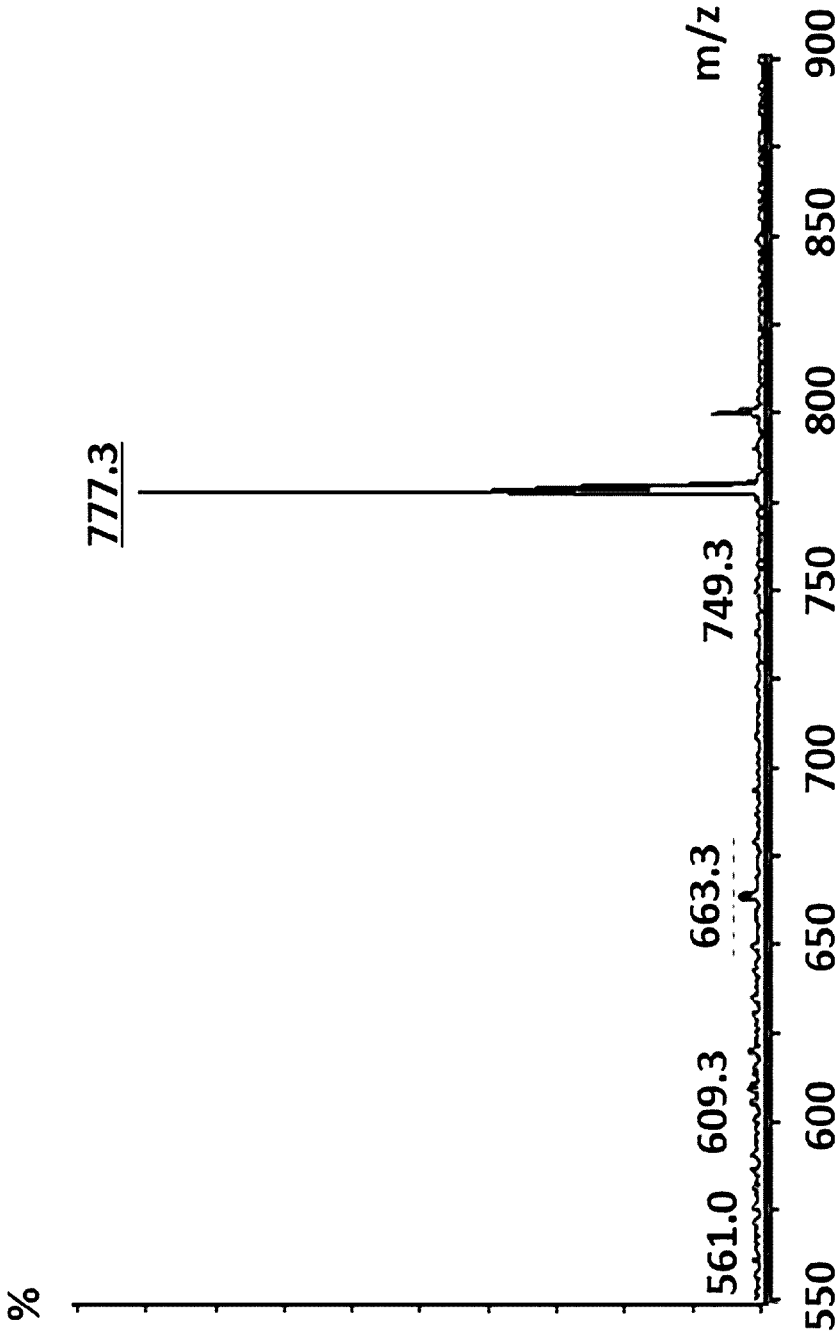
[도28]



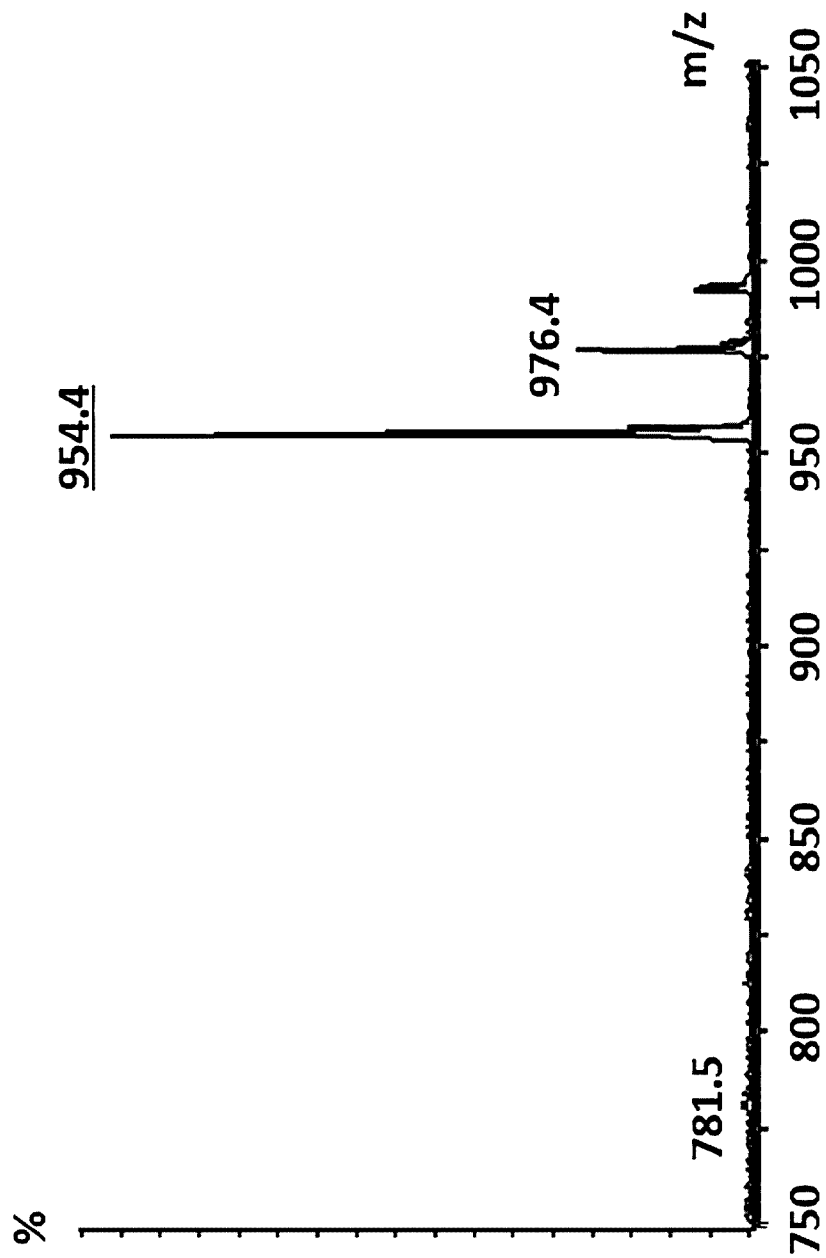
[도29]



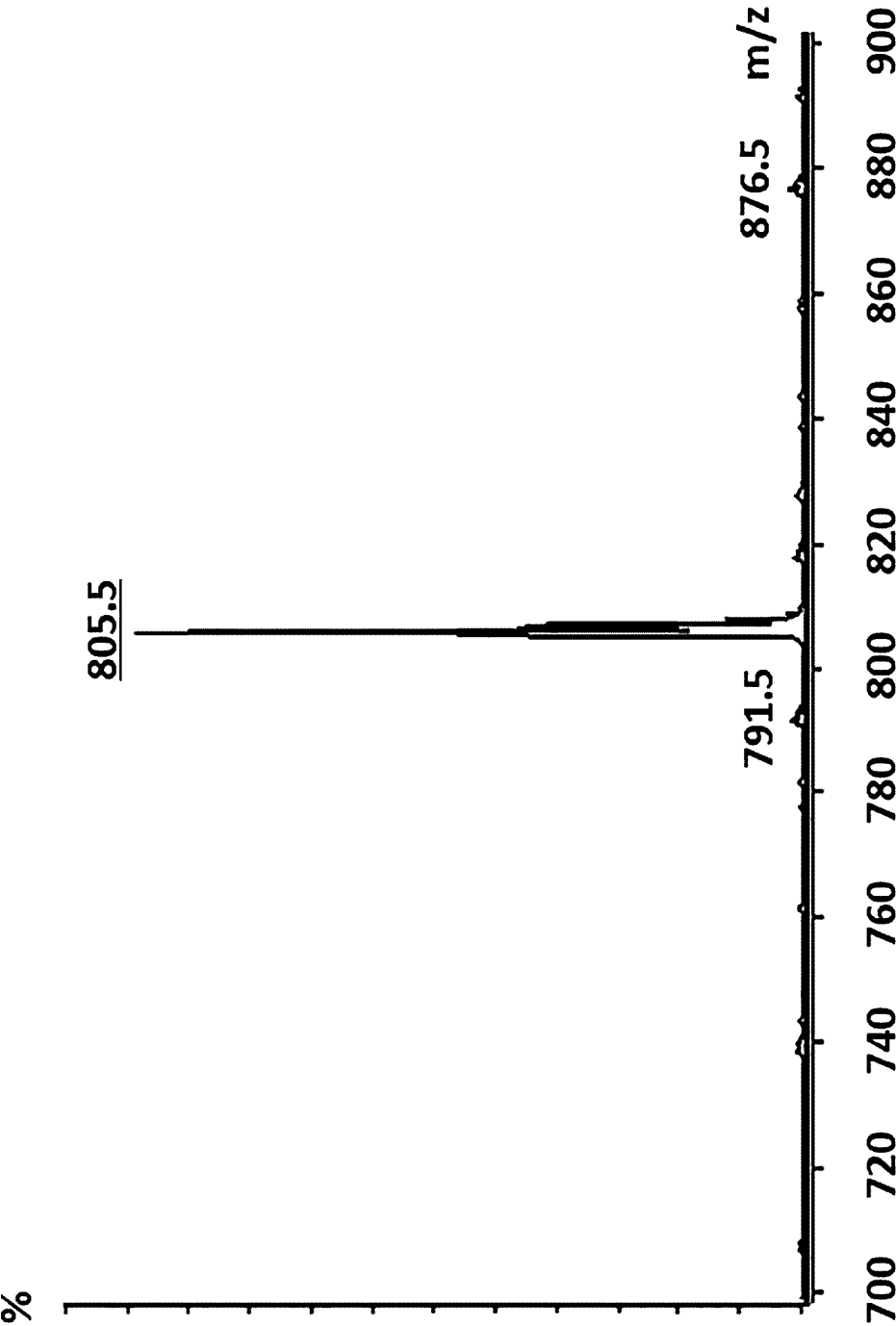
[도30]



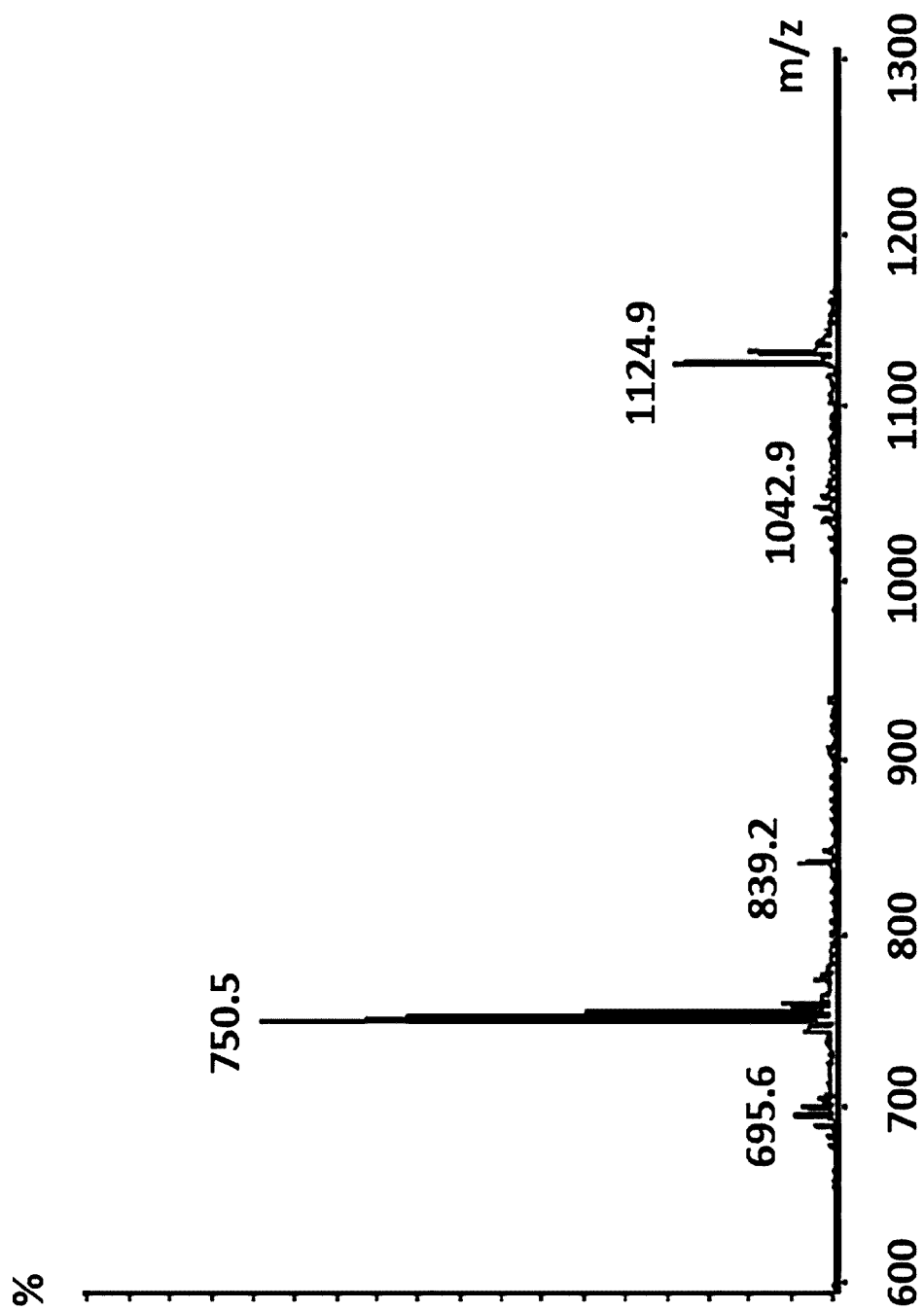
[도31]



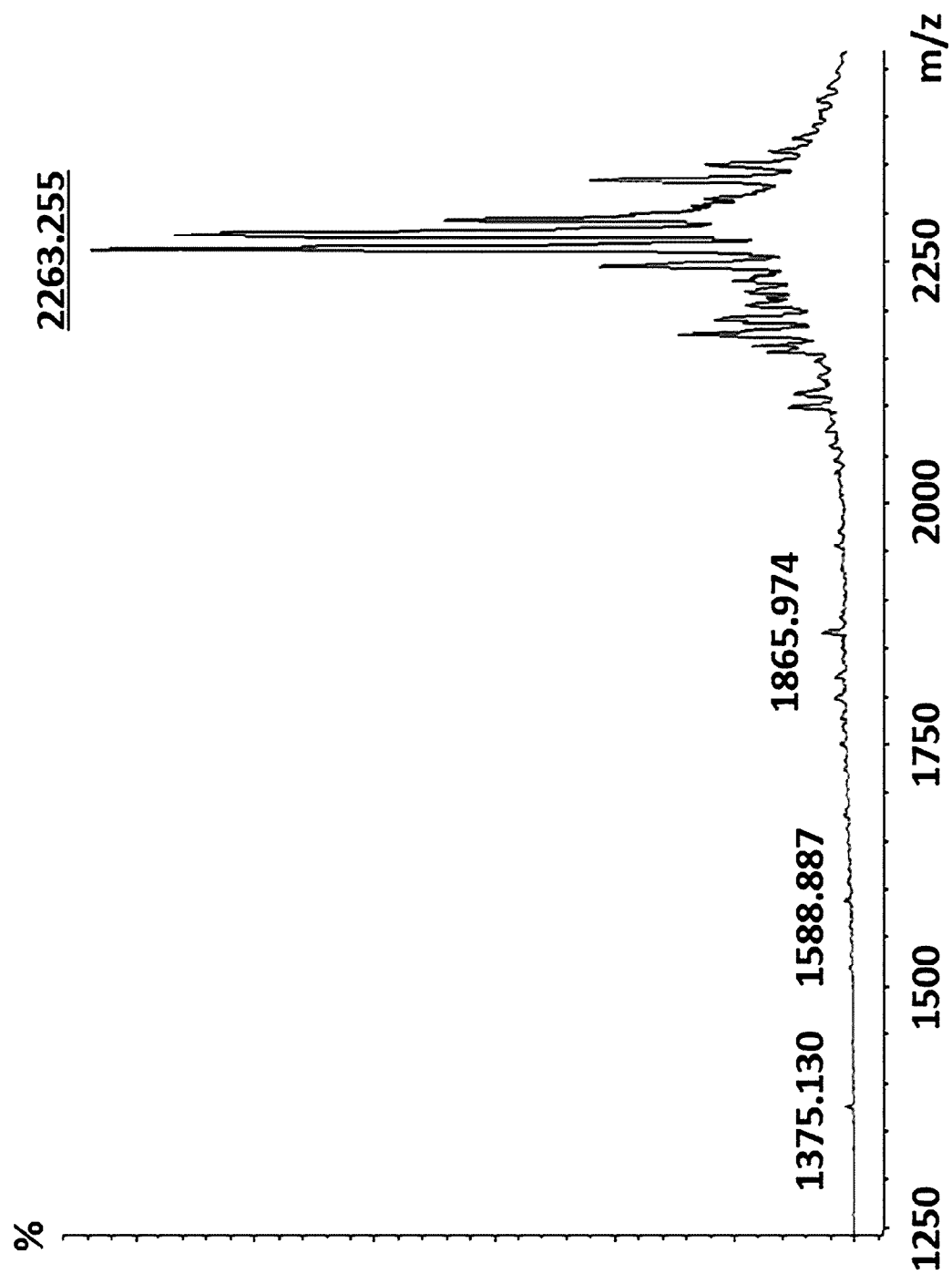
[도32]



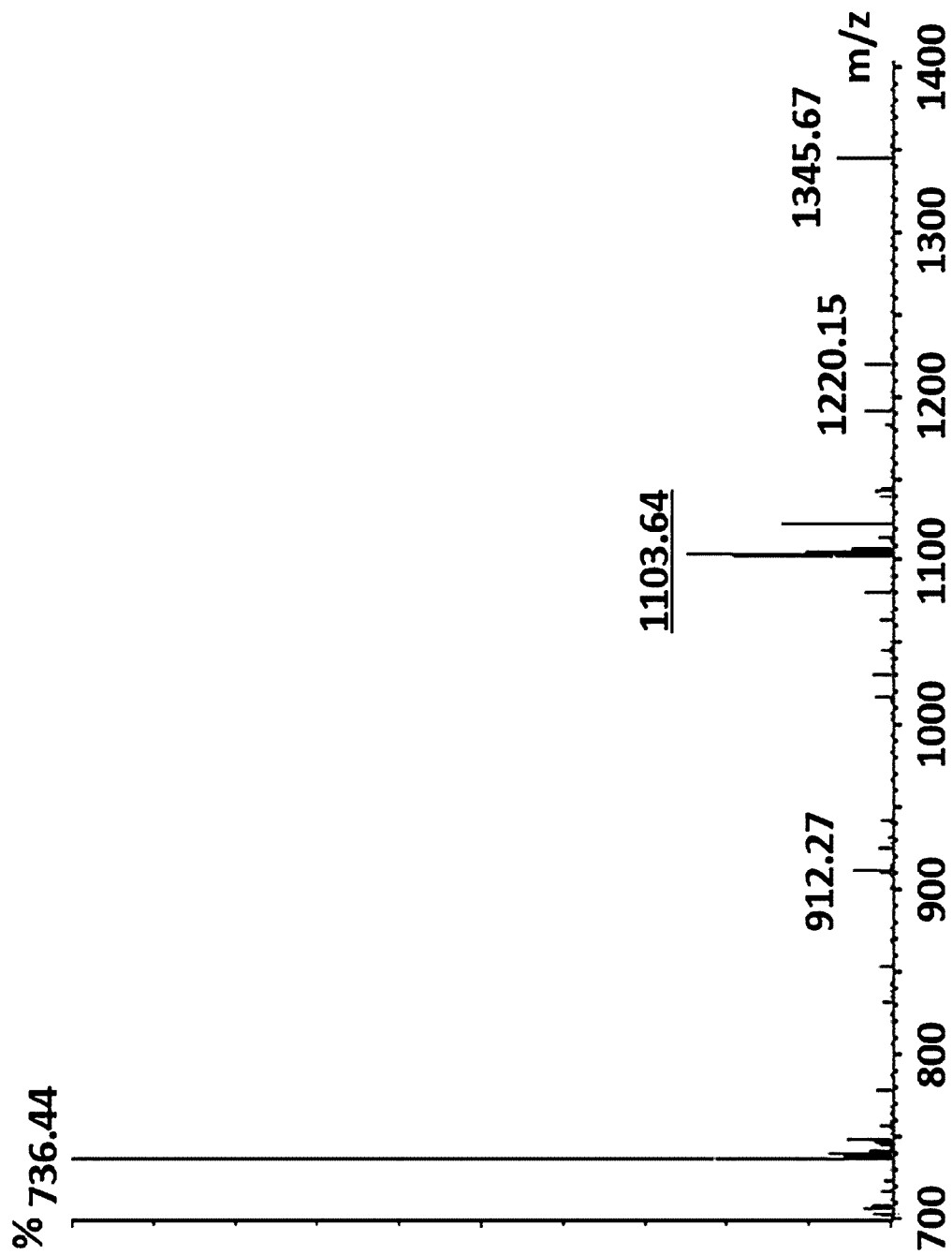
[도33]



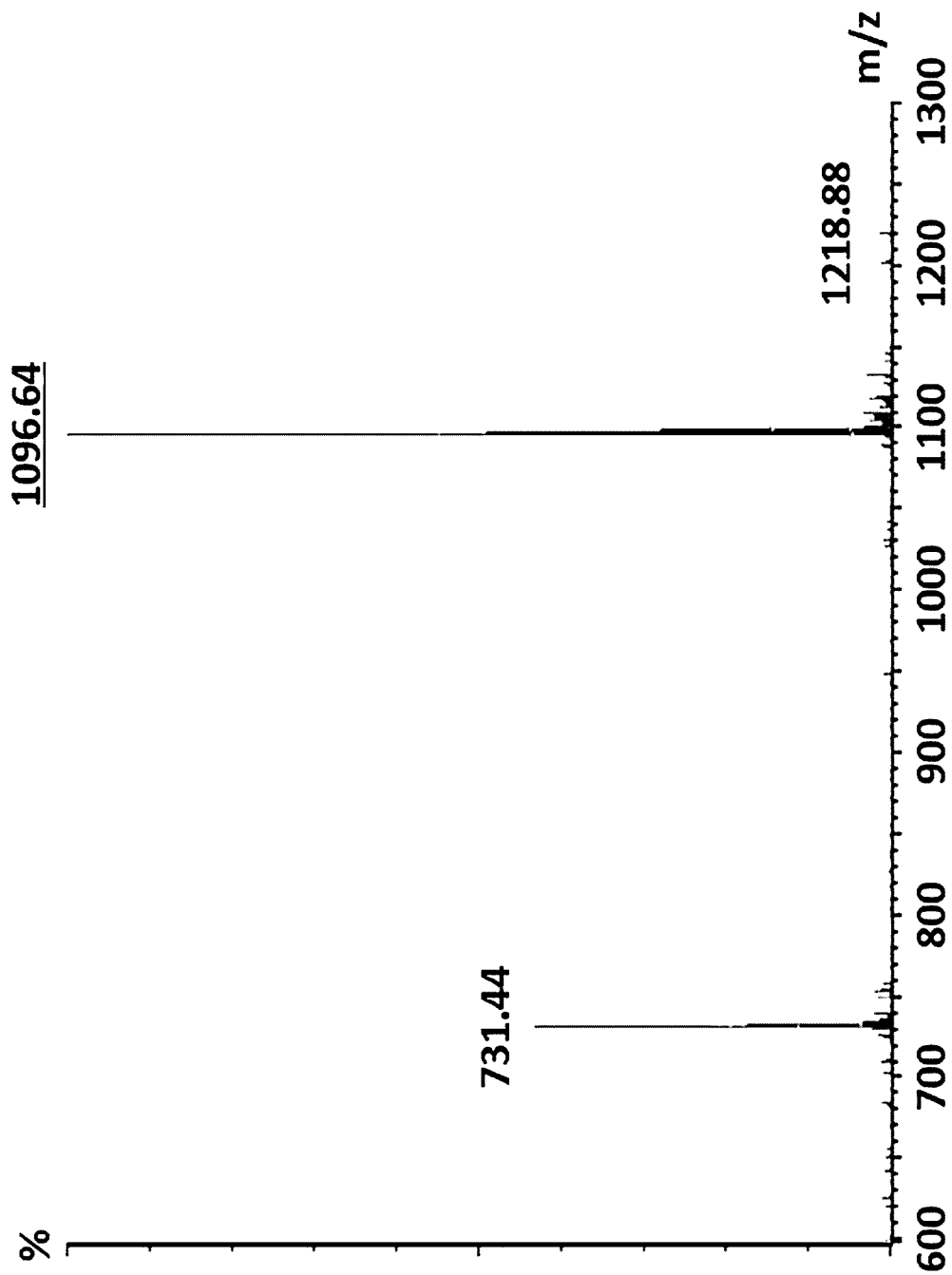
[도34]



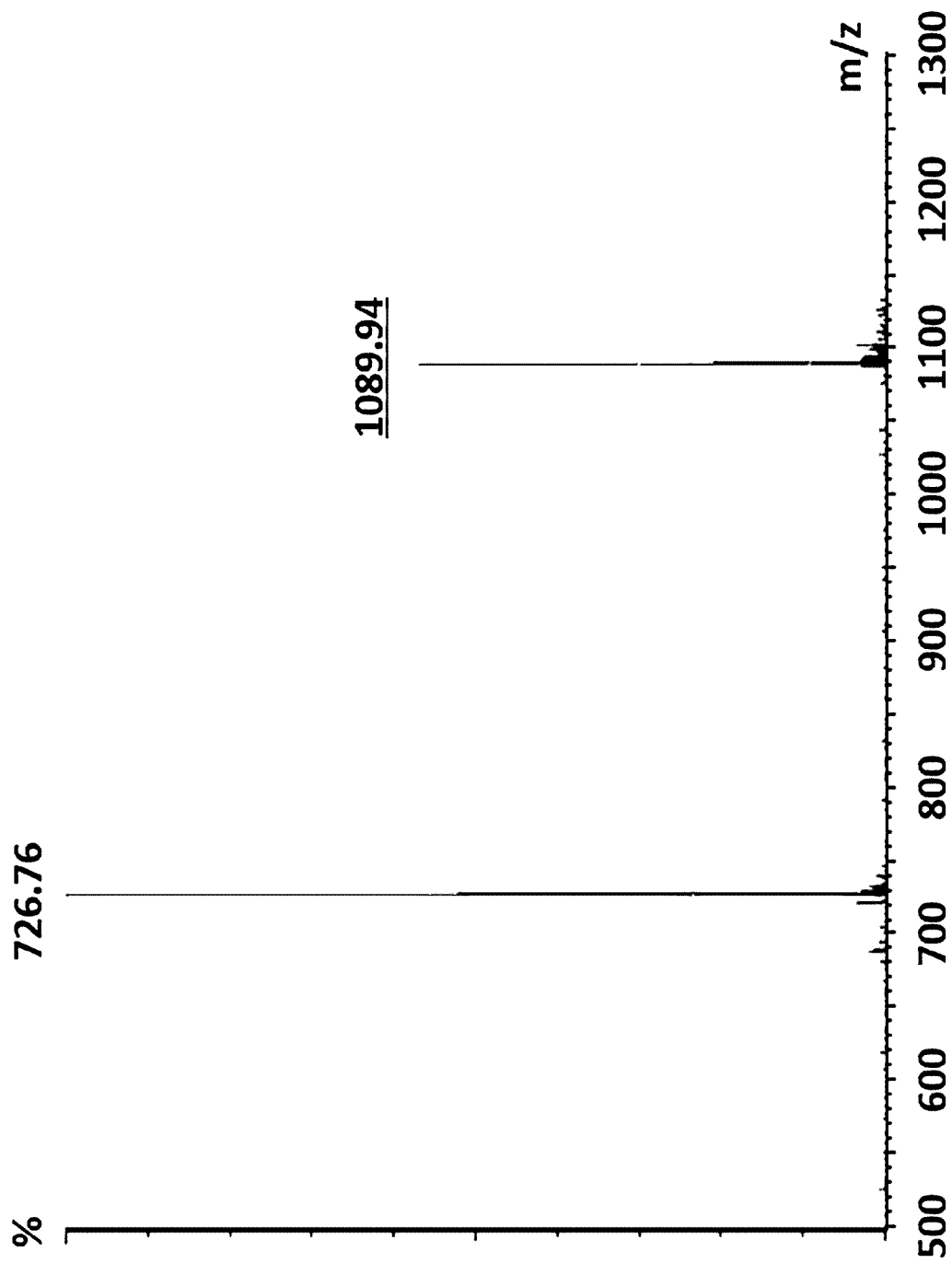
[도35]



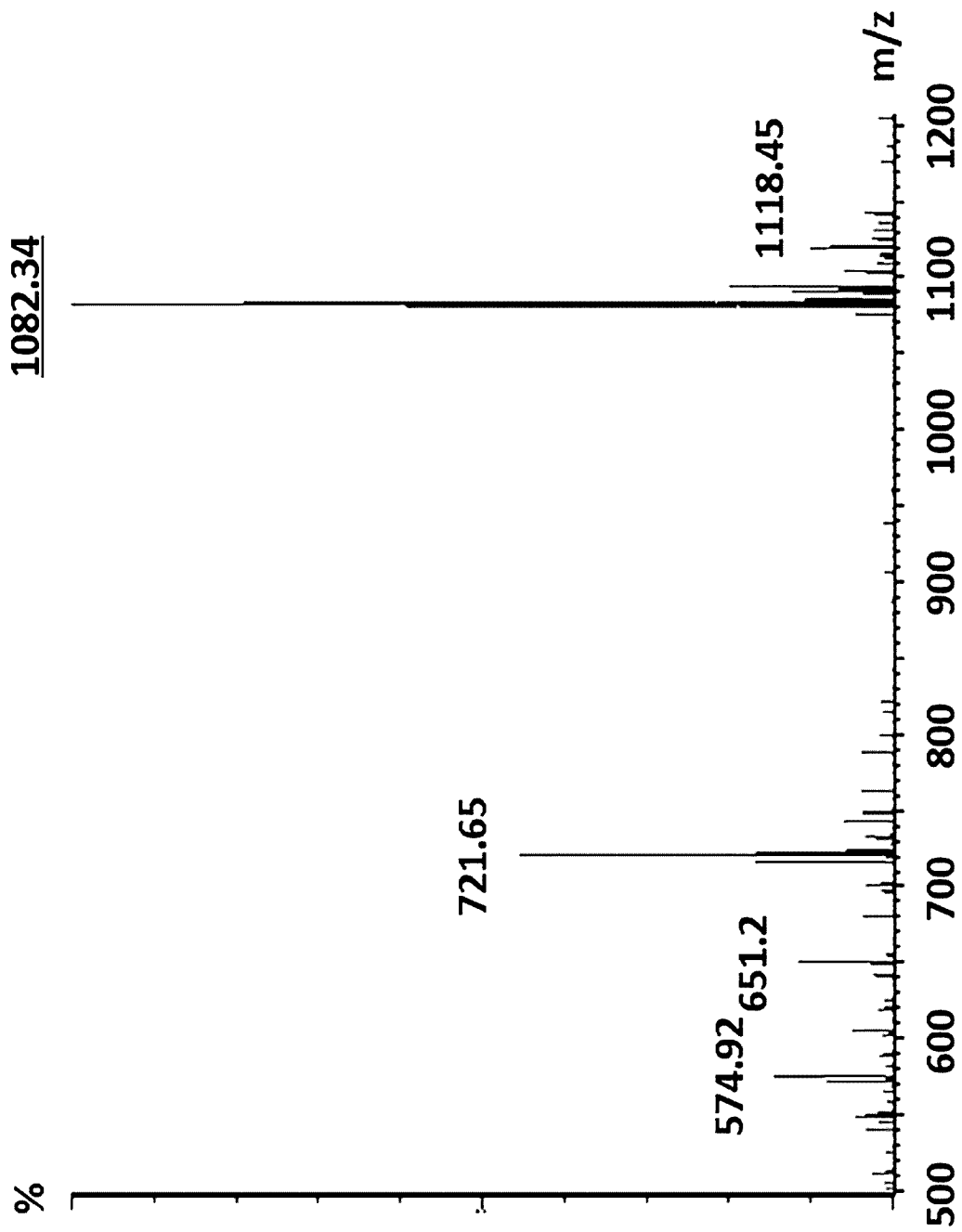
[도36]



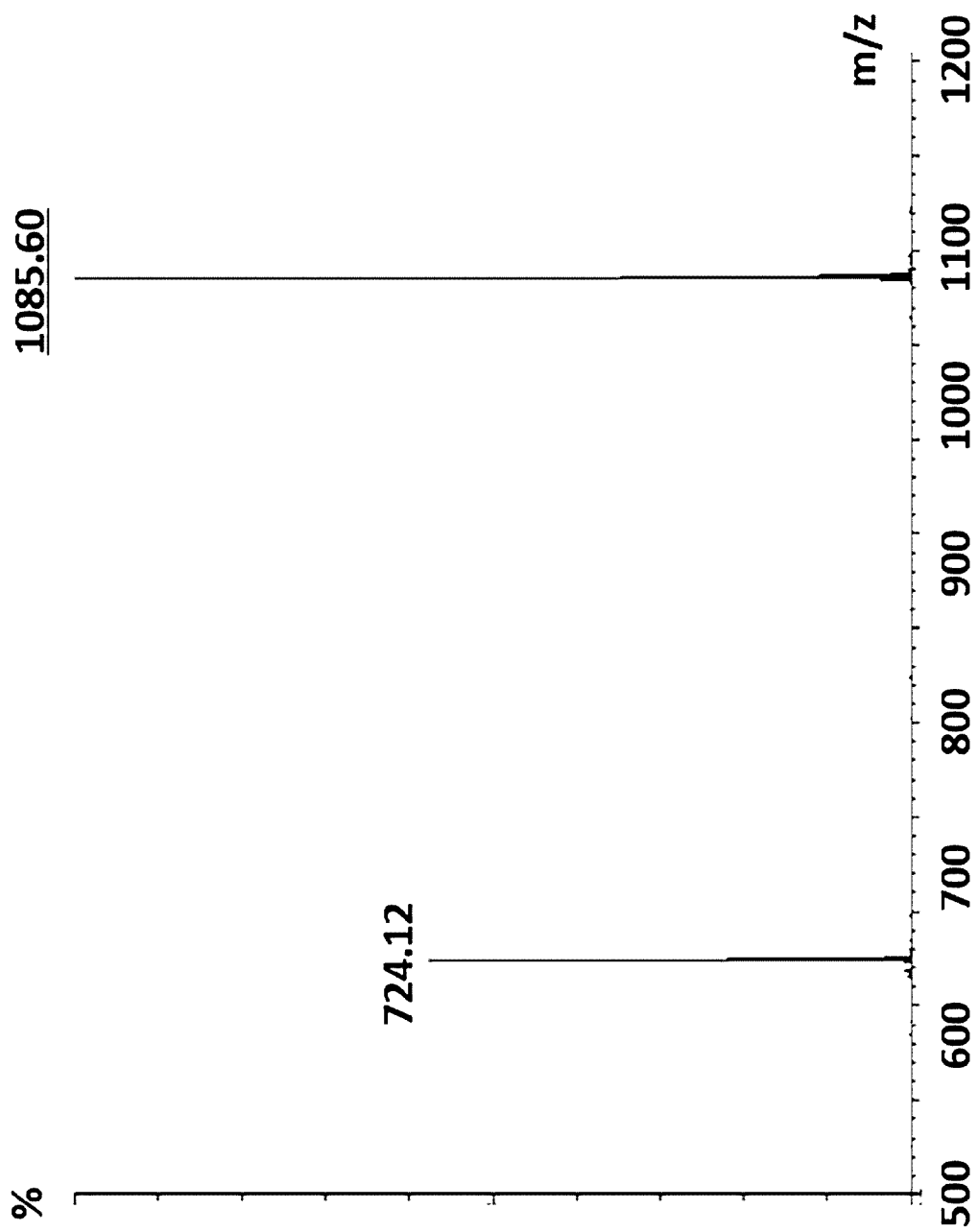
[도37]



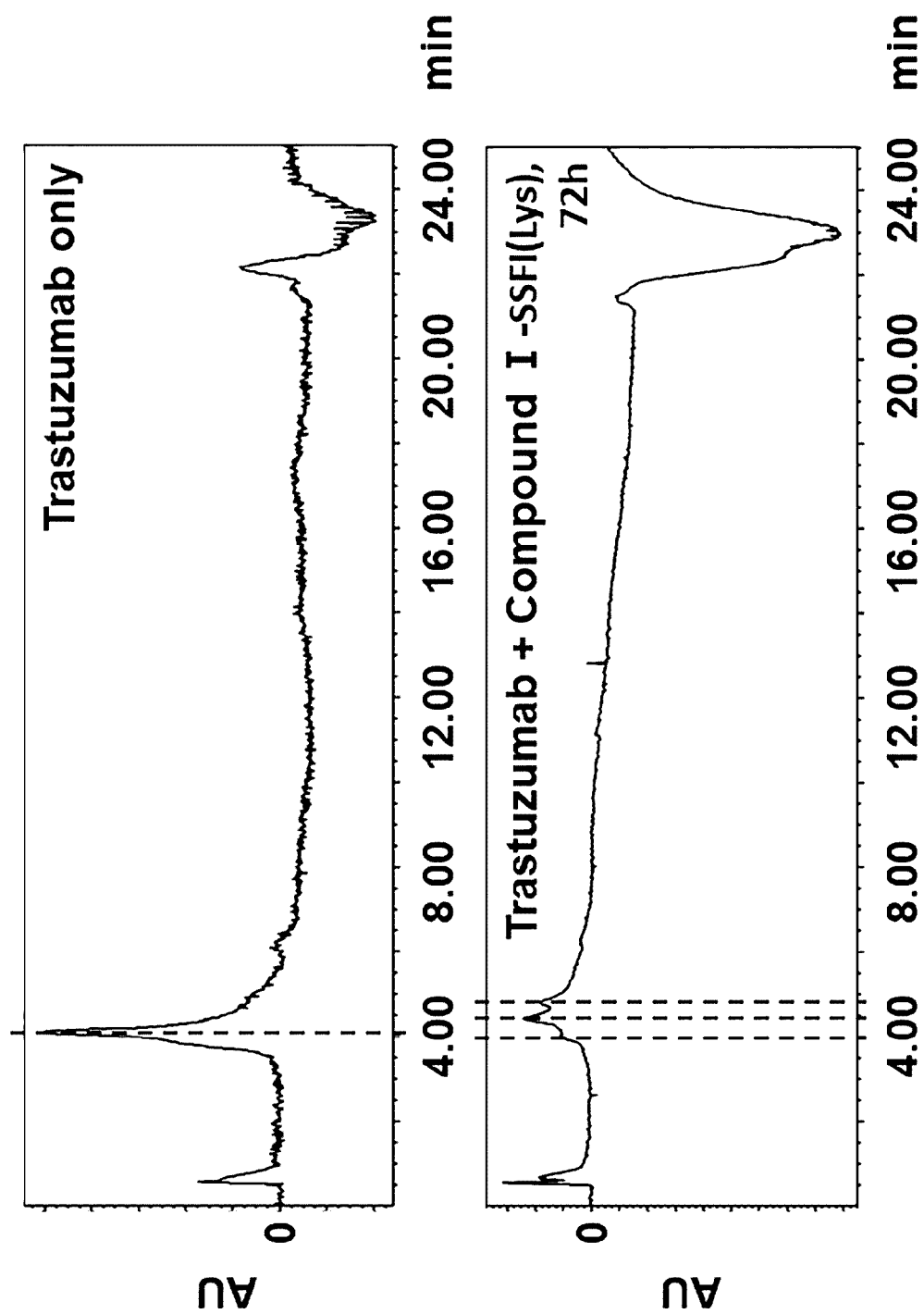
[도38]



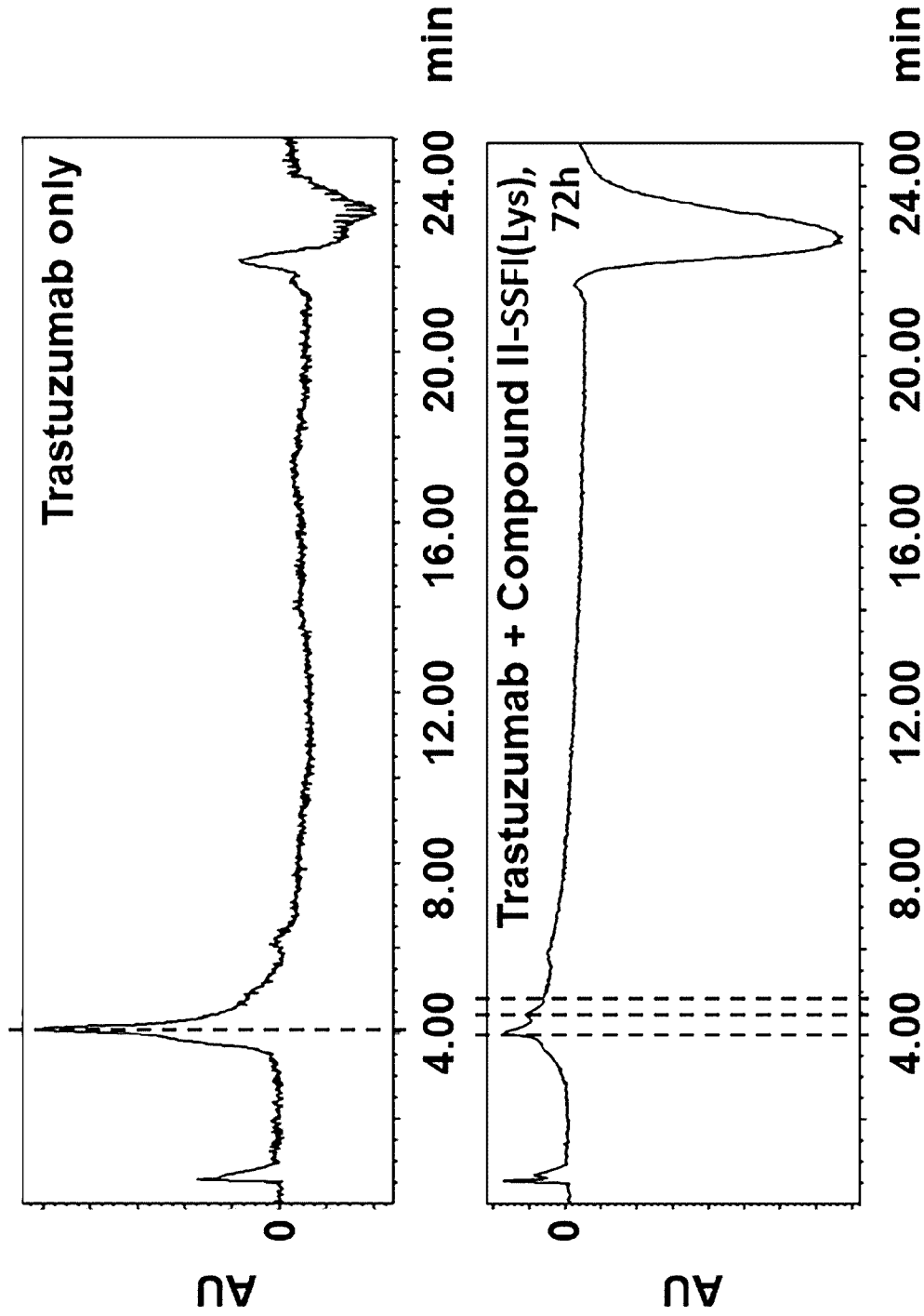
[도39]



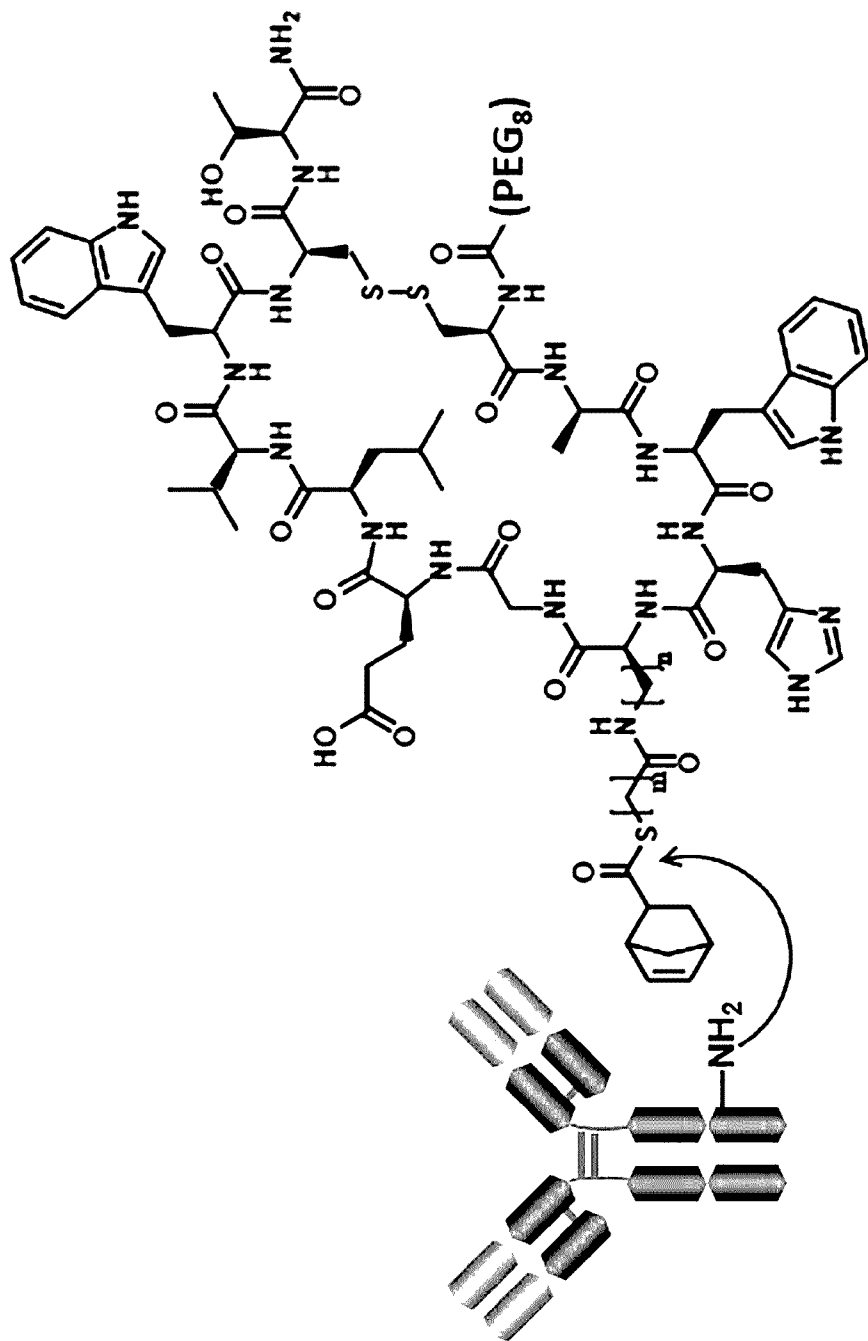
[도40]



[도41]

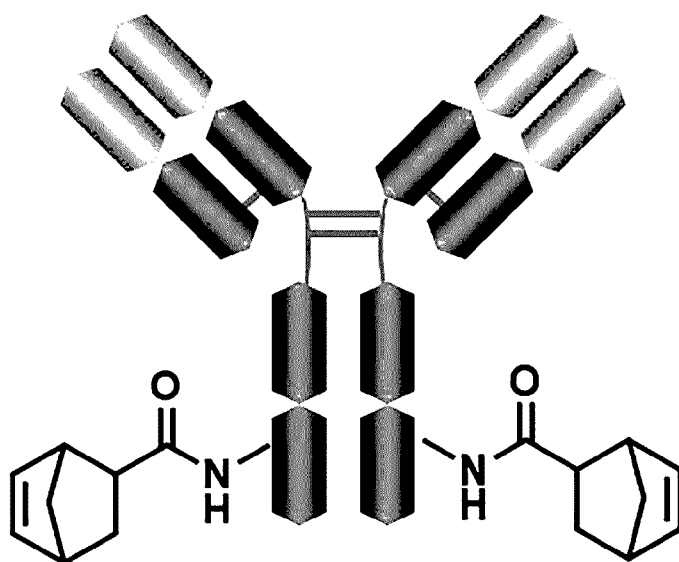


[도42]

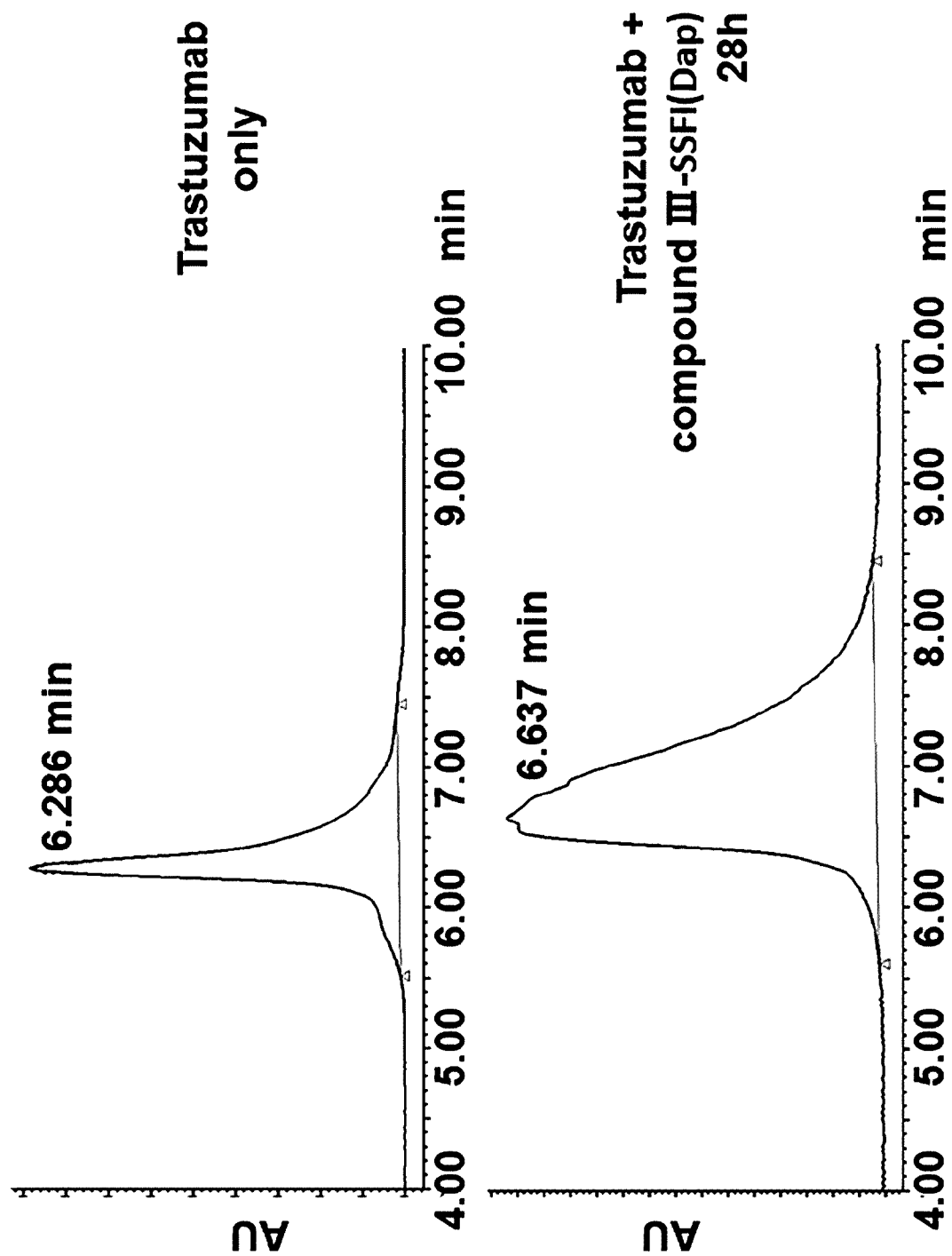


(chemical structure of formula 16 pegylated)

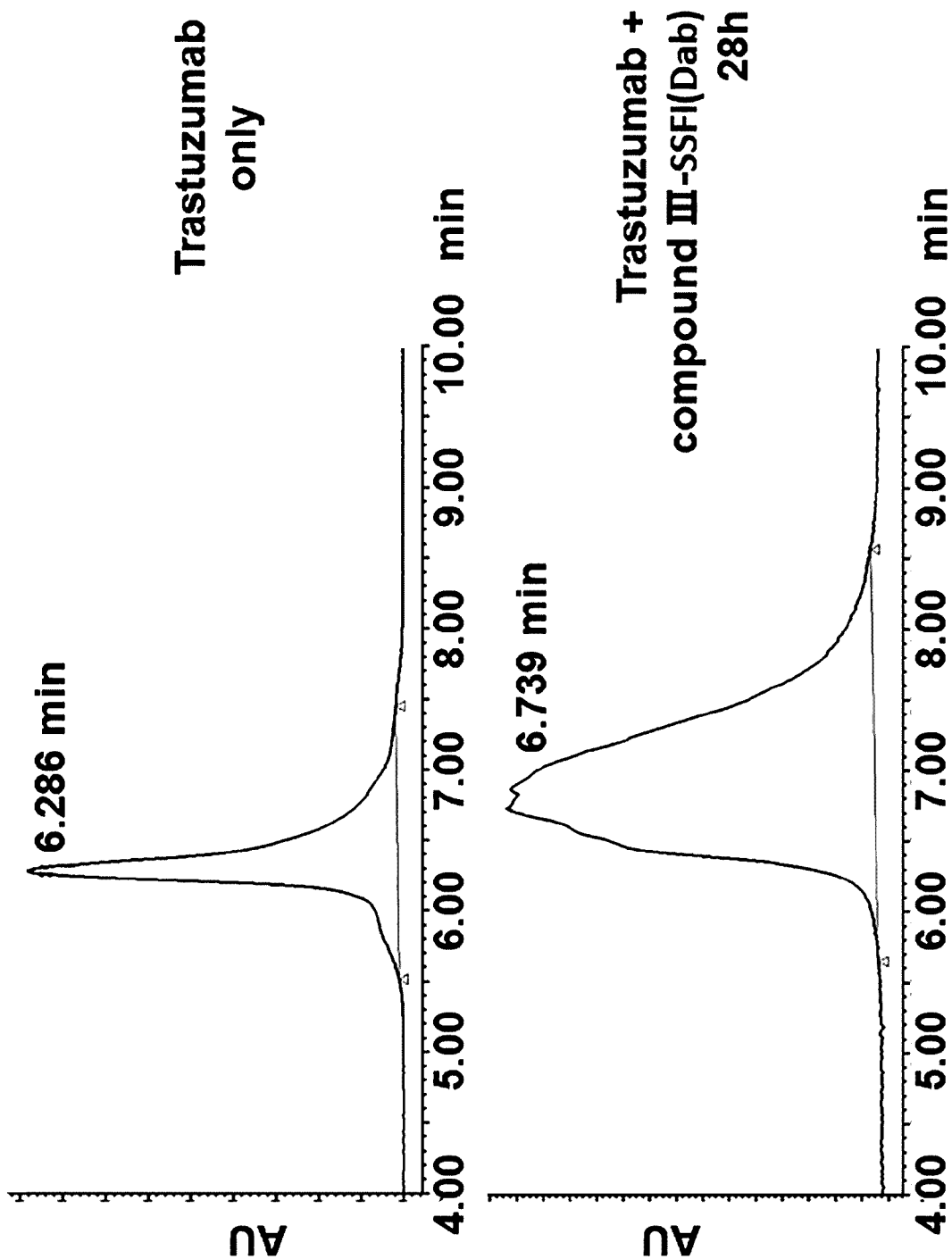
[도43]



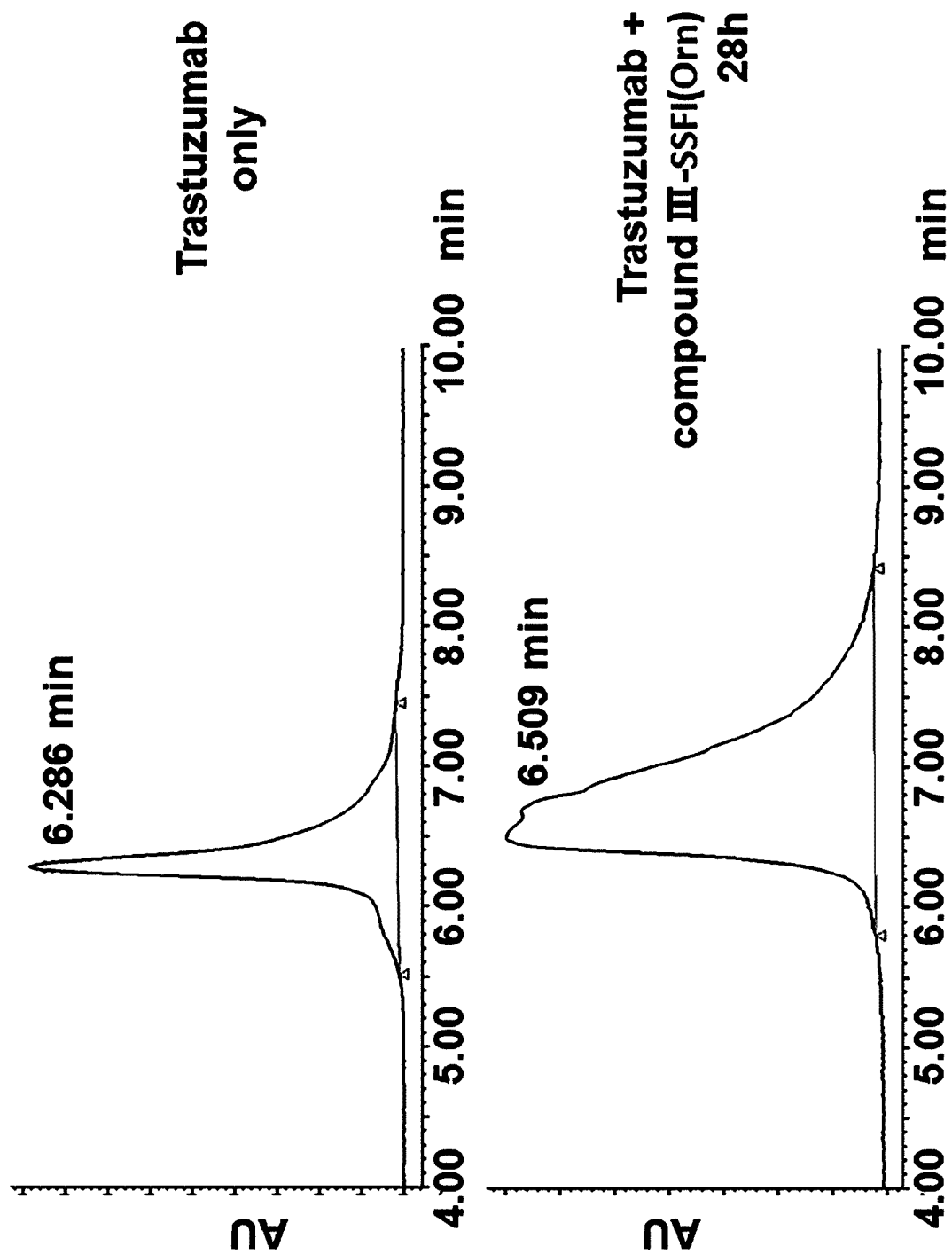
[도44]



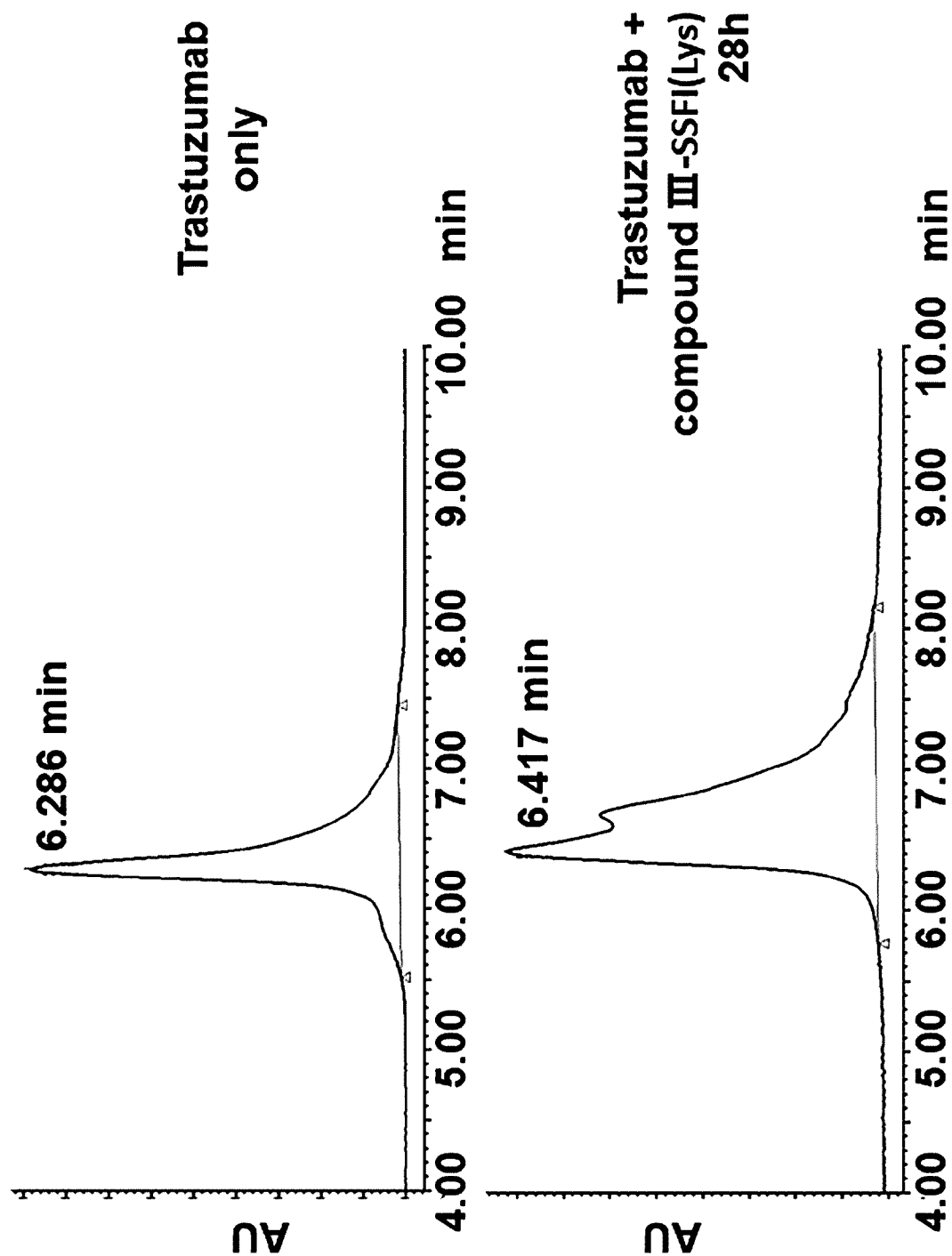
[도45]



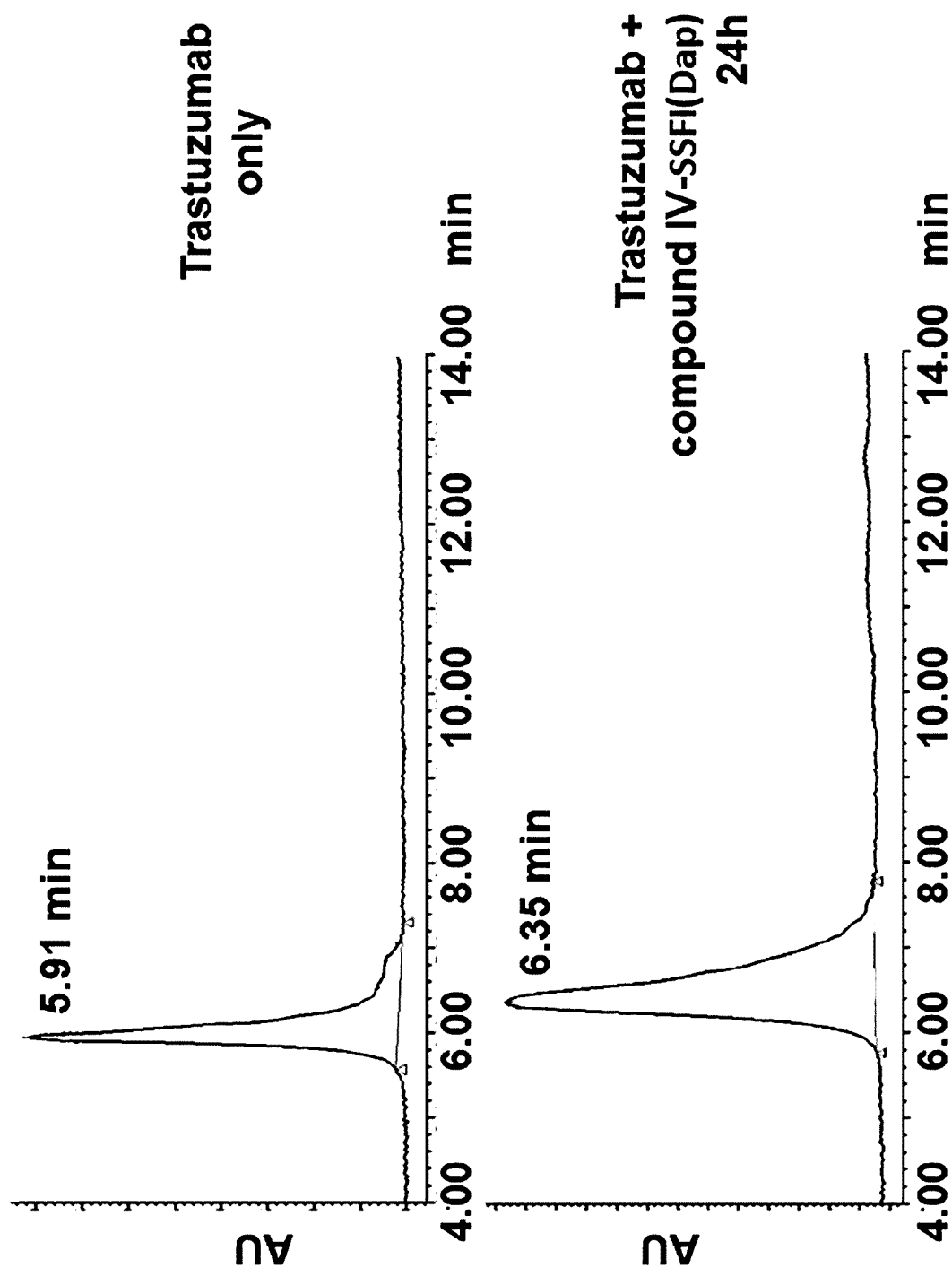
[도46]



[도47]

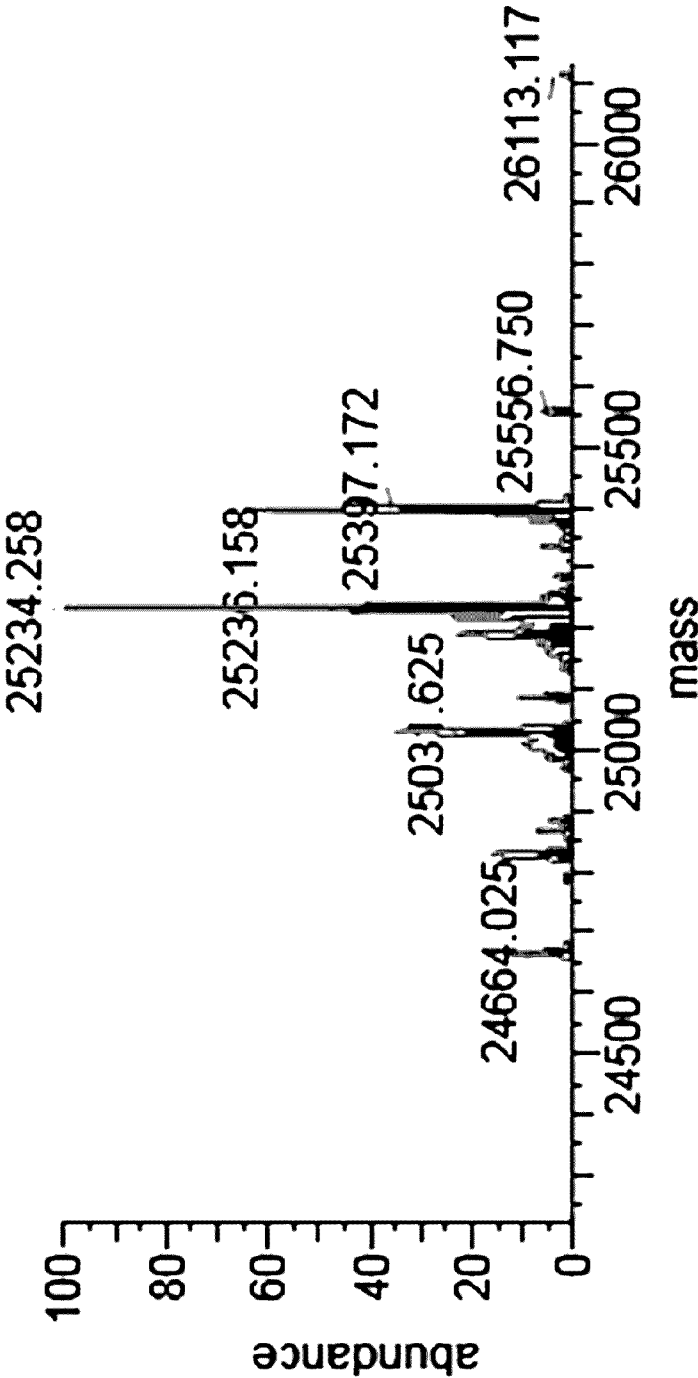


[도48]



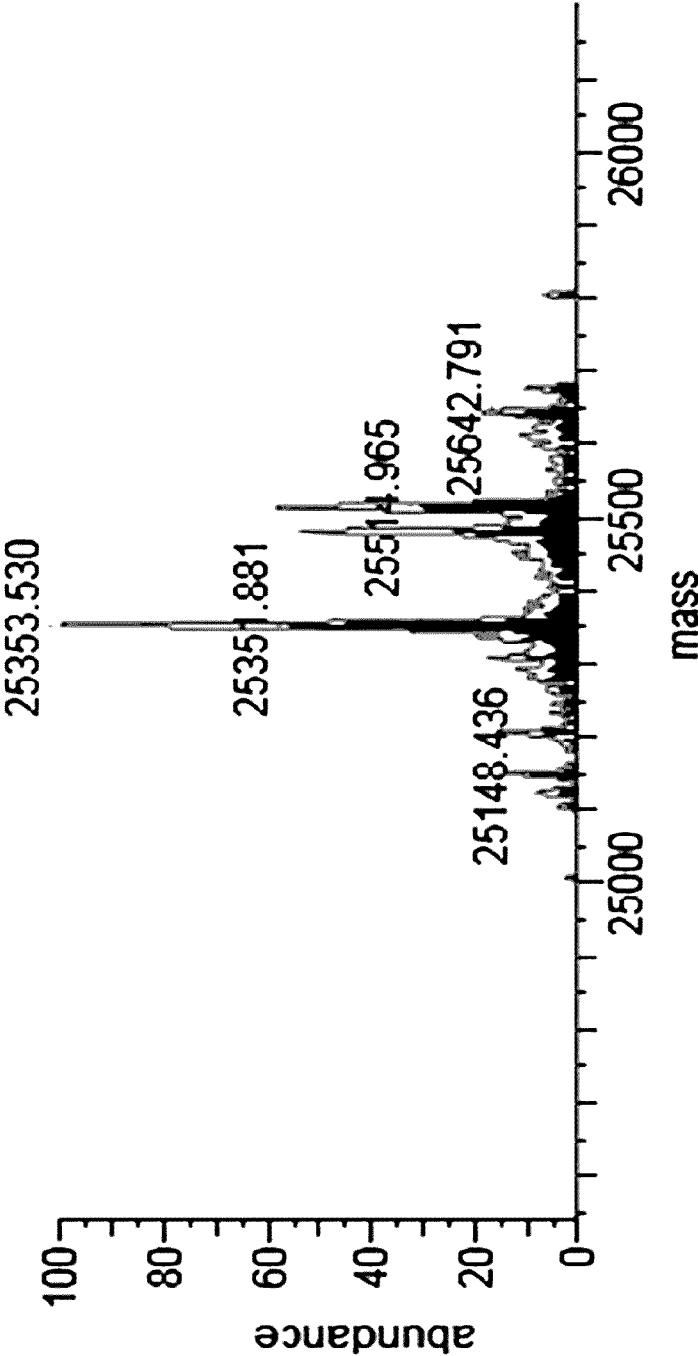
[도49]

Trastuzumab only (Fc/2)

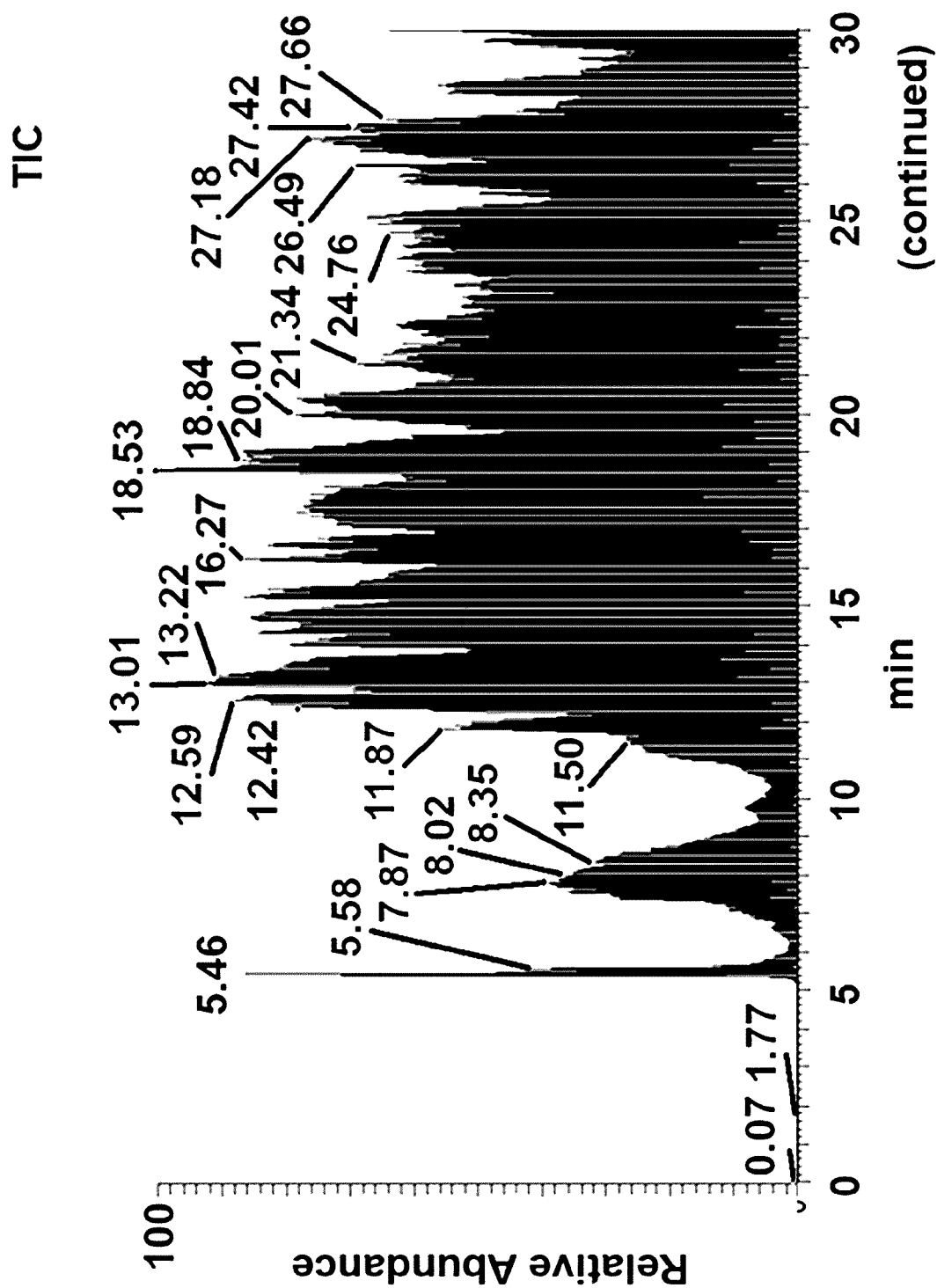


[도50]

Trastuzumab-norbornene conjugate (Fc/2)

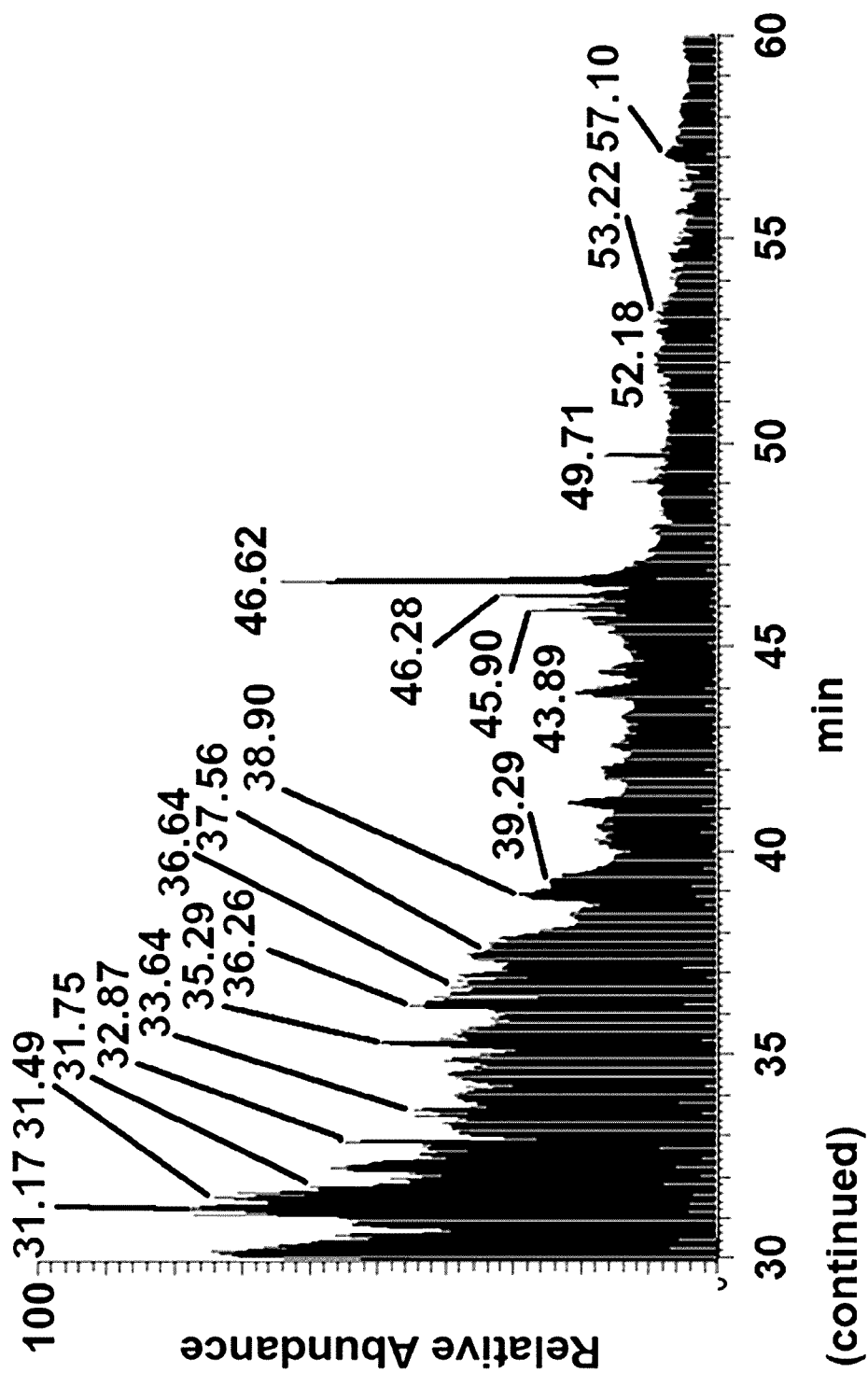


[도51]



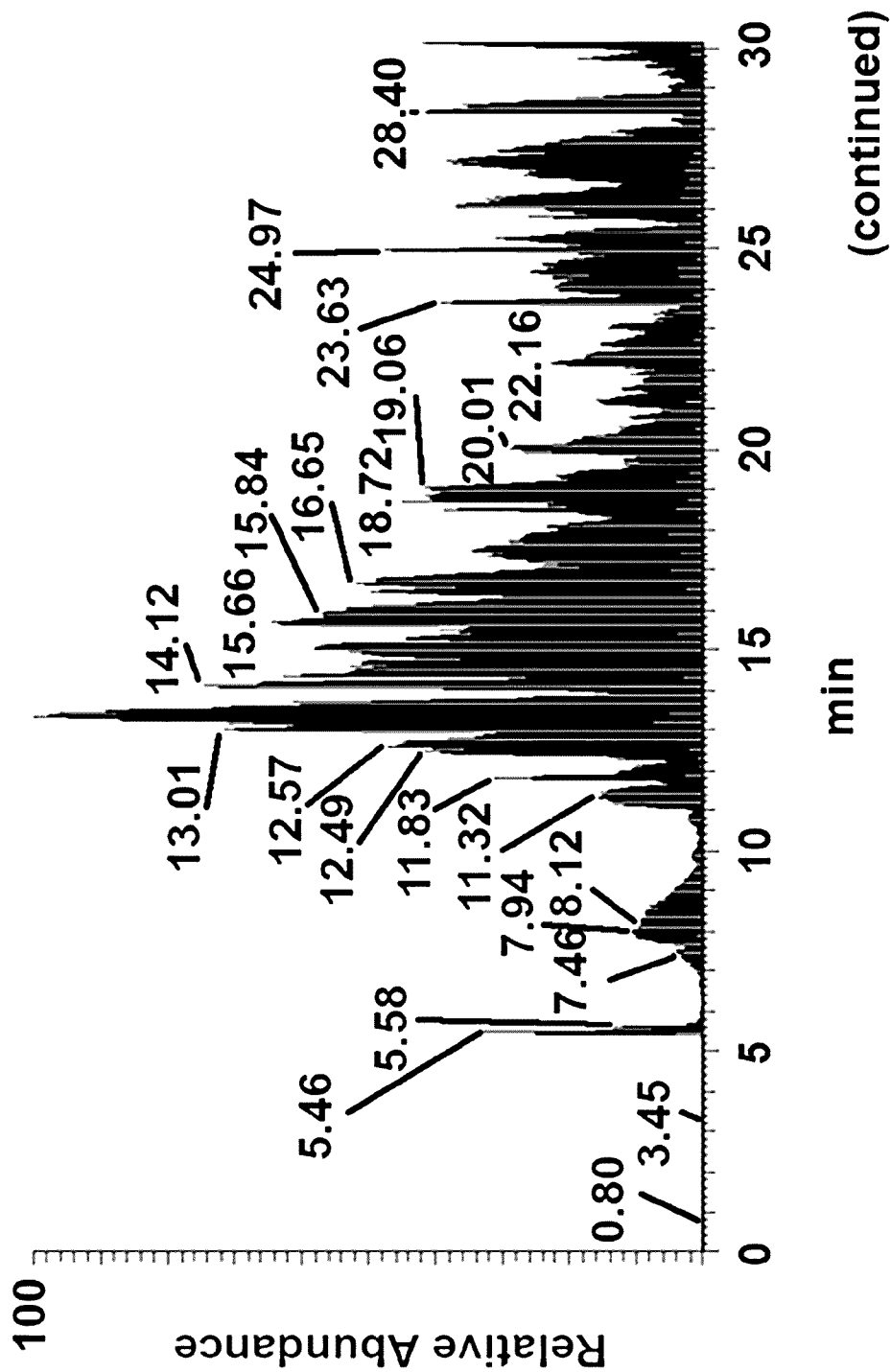
[도52]

TIC



[도53]

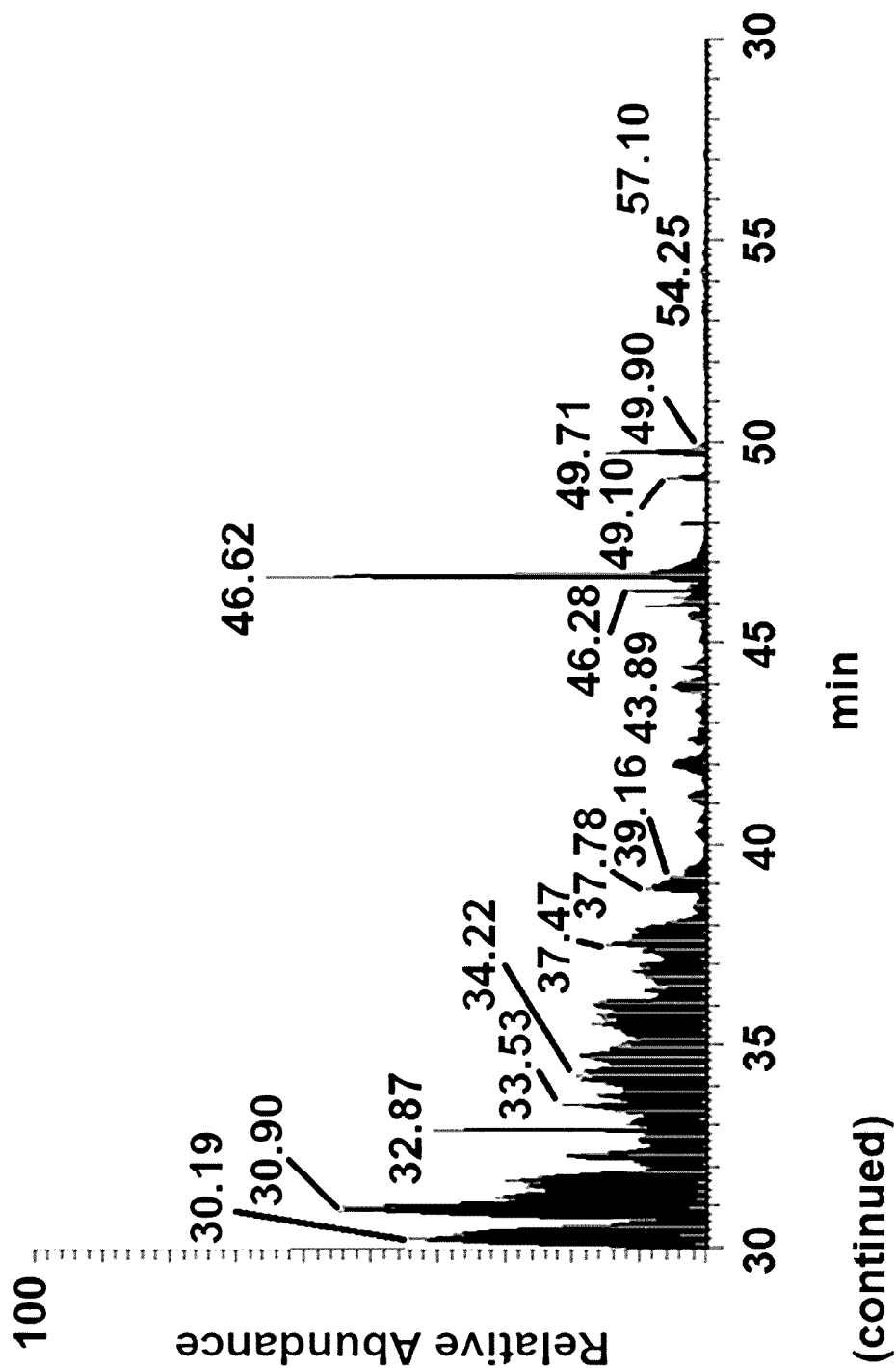
Base peak



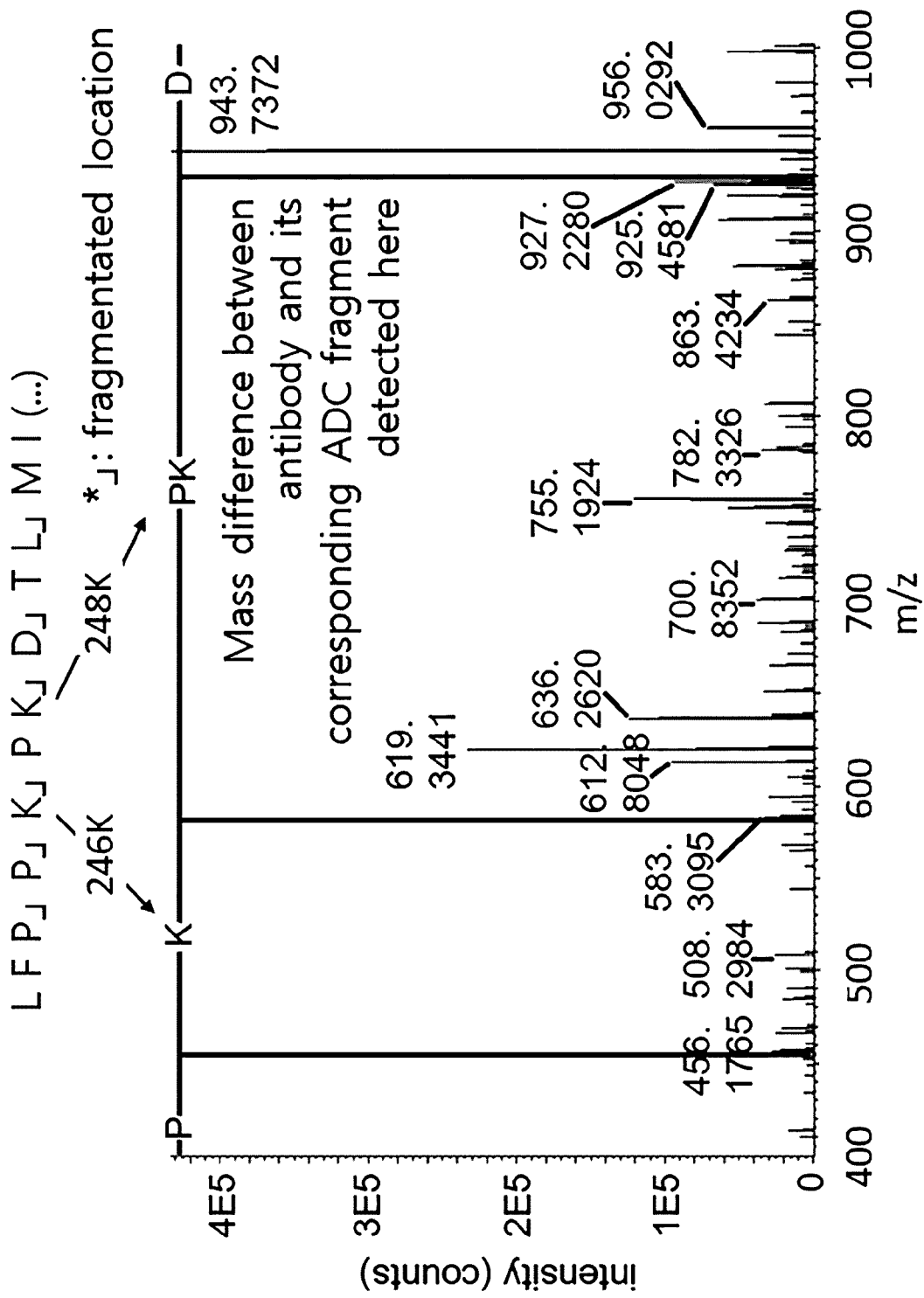
(continued)

[도54]

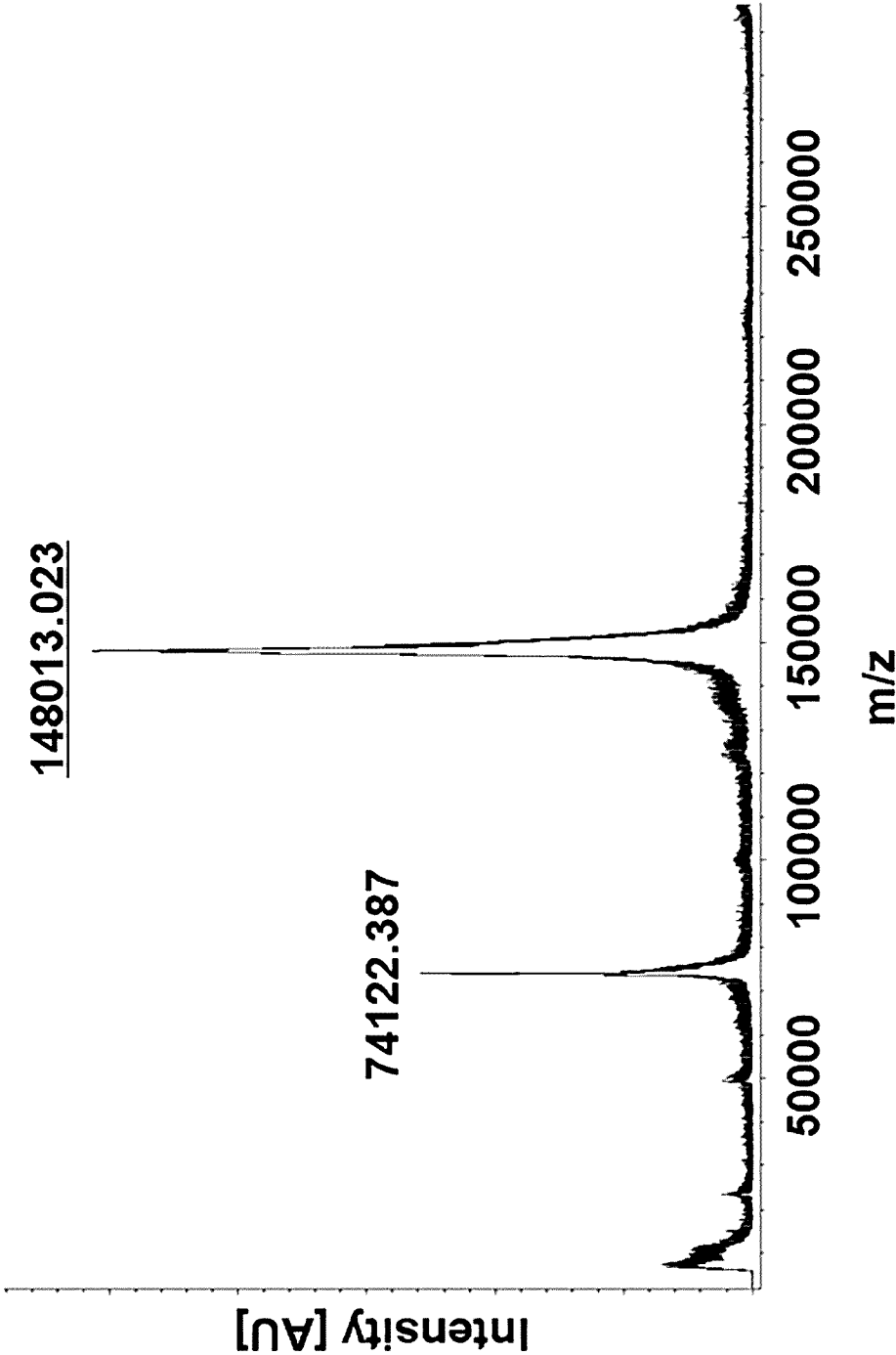
Base peak



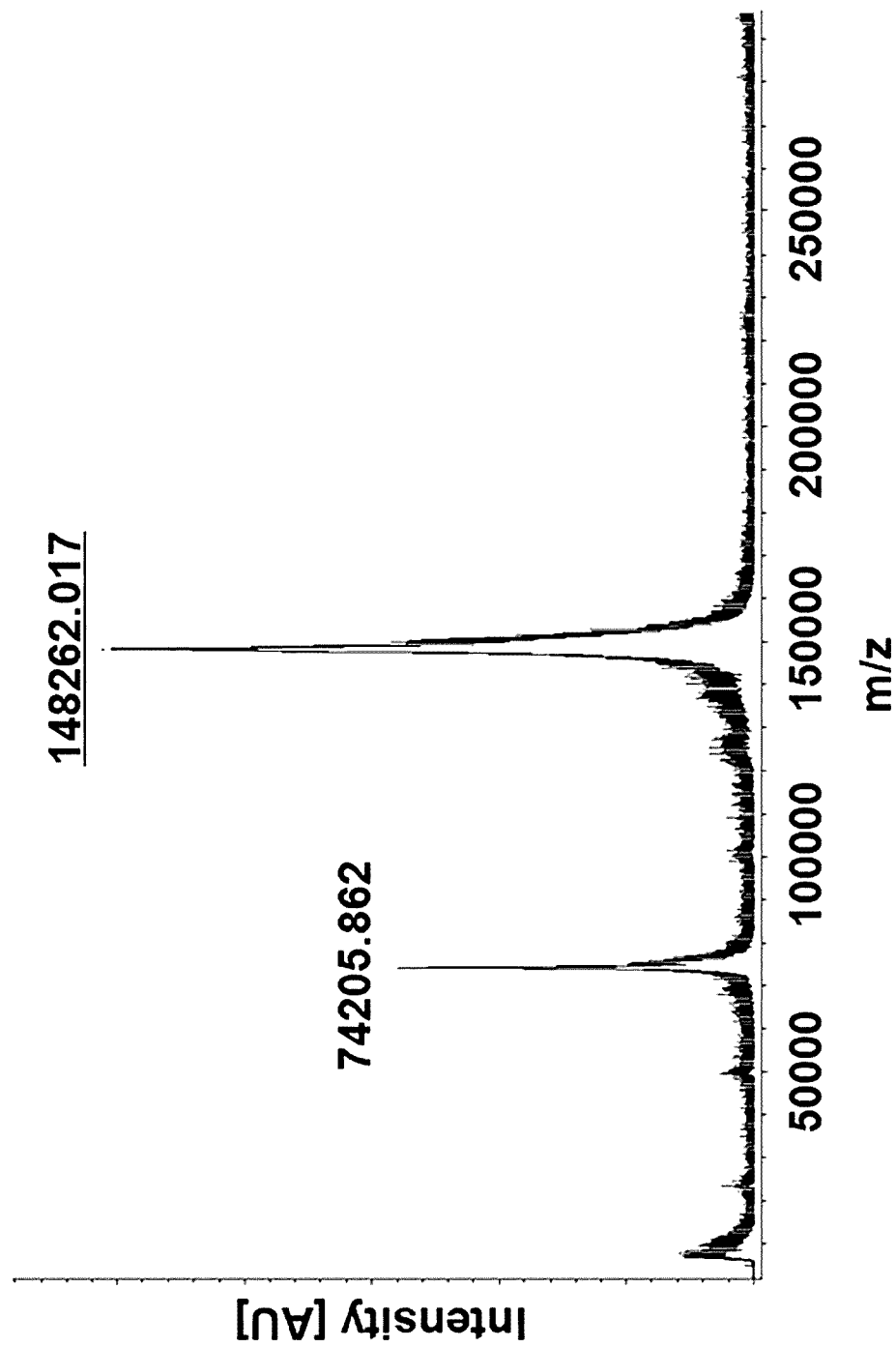
[도55]



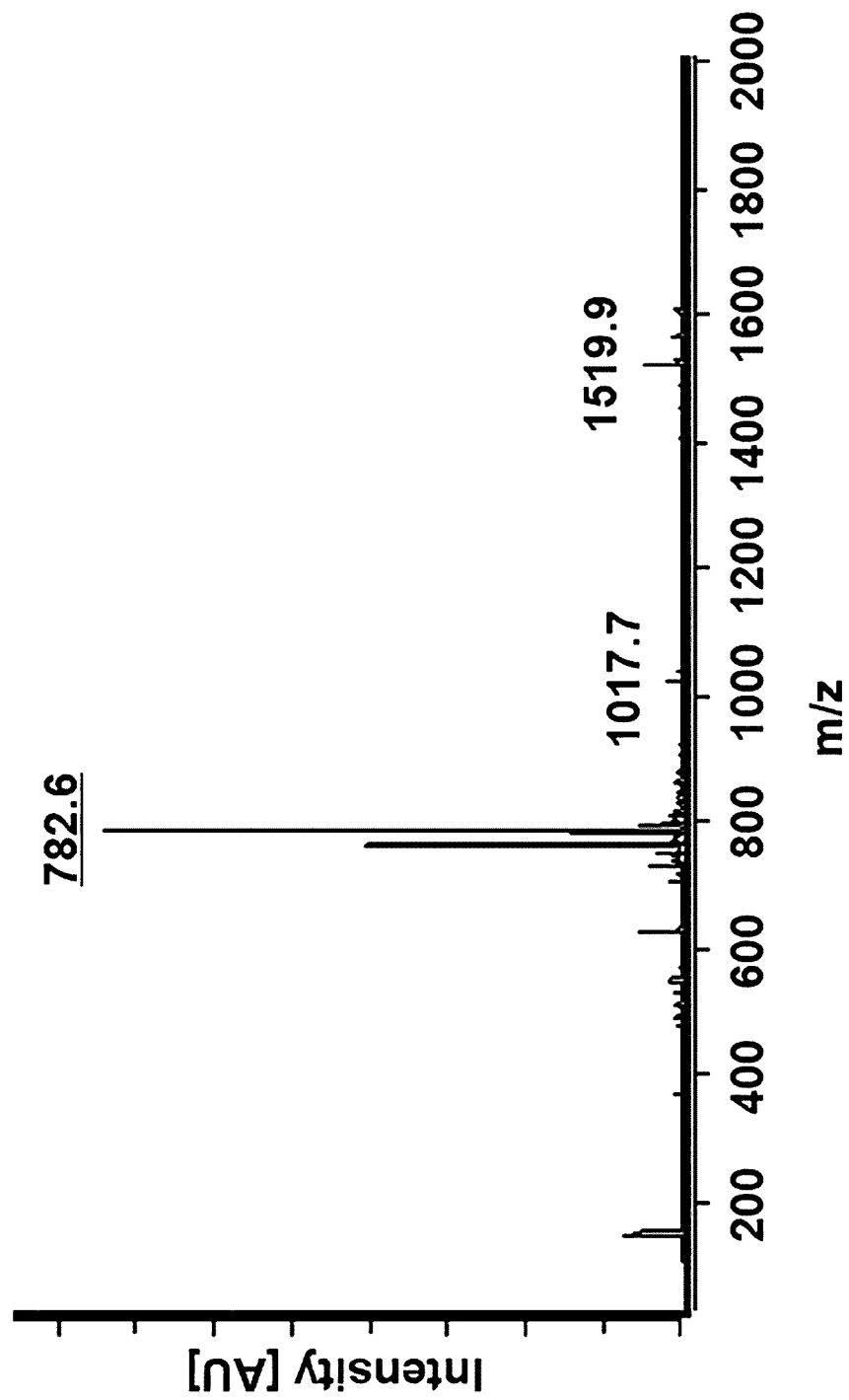
[도56]



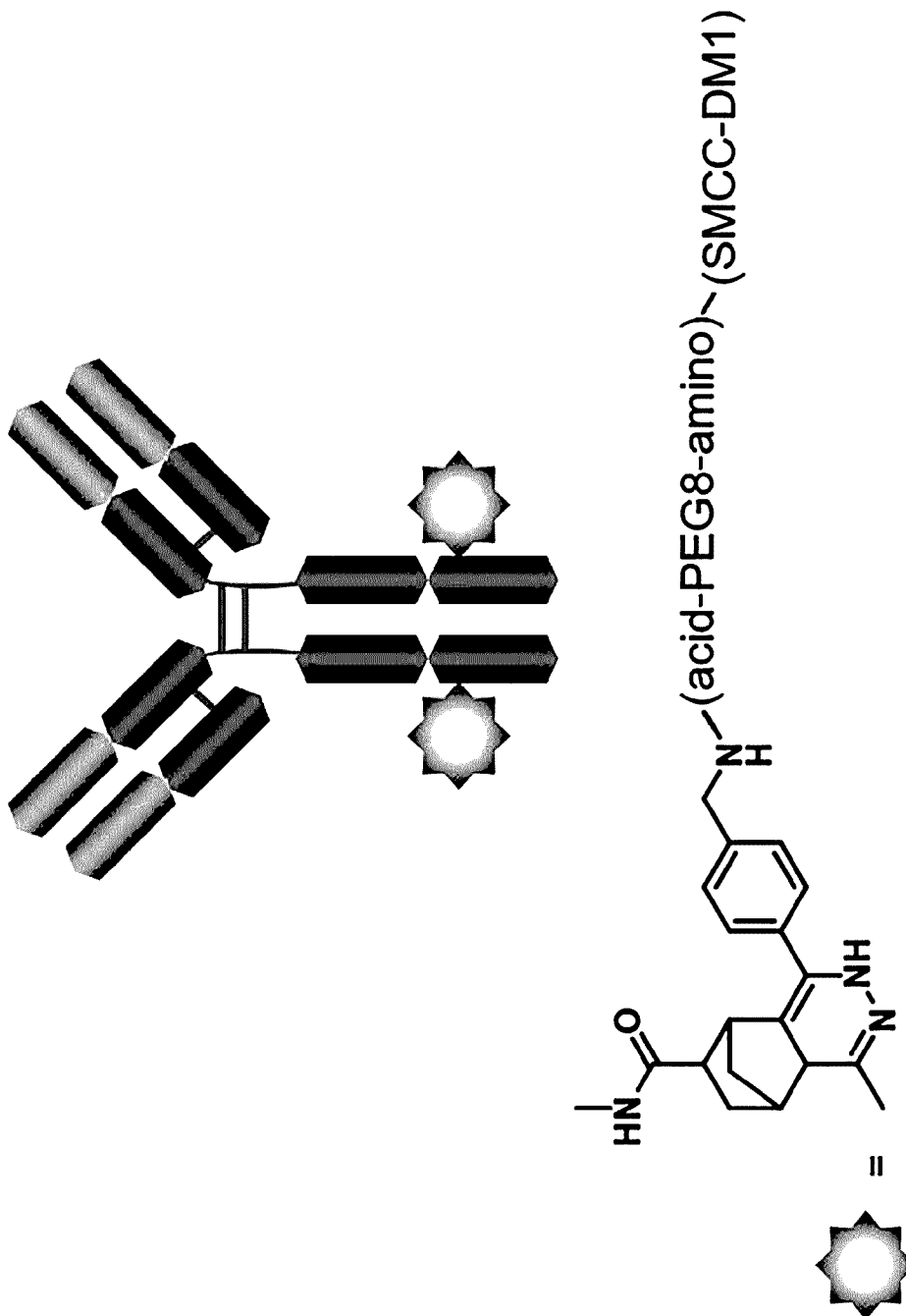
[도57]



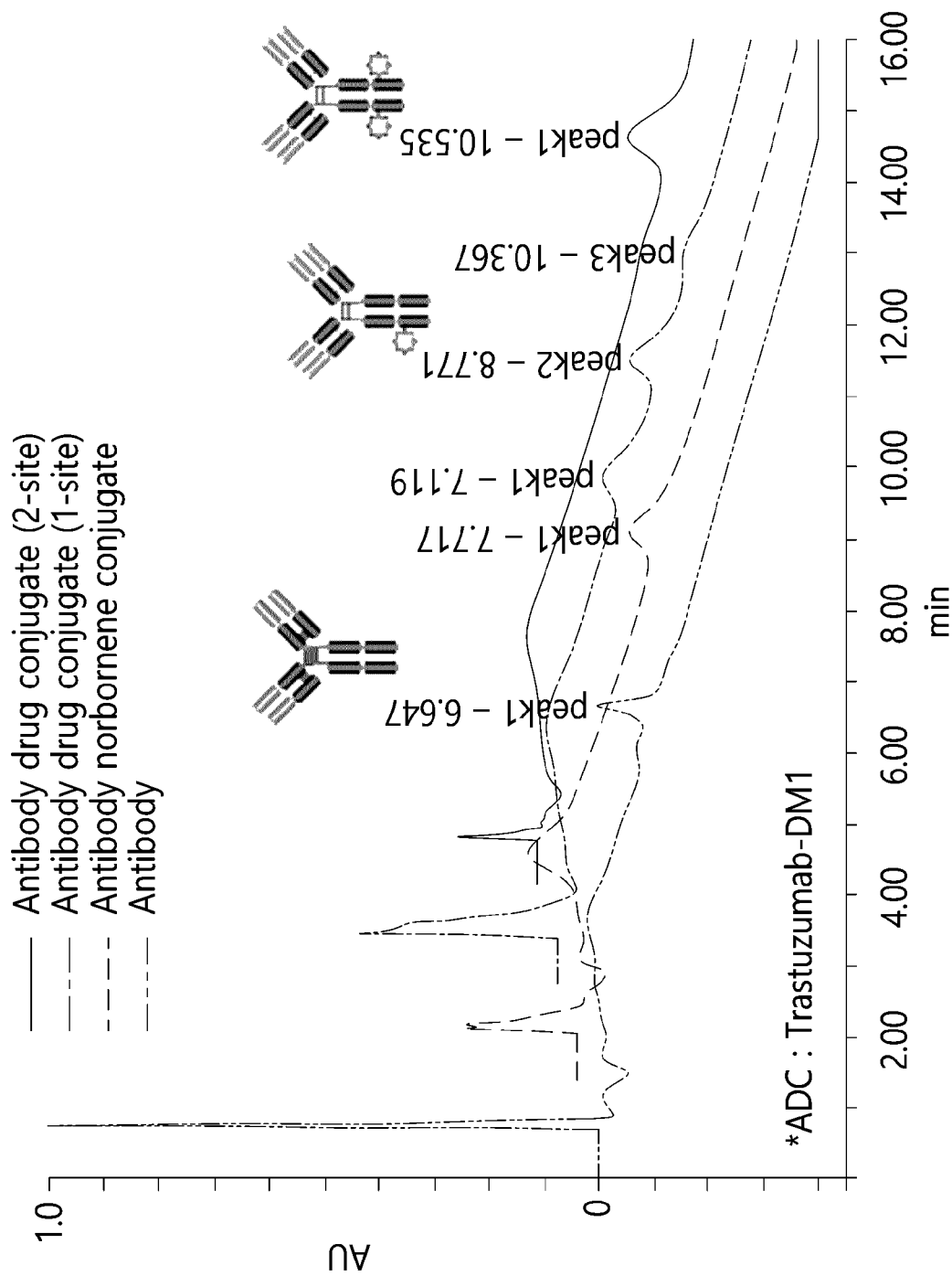
[도58]



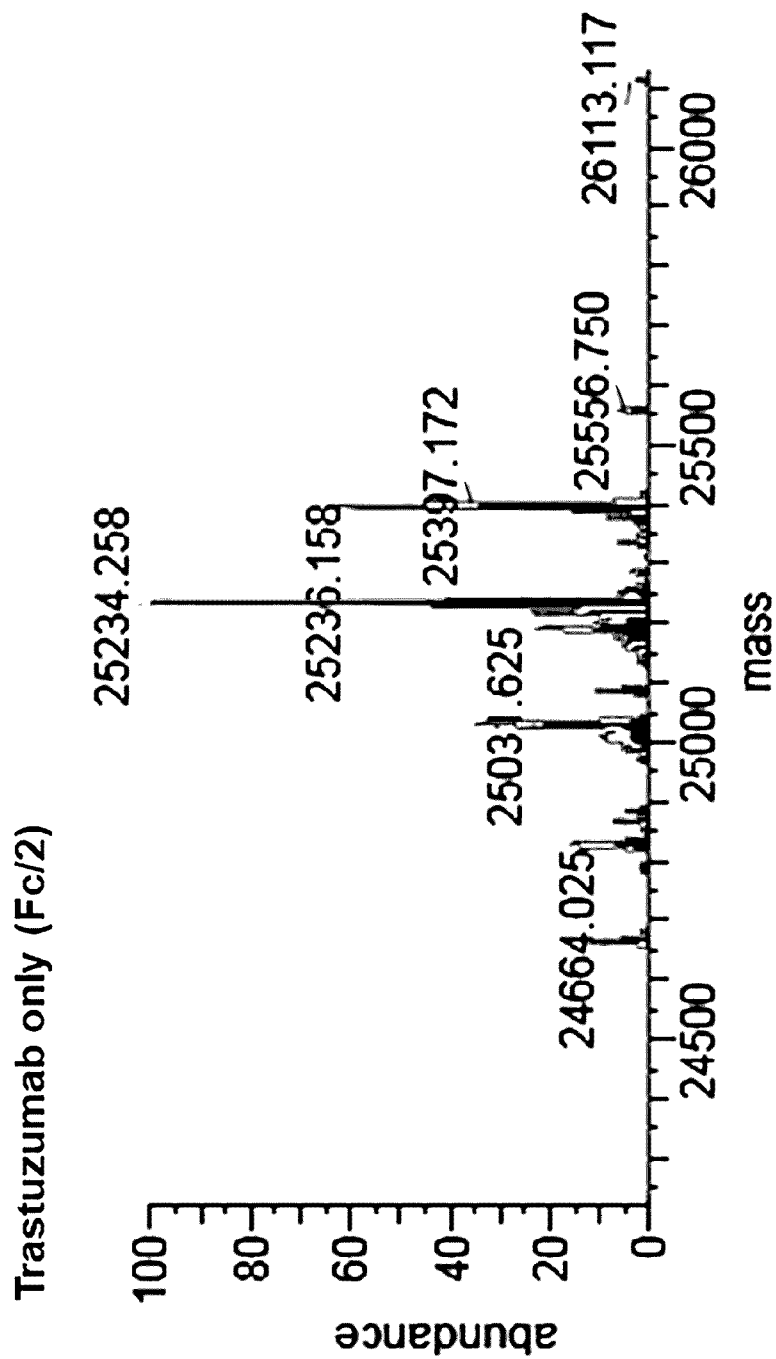
[도59]



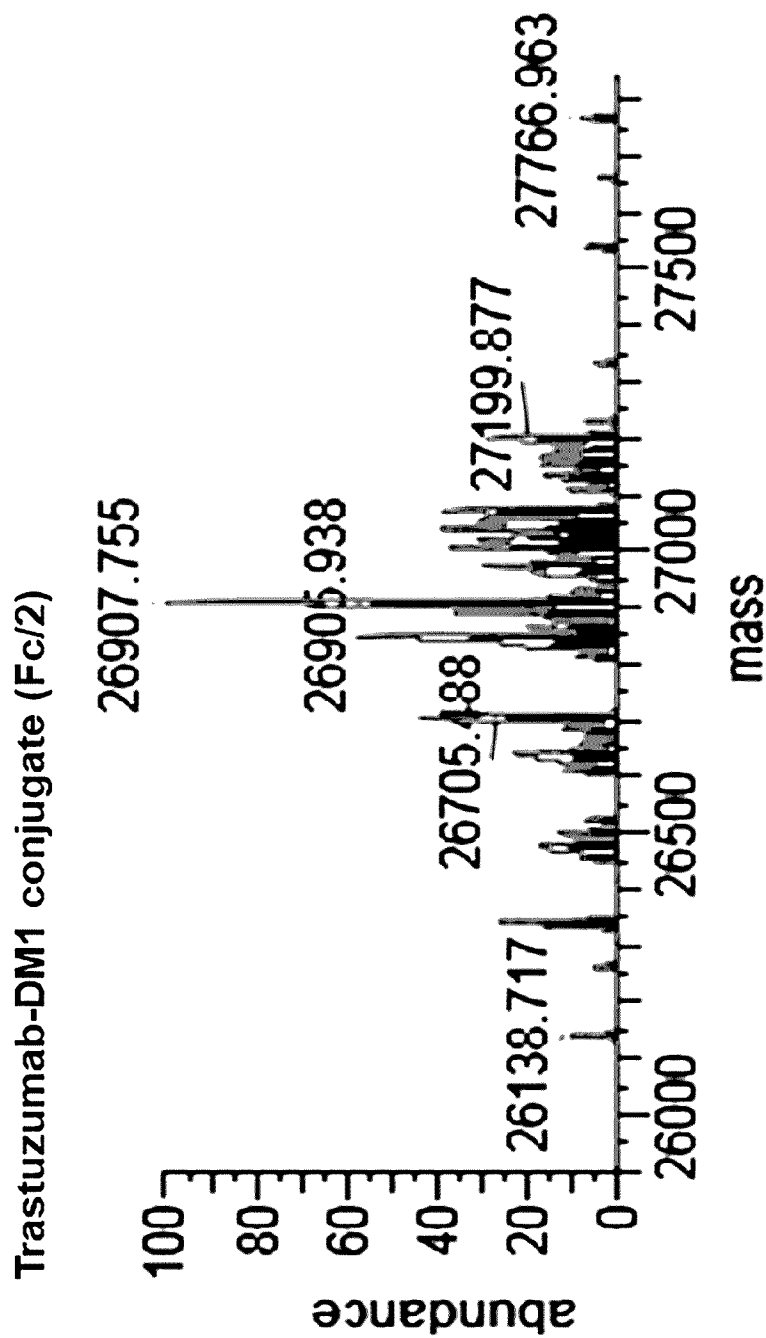
[도60]



[도61]



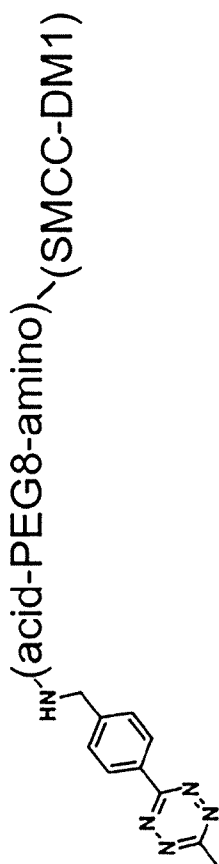
[도62]



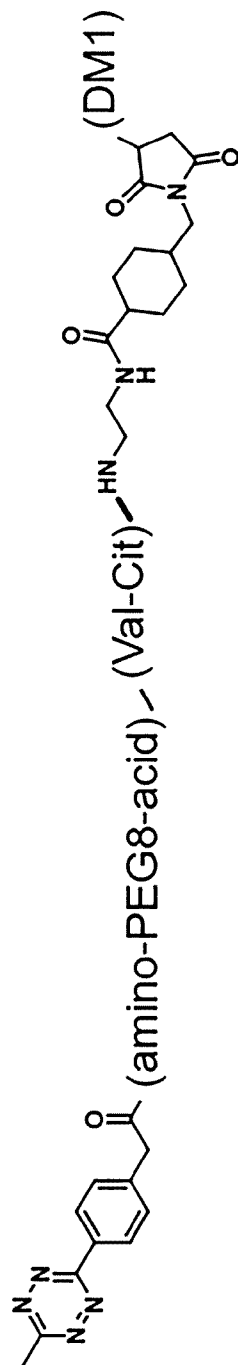
* Exact mass of DM1: 1688.80

[도63]

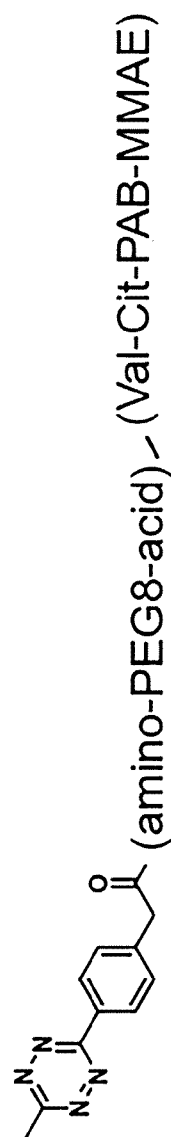
1. NC-DM1 : non-cleavable DM1 (tetrazine-PEG8-DM1)



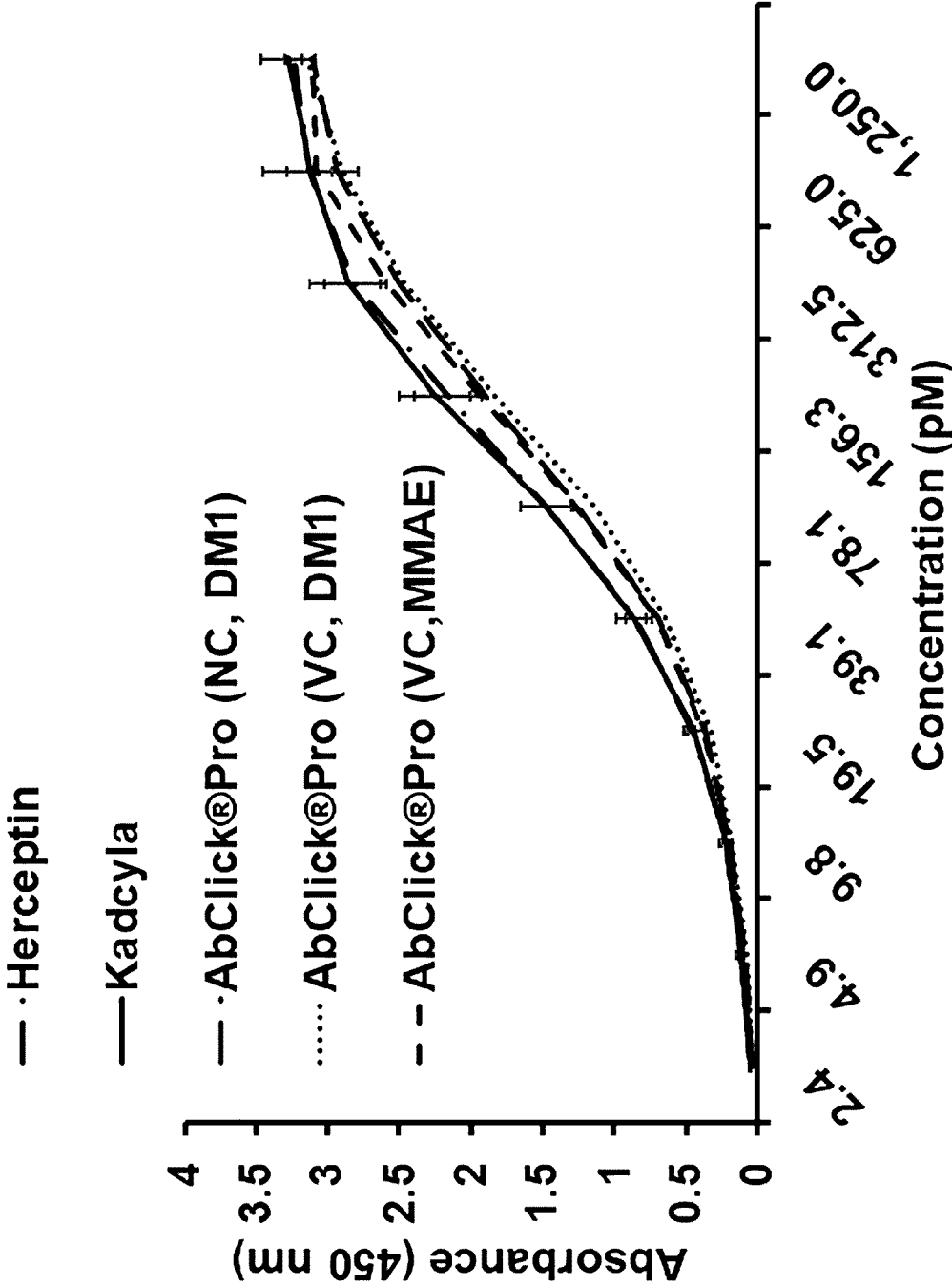
2. VC-DM1 : cleavable DM1 (tetrazine-PEG8-valine-citrulline-DM1)



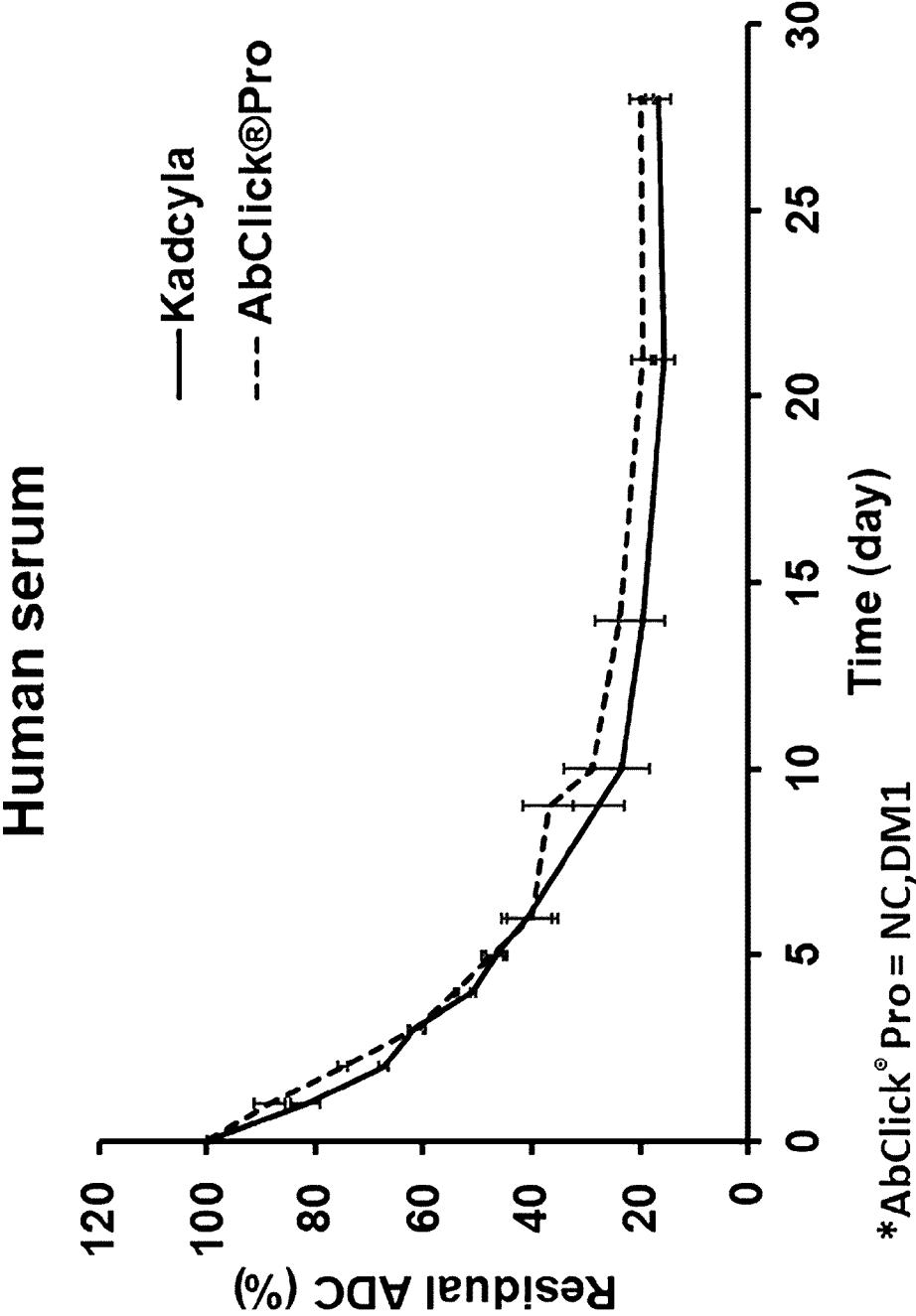
3. VC-MMAE : cleavable DM1 (tetrazine-PEG8-valine-citrulline-PAB-MMAE)



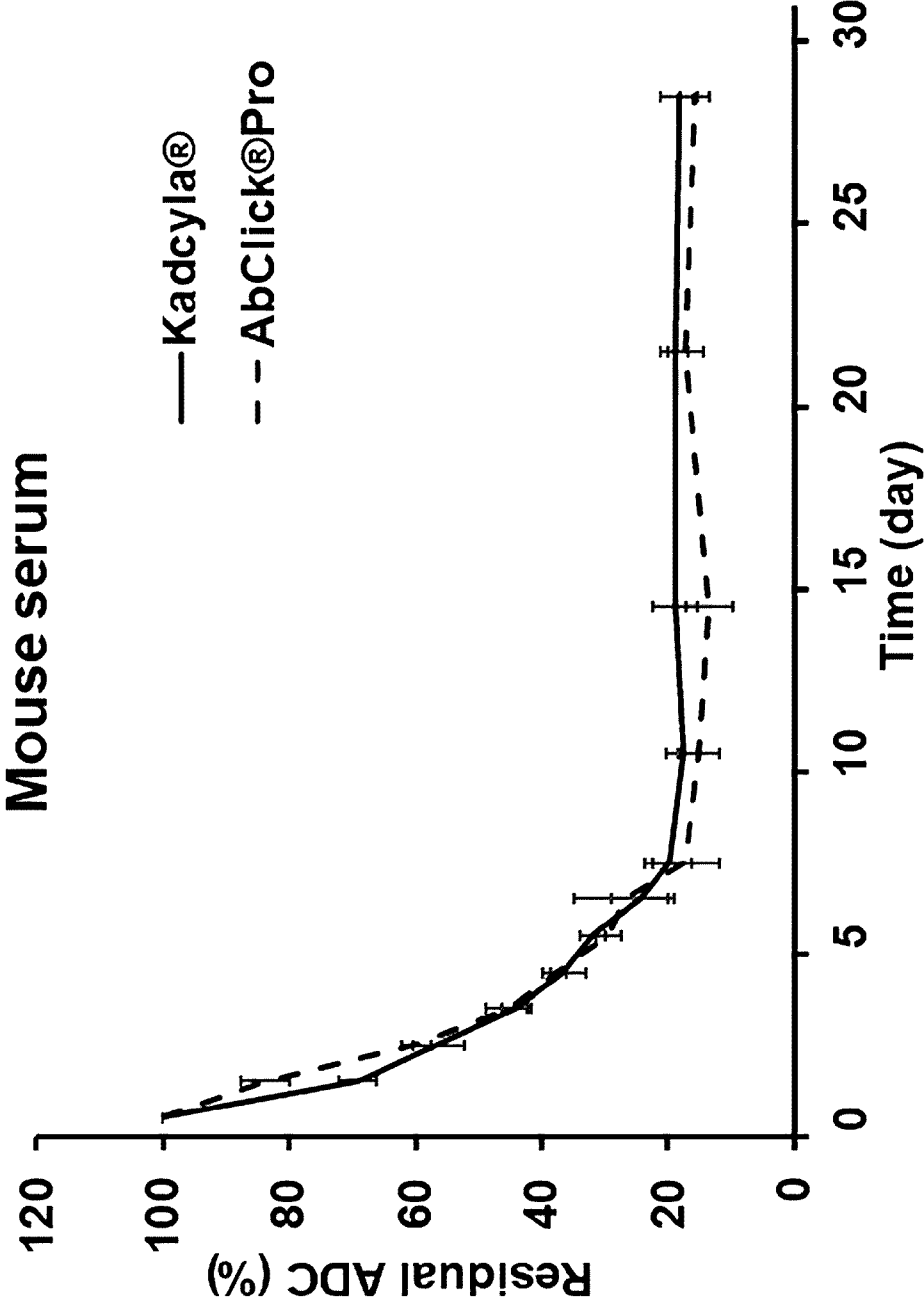
[도64]



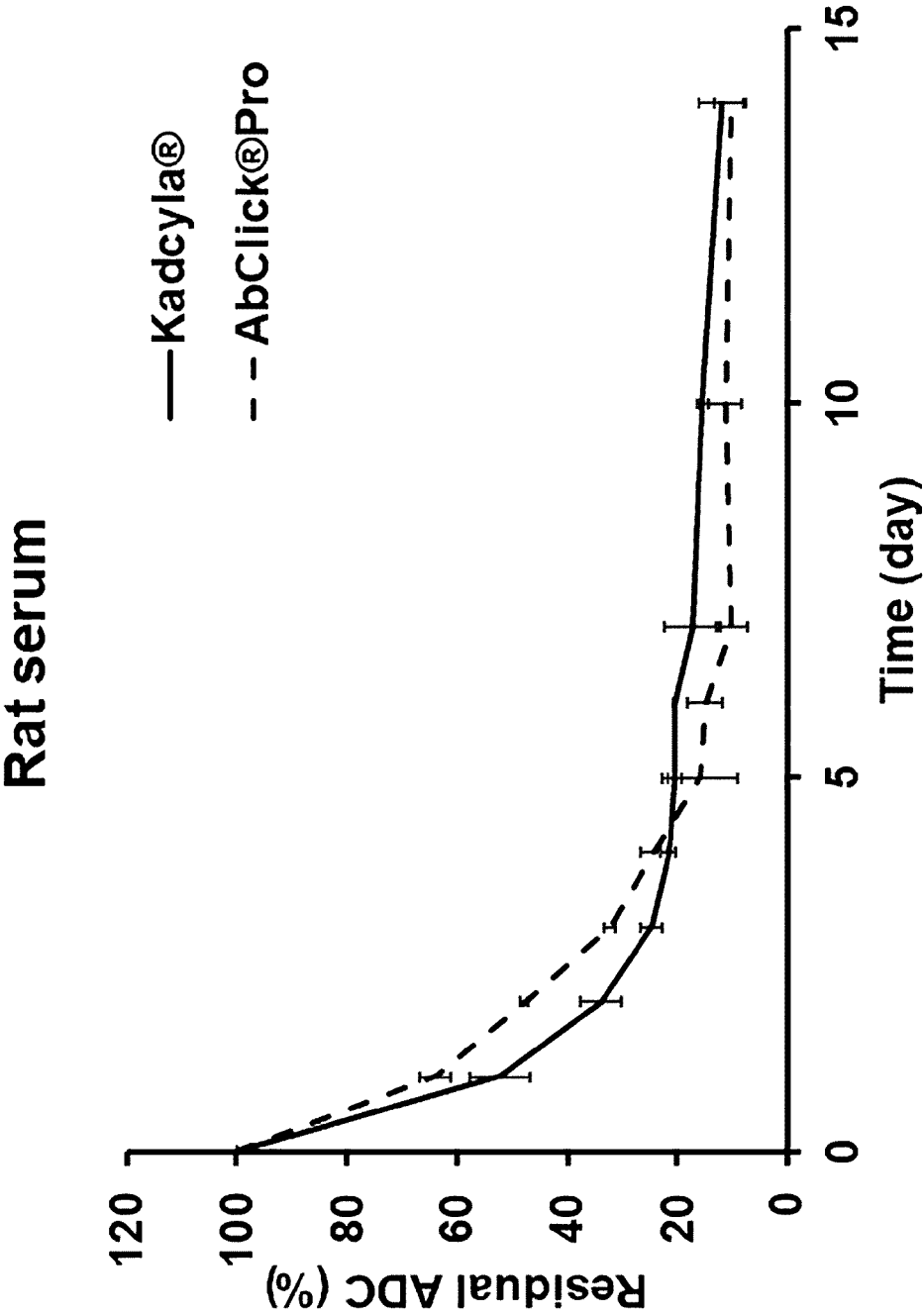
[도65]



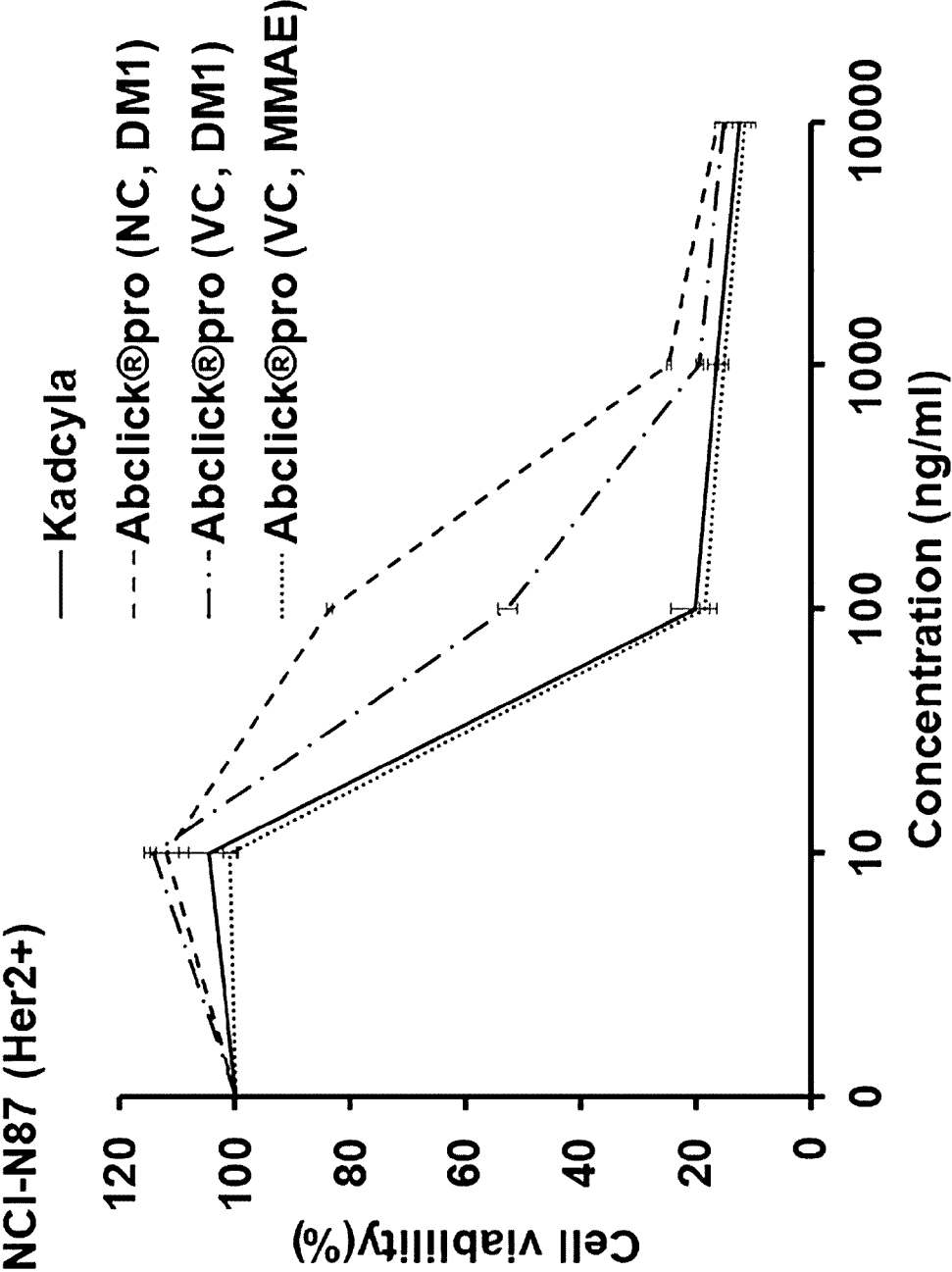
[도66]



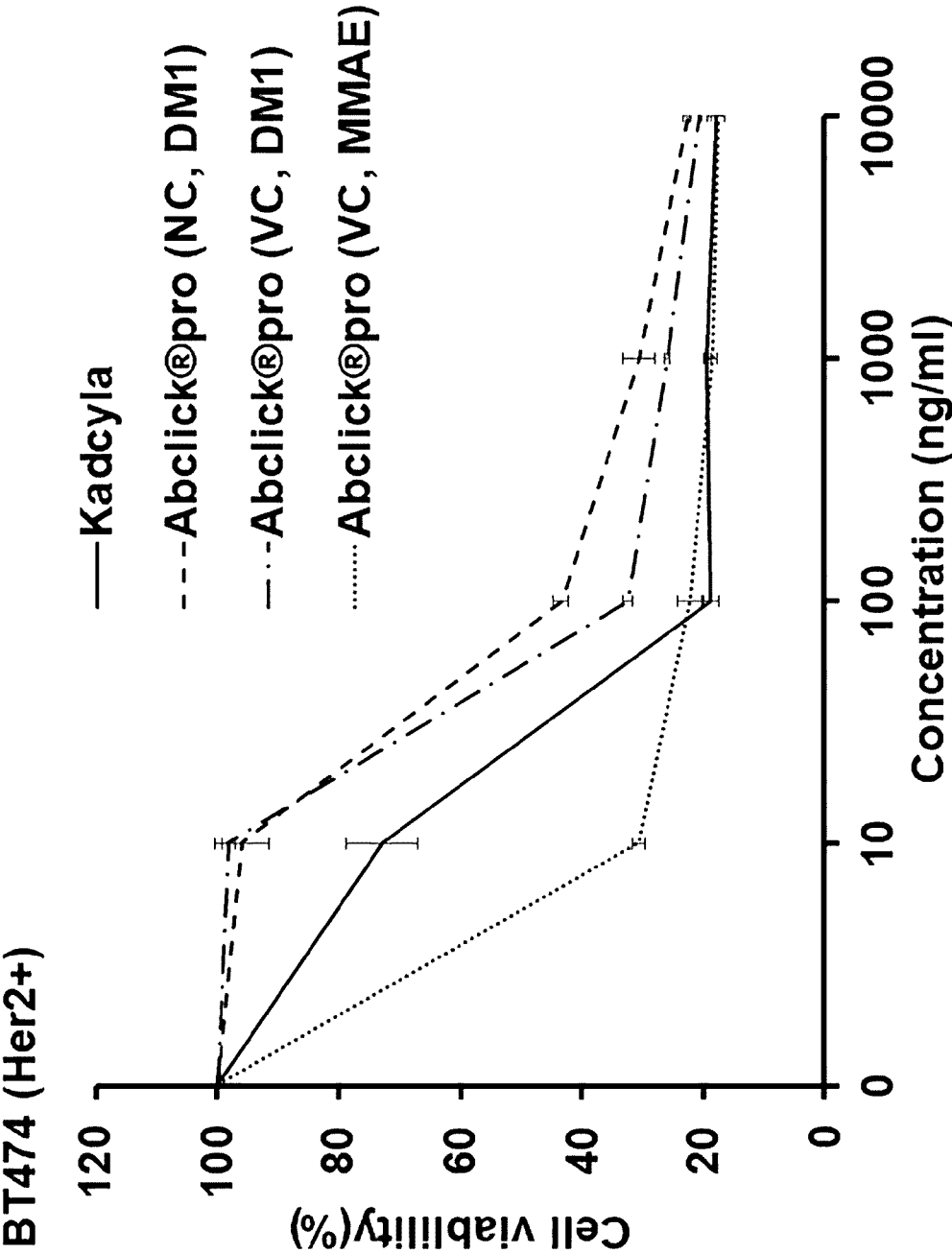
[도67]



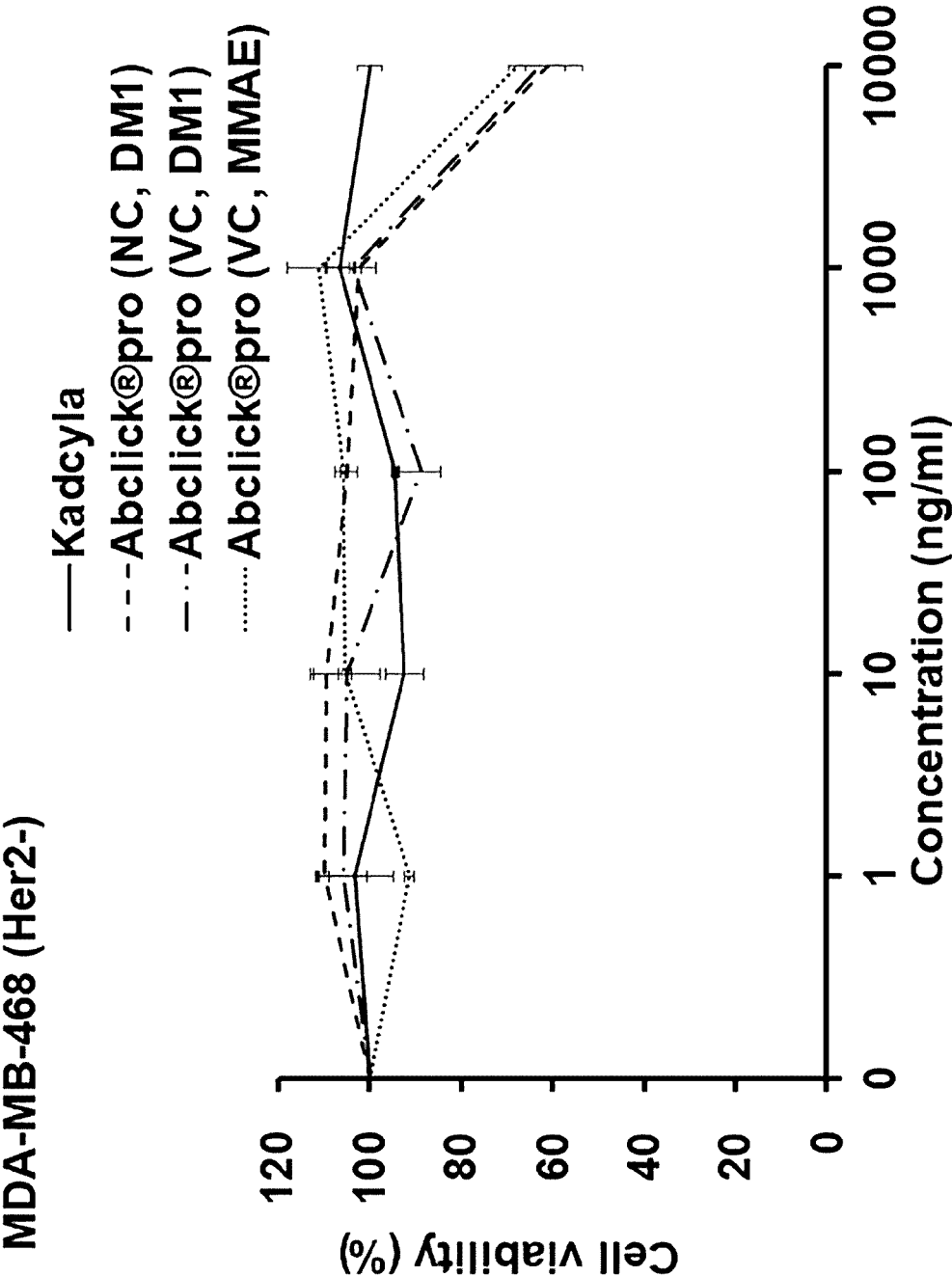
[도68]



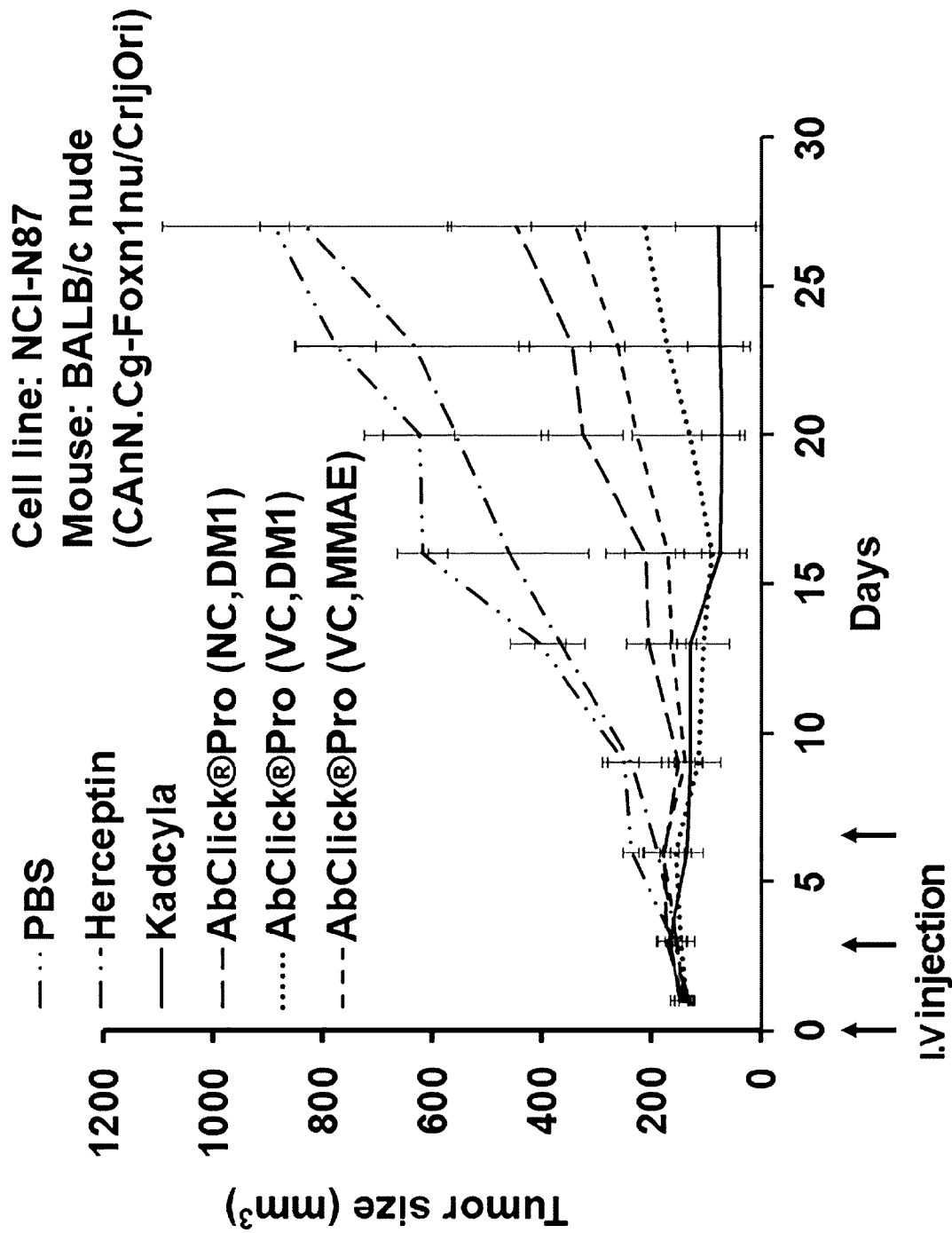
[도69]



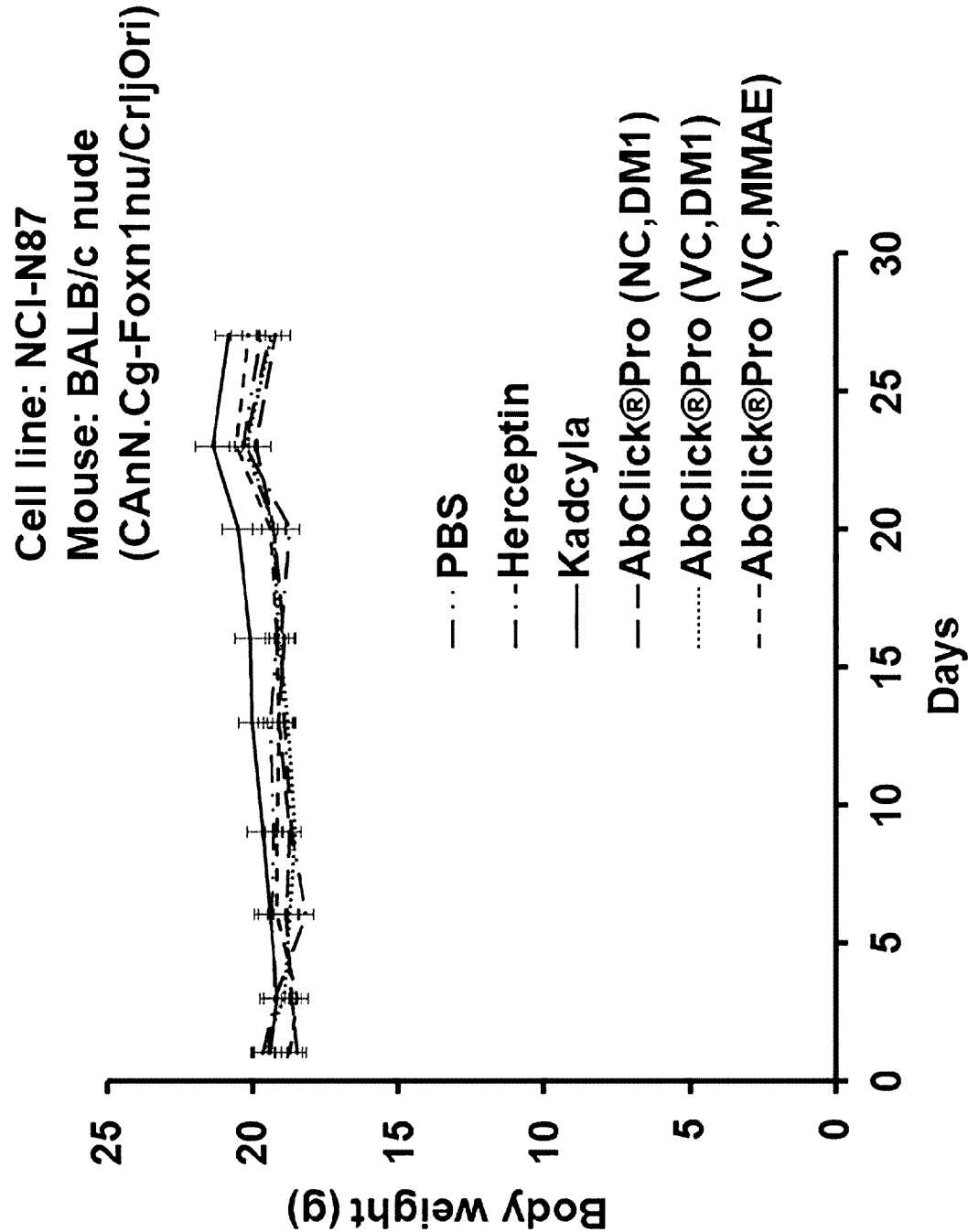
[도70]



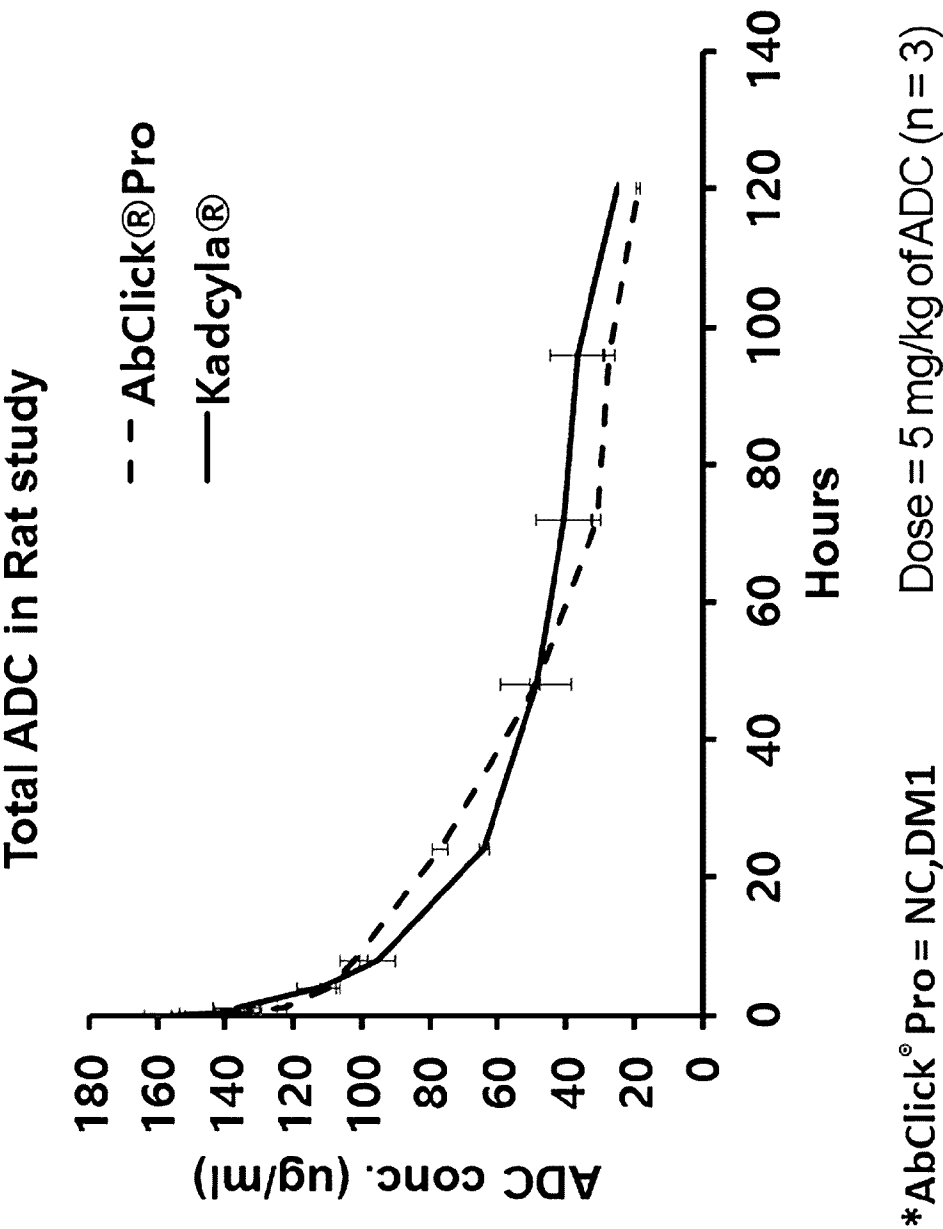
[도71]



[도72]



[도73]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 207/46(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, A61K 47/65(2017.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 207/46; A61K 47/62; A61L 26/00; C07H 23/00; C07K 16/00; C07K 19/00; C07K 2/00; C08F 283/06; C07K 7/08; A61K 47/68; A61K 47/65; A61P 35/00; C07K 16/28; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: antibody, drug, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107496978 A (YUNHUI, Liu) 22 December 2017 See claim 1.	1,2,4
A		3,5-50
DX	KR 10-2018-0002734 A (KAGOSHIMA UNIVERSITY) 08 January 2018 See claims 1, 7, 9; page 56; figure 11.	6-8
X	US 2012-0172575 A1 (BOONS, G. -J. et al.) 05 July 2012 See claim 17; figure 20.	34
DX	WO 2018-199337 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 01 November 2018 See abstract; SEQ ID NO: 38; paragraph [0093].	6-8
X	VAN GEEL, R. et al. Chemoenzymatic conjugation of toxic payloads to the globally conserved N-glycan of native mAbs provides homogeneous and highly efficacious antibody-drug conjugates. Bioconjugate Chemistry. 2015, vol. 26, pages 2233-2242.	34



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 JUNE 2020 (16.06.2020)

Date of mailing of the international search report

16 JUNE 2020 (16.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003282

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **51-53**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 51-53 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/003282

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 107496978 A	22/12/2017	None	
KR 10-2018-0002734 A	08/01/2018	CA 2985985 A1	24/11/2016
		CN 107614514 A	19/01/2018
		EP 3299383 A1	28/03/2018
		SG 11201709573 A	28/12/2017
		US 10227383 B2	12/03/2019
		US 2018-0141976 A1	24/05/2018
		WO 2016-186206 A1	24/11/2016
US 2012-0172575 A1	05/07/2012	CN 101925366 A	22/12/2010
		CN 101925366 B	04/02/2015
		CN 104529711 A	22/04/2015
		CN 104529711 B	07/02/2020
		DK 2222341 T3	09/03/2015
		DK 2907525 T3	06/08/2018
		EP 2222341 A1	01/09/2010
		EP 2222341 B1	25/02/2015
		EP 2907525 A2	19/08/2015
		EP 2907525 A3	02/12/2015
		EP 2907525 B1	16/05/2018
		JP 2011-504507 A	10/02/2011
		JP 2014-177458 A	25/09/2014
		JP 2016-145221 A	12/08/2016
		JP 2018-039841 A	15/03/2018
		JP 5498952 B2	21/05/2014
		JP 5956487 B2	27/07/2016
		JP 6659397 B2	04/03/2020
		US 2010-0297250 A1	25/11/2010
		US 2012-0040011 A9	16/02/2012
		US 2012-0322974 A9	20/12/2012
		US 2015-0126706 A1	07/05/2015
		US 2016-0159732 A1	09/06/2016
		US 2017-320815 A1	09/11/2017
		US 8133515 B2	13/03/2012
		US 8940859 B2	27/01/2015
		US 9227943 B2	05/01/2016
		US 9725405 B2	08/08/2017
		US 9932297 B2	03/04/2018
		WO 2009-067663 A1	28/05/2009
WO 2018-199337 A1	01/11/2018	AU 2018-259856 A1	14/11/2019
		AU 2018-259856 A2	28/11/2019
		CN 110637036 A	31/12/2019
		EP 3617235 A1	04/03/2020
		KR 10-2020-0002858 A	08/01/2020
		WO 2018-199337 A1	12/03/2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07D 207/46(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, A61K 47/65(2017.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07D 207/46; A61K 47/62; A61L 26/00; C07H 23/00; C07K 16/00; C07K 19/00; C07K 2/00; C08F 283/06; C07K 7/08; A61K 47/68; A61K 47/65; A61P 35/00; C07K 16/28; A61K 39/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 항체 (antibody), 약물 (drug). 암 (cancer)																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 107496978 A (LIU YUNHUI) 2017.12.22 청구항 1</td> <td>1, 2, 4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>3, 5-50</td> </tr> <tr> <td>DX</td> <td>KR 10-2018-0002734 A (가코시마 유니버시티) 2018.01.08 청구항 1, 7, 9; 페이지 56; 도면 11.</td> <td>6-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2012-0172575 A1 (BOONS, G. -J. 등) 2012.07.05 청구항 17; 도면 20</td> <td>34</td> </tr> <tr> <td>DX</td> <td>WO 2018-199337 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2018.11.01 요약; SEQ ID NO: 38; 단락 [0093]</td> <td>6-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>VAN GEEL, R. 등, "Chemoenzymatic conjugation of toxic payloads to the globally conserved N-glycan of native mAbs provides homogeneous and highly efficacious antibody-drug conjugates", Bioconjugate Chemistry, 2015, 26권, 페이지 2233-2242</td> <td>34</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	CN 107496978 A (LIU YUNHUI) 2017.12.22 청구항 1	1, 2, 4	A		3, 5-50	DX	KR 10-2018-0002734 A (가코시마 유니버시티) 2018.01.08 청구항 1, 7, 9; 페이지 56; 도면 11.	6-8	X	US 2012-0172575 A1 (BOONS, G. -J. 등) 2012.07.05 청구항 17; 도면 20	34	DX	WO 2018-199337 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2018.11.01 요약; SEQ ID NO: 38; 단락 [0093]	6-8	X	VAN GEEL, R. 등, "Chemoenzymatic conjugation of toxic payloads to the globally conserved N-glycan of native mAbs provides homogeneous and highly efficacious antibody-drug conjugates", Bioconjugate Chemistry, 2015, 26권, 페이지 2233-2242	34
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
X	CN 107496978 A (LIU YUNHUI) 2017.12.22 청구항 1	1, 2, 4																					
A		3, 5-50																					
DX	KR 10-2018-0002734 A (가코시마 유니버시티) 2018.01.08 청구항 1, 7, 9; 페이지 56; 도면 11.	6-8																					
X	US 2012-0172575 A1 (BOONS, G. -J. 등) 2012.07.05 청구항 17; 도면 20	34																					
DX	WO 2018-199337 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2018.11.01 요약; SEQ ID NO: 38; 단락 [0093]	6-8																					
X	VAN GEEL, R. 등, "Chemoenzymatic conjugation of toxic payloads to the globally conserved N-glycan of native mAbs provides homogeneous and highly efficacious antibody-drug conjugates", Bioconjugate Chemistry, 2015, 26권, 페이지 2233-2242	34																					
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																							
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2020년 06월 16일 (16.06.2020)		국제조사보고서 발송일 2020년 06월 16일 (16.06.2020)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																					

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 51-53
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 51-53은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것입니다 (PCT 제 17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 107496978 A	2017/12/22	없음	
KR 10-2018-0002734 A	2018/01/08	CA 2985985 A1 CN 107614514 A EP 3299383 A1 SG 11201709573 A US 10227383 B2 US 2018-0141976 A1 WO 2016-186206 A1	2016/11/24 2018/01/19 2018/03/28 2017/12/28 2019/03/12 2018/05/24 2016/11/24
US 2012-0172575 A1	2012/07/05	CN 101925366 A CN 101925366 B CN 104529711 A CN 104529711 B DK 2222341 T3 DK 2907525 T3 EP 2222341 A1 EP 2222341 B1 EP 2907525 A2 EP 2907525 A3 EP 2907525 B1 JP 2011-504507 A JP 2014-177458 A JP 2016-145221 A JP 2018-039841 A JP 5498952 B2 JP 5956487 B2 JP 6659397 B2 US 2010-0297250 A1 US 2012-0040011 A9 US 2012-0322974 A9 US 2015-0126706 A1 US 2016-0159732 A1 US 2017-320815 A1 US 8133515 B2 US 8940859 B2 US 9227943 B2 US 9725405 B2 US 9932297 B2 WO 2009-067663 A1	2010/12/22 2015/02/04 2015/04/22 2020/02/07 2015/03/09 2018/08/06 2010/09/01 2015/02/25 2015/08/19 2015/12/02 2018/05/16 2011/02/10 2014/09/25 2016/08/12 2018/03/15 2014/05/21 2016/07/27 2020/03/04 2010/11/25 2012/02/16 2012/12/20 2015/05/07 2016/06/09 2017/11/09 2012/03/13 2015/01/27 2016/01/05 2017/08/08 2018/04/03 2009/05/28
WO 2018-199337 A1	2018/11/01	AU 2018-259856 A1 AU 2018-259856 A2 CN 110637036 A EP 3617235 A1 KR 10-2020-0002858 A WO 2018-199337 A1	2019/11/14 2019/11/28 2019/12/31 2020/03/04 2020/01/08 2020/03/12