



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월23일
(11) 등록번호 10-2697329
(24) 등록일자 2024년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) A61K 47/65 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12P 1/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2023.08)
A61K 47/65 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2020-7011370
(22) 출원일자(국제) 2018년09월19일
심사청구일자 2021년05월04일
(85) 번역문제출일자 2020년04월20일
(65) 공개번호 10-2020-0057046
(43) 공개일자 2020년05월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/075350
(87) 국제공개번호 WO 2019/057772
국제공개일자 2019년03월28일
(30) 우선권주장
17191825.3 2017년09월19일
유럽특허청(EPO)(EP)
1800878.9 2018년01월19일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
JP2016528183 A
WO2016207090 A2
JP2014500866 A

(73) 특허권자
폴 슈레 앙스띠뛰
스위스 5232 빌리겐 피에스아이 포어슈슈트라세 111
(72) 발명자
슈피허, 필립
스위스 취리히 8033 로타흐슈트라세 33
쉬블리, 로저
스위스 바덴 5400 샤프텐라인슈트라세 42
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 21 항

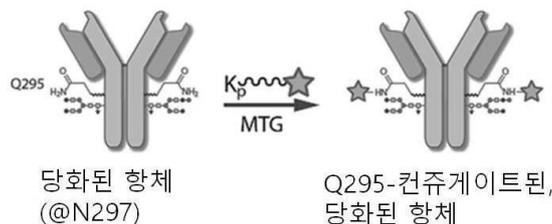
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 트랜스글루타미나제 컨주게이션 방법 및 링커

(57) 요약

본 발명은 미생물 트랜스글루타미나제(MTG)의 수단에 의해 항체-페이로드 컨주게이트를 생성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 1차 아민 잔기를 갖는 링커를 컨주게이팅하는 단계를 포함하고, 상기 링커는 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 Gln 잔기에 대한 펩타이드 구조(N->C 방향으로 도시됨) (Aax)_m-(Aax)(NH₂)-(Aax)_n-B-(Aax)_o, 또는 (Aax)_m-B-(Aax)_n-(Aax)(NH₂)-(Aax)_o를 갖는다. Aax(NH₂)는 1차 아민 그룹을 갖는 측쇄를 포함하는 아미노산, 아미노산 유도체 또는 아미노산 모방체이다(도 1).

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/6855 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C12P 1/00 (2013.01)

(72) 발명자

베헤, 마르틴

스위스 겔터킨든 4460 라우라허베크 3

베르뮐러, 죄리

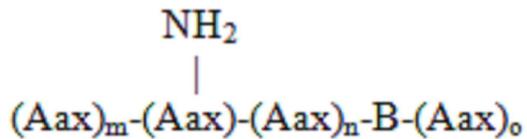
스위스 취리히 8050 디아로그베크 6

명세서

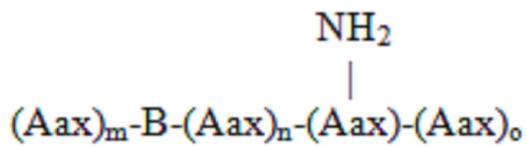
청구범위

청구항 1

미생물 트랜스글루타미나제(MTG)을 사용하여 항체-페이로드 컨쥬게이트를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은 1차 아민 잔기를 갖는 링커를 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 Gln 잔기에 컨쥬게이트하는 단계를 포함하고, 상기 링커는 펩타이드 구조(N->C 방향으로 도시됨)



또는



를 가지며, 여기서

- m은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,
- n은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이며,
- o는 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,
- $m + n + o \geq 0$ 이며,
- Aax는 L- 또는 D-아미노산이고, 및
- B는 페이로드 또는 연결 모이어티이며,



상기 Aax는 1차 아민 그룹을 갖는 라이신 또는 라이신 유도체이고,

상기 라이신 또는 라이신 유도체는 L-라이신, D-라이신, 오르니틴 L 및 D 구조, L-β-호모라이신, 호모라이신, 또는 α, γ-디아미노뷰틸릭 애씨드 L 및 D 구조이며,

링커의 순 전하는 중성 또는 양성이며,

상기 항체는 당화된 IgG 항체이고,

상기 페이로드는 독소이며, 여기서 독소는

- 피롤로벤조디아제핀 (PBD)
- 아우리스타틴
- 메이탄시노이드
- 듀오카르마이신
- 튜블리신
- PNU
- 독소루비신
- 칼리키아마이신

- 아파니틴, 및
 - 캄토테신
- 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나이며,
- 상기 연결 모이어티는
- $-N-N\equiv N$, 또는 $-N_3$
 - Lys(N_3)
 - 테트라진
 - 알킨
 - 디벤조사이클로옥텐 (DBCO)
 - 바이사이클로노닌 (BCN)
 - 노보렌
 - 트랜스사이클로옥텐
 - $-RCOH$ (알데하이드)
 - 아실트리플루오로붕산
 - $-SH$, 및
 - 시스테인

으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나인 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 링커는

- a) 카텝신 B에 의해 절단되지 않는 것;
- b) 발린-알라닌 모티프 또는 발린-시트룰린 모티프를 포함하지 않는 것; 또는
- c) 폴리에틸렌글리콜을 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, $m + n + o \leq 25$ 인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 페이로드 또는 연결 모이어티 B를 포함하는 링커는

- a) 분자적 조작에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기에 컨쥬게이트되는 것;
- b) 항체의 Fc 도메인의 Gln 잔기에 컨쥬게이트되는 것; 또는
- c) 항체의 C_H2 도메인의 Gln 잔기 Q295(EU 번호)에 컨쥬게이트되는 것인 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

a) 링커는 음전하 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것;

b) 링커는 양전하 아미노산 잔기를 포함하는 것; 또는

c) 링커는

- 라이신, 또는 라이신 유도체, 여기서 라이신 또는 라이신 유도체는 L-라이신, D-라이신, 오르니틴 L 및 D 구조, L-β-호모라이신, 호모라이신, 또는 α, γ-디아미노뷰틸릭 애씨드 L 및 D 구조임,

- 알지닌, 및

- 히스티딘

으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체는 항체의 C_H2 도메인의 Asn 잔기 N297(EU 번호)을 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 N297 잔기는 당화된 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, B가 연결 모이어티인 경우, 실제 페이로드를 연결 모이어티에 연결하는 추가 단계를 수행하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 미생물 트랜스글루타미나제는 스트렙토마이세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*)로부터 유래되는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 링커는 둘 이상의 연결 모이어티 B를 갖는 방법.

청구항 17

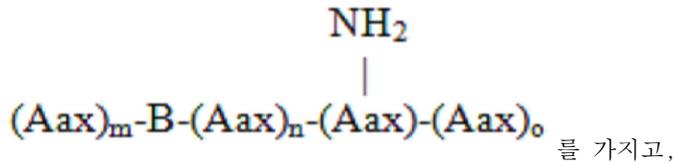
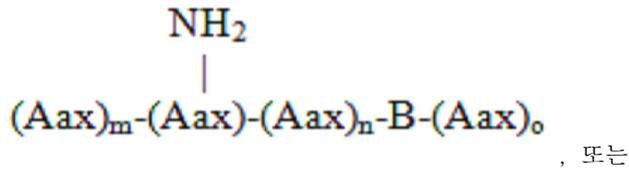
제16항에 있어서, 상기 둘 이상의 연결 모이어티 B는 서로 다른 것인 방법.

청구항 18

제1항, 제3항 내지 제5항, 제7항 내지 제11항, 제16항 및 제17항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 생성된 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 19

항체; 페이로드; 및 항체와 페이로드를 연결하는 링커;를 포함하는 항체-페이로드 컨쥬게이트로서,
링커는 펩타이드 구조(N→C 방향으로 도시됨)



여기서

- m은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,
- n은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이며,
- o는 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,
- $m + n + o \geq 0$ 이며,
- Aax는 L- 또는 D-아미노산이고, 및
- B는 페이로드 또는 연결 모이어티이며,

$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ | \\ \text{Aax} \end{array}$ 는 1차 아민 그룹을 갖는 라이신 또는 라이신 유도체이고,

상기 라이신 또는 라이신 유도체는 L-라이신, D-라이신, 오르니틴 L 및 D 구조, L-β-호모라이신, 호모라이신, 또는 α, γ-디아미노뷰틸릭 애씨드 L 및 D 구조이며,

링커의 순 전하는 중성 또는 양성이며,

상기 항체는 당화된 IgG 항체이고,

상기 페이로드는 독소이며, 여기서 독소는

- 피롤로벤조디아제핀 (PBD)
- 아우리스타틴
- 메이탄시노이드
- 듀오카르마이신
- 튜블리신
- PNU
- 독소루비신
- 칼리키아마이신
- 아마니틴, 및
- 캄토테신

으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나이며,

상기 연결 모이어티는

- $-N-N\equiv N$, 또는 $-N_3$
- $Lys(N_3)$
- 테트라진
- 알킨
- 디벤조사이클로옥텐 (DBCO)
- 바이사이클로노닌 (BCN)
- 노보렌
- 트랜스사이클로옥텐
- $-RCOH$ (알데하이드)
- 아실트리플루오로붕산
- $-SH$, 및
- 시스테인

으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나이고,

상기 링커는 상기 아미노산의 측쇄에 포함된 1차 아민을 통해 항체의 Fc 도메인의 Gln 잔기에 컨쥬게이트된 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 20

삭제

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 링커는

- a) 분자적 조작에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 Gln 잔기에 컨쥬게이트되는 것; 또는
- b) 항체의 C_{H2} 도메인의 Gln 잔기 Q295(EU 번호)에 컨쥬게이트되는 것인 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 22

삭제

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 항체는 항체의 C_{H2} 도메인의 Asn 잔기 N297(EU 번호)을 포함하는 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 N297 잔기는 당화된 것인 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 링커는

- a) 카텝신 B에 의해 절단되지 않는 것;
- b) 발린-알라닌 모티프 또는 발린-시트룰린 모티프를 포함하지 않는 것; 또는
- c) 폴리에틸렌글리콜을 포함하지 않는 것인 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 26

제19항에 있어서, $m + n + o \leq 25$ 인 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 27

제19항에 있어서,

- a) 링커는 음전하 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것;
- b) 링커는 양전하 아미노산 잔기를 포함하는 것; 또는
- c) 링커는

- 라이신, 또는 라이신 유도체, 여기서 라이신 또는 라이신 유도체는 L-라이신, D-라이신, 오르니틴 L 및 D 구조, L- β -호모라이신, 호모라이신, 또는 α , γ -디아미노뷰틸릭 애씨드 L 및 D 구조임,

- 알지닌, 및

- 히스티딘

으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기를 포함하는 것인 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

제19항에 있어서, 상기 링커는 둘 이상의 연결 모이어티 B를 갖는 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 둘 이상의 연결 모이어티 B는 서로 다른 것인 항체-페이로드 컨쥬게이트.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물 트랜스글루타미나제의 수단에 의해 항체-페이로드 컨쥬게이트(antibody-payload conjugate)를 생성하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 매우 강력한 페이로드를 항체에 부착하는 것으로 인해 암 또는 염증성 질환의 표적 치료에 대한 관심(interest)이 증가하였다. 이러한 생산물의 구성물은 항체-페이로드 컨쥬게이트(antibody-payload conjugates), 또는 항체-약물 컨쥬게이트(antibody-drug conjugates, ADC)라고 부른다.

[0003] 현재, 4개의 ADC가 FDA-승인 받았으며(애드세트리스(Adcetris), 캐싸일라(Kadcyla), 베스폰사(Besponsa) 및 마이로타그(Mylotarg)), 이들 모두 이들의 페이로드가 부위-비 특이적(non-site specific) 방식으로 항체에 화학적으로 부착되어 있다. 따라서, 결과 생산물은 항체와 페이로드의 화학량론적 관계(페이로드 항체 비율, 또는 약물 대 항체 비율, DAR)와 관련하여 매우 이질적일 뿐만 아니라, 항체 상의 컨쥬게이션 부위와 관련하여 매우 이질적이다. 각각의 생산된 종은, 비록 동일한 약품(drug product)이지만, 넓은 범위의 상이한 생체 내 약동학적 특성 및 활성을 잠재적으로 유발할 수 있는 별개의 특성을 가질 수 있다.

- [0004] 이전의 생체 내 연구(Lhospice et al., 2015)에서, 부위-특이적 약물 부착은 FDA-승인된 ADC에 비해 현저하게 더 높은 종양 흡수(~2배(2X))와 비-표적 조직에서 감소된 흡수를 유발했고, 또한 최대 허용 용량은 적어도 3배(3X) 더 높았다. 이러한 데이터는 화학량론적으로 잘 정의된 ADCs가 화학적으로 변형된 ADCs에 비해 개선된 약동학적 및 더 나은 치료 지수를 보여줌을 시사한다.
- [0005] 부위-특이적 기술로서, 효소적 컨쥬게이션(enzymatic conjugation)은 이러한 컨쥬게이션 반응이 전형적으로 빠르고 생리학적 조건 하에서 수행될 수 있기 때문에 큰 관심을 보였다. 사용가능한 효소 중에서, 스트렙토마이세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*) 종 유래의 미생물 트랜스글루타미나제(microbial transglutaminase, MTG)는 항체를 포함한 기능성 모이어티(moiety)의 통상적인 화학적 단백질 컨쥬게이션에 대한 매력적인 대안으로 관심이 증가하고 있는 것으로 밝혀졌다. MTG는 생리학적 조건 하에서 단백질 또는 펩타이드의 '반응성(reactive)' 글루타민과 단백질 또는 펩타이드의 '반응성' 라이신 잔기 사이의 아미드교환(transamidation) 반응을 촉매하고, 여기서, 후자는 또한 단순하고, 5-아미노펜틸 그룹과 같은 저분자량 1차 아민일 수 있다(Jeger et al., 2010, Strop et al., 2014).
- [0006] 형성된 결합은 아미드 결합인 이소펩타이드(isopeptide) 결합이고, 상기 결합은 각각의 폴리펩타이드 또는 단백질의 펩타이드-결합 백본의 일부를 형성하지 않는다. 이 결합은 아실 글루타민-함유 아미노산 공여 서열의 글루타미드 잔기의 감마-카복사마이드와 본 발명에 따른 기질 포함 아미노 공여체의 1차(1°) 아민 사이에 형성된다.
- [0007] 발명자의 경험뿐만 아니라 다른 사람들의 경험으로 볼 때, 오직 소수의 글루타민이 MTG에 의해 전형적으로 표적되며, 따라서 MTG는 부위-특이적 및 화학량론적 단백질 변형을 위한 매력적인 도구가 된다.
- [0008] 이전에, 글루타민 295(Q295)는 상이한 IgG 타입의 중쇄 상의 반응성 글루타민으로만 확인되어 저-분자량 1차 아민 기질을 갖는 MTG에 의해 특이적으로 표적되었다(Jeger et al. 2010).
- [0009] 그러나, Q295에 대한 정량적 컨쥬게이션은 PNGase F를 가지는 아스파라긴 잔기 297(N297)에서 글리칸 모이어티의 제거 시에만 가능했지만, 당화된 항체는 효율적으로 컨쥬게이트될 수 없었다(컨쥬게이션 효율 <20). 또한 이 결과는 Mindt et al. (2008) 및 Jeger et al. (2010)의 연구에 의해 뒷받침된다.
- [0010] 탈당화를 피하기 위해, 잔기 N297에 점 돌연변이를 삽입하는 것이 가능하고, 이는 비당화(aglycosylation)라 불리는 당화의 제거를 초래한다.
- [0011] 그러나, 두 가지 접근법 모두 중요한 단점이 있다. 효소적 탈당화 단계는 DMP 측면에서 바람직하지 않은데, 이는 높은 순도의 생산물을 보장하기 위해, 탈당화 효소(예를 들어, PNGase F) 및 절단된 글리칸이 모두 배지로부터 제거되어야 한다는 것을 보장해야 하기 때문이다.
- [0012] 또 다른 아미노산에 대한 N297의 치환은 원하지 않는 효과도 갖는데, 이는 결과로서C_H2 도메인의 전반적인 안정성 및 전체 컨쥬게이트의 효율에 영향을 줄 수 있기 때문이다. 또한, N297에 존재하는 글리칸은 중요한 면역조절 효과를 갖는데, 이는 글리칸이 항체 의존적인 세포성 세포독성(antibody dependent trigger cellular cytotoxicity, ADCC) 등을 촉발시키기 때문이다. 탈당화 또는 또 다른 아미노산에 대한 N297의 치환시 이러한 면역조절 효과를 잃을 것이다.
- [0013] 나아가, 서열 삽입이 면역원성을 증가시키고 항체의 전반적인 안정성을 감소시킬 수 있다는 점에서 페이로드 부착을 위한 항체의 유전적 조작은 단점을 가질 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 따라서 본 발명의 목적은 특히 N297에서, 항체의 사전 탈당화(prior deglycosylation)를 필요로 하지 않는 트랜스글루타미나제 기반 항체 컨쥬게이션 접근법을 제공하기 위한 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 C_H2 도메인에서 N297의 치환 또는 변형을 필요로 하지 않는 트랜스글루타미나제 기반 항체 컨쥬게이션 접근법을 제공하기 위한 것이다.
- [0016] 본 발명의 추가의 목적은 화학량론 및 컨쥬게이션의 부위-특이성과 관련하여 고도로 균질한 컨쥬게이션 생산물의 제조를 가능하게 하는 항체 컨쥬게이션 기술을 제공하기 위한 것이다.
- [0017] 이들 및 추가의 목적은 본 발명의 독립항에 따른 방법 및 수단을 만족시킨다. 독립항은 특정 구현예와 관련이

있다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 미생물 트랜스글루타미나제(MTG)의 수단에 의해 항체-페이로드 컨쥬게이트를 생성하기 위한 방법 및 링커 구조에 관한 것이다. 본 발명 및 본 발명의 특징의 일반적인 이점은 아래에서 상세히 논의될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 한 측면을 도시한다. MTG = 미생물 트랜스글루타미나제. 별 기호는 페이로드 또는 연결 모이어티(linking moiety) B를 도시한다. Kp는 라이신 잔기, 라이신 유도체 또는 라이신 모방체를 도시하고, 이는 펩타이드 N- 또는 C-말단 또는 사슬 내부(intrachain)일 수 있으며, 이는 MTG를 위한 기질이다. 이 공정이 N297의 당화를 유지할 수 있게 한다는 것에 주목한다. B/별 기호가 연결 모이어티인 경우, 실제 페이로드는 여전히 모이어티에 컨쥬게이트 되어야 한다는 것을 주목한다.

본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, B/별 기호는 예를 들어, DBCO-함유 페이로드(예를 들어, 독소 또는 형광 염료 또는 DOTA 또는 NODA-GA와 같은 금속 킬레이터)에 대한 균주-촉진된 알킨-아자이드 고리첨가(SPAAC) 클릭-화학 반응에 적합한 생체직교적 그룹(예를 들어 아자이드/N₃-그룹)과 같은 연결 모이어티일 수 있다. 기능적 모이어티에 항체를 부착시키는 이러한 클릭-화학 기반 "2단계 화학효소적(two-step chemoenzymatic)"-접근법은 항체에 비해 낮은 분자 과잉(low molecular excess)에서, 전형적으로 예를 들어 컨쥬게이션 부위당 5eq 또는 그 이하에서 클릭될 수 있다는 주요 이점을 갖는다(Dennler et al. 2014). 이는 ADC의 비용-효율적인 생성을 가능하게 한다. 또한, 사실상 임의의 프로브는 형광 염료에서 금속 킬레이터에 이르기까지 이 접근법으로 클릭될 수 있다(Spycher et al. 2017, Dennler et al. 2015 참조).

B/별 기호는 실제 페이로드, 예를 들어 독소일 수 있다. 이러한 구현에는 정제 및 생산을 용이하게 하여, 생성된 화합물을 하나의 단계로 신속하게 제조할 수 있게 한다.

도 2는 본 발명에 따른 올리고펩타이드를 포함하는 링커 펩타이드의 예를 도시한다. 서열은 ArgAlaLysAlaArgLys(N₃) (RAK₁ARK₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃))이다. Lys(N₃)는 1차 아민이 아자이드(-N=N=N, 또는 -N₃)로 대체된 Lys 잔기이다. 본 발명의 명명법에 따르면, Lys(N₃) 또는 N₃ 단독은 연결 모이어티 B로 간주될 수 있다(이 예에서, N₃는 클릭-화학(click chemistry)에 적합하다).

펩타이드는 위치 Q295에서 천연 IgG1 항체에 효과적으로 컨쥬게이트한다(비-최적화된 조건 하에서 LC-MS 분석으로부터 추정된 바와 같이 ~77%).

본 명세서에 도시된 일부 링커 펩타이드에서, C-말단의 모이어티는 단순히 N₃로 디자인된다는 것을 이해하는 것이 중요하다. 그러나, 이것은 Lys(N₃)의 약어로 이해되어야 한다. 예를 들어, RAKAR(N₃) 또는 ArgAlaLysAlaArg(N₃)는 실제로 RAK₁ARK₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃), 또는 ArgAlaLysAlaArgLys(N₃)를 의미한다.

또한, 본 명세서에 도시된 다른 링커 펩타이드에서, 달리 도시되더라도, C-말단 및/또는 N-말단은 보호되거나 보호되지 않을 수 있음을 이해하는 것이 중요하다. 보호는, 예를 들어 전자의 아미드화, 및/또는 후자의 아세틸화에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 보호된 및 보호되지 않은 링커 펩타이드 모두가 포함된다.

예를 들어, RAKARK(N₃)는 실제로 a) 상기 논의된 바와 같이 보호된 말단 모두, b) 상기 논의된 바와 같이 보호된 오직 N-말단 또는 C-말단, 또는 c) 보호되지 않은 말단 모두를 갖는 4개의 변이체를 포함한다.

다음 도면은 아미드화된 C-말단을 갖는 C-말단 Lys(N₃)를 보여준다:



도 3은 임의의 펩타이드 라이브러리의 스크리닝 결과를 도시한다. MTG-반응성 라이신 잔기를 함유하고, 다른 길

이와 전하를 갖는 다른 펩타이드들을 스크리닝하였다. LC-MS는 분석에 사용되었다. 분명하게, 양전하 펩타이드들은 Q295 컨쥬게이션을 선호하는 것으로 보이지만, c 음전하 펩타이드들은 불량한 컨쥬게이션 수율을 보인다.

도 4 및 5는 링커가 말레이미드-포함 독소 링커 구성물을 컨쥬게이션하는데 적합한 자유 설프하이드릴 그룹을 갖는 Cys 잔기를 포함하는 구현예를 도시한다.

도 4는 결합 반응을 도시하고, 도 5는 일부 잠재적인 링커 구성물을 도시한다.

링커 펩타이드	공정 타입	단계
(Aax) _m -Lys-(Aax) _n -페이로드	1 단계 컨쥬게이션	단계 1: 페이로드를 포함하는 링커와 항체의 Gln 잔기와의 컨쥬게이션
(Aax) _m -Lys-(Aax) _n -연결 모이어티	2 단계 컨쥬게이션	단계 1: 연결 모이어티를 포함하는 링커와 항체의 Gln 잔기와의 컨쥬게이션 단계 2: 페이로드와 연결 모이어티와의 컨쥬게이션

도 6은 본 발명에 따른, 항체의 Gln(A295 또는 분자적으로 조작(molecular engineered)된)에 컨쥬게이트되어 있는 펩타이드를 갖는 2단계 컨쥬게이션 공정(도 6A)과 1단계 컨쥬게이션 공정(도6B)를 도시한다.

상기 2단계 공정에서, 링커 펩타이드는 (Aax)_m-Lys-(Aax)_n-연결 모이어티이다. Lys 잔기는 미생물 트랜스글루타미나제를 통해 항체의 Gln 잔기에 컨쥬게이트되고, 이어서 연결 모이어티 - 이 경우 자유 설프하이드릴 그룹을 갖는 Cys 잔기 - 는 페이로드, 이 경우 말레이미드를 통해, MC/VC/PABDC 링커 구조를 갖는 MMAE 독소에 컨쥬게이트된다.

하나의 2단계 공정에서, 링커 펩타이드 (Aax)_m-Lys-(Aax)_n는 이미 페이로드에 컨쥬게이트되어 있다. Lys 잔기는 항체의 Gln 잔기에 컨쥬게이트되고, 페이로드는 VC/PABDC 구조를 갖는 MMAE 독소로 이루어진다. VC 구조의 발린 잔기는 펩타이드 결합에 의해 링커 펩타이드의 마지막 아미노산에 컨쥬게이트된다.

도 7은 이중-페이로드(dual-payload) 부착에 적합한 링커를 포함하는 링커의 3가지 예를 보여준다.

도 7A는 첫 번째 연결 모이어티가 아자이드(N₃)인 동시에 두 번째 연결 모이어티가 테트라진인 펩타이드(둘 다 생체적교적)를 도시한다. 올리고펩타이드의 구조는 ArgAlaLysLys(N₃)- ArgAlaLys(Tetrazine) (RAK₁K₂RAK₃, 여기서 K₂=Lys(N₃), K₃ = Lys(Tetrazine))이다.

도 7B는 아자이드(N₃) 및 Cys-모이어티로부터 유리된 설프하이드릴 그룹을 갖는 펩타이드를 보여준다. 올리고펩타이드의 구조는 Lys(N₃)CysArgAlaLys (K₁CRAK₂, 여기서 K₁=Lys(N₃))이다.

도 7C는 아자이드(N₃) 및 Cys-모이어티로부터 유리된 설프하이드릴 그룹을 갖는 또 다른 펩타이드를 보여준다. 올리고펩타이드의 구조는 LysAlaArgCysLys(N₃) (K₁ARCK₂, 여기서 K₂=Lys(N₃))이다.

각각의 연결 모이어티는 동시에 클릭될 수 있는 생체적교적으로 호환 가능한 그룹이다.

따라서, 이들 링커는 2개의 다른 페이로드를 항체의 C_H2 도메인의 O295에 컨쥬게이트할 수 있게 한다. 두 번째 페이로드를 사용하면 효능 및 잠재성(potency)과 관련하여 현재 치료법을 넘어서는 완전히 새로운 클래스의 항체 페이로드 컨쥬게이트가 개발될 수 있다. 또한 새로운 적용 분야로, 예를 들어, 영상 및 치료 또는 수술 중/후를 위한 이중-타입 이미징이 예상된다(Azhdarinia A. et al., Molec Imaging and Biology, 2012 참조). 예를 들어, 수술 전 양전자 방출 단층 촬영기(positron emission tomography, PET) 및 수술 절제면의 가이드 설계를 위한 근적외선 형광(near-infrared fluorescent, NIRF)-염료용 조영제(imaging agent)를 포함하는 이중-표지된 항체는 암의 진단, 병기(staging) 및 절제를 크게 향상시킬 수 있다(Houghton JL. et al., PNAS 2015 참조). PET 및 NIRF 광학 이미징은 보완적 임상 적용을 제공하여, 비침습적 전신 이미징으로 각각 수술 중 질병의 위치를 알아내고 중앙 절제면을 식별할 수 있다. 그러나, 현재까지 이러한 이중-표지된 프로브의 생성은 적절한 부위-특이적 방법이 부족하기 때문에 어렵고; 화학적 수단에 의해 두 개의 다른 프로브를 부착시키는 것은 프로브

의 무작위의(random) 컨주게이션 때문에 거의 불가능한 분석과 재현성을 초래한다. 또한, Levengood M. et al., Angewandte Chemie, 2016의 연구에서, 두 가지 다른 아우리스타틴(auristatin) 독소가 부착된(다른 물리화학적 성질을 가지고 보완적인 항암 활성을 나타내는) 이중-약물 표지된 항체는 개별적인 아우리스타틴 성분으로 구성된 ADC에 저항할 수 있는(refractory) 세포주 및 이중 이식편 모델에 활성을 부여하였다. 이것은 이중-표지 ADC가 단일의 종래 ADC 단독보다 암 이종성(heterogeneity) 및 저항성을 보다 효과적으로 다룰 수 있음을 시사한다. ADC에 대한 하나의 저항성 메커니즘은 암세포로부터 세포독성 모이어티의 능동적 배출(pumping-out)을 포함하기 때문에, 또 다른 이중-약물 용도는 세포독성 약물의 유출 메커니즘을 특이적으로 차단하는 약물의 추가적이고 동시적인 전달을 포함할 수 있다. 따라서, 이러한 이중-표지 ADC는 ADC에 대한 암 저항성을 종래의 ADC에 비해 보다 효율적으로 극복하는데 도움이 될 수 있다.

알킨 또는 테트라진/트랜스-사이클로옥테인이 링커로서 사용되고 있는 유사한 구조가 동일하게 적합하고 본 발명의 범위 및 요지에 의해 포함된다.

본 명세서에 도시된 일부 링커 펩타이드에서, C-말단에서 모이어티는 단순히 N₃로서 디자인되는 것을 이해하는 것이 중요하다. 그러나, N₃는 Lys(N₃)의 약어로 이해되어야 한다. 예를 들어, RAKAR(N₃) 또는 ArgAlaLysAlaArg(N₃)는 실제로 RAK₁ARK₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃), 또는 ArgAlaLysAlaArgLys(N₃)를 의미한다.

또한, 본 명세서에 도시된 다른 링커 펩타이드에서, 달리 도시되더라도, C-말단 및/또는 N-말단은 보호되거나 보호되지 않을 수 있음을 이해하는 것이 중요하다. 보호는 전자의 아미드화, 및/또는 후자의 아세틸화에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 보호된 및 보호되지 않은 링커 펩타이드 모두가 포함된다. 예를 들어, RAKARK(N₃)는 실제로 a) 상기 기술된 바와 같이 보호된 두 말단, b) 상기 기술된 바와 같이 보호된 오직 N-말단 또는 C-말단, 또는 c) 보호되지 않은 두 말단을 갖는 4개의 변이체를 포함한다.

C- 및/또는 N-말단이 아미드화 및/또는 아세틸화되는지의 여부에 관한 질문은 컨주게이션 조건(버퍼, 배지, 다른 반응 성분의 반응성 등)에 의존하는 실행적 질문(practice question)이다.

도 8A 및 B는 2개의 아자이드 링커 모이어티를 갖는 가능한 링커 구조를 도시한다. 도 8A는 Lys(N₃)ArgAlaLysAlaArgLys(N₃) (K₁RAK₂ARK₃, 여기서 K₁ 및 K₃=Lys(N₃))를 도시한다. 도 8B는 LysAlaArgLys(N₃)Lys(N₃) (K₁RK₂K₃; 여기서 K₂ 및 K₃=Lys(N₃))를 도시한다. 이런 식으로, 항체 페이로드 비율 4를 얻을 수 있다. 하전된 Arg 잔기의 존재는 용액 내 소수성 페이로드를 유지하는 것을 돕는다.

본 명세서에 도시된 일부 링커 펩타이드에서, C-말단의 모이어티는 단순히 N₃으로 디자인되는 것을 이해하는 것이 중요하다. 그러나, 이것은 Lys(N₃)의 약어로 이해되어야 한다. 예를 들어, RAKAR(N₃) 또는 ArgAlaLysAlaArg(N₃)는 실제로 RAK₁ARK₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃), 또는 ArgAlaLysAlaArgLys(N₃)를 의미한다.

또한, 본 명세서에 도시된 다른 링커 펩타이드에서, 달리 도시되더라도, C-말단 및/또는 N-말단은 보호되거나 보호되지 않을 수 있음을 이해하는 것이 중요하다. 보호는 전자의 아미드화 및/또는 후자의 아세틸화에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 보호된 및 보호되지 않은 링커 펩타이드 모두가 포함된다. 예를 들어, RAKARK(N₃)는 실제로 a) 상기 논의된 바와 같은 보호된 말단 모두, b) 상기 논의된 바와 같이 보호된 오직 N-말단 또는 C-말단, 또는 c) 보호되지 않은 말단 모두를 갖는 4개의 변이체를 포함한다.

도 9는 천연 항체에 대한 MTG-매개 컨주게이션에 적합한 추가의 링커를 도시한다. 이들 링커 구조는 2단계에서 기능적 페이로드의 클릭-화학 기반 부착에 적합한 링커 모이어티(아자이드, N₃), 또는 말레이미드에 부착하기에 적합한 티올 그룹을 제공하는 Cys-잔기를 함유한다. 이러한 구조는 펩타이드를 기반으로 하기 때문에, 화학이 잘 이해되고 단일 아미노산의 빌딩 블록에서 조립되며 새로운 링커를 빠르고 쉽게 합성하고 평가할 수 있다.

	트랜스글루타미나제의 서열, 잔기 굵은 글씨로 표시	연결 모이어티 B
1	ArgAlaLysLys(N ₃) RAK ₁ K ₂ 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)
2	ArgAlaLysXaa(N ₃) RAKX, 여기서 X = Xaa(N ₃), Xaa 는 4-아지도-호모알라닌(4-Azido-L- homoalanine)이다.	Xaa(N ₃)
3	ArgAlaLys[PEG] ₃ (N ₃) RAK[PEG] ₃ N ₃ , 여기서 [PEG] ₃ = 트리에틸렌글리콜	[PEG] ₃ N ₃
4	ArgAlaLysCys RAKC	시스테인

도 10은 IgG1 항체의 경쇄가 컨쥬게이션에 의해 변형되지 않음을 도시한다. IgG1 경쇄의 디콘볼루션(deconvoluted)된 LC-MS 스펙트럼이 도시되어 있다.

도 11은 N₃-기능적 펩타이드를 갖는 선택적으로 변형된 2개의 상이한 천연 IgG1 중쇄의 디콘볼루션된 LC-MS 스펙트럼을 도시한다. 스펙트럼으로부터, 관찰된 질량 차이가 예상된 펩타이드 질량 이동에 대응하기 때문에, 하나의 펩타이드-링커만으로 두 중쇄가 선택적이고 정량적으로(>95%) 변형된 것을 알 수 있다.

도 12는 상이한 DBCO-기능적 프로브(FAM- 및 카르복시로다민-염료)의 아자이드-작용화된 천연 IgG1 항체로의 전환/클릭킹 실험(>95%)의 결과를 도시한 것이다; 이는 단일 잔기(Q295)에서 선택적으로 변형된, 부위-특이적으로 변형된 천연 IgG1 항체를 제공한다.

도 13A, B는 탈당화된 변이체를 기준(reference)으로 사용하여 2개의 천연 IgG1를 사용한 유세포 분석 실험 결과를 도시한다. FAM-염료가 사용되었다. 펩타이드로서: RAKAR-K(N₃)가 사용되고, 클릭킹을 위해 DBCO-PEG4-5/6-FAM-염료가 사용되었다. LC-MS에 따르면, >95% 효율의 클릭킹이 달성되었다.

도 14는 다른 번호 체계를 갖는 Ig C_{H2}의 개요를 보여준다. 본 발명의 목적을 위해, EU 번호(EU numbering)가 사용되고 있다.

도 15는 유리 1차 아민을 가지는 Lys 잔기를 갖는 링커(측쇄 또는 N-/C-말단)를 항체의 Q295 잔기의 유리 1차 아민에 컨쥬게이트하는 트랜스글루타미나제 반응을 도시한다.

도 16. 페이로드에 표시된 디벤조사이클로옥틴(dibenzocyclooctyne)에 링커 ArgAlaLysLys(N₃) (RAK₁K₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃))를 컨쥬게이트하기 위한 클릭 화학 반응 도식도(균주-촉진된 알킨-아자이드 고리첨가(SPAAC)).

도 17. MTG를 사용하여 당화된 IgG1 기준 항체에 컨쥬게이트된 ArgAlaLysAlaArg (RAKAR)의 펩타이드 맵핑(mapping)을 트립신 분해에 이어 LC-MS/MS에 적용하였다. 펩타이드 단편화는 단편 EEQYDSTYR (1*Peptide_23_AKAR, Mw: 1617.7 Da 예상 및 측정) 내 변형 부위로서 항체 중쇄에서 Q295를 명확하게 확인하였다.

도 18A-B는 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 상이한 펩타이드 링커를 도시한다. 도 18A는 비-천연 아미노산을 포함하는 펩타이드 링커를 도시한다. 도 18B는 트랜스글루타미나제 반응을 위한 1차 아민을 제공하는 라이신 유도체 또는 모방체를 포함하는 펩타이드 링커를 도시한다. 이들 펩타이드 변이체 또는 펩타이드 모방체(peptidomimetics)는 모두 ArgAlaLysLys(N₃) 펩타이드 (RAK₁K₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃))로부터 유래되었다. Lys(N₃) 대신, 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같이 다른 연결 모이어티 B가 사용될 수 있음을 주목한다.

도 19는 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 추가의 펩타이드 링커를 도시한다.

도 20은 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 추가의 펩타이드 링커를 도시한다. ArgLys(N₃)Lys는 N-말단 또는 C-말단이 아닌, 사슬 내부에 연결 모이어티 Lys(N₃)를 가지는 펩타이드이다. LysLys(N₃) 및 LysCys는 매우 짧은 링커이다.

도 21은 본 명세서에 기술된 방법에 따라 항체에 컨쥬게이트될 수 있는 상이한 링커 독소 구성물을 도시한다. 모든 경우에, Lys 잔기는 트랜스글루타미나제 컨쥬게이션을 위한 1차 아민을 보유한다.

도 21A RKR-DM1 이 도면은 소수성 페이로드 DM1의 용해도를 증가시키는 역할을 하는 2개의 알지닌-그룹을 갖는 절단 불가능한 RKR-DM1 펩타이드-독소 컨쥬게이트를 도시한다. 라이신은 MTG를 통해 항체와의 컨쥬게이션을 수행한다. Ahx-스페이서(Ahx-spacer)는 양전하 알지닌을 DM1로부터 디커플링되는 것을 돕고, 링커가 절단될 수 없기 때문에 후자가 표적에 보다 효과적으로 결합하는 것을 돕는다.

도 21B RKR-DM1 이 도면은 소수성 페이로드 DM1의 용해도를 증가시키는 역할을 하는 2개의 알지닌-그룹과 하나의 PEG4-스페이서인 모두 3개의 모이어티를 갖는 절단 불가능한 RKR-DM1 펩타이드-독소 컨쥬게이트를 도시한다. 라이신은 MTG를 통해 항체와의 컨쥬게이션을 수행한다. PEG4는 또한 양전하 알지닌을 DM1로부터 분리하는 것을 돕고, 링커가 절단될 수 없기 때문에 후자가 표적에 보다 효과적으로 결합하는 것을 돕는다.

도 21C RKR-MMAE 이 도면은 2개의 알지닌-그룹, PEG4-스페이서, PABC-그룹 및 val-cit 서열을 갖는 절단 가능한 RKR-MMAE 펩타이드-독소 컨쥬게이트를 도시한다. 라이신은 MTG, 알지닌-그룹 및 PEG4-스페이서를 통해 항체와의 컨쥬게이션을 수행하여 용해도를 증가시키고, PABC-그룹 및 val-cit 서열은 독소를 방출하는 것을 돕는다.

도 21D RKR-MMAE 이 도면은 2개의 알지닌-그룹과 PEG-스페이서 및 val-cit 서열이 없는 PABC-그룹을 갖는 절단 가능한 RKR-MMAE 펩타이드-독소 컨쥬게이트를 도시한다. RKR-펩타이드가 펩티다제에 의해 본질적으로 분해될 수 없기 때문에, val-cit 서열이 독소 방출을 위해 필요하지 않을 수 있고, 2개의 알지닌-그룹이 매우 친수성이기 때문에, PEG-스페이서가 필요하지 않을 수 있으며, 따라서 전체 펩타이드-독소 컨쥬게이트를 혈액 순환 중에 다른 분자와 바람직하지 않은 상호작용을 최소화하기 위해 가능한 한 작게 유지한다.

도 22는 실시예 2에 따라 수행된 바와 같은 세포 독성 분석 결과를 도시한다. 내부 ADC는 Kadcyla와 같은 SK-BR3 세포에 대해 유사한 효능(potency)을 갖는다. 따라서, 신규한 링커 기술(제조 용이성, 부위 특이성, 안정한 화학량론, 항체의 탈당화 불필요)에 의해 제공되는 이점은 세포 독성과 관련하여 어떠한 단점도 갖지 못한다.

도 23은 이중-페이로드 컨쥬게이션 및 세포-결합 연구의 결과(실시예 6)를 도시한다. 도 23A: 이중-페이로드 컨쥬게이션 후 인간화 IgG1의 경쇄: 순도 >95%. 도 23B: 이중-페이로드 컨쥬게이션과 말레이미드- NODAGA 및 DBCO-PEG4-Ahx-DM1의 부착 후 인간화 IgG1의 중쇄: 순도 >90%.

도 24는 이중-페이로드 컨쥬게이션 및 세포-결합 연구의 추가 결과(실시예 6)를 도시한다.

도 25는 인간화IgG1에 대한 컨쥬게이션을 위한 Ac-RβAK(N₃)-NH₂ (Ac-ArgβAlaLys(N₃)-NH₂)(즉, 측쇄에 1차 아민을 갖는 아미노산을 함유하지 않는 링커)의 대조군 컨쥬게이션의 결과(실시예 7)를 도시한다. 컨쥬게이션은 검출되지 않았다.

도 26은 인간 IgG4 항체에 대한 컨쥬게이션 실험 결과(실시예 8)를 도시한다. 도 26A: 인간 IgG4의 경쇄: 컨쥬게이션이 검출되지 않았다. 도 26B: 당화 패턴을 보이는 인간 IgG4의 천연 중쇄. 도 26C: 단일 잔기에서 선택적인 변형을 보이는, RAKAR와의 컨쥬게이션 후 인간 IgG4의 천연 중쇄. 최적화되지 않은 조건에서 85%의 컨쥬게이션 효율에 도달했다.

도 27은 인간화 IgG1로부터 ADC의 제조 후, LC-MS의 결과(실시예 9)를 도시한다. 도 27A: 천연 당화 패턴을 보이는 인간화 IgG1의 천연 중쇄. 도 27B: Ac-RAK-Lys(N₃)-NH₂와의 컨쥬게이션 후 인간화 IgG1의 천연 중쇄. 98%의 컨쥬게이션 효율이 달성되었다. 도 27C: Ac-RAK-Lys(N₃)-NH₂ 와의 컨쥬게이션 및 DBCO-PEG4-Ahx-DM1와의 클릭 후 인간화 IgG1의 천연 중쇄. 98%의 클릭 효율이 달성되었다.

도 28은 SEC-MALS 실험 결과를 도시한다. 도 28A: 허셉틴(Herceptin), 도 28B: 청구된 링커 기술을 사용한 항-HER2-링커 구성물, 도 28C: 내부 ADC, 도 28D: Kadcyla[®]

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

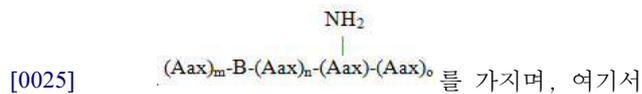
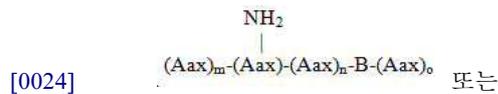
[0020] 본 발명을 상세하게 기술하기 전에, 이 발명은 이러한 장치로서 기술된 방법의 특정 구성 또는 공정 단계로 제한되지 않고, 방법은 변할 수 있다는 것으로 이해되어야 한다. 또한 본 명세서에서 사용된 용어는 오직 특정 구현예를 기술하기 위한 목적이요, 제한하려는 것이 아니라는 것으로 이해되어야 한다. 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 것과 같이, 단수 형태 "한(a)", "한(an)", 및 "그(the)"는 문맥상 명백하게 달리 지시되지 않는 한, 단수 및/또는 복수의 지시 대상을 포함한다는 것을 주목해야 한다. 또한, 수치로 구분되는 파라미터 범위가

제공되는 경우, 범위는 이러한 제한 값을 포함하는 것으로 간주된다는 점을 이해해야 한다.

[0021] 또한, 본 명세서에 개시된 구현예들은 서로 관련이 없는 개별적인 구현예들로서 이해되도록 의도된 것이 아님을 이해해야 한다. 한 구현예와 관련하여 논의된 특징은 본 명세서에 도시된 다른 구현예와 관련하여 또한 개시되도록 의도된다. 한 경우에, 특정 특징이 한 구현예와 함께 개시되지 않고 또 다른 구현예와 함께 기술된다면, 당업자는 상기 특징이 상기 다른 구현예에는 개시되지 않은 것을 반드시 의미하는 것은 아니라는 것을 이해할 것이다. 당업자는 다른 구현예에 대해서도 상기 특징을 개시하는 것이 본 출원의 요지라는 것을 이해할 것이지만, 단지 이는 명확성을 목적으로 하고, 관리 가능한 양으로 설명을 유지하기 위한 것이다.

[0022] 또한, 본 명세서에 언급된 문헌의 내용은 참고로 포함된다. 이는, 바람직하게, 표준 또는 일상적인 방법을 공개한 문서에 해당한다. 이 경우에, 참조에 의한 통합은 주로 충분한 가능한 개시를 제공하고, 긴 반복을 피하는 목적을 갖는다.

[0023] 첫 번째 측면에 따르면, 미생물 트랜스글루타미나제(MTG)의 수단에 의해 항체-페이로드 컨쥬게이트를 생성하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 1차 아민 잔기를 갖는 링커를 항체의 중쇄 또는 경쇄에 포함된 Gln 잔기에 컨쥬게이트하는 단계를 포함하고, 상기 링커는 펩타이드 구조(N->C 방향으로 도시됨)



[0026] - m은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,

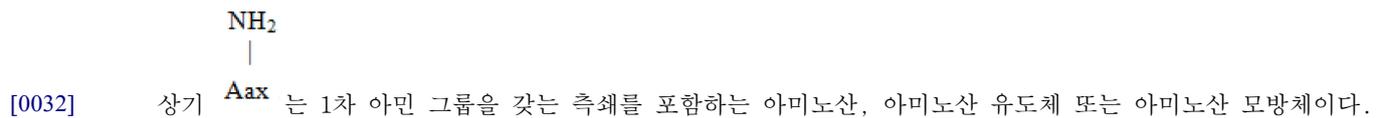
[0027] - n은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이며,

[0028] - o는 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,

[0029] - $m + n + o \geq 0$ 이며,

[0030] - Aax는 임의의 자연적 또는 비-자연적으로 발생하는 L- 또는 D-아미노산, 또는 아미노산 유도체 또는 모방체이고, 및

[0031] - B는 페이로드 또는 연결 모이어티이며,



[0033] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "1차 아민(primary amine)"은 화학식 R-NH₂의 2개의 수소 원자로 치환된 아민에 관한 것이다.

[0034] 본 명세서에 도시된 상이한 링커 펩타이드에서, 달리 도시되더라도, C-말단 및/또는 N-말단은 보호되거나 보호되지 않을 수 있음을 이해하는 것이 중요하다. 보호는 전자의 아미드화, 및/또는 후자의 아세틸화에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 보호된 및 보호되지 않은 링커 펩타이드 모두 포함된다.

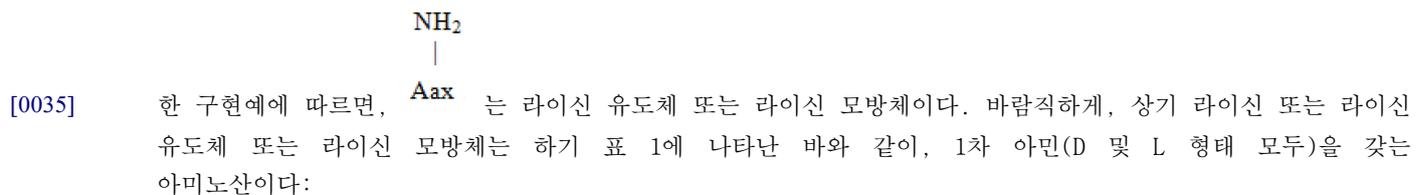


표 1

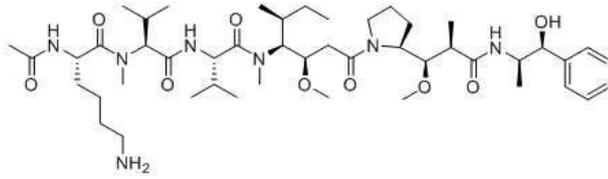
	<p>L-라이신 ((S)-2,6-디아미노헥사노익 애씨드)</p>
	<p>D-라이신 ((R)-2,6-디아미노헥사노익 애씨드)</p>
	<p>오르니틴 (2,5-디아미노헥사노익 애씨드), L 및 D 구조 둘 다</p>
	<p>L-β-호모라이신 (S)-3,7-디아미노헵타노익 애씨드</p>
	<p>호모라이신</p>
	<p>α,γ-디아미노뷰틸릭 애씨드(Dab) L 및 D 구조 둘 다 (L 도시)</p>

[0036]

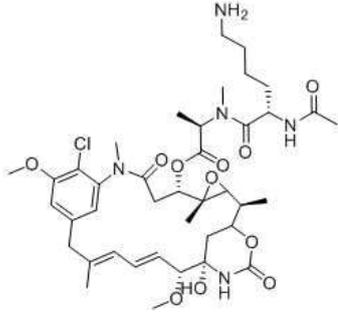
[0037] 따라서, 가장 간단한 형태에서, B는 Lys 또는 라이신 유도체 또는 라이신 모방체에 직접 컨쥬게이트 될 수 있다. 이 경우, $m + n + o = 0$ 이다.

[0038] 라이신 또는 라이신 유도체 또는 라이신 모방체가 독소에 직접 컨쥬게이트되는 이러한 구현예에 대한 두 가지 예는 다음과 같다:

Lys-MMAE



Lys-DM1



[0039]

[0040]

일부 구현예에서, 펩타이드 구조의 N- 또는 C-말단은 적합한 보호기(아미드화 또는 아세틸화)로 보호될 수 있다.

[0041]

또 다른 구현예에서, Lys 유도체는 1차 아민을 포함하고 트랜스글루타미나제 효소에 의해 수용되는 유기 분자일 수 있다.

[0042]

따라서 링커 구조는 다음의 표 2의 예시 중 임의의 것일 수 있다(Lys는 Aax-NH₂, 또는 라이신, 또는 라이신 유도체 또는 모방체를 나타낸다):

표 2

-Gln-
Lys-B
-Gln-
(Aax) _m -Lys-B
-Gln-
Lys-B-(Aax) _o
-Gln-
(Aax) _m -Lys-B-(Aax) _o
-Gln-
Lys-(Aax) _n -B
-Gln-
Lys-(Aax) _n -B-(Aax) _o
-Gln-
(Aax) _m -Lys-(Aax) _n -B
-Gln-
(Aax) _m -Lys-(Aax) _n -B-(Aax) _o
-Gln-
B-Lys
-Gln-
B-(Aax) _n -Lys
-Gln-
(Aax) _m -B-Lys
-Gln-
B-Lys-(Aax) _o
-Gln-
(Aax) _m -B-Lys-(Aax) _o
-Gln-
B-(Aax) _n -Lys-(Aax) _o
-Gln-
(Aax) _m -B-(Aax) _n -Lys
-Gln-
(Aax) _m -B-(Aax) _n -Lys-(Aax) _o

[0043]

[0044] 본 발명자들은 이 공정이 매우 비용 효율적이고 빠르게(24 - 36 시간) 부위-특이적 항체-페이로드 컨쥬게이트를 생산하기에 적합하고, 따라서 이 공정이 이러한 분자의 대규모 라이브러리의 생산과 고 처리량의 스크리닝 시스템에서의 후속 스크리닝이 허용됨을 보여주었다.

[0045] 이와 대조적으로, 유전자적으로(분자적으로) 조작(engineered)된 Cys 잔기를 통해 페이로드가 항체에 컨쥬게이트되어 생성되는 항체 페이로드 컨쥬게이트의 Cys 조작 공정은 적어도 약 3 - 4 주가 필요하다.

[0046] 일반적으로, 상기 방법은 다수의 페이로드를 항체에 컨쥬게이트시킬 수 있다. 각각의 페이로드에 대해, 적합한 펩타이드 링커 구조는 최적의 임상적 및 비-임상적 특성을 제공하기 위해 큰 링커 풀에서 확인될 수 있다. 이는 링커 구조가 고정된 다른 방법에서는 불가능하다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "비-자연적으로 발생하는 아미노산(non-naturally occurring amino acid)", 또는 아미노산 유사체(analog)는 일반적인 구조 -NH-CHR-CO-를 갖지만, 생물학적 단백질에서 발생하지 않는 아미노산에 관한 것이다. 상기 용어는, 이에 제한되지 않으나, β-알라닌, α-아미노부티르산, γ-아미노부티르산, α-아미노이소부티르산, ε-라이신, 오르니틴, 하이드록시프롤린, 아그마틴, (S)-2-아미노-4-

((2-아미노)피리미디닐)부탄산, 4-아미노부티르산, 4-아미노-3-하이드록시-5-페닐펜탄산, 4-아미노-3-하이드록시-6-메틸헵탄산, 6-아미노헵산산, 알파-아미노이소부티르산, 벤조페논, t-부틸글라이신, 시트룰린, 사이클로헥실알라닌, 데스아미노 티로신, L-(4-구아니디노)페닐알라닌, 호모알지닌, 호모시스테인, 호모세린, 호모라이신, n-포밀 트립토판, 노르류신, 노르발렌, 페닐글라이신, (S)-4- 피페리딜-N-아미디노)글라이신, 오르니틴, 파라벤조일-L-페닐알라닌, 사르코신, 스타틴, 2-싸이에닐 알라닌, 및/또는 자연적으로 또는 비-자연적으로 발생하는 아미노산의 D- 이성질체를 포함한다.

[0048] 용어 “D-아미노산(D-amino acid)” 는 자연적으로 발생하는 아미노산뿐만 아니라 비-자연적으로 발생하는 아미노산의 D-대응물(counterparts)을 포함한다.

[0049] 한 구현예에서, 펩타이드 구조를 갖는 링커는 카텝신 B에 의해 절단될 수 없다. 추가의 구현예에서, 펩타이드 구조를 갖는 링커는 발린-알라닌 모티프 또는 발린-시트룰린 모티프를 포함하지 않는다.

[0050] Lys 잔기는 없지만, ADC 링커에 사용되는 하나의 전형적인 디펩타이드 구조는, 예를 들어, 브렌톡시맵 베도틴에서 제공되고 Dubowchik and Firestone 2002에서 논의된 바와 같은 발린-시트룰린 모티프이다. 이 링커는 질병의 측면에서 독소를 방출하기 위해 카텝신 B에 의해 절단될 수 있다. 발린-알라닌 모티프에서도 동일하게 적용되며, 이는 예를 들어 SGN-CD33A로 제공된다.

[0051] 추가의 구현예에서, 링커는 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜 유도체를 포함하지 않는다.

[0052] 폴리에틸렌글리콜(PEG)은 산업 제조에서 의약품에 이르기까지 많은 적용 분야를 갖는 폴리에테르 화합물이다. PEG는 또한 이의 분자량에 따라 폴리에틸렌옥사이드(PEO) 또는 폴리옥시에틸렌(POE)으로도 알려져 있다. PEG의 구조는 일반적으로 H-(O-CH₂-CH₂)_n-OH로서 표현된다.

[0053] 따라서, B가 페이로드 또는 연결 모이어티일 수 있기 때문에, 본 발명에 따른 방법은 다음의 표 3에서 나타난 바와 같이, 두 가지 주요 구현예를 갖는다는 것을 이해하는 것이 중요하다:

표 3

링커 펩타이드	공정 유형	단계
(Aax) _m -Lys-(Aax) _n -페이로드	1단계 컨쥬게이션	단계 1: 페이로드를 포함하는 링커와 항체의 Gln 잔기와의 컨쥬게이션
(Aax) _m -Lys-(Aax) _n -연결 모이어티	2단계 컨쥬게이션	단계 1: 연결 모이어티를 포함하는 링커와 항체의 Gln 잔기와의 컨쥬게이션 단계 2: 페이로드와 연결 모이어티와의 컨쥬게이션

[0055] 본 발명의 한 구현예에 따르면, m + n + o ≤ 25이고, 바람직하게는 ≤ 20이며, 보다 바람직하게는 ≤ 15이고, 보다 바람직하게는 ≤ 12이며, 보다 바람직하게는 ≤ 10이고, 보다 바람직하게는 ≤ 8이며, 보다 바람직하게는 ≤ 7이고, 보다 바람직하게는 ≤ 6이며, 보다 바람직하게는 ≤ 5이고, 보다 바람직하게는 ≤ 4이다.

[0056] 본 발명의 추가의 구현예에 따르면, 페이로드 또는 연결 모이어티(linking moiety)는 분자적 조작(molecular engineered)에 의해 항체의 중쇄 또는 경쇄로 도입되는 Gln 잔기에 컨쥬게이트 된다.

[0057] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 페이로드 또는 연결 모이어티는 항체의 Fc 도메인에서 Gln에 컨쥬게이트 된다.

[0058] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 페이로드 또는 연결 모이어티는 항체의 C_H2 도메인의 Gln 잔기 Q295(EU 번호)에 컨쥬게이트 된다.

[0059] Q295가 IgG 타입 항체에서 매우 보존된 아미노산 잔기라는 것을 이해하는 것이 중요하다. Q295는 인간 IgG1, 2, 3, 4뿐만 아니라 토끼 및 쥐 항체에서도 보존된다. 따라서, Q295를 사용할 수 있다는 것은 항체가 종종 비인간 기원인 치료용 항체-페이로드 컨쥬게이트, 또는 진단 컨쥬게이트를 제조하는데 상당한 이점이 된다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은 매우 다양하고 광범위하게 적용 가능한 도구를 제공한다.

[0060] 또한, 페이로드 부착을 위해 Q295를 사용하는 조작된 컨쥬게이트는 우수한 약동학 및 효능을 나타내고(Lhospice et al. 2015), 분해되기 쉬운 불안정한 독소를 운반할 수 있는 것으로 나타났다(Dorywalska et al. 2015). 따라서, 동일한 잔기가 변형되지만 당화된 항체의 경우 이 부위-특이적 방법으로 유사한 효과가 나타날 것으로 예

상된다. 당화는 전반적인 ADC 안정성에 추가로 기여할 수 있으며, 언급된 접근법과 같이 글리칸 모이어티의 제거는 불안정한 항체를 생성하는 것으로 나타났다(Zheng et al. 2011).

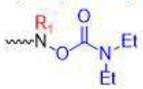
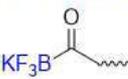
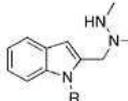
- [0061] 본 발명의 추가의 구현예에 따르면, 페이로드 또는 연결 모이어티가 컨쥬게이트된 항체는 당화된다.
- [0062] 전형적인 IgG 형태의 항체는 C_H2 도메인의 N297 위치(Asp-X-Ser/Thr-모티프)에서 N-당화된다.
- [0063] 트랜스글루타미나제에 의한 C_H2 Gln 잔기에 대한 링커의 컨쥬게이션을 논의하는 문헌에서, 작고, 저분자량의 기질에 중점을 두어 왔지만, 종래 기술 문헌에서는 이러한 컨쥬게이션을 달성하기 위한 N297 위치에서 당화 단계 또는 당화 항체의 사용은 항상 필요에 따라 기술되어 있다(WO 2015/015448; WO 2017/025179; WO 2013/092998).
- [0064] 그러나 놀랍게도, 모든 기대에 대해, 당화된 항체의 Q295에 대한 부위-특이적 컨쥬게이션은 상기 논의된 올리고펩타이드 구조를 사용함으로써 실제로 효율적으로 가능하다.
- [0065] Q295는 본래의 상태에서 당화된 N297에 매우 근접하지만, 특정된 링커를 사용하는 본 발명에 따른 방법은 여전히 그것에 링커 또는 페이로드를 컨쥬게이션하는 것을 허용한다.
- [0066] 그러나, 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 방법은 Q295의 선행 효소적 탈당화, 또는 비당화된 항체의 사용, 또는 또 다른 아미노산에 대한 N297의 치환, 또는 당화를 예방하기 위한 T299A 변이의 도입을 필요로 하지 않는다.
- [0067] 이 두 점은 제조 측면에서 상당한 이점을 제공한다. 효소적 탈당화 단계는 GMP 측면에서 바람직하지 않은데, 이는 탈당화 효소(예를 들어, PNGase F)와 절단된 글리칸 모두가 배지에서 제거되어야 한다는 점을 명심해야 하기 때문이다.
- [0068] 또한, 페이로드 부착을 위한 항체의 유전적 조작은 필요하지 않으므로, 면역원성을 증가시키고 항체의 전반적인 안정성을 감소시킬 수 있는 서열 삽입을 피할 수 있다.
- [0069] 또 다른 아미노산에 대한 N297의 치환은 원하지 않는 효과도 갖는데, 이는 전체 Fc 도메인의 전반적인 안정성(Subedi et al, 2015)과 전체 컨쥬게이트의 효능에 영향을 미쳐 항체 응집체 증가 및 용해도 감소로 이어질 수 있으며(Zheng et al. 2011), 이는 PBD와 같은 소수성 페이로드에 특히 중요하기 때문이다. 또한, N297에 존재하는 글리칸은 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 등을 유발하기 때문에 중요한 면역조절 효과를 갖는다. 이들 면역조절 효과는 탈당화 또는 상기 논의된 임의의 다른 접근법 중 하나에서 손실되어 당화 항체를 얻을 수 있다. 또한, 확립된 항체의 임의의 서열 변형은 조절 문제를 야기할 수 있는데, 이는 종종 허용되고 임상적으로 검증된 항체가 ADC 컨쥬게이션의 출발점으로 사용되기 때문에 문제가 된다.
- [0070] 따라서, 본 발명에 따른 방법은 부위 특이적 페이로드 결합을 갖는 화학량론적으로 잘 정의된 ADC를 쉽고 단점 없이 만들 수 있게 한다.
- [0071] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 링커의 순 전하는 중성 또는 양이다.
- [0072] 펩타이드의 순 전하는 보통 중성 pH (7.0)에서 계산된다. 가장 간단한 접근법에서, 순 전하는 양전하 아미노산 잔기(Arg 및 Lys 및 임의의 His)의 수 및 음전하 아미노산 잔기(Asp 및 Glu)의 수를 더하고 두 그룹의 차이를 계산함으로써 결정된다.
- [0073] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 링커는 음전하 아미노산 잔기를 포함하지 않는다.
- [0074] 바람직하게는, 올리고펩타이드는 음전하 아미노산 잔기 Glu 및 Asp를 포함하지 않는다.
- [0075] 본 발명의 추가의 구현예에 따르면, 링커는 음전하 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0076] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 링커는
 - [0077] - 라이신 또는 라이신 유도체 또는 라이신 모방체,
 - [0078] - 알지닌, 및/또는
 - [0079] - 히스티딘
- [0080] 으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 두 개의 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0081] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, B는 자유 설프하이드릴 그룹을 갖는 Cys 잔기이다.

- [0082] 이러한 Cys 잔기(또는 유도체)의 자유 설프하이드릴 그룹은 이들의 말레이미드-포함 링커 독소 구성물을 컨쥬게이트하는데 사용될 수 있다. 컨쥬게이션 반응 및 일부 잠재적인 링커 구성물에 대한 보다 자세한 내용은 도 5를 참고한다.
- [0083] 말레이미드 링커를 포함하는 독소는 자주 사용되어 왔으며, 또한 아드세트리스(Adcetris)와 같은 의료 기관에 의해 승인되었다. 따라서 MMAE 독소를 포함하는 약물은 (i) p-아미노벤질 스페이서, (ii) 디펩타이드 및 (iii) 말레이미도카프릴로일 링커를 포함하는 링커에 컨쥬게이트되는데, 이는 항체에서 Cys 잔기의 유리 설프하이드릴 그룹과의 컨쥬게이션을 가능하게 한다.
- [0084] 따라서, 본 발명에 따른 링커에서, Cys-잔기를 제공하는 것은 항체-페이로드 컨쥬게이트를 생성하기 위해 상용화된 독소-말레이미드 구성물을 사용하는 것을 가능하게 하거나, 보다 일반적으로, Cys-말레이미드 결합 화학의 이점을 완전히 이용하는 것을 가능하게 하는 이점을 갖는다. 동시에, 탈당화될 필요가 없는 상용화된 항체가 사용될 수 있다.
- [0085] 특정 구현예에서, Cys 잔기는 펩타이드 링커에서 C-말단, 사슬 내 또는 N-말단이다.
- [0086] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 항체는 항체의 C_H2 도메인에서 Asn 잔기 N297(EU 번호)을 포함한다.
- [0087] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, N297 잔기는 당화된다.
- [0088] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 링커 또는 페이로드는 Gln 잔기의 아미드 측쇄에 컨쥬게이트 된다.
- [0089] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, B가 연결 모이어티인 경우, 실제 페이로드를 연결 모이어티에 연결하는 추가의 단계가 수행되는 것을 제공한다.
- [0090] 본 발명의 한 추가 구현예에 따르면, 미생물 트랜스글루타미나제는 우선적으로 천연 효소에 대해 80%의 서열 상동성을 갖는 스트렙토마이세스 모바라엔시스(*Streptomyces mobaraensis*)로부터 유래된다.
- [0091] 이러한 미생물 트랜스글루타미나제 중 하나는 Zedira(독일)로부터 상업적으로 이용가능하다. 이는 대장균(*E. coli*)에 의해 재조합적으로 생산된다. 스트렙토마이세스 모바라엔시스 트랜스글루타미나제(UniProtKB - Q6E0Y3 (Q6E0Y3_STRMB))는 SEQ ID NO 36에 기술된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0092] 또 다른 구현예에서, 미생물 트랜스글루타미나제 스트렙토마이세스 라다카눔(*Streptomyces ladakanum*)(이전에 스트렙토버티실리움 라다카눔(*Streptoverticillium ladakanum*)으로 알려짐)이 사용되고 있다. 스트렙토마이세스 라다카눔 트랜스글루타미나제(미국 특허번호 US 6,660,510 B2)는 SEQ ID NO 37에 기술된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0093] 상기 트랜스글루타미나제는 모두 서열 변형될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 트랜스글루타미나제는 SEQ ID NO 36 또는 SEQ ID NO 37과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것이 사용될 수 있다.
- [0094] 또 다른 적합한 미생물 트랜스글루타미나제는 ACTIVA TG라 불리고, Ajinomoto로부터 상업적으로 이용가능하다. Zedira의 트랜스글루타미나제와 비교하여, ACTIVA TG는 4N 말단 아미노산이 없지만 유사한 활성을 갖는다.
- [0095] 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 추가의 미생물 트랜스글루타미나제는 Kieliszek 및 Misiewicz 2014, WO2015191883 A1, WO2008102007 A1 및 US20100143970에 개시되어 있고, 이의 내용은 본 명세서에서 참고로 완전히 포함된다.
- [0096] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 연결 모이어티 B는
- [0097] - 생체직교적 마커 그룹
- [0098] - 가교를 위한 다른 비-생체직교적 엔티티(non-bio-orthogonal entity)
- [0099] 로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나이다.
- [0100] 용어 "생체직교적 마커 그룹(bioorthogonal marker group)"은 천연 생화학적 과정을 방해하지 않고 살아있는 시스템 내에서 화학 반응이 일어날 수 있는 반응성 그룹을 지정하기 위해 Sletten and Bertozzi (2011)에 의해 확립되었다.
- [0101] 아자이드 및 사이클로옥틴 간 (구리-유리 클릭 화학이라고도 함, Baskin et al (2007)), 니트론(nitrones) 및 사이클로옥틴(Ning et al (2010)) 간의 1,3-양극성 고리첨가(1,3-dipolar cycloaddition), 알데하이드 및 케톤

으로부터의 옥심/하이드라존 형성(Yarema, et al (1998)), 테트라진 라이게이션 Blackman et al (2008), 이소나이트릴-기반 클릭 반응(Stokmann et al (2011), 및 가장 최근에는 퀘드리사이클란 라이게이션(quadricyclane ligation) (Sletten & Bertozzi (JACS, 2011)), 구리(I)-촉매 아자이드-알킨 고리첨가(Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) (CuAAC, Kolb & Sharpless 2003), 균주-촉진 아자이드-알킨 고리첨가(Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) (SPAAC, Agard et al 2006), 또는 균주-촉진 알킨-니트론 고리첨가(Strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition) (SPANAC, MacKenzie et al 2014)을 포함하는 생체 직교성의 요구사항을 충족시키는 수많은 화학 라이게이션 전략이 개발되었다.

- [0102] 이러한 모든 문서는 충분한 가능한 개시를 제공하고, 긴 반복을 피하기 위해 본 명세서에 참조로서 포함된다.
- [0103] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 생체직교적 마커 그룹 또는 비-생체직교적 엔티티는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나이다:
- [0104] - $-N=N\equiv N$, 또는 $-N_3$
- [0105] - $Lys(N_3)$
- [0106] - 테트라진
- [0107] - 알킨
- [0108] - DBCO
- [0109] - BCN
- [0110] - 노보넨
- [0111] - 트랜스사이클로옥텐
- [0112] - $-RCOH$ (알데하이드),
- [0113] - 아실트리플루오로붕산,
- [0114] - $-SH$, 및/또는
- [0115] - 시스테인.
- [0116] 이들 그룹은 예를 들어 다음의 결합 반응 중 임의의 것에 관여할 수 있다:

표 4

결합 파트너 1	결합 파트너 2	반응 타입
-N≡N	사이클로옥틴 유도체 (예. DIFO, BCN, DIBAC, DIBO, ADIBO/DBCO)	SPAAC
-N≡N	알킨	CuAAC
-N≡N	트리아릴포스핀(Triarylphosphines)	스타우딩거 라이게이션(Staudinger ligation)
테트라진	사이클로프로펜(Cyclopropene) 노보넨(Norborene) 사이클로옥틴(Cyclooctyne) (BCN)	
-SH, 예를 들어, Cys 잔기의 -SH	말레이미드(Maleimide)	티올-말레이미드 컨쥬게이션
아민	N-하이드록시숙신이미드	
-O- 카르바모일하이드록실아민 	아실트리플루오로붕산 	KAT-라이게이션 (포타슘 아실-트리플루오로붕산)
R _x -S-S-R _y	R _z -SH + 환원제 (예. TCEP, DTT)	직접 이황화 바이오킨쥬게이션
-CHO (알데하이드)	HIPS-프로브 	하이드라지노-아이소-피테트-스팽글러(Hydrazino-iso-Pictet-Spengler (HIPS))
-CHO (알데하이드)	R ₁ -N-N-R ₂ HO-N-R ₁ H ₂ N-CHR ₁ -CH ₂ -SH	하이드라존-라이게이션 옥심-라이게이션 티아졸리딘-라이게이션
말레이미드	-SH, 예를 들어, Cys 잔기의 -SH	티올-말레이미드 컨쥬게이션

[0117]

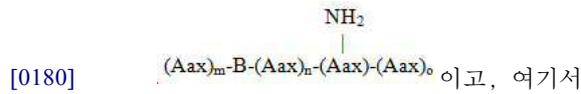
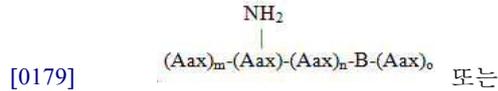
[0118] 상기 표 4에서, 상기 연결 모이어티는 "결합 파트너 1" 또는 "결합 파트너 2"로 불리는 것일 수 있다.

[0119] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 페이로드 B는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나이다:

- [0120] - 독소
- [0121] - 사이토카인
- [0122] - 성장인자
- [0123] - 방사성 핵종
- [0124] - 호르몬
- [0125] - 항바이러스제
- [0126] - 항균제
- [0127] - 형광염료

- [0128] - 면역조절/면역자극제
- [0129] - 반감기 증가 모이어티
- [0130] - 용해도 증가 모이어티
- [0131] - 중합체-독소 컨쥬게이트
- [0132] - 핵산
- [0133] - 비오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티
- [0134] - 비타민
- [0135] - 표적 결합 모이어티, 및/또는
- [0136] - 항염제.
- [0137] 반감기 증가 모이어티는, 예를 들어, PEG-모이어티(폴리에틸렌글리콜 모이어티; 폐길레이션(PEGylation)), 다른 중합체 모이어티, PAS 모이어티(프롤린, 알라닌 및 세린을 포함하는 올리고펩타이드; 파실레이션(PASylation)), 또는 혈청 알부민 결합체(binder)이다. 용해도 증가 모이어티는, 예를 들어 PEG-모이어티(폐길레이션) 또는 PAS 모이어티(파실레이션)이다.
- [0138] 중합체-독소 컨쥬게이트는 많은 페이로드 분자를 운반할 수 있는 중합체다. 이러한 컨쥬게이트는, 예를 들어 Mersana therapeutics 가 판매하는 것과 같은 플렉시머로도 불린다.
- [0139] 핵산 페이로드의 한 예는 MCT-485인데, 이는 MultiCell Technologies, Inc.에 의해 개발된, 종양 용해성 및 면역 활성화 특성을 갖는 매우 작은 비코딩 이중가닥 RNA이다.
- [0140] 항염제는, 예를 들어 항염 사이토카인이고; 이는, 표적-특이적 항체에 컨쥬게이트될 때, 예를 들어 자가 면역에 의해 유발되는 염증을 개선할 수 있다.
- [0141] 본 발명의 한 추가의 구현예에 따르면, 독소는
- [0142] - 피롤로벤조디아제핀 (PBD)
- [0143] - 아우리스타틴 (예, MMAE, MMAF)
- [0144] - 메이탄시노이드 (메이탄신, DM1, DM4)
- [0145] - 듀오카르마이신
- [0146] - 튜블리신
- [0147] - 엔다이인 (예. 칼리키아마이신)
- [0148] - PNUs, 독소루비신
- [0149] - 피롤-기반 키네신 스피들 단백질(KSP) 저해제
- [0150] - 칼리키아마이신
- [0151] - 아마니틴 (예. α-아마니틴), 및/또는
- [0152] - 캄토테신 (예. 엑사테칸, 데룩스테칸)
- [0153] 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나이다.
- [0154] 비타민은 폴산(folic acid), 폴라신(folacin) 및 비타민 B9를 포함하는 엽산(folates)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0155] 표적 결합 모이어티는 단백질 또는 비-단백질 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 또는 소분자일 수 있다. 한 구현예에서, 이러한 표적 결합 모이어티는 scFV 형태의 항체, Fab 단편, F(ab)₂ 단편, 나노바디, 어피 바디, 디아바디, VHH 형태의 항체, 또는 DARPIN을 포함하는 항체 모방체이다.
- [0156] 본 발명의 한 추가의 구현예에 따르면, 항체는

- [0157] - IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY
- [0158] - IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA, 및/또는
- [0159] - 표적 결합 특성을 유지하고 C_H2 도메인을 포함하는 단편 또는 이들의 재조합 변이체
- [0160] 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나이다.
- [0161] 항체는 바람직하게 단일클론 항체이다.
- [0162] 항체는 인간 유래의 것일 수 있지만, 마우스, 래트, 염소, 당나귀, 햄스터, 또는 토끼 등으로부터 유래될 수 있다. 컨주게이트가 치료를 위한 것일 경우, 뮤린(murine) 또는 토끼 항체가 임의로 키메라화 또는 인간화될 수 있다.
- [0163] C_H2 도메인을 포함하는 항체의 단편 또는 재조합 변이체는, 예를 들어,
- [0164] - 단순한 중쇄 도메인(상어 항체/IgNAR (V_H-C_H1-C_H2-C_H3-C_H4-C_H5)₂ 또는 낙타 항체/hcIgG (V_H-C_H2-C_H3)₂)을 포함하는 항체 구성(format)
- [0165] - scFv-Fc (V_H-V_L-C_H2-C_H3)₂
- [0166] - Fc 도메인 및 하나 이상의 수용체 도메인을 포함하는 Fc 융합 펩타이드
- [0167] 이다.
- [0168] 항체는 또한 이중 특이적(예를 들어, DVD-IgG, crossMAP, 첨부된 IgG - HC 융합) 또는 이중파라토프(biparatopic)일 수 있다. Brinkmann 및 Kontermann (2017)의 개요를 참고한다.
- [0169] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 링커는 둘 이상의 연결 모이어티 B를 갖는다.
- [0170] 이러한 구현예에서, 항체-페이로드 컨주게이트는, 예를 들어, 2개의 페이로드가 각각 Q295 잔기에 컨주게이트된, 2의 항체 대 페이로드의 비율로 생성될 수 있다.
- [0171] 본 발명의 추가 구현예에 따르면, 둘 이상의 연결 모이어티 B는 서로 상이하다.
- [0172] 이러한 구현예에서, 첫 번째 연결 모이어티는, 예를 들어 아자이드(N3)일 수 있는 반면, 두 번째 연결 모이어티는 테트라진일 수 있다. 따라서 이러한 올리고펩타이드 링커는 두 개의 다른 페이로드를 항체의 두 개의 Gln 잔기, 즉 항체의 C_H2도메인의 Q295에 컨주게이트시킬 수 있다.
- [0173] 이러한 방식으로, 2+2의 비율의 항체 페이로드를 얻을 수 있다. 두 번째 페이로드를 사용하면 효율과 효능과 관련하여 현재의 치료법을 넘어서는 완전히 새로운 클래스의 항체 페이로드 컨주게이트가 개발될 수 있다.
- [0174] 이러한 구현예는, 그 중에서도, 예를 들어, DNA 및 미소관(microtubule)과 같은 세포 내 두 개의 상이한 구조를 표적화할 수 있게 한다. 일부 암은, 예를 들어 미소관 독소와 같은 하나의 약물에 대해 내성이 있을 수 있기 때문에, DNA-독소는 여전히 암 세포를 죽일 수 있다.
- [0175] 또 다른 구현예에 따르면, 동시에 및 동일한 조직에서 방출될 때 완전히 강력한 2 가지 약물이 사용될 수 있다. 이는 항체가 건강한 조직에서 부분적으로 분해되거나 하나의 약물이 조기에 손실되는 경우에 표적외 독성을 감소시킬 수 있다.
- [0176] 또한, 이중-표지된 프로브는 비-침습적 이미징 및 치료 또는 수술-중/후 이미징/수술에 사용될 수 있다. 이러한 구현예에서, 비-침습적 이미징 수단에 의해 암 환자를 선택할 수 있다. 그런 다음, 외과 의사 또는 로봇이 모든 암 조직을 식별하는데 도움이 되는 다른 조영제(imaging agent)(예를 들어, 형광 염료)를 사용하여 외과적으로 제거할 수 있다.
- [0177] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 항체-페이로드 컨주게이트는 앞서 언급한 단계 중 어느 하나에 따른 방법으로 생성된 것이 제공된다.
- [0178] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 펩타이드 구조(N>C 방향으로 도시됨)를 갖는 링커가 제공된다:



[0181] - m은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,

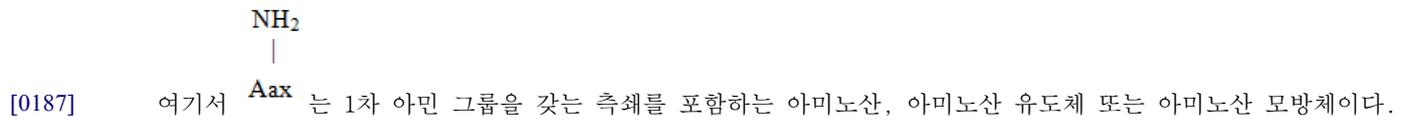
[0182] - n은 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이며,

[0183] - o는 ≥ 0 및 ≤ 12 사이의 정수이고,

[0184] - $m + n + o \geq 0$ 이며,

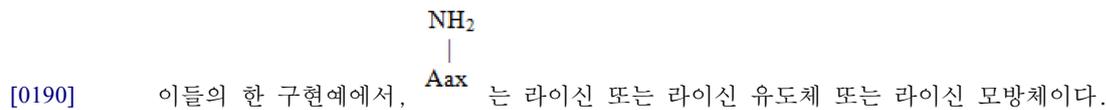
[0185] - Aax는 임의의 자연적 또는 비-자연적으로 발생하는 L- 또는 D-아미노산, 또는 아미노산 유도체 또는 모방체이고, 및

[0186] - B는 페이로드 또는 연결 모이어티이며,



[0188] 일반적으로, 본 발명의 방법에 따라 앞서 논의된 이점 및 구현에는 이 측면, 즉 물질 구성 (composition of matter) 으로서의 링커에도 적용된다. 따라서, 이들 구현에는 물질의 구성으로서 링커와 함께 개시된 것으로 간주된다.

[0189] 본 명세서에 도시된 상이한 링커 펩타이드에서, 달리 도시되더라도, C-말단 및/또는 N-말단은 보호되거나 보호되지 않을 수 있음을 이해하는 것이 중요하다. 보호는 전자의 아미드화, 및/또는 후자의 아세틸화에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 보호된 및 보호되지 않은 링커 펩타이드 둘다 포함된다.



[0191] 추가 구현예에서, 링커는 카텡신 B에 의해 절단될 수 있는 것이 아니고/거나 링커는 발린-알라닌 모티프 또는 발린-시트룰린 모티프를 포함하는 것이 아니고/거나 링커는 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜 유도체를 포함하지 않는다.

[0192] 한 구현예에 따르면, $m + n + o \leq 25$ 이고, 바람직하게 ≤ 20 이며, 보다 바람직하게 ≤ 15 이고, 보다 바람직하게 ≤ 12 이며, 보다 바람직하게 ≤ 10 이고, 보다 바람직하게 ≤ 8 이며, 보다 바람직하게 ≤ 7 이고, 보다 바람직하게 ≤ 6 이며, 보다 바람직하게 ≤ 5 이고, 보다 바람직하게 ≤ 4 이다.

[0193] 한 구현예에 따르면, 연결 모이어티 B는

[0194] - 생체직교적 마커 그룹

[0195] - 가교를 위한 다른 비-생체직교적 엔티티

[0196] 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나 이상이다.

[0197] 한 구현예에 따르면, 생체직교적 마커 그룹 또는 비-생체직교적 엔티티는

[0198] - $-\text{N}-\text{N}=\text{N}$, 또는 $-\text{N}_3$

[0199] - Lys(N_3)

[0200] - 테트라진

[0201] - 알킨

- [0202] - DBCO
- [0203] - BCN
- [0204] - 노보렌
- [0205] - 트랜스사이클로옥텐
- [0206] - -RCOH (알데하이드),
- [0207] - 아실트리플루오로붕산(Acyltrifluoroborates),
- [0208] - -SH, 및/또는
- [0209] - 시스테인
- [0210] 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나 이상이다.
- [0211] 추가의 구현예에서, 링커의 순 전하는 중성 또는 양성이고/이거나, 링커는 음전하 아미노산 잔기를 포함하지 않고/않거나, 링커는 양전하 아미노산을 포함하고/하거나, 링커는
- [0212] - 라이신 또는 라이신 유도체 또는 라이신 모방체,
- [0213] - 알지닌, 및/또는
- [0214] - 히스티딘
- [0215] 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 두 개의 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0216] 한 구현예에 따르면, 1차 아민 그룹은 미생물 트랜스글루타미나제 (MTG)의 기질로서 작용하기에 적합하다.
- [0217] 하나의 추가 구현예에 따르면, 링커는 미생물 트랜스글루타미나제(MTG)의 수단에 의해 항체-페이로드 컨쥬게이트를 생성하기에 적합하다.
- [0218] 하나의 추가 구현예에 따르면, 링커는
- [0219] a) 표 5에 표시된 리스트, 및/또는
- [0220] b) SEQ ID NO 1 - 35 및 38 - 45 중 임의의 것으로부터 선택된다.
- [0221] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 링커-페이로드 구성물이 제공되며, 적어도
- [0222] a) 임의의 상기 설명에 따른 링커, 및
- [0223] b) 하나 이상의 페이로드를 포함하고,
- [0224] 여기서, 상기 구성물에서, 링커 및/또는 페이로드는 공유 또는 비공유 결합이 가능하도록 결합 동안 선택적으로 화학적으로 변형되어 상기 구성물을 형성한다.
- [0225] 둘 이상의 페이로드가 사용되는 경우, 후자는 서로 동일하거나 다른 것일 수 있다.
- [0226] 한 구현예에서, 페이로드는
- [0227] - 독소
- [0228] - 사이토카인
- [0229] - 성장인자
- [0230] - 방사성 핵종
- [0231] - 호르몬
- [0232] - 항바이러스제
- [0233] - 항균제
- [0234] - 형광염료

- [0235] - 면역조절/면역자극제
- [0236] - 반감기 증가 모이어티
- [0237] - 용해도 증가 모이어티
- [0238] - 중합체-독소 컨쥬게이트
- [0239] - 핵산
- [0240] - 비오틴 또는 스트렙타비딘 모이어티
- [0241] - 비타민
- [0242] - 표적 결합 모이어티, 및/또는
- [0243] - 항염제
- [0244] 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나이다.
- [0245] 또 다른 구현예에서, 독소는
- [0246] - 피롤로벤조디아제핀 (PBD)
- [0247] - 아우리스타틴 (예, MMAE, MMAF)
- [0248] - 메이탄시노이드 (메이탄신, DM1, DM4)
- [0249] - 듀오카르마이신
- [0250] - 튜블리신
- [0251] - 엔다이인 (예, 칼리키아마이신)
- [0252] - PNUs, 독소루비신
- [0253] - 피롤-기반 키네신 스피들 단백질(kinesin spindle protein)(KSP) 저해제
- [0254] - 칼리키아마이신
- [0255] - 아마니틴 (예, α -아마니틴), 및/또는
- [0256] - 캄토테신 (예, 엑사테칸, 데록스테칸)
- [0257] 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나이다.
- [0258] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 항체-페이로드 컨쥬게이트가 제공되며,
- [0259] a) 상기 설명에 따른 하나 이상의 링커-페이로드 구성물, 및
- [0260] b) 중쇄 또는 경쇄에 하나 이상의 Gln 잔기를 포함하는 항체를 포함하고,
- [0261] 여기서, 상기 컨쥬게이트에서, 링커-페이로드 구성물 및/또는 항체는 공유 또는 비공유 컨쥬게이션이 가능하도록 컨쥬게이션 동안 선택적으로 화학적으로 변형되어 상기 컨쥬게이트를 형성한다.
- [0262] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 설명에 따른 링커, 상기 설명에 따른 링커-페이로드 구성물, 및/또는 상기 설명에 따른 항체-페이로드 컨쥬게이트를 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0263] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 설명에 따른 항체-페이로드 컨쥬게이트, 또는 상기 설명에 따른 약학 조성물, 및 적어도 하나의 추가의 약제학적으로 허용가능한 성분을 포함하는 의약품이 제공된다.
- [0264] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 종양성 질환, 신경계 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환으로
- [0265] 고통받거나; 진행될 위험이 있거나; 및/또는 진단을 받은 환자의 치료 또는 예방 또는 이러한 증상의 예방을 위한 (의약 제조용) 상기 설명에 따른 약학 조성물 또는 상기 설명에 따른 제품이 제공된다.
- [0266] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 종양성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 설명에 따른 항체-페이로드 컨쥬게이트, 상기 설명에 따른 약학 조성물, 또는 상기 설명에 따른 제품을 이를 필요로

하는 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

- [0267] 염증성 질환은 자가면역 질환일 수 있다. 감염성 질환은 박테리아 감염 또는 바이러스 감염일 수 있다.
- [0268] 상기 컨주게이트 또는 제품은 질병을 효과적으로 치료하는 양 또는 용량으로 인간 또는 동물 개체에 투여된다. 대안적으로, 상응하는 치료 방법을 제공한다.
- [0269] 하기 표 5는 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 상이한 링커, 및 이들의 SEQ ID 번호를 나타낸다. 의심의 여지를 피하기 위해, 전자 WIPO ST 25 서열목록과 일치하지 않는 경우, 이 표의 서열이 올바른 것으로 간주된다.
- [0270] 본 명세서에 도시된 일부 링커 펩타이드에서, C-말단에서 모이어티는 단순히 N₃로 지정됨을 이해하는 것이 중요하다. 그러나, 이는 Lys(N₃)의 약어로 이해되어야 한다. 예를 들어, RAKAR(N₃) 또는 ArgAlaLysAlaArg(N₃)는 실제로 RAK₁ARK₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃), 또는 ArgAlaLysAlaArgLys(N₃)를 의미한다.
- [0271] 또한, 본 명세서에 도시된 상이한 링커 펩타이드에서, 달리 도시되더라도, C-말단 및/또는 N-말단은 보호되거나 보호되지 않을 수 있음을 이해하는 것이 중요하다.
- [0272] 보호는 전자의 아미드화, 및/또는 후자의 아세틸화에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 보호된 및 보호되지 않은 링커 펩타이드 모두 포함된다.
- [0273] 예를 들어, RAKARK(N₃)는 a) 앞서 논의된 바와 같이 보호된 말단 모두, b) 앞서 논의된 바와 같이 보호된 오직 N-말단 또는 C-말단, 또는 c) 보호되지 않은 두 말단을 갖는 4개의 변이체를 포함한다.
- [0274] 반면, NH₂-ArgAlaLysLys(N₃)-COOH는 예를 들어, 보호되지 않은, 즉 보호되지 않은 N- 및 C-말단을 갖는 펩타이드를 분명하게 명시한다.

표 5

도면 No	3 자리 코드	1 자리 코드	연결 모이어티 B	펩타이드 길이	양성 아미노산의 수 (Lys/Arg/His)*	SEQ ID No
트랜스글루타미나제 반응을 위한 1 차 아민을 제공하는 Lys 가 있는 링커(굵은 글씨로 표시)						
2	ArgAla Lys AlaArgLys(N ₃)	RAK ₁ ARK ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	6	3	1
9, 16	ArgAla Lys Lys(N ₃)	RAK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	2
9	ArgAla Lys Xaa(N ₃)	RAKX, 여기서 X = Xaa(N ₃), Xaa 는 4-아지도-호모알라닌(4-Azido-L-homoalanine)	Xaa(N ₃)	4	2	3
9	ArgAla Lys [PEG] ₃ (N ₃)	RAK [PEG] ₃ N ₃ , 여기서 [PEG] ₃ = 트리에틸렌글리콜	N ₃	5	2	4
9	ArgAla Lys Cys	RAKC	Cys-SH	4	2	5
19A	ArgGly Lys Lys(N ₃)	RGK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	6
19A	ArgSer Lys Lys(N ₃)	RSK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	7
19A	ArgHis Lys Lys(N ₃)	RHK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	3	8
19A	AlaHis Lys Lys(N ₃)	AHK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	9
19A	Lys(N ₃)ArgAla Lys Ala Arg	K ₁ RAK ₂ AR 여기서 K ₁ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	6	3	10
19A	ArgLysArgLys(N ₃)	RK ₁ RK ₂ 여기서 K ₁ =	Lys(N ₃)	4	3	11

[0275]

트랜스글루타미나제 반응을 위한 1차 아민을 갖는 Lys를 갖는 링커(굵은 글씨로 표시), N- 및/또는 C-말단은 보호되지 않음						
19B	NH ₂ - ArgAla Lys Lys(N ₃)- COOH	NH ₂ -RAK ₁ K ₂ -COOH 여기서 K ₁ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	
아민산 유도체 또는 모방체(이탈릭체)를 갖는 링커, 트랜스글루타미나제 반응을 위한 1차 아민을 제공하는 Lys(굵은 글씨로 표시)						
18A	ArgβAla Lys Lys(N ₃)	RβAK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	12
18A	HomoArgAla Lys Lys(N ₃)	hRAK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	13
18A	homoArgβAla Lys Lys(N ₃)	hRβAK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	14
트랜스글루타미나제 반응을 위한 1차 아민을 제공하는 Lys 유도체 또는 모방체를 갖는 아미노산을 갖는 링커(굵은 글씨로 표시)						
18B	ArgAla Orn Lys(N ₃), Orn = Ornithine	RAoK, 여기서 K = Lys(N ₃)이고, o = Orn	Lys(N ₃)	4	2	15
18B	ArgAla Dab Lys(N ₃), Dab = α,γ-diaminobutyric acid	RA _d K, 여기서 K = Lys(N ₃)이고, d = Dab	Lys(N ₃)	4	2	16
18B	ArgAla βhLys Lys(N ₃), βhLys = L-βhomolysine ((S)-3,7-Diamino-heptanoic acid)	RABhK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	17
18B	ArgAla homoLys Lys(N ₃) homoLys = homolysine	RAhK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	4	2	18
18C	ArgAla dLys Lys(N ₃).	RAK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ =	Lys(N ₃)	4	2	19

[0276]

이중기능성 링커(Bifunctional linkers)						
7A	ArgAla Lys Lys(N ₃)Arg AlaLys(Tetrazine)	RAK ₁ K ₂ RAK ₃ , 여기서 K ₂ =Lys(N ₃), K ₃ = Lys(Tetrazine)	Lys(N ₃) 및 Lys(Tetrazi ne)	7	3	20
7B	Lys(N ₃)CysArgAla Lys	K ₁ CRACK ₂ 여기서 K ₁ =Lys(N ₃)	Lys(N ₃) , Cys- SH	5	2	21
7C	LysAlaArgCys Lys (N ₃)	K ₁ ARCK ₂ 여기서 K ₂ =Lys(N ₃)	Lys(N ₃) , Cys- SH	5	2	22
8A	Lys(N ₃)ArgAla Lys Ala ArgLys(N ₃)	K ₁ RAK ₂ ARK ₃ , 여기서 K ₁ 및 K ₃ =Lys(N ₃)	Lys(N ₃) (2x)	7	3	23
8B	Lys AlaArgLys(N ₃)Lys(N ₃)	K ₁ ARK ₂ K ₃ ; 여기서 K ₂ 및 K ₃ =Lys(N ₃)	Lys(N ₃) (2x)	5	2	24
트랜스글루타미나제 반응을 위한 1 차 아민을 제공하는 Lys 를 갖는 다른 링커(굵은 글씨로 표시)						
20	ArgLys(N ₃) Lys	RK ₁ K ₂ , 여기서 K ₁ =Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	3	2	38**
20	Lys Lys(N ₃)	K ₁ K ₂	Lys(N ₃)	2	1	39**
20	Lys Cys	KC	Cys- SH	2	1	40**
	Arg Lys Arg-B	RKR		3	3	41**
	ArgHis Lys -B	RHK		3	3	42**
	ArgAlaAlaArg Lys -B	RAARK		5	3	25
	Lys TyrArg -B	KYR		3	2	43**
	ArgArg Lys AlaTyr-B	RRKAY		5	3	26

[0277]

	ArgArgLysAsnTyr-B	RRKNY		5	3	27
	LysAlaArgAlaArg-B	KARAR		5	3	28
	LysAlaArgAla-B	KARA		4	2	29
	ArgAlaLysAlaArg-B	RAKAR		5	3	30
	AlaTyrAlaLys-B	AYAK		4	1	31
	ArgAlaLysAlaArgGly Lys-B	RAKARGK		7	4	32
	ArgAlaLysLysAsnArg AlaLys-B	RAKKNRAK		8	5	33
	AsnLysAlaLeuLysAla Pro-B	NKALKAP		7	2	34
	AspGlyValGluLysAsn AlaLysThrLysProArg- B	DGVEKNAKTKPR		12	4	35
	ArgAlaLys-B	RAK		3	2	44**
	LysAlaArg-B	KAR		3	2	45**
	LysAlaHis-B	KAH		3	2	46
	LysHisAla-B	KHA		3	2	47
	LysGlyHis-B	KGH		3	2	47
	LysHisGly-B	KHG		3	2	48
	LysAlaAla-B	KAA		3	1	49
	LysAlaSer-B	KAS		3	1	50
	LysSerAla-B	KSA		3	1	51
	LysSerArg-B	KSR		3	2	52
	LysArgSer-B	KRS		3	2	53
	LysHisArg-B	KHR		3	2	54
	LysArgHis-B	KRH		3	2	55
	LysArgTyr-B	KRY		3	2	56
	LysTyrArg-B	KYR		3	2	57
	LysGlyAla-B	KGGA		3	1	58
	LysAlaGly-B	KAG		3	1	59
	LysSerGly-B	KSG		3	1	60

	LysGlySer-B	KGS		3	1	61
	LysAlaAsn-B	KAN		3	1	61

[0278]

[0279]

[0280]

[0281]

[0282]

[0283]

[0284]

* Lys(N3)는 양전하 아미노산으로 적합하지 않음

** 최대 3 AA의 길이로 인해 이들 링커는 전자서열목록에 언급되지 않음

실시예

본 발명이 도면 및 기술한 설명에 상세하게 예시되고 기술되었지만, 이러한 예시 및 설명은 서술적이거나 예시적인 것으로 제한되지 않는 것으로 이해되고; 본 발명은 개시된 구현예들에 제한되지 않는다. 개시된 구현예에 대한 다른 변형은 도면, 개시 및 첨부된 청구범위의 연구로부터 청구된 발명을 실시함에 있어서 당업자에 의해 이해되고 달성될 수 있다. 청구범위에서, 단어 "포함하는(comprising)"은 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않으며, 부정 관사 "한(a)" 또는 "한(an)"은 복수를 배제하지 않는다. 특정 수단들이 서로 다른 종속항들에서 인용된다는 사실은 이러한 수단들의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것을 나타내지 않는다. 청구범위의 임의의 참고 부호는 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

본 명세서에 개시된 모든 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단으로 나타내고; 본 명세서에 개시된 모든 핵산은 5'→3'으로 나타낸다.

[0285] **실시예 1: 펩타이드를 포함하는 Lys에 적합한 링커 라이브러리의 스크리닝**

[0286] 본 명세서에 논의된 바와 같이 미생물 트랜스글루타미나제의 수단에 의해 천연 항체의 Q295에 정량적 컨쥬게이션(즉, >95%)을 달성하기에 적합한 올리고펩타이드 구조를 확인하기 위해, 3개의 라이신-함유 올리고펩타이드 라이브러리를 스크리닝했다. 라이브러리 1의 펩타이드는 Caporale et al., 2015에서 일부 과생했지만, 자체 라이브러리도 설계하였으며, 라이브러리 2 및 3은 이전 라이브러리에 대한 지식을 바탕으로 생성 및 개발하였다. 당화된 IgG(IgG1)를 기준 항체로서 사용하였다.

[0287] 반응 조건은 다음과 같다: 1 mg/mL의 천연 인간화 IgG1 기준 항체, 항체에 대하여 80 몰의 과량의 펩타이드, 6 - 12 U/ml MTG, 20시간, 37°C, pH 7.6의 버퍼. 반응 혼합물을 LC-MS-ESI (LCT-Premier, Waters, Milford, United States)에서 분석하였다. 분석을 위해, 항체-컨쥬게이트를 50mM DTT로 환원시켜(37°C에서 15분), 중쇄로부터 경쇄를 분리시켰다. 이는 액체 크로마토그래피(LC)와 Aeris WIDEPORE XB-C18컬럼(3.6µm, 100mm x 2.1mm; Phenomenex, USA)를 사용하여, 80°C의 컬럼 온도에서, 하기 표 6에 나타낸 LC-구배(LC-gradient)를 적용하여 달성되었다.

표 6

시간 [min]	수분 [%]	아세트나이트릴 [%]	2-프로판올 [%]	곡선
0	90	10	0	시작점
3	70	25	5	직선
15	58	37	5	직선
20	5	90	5	직선

[0289] 얻은 MS 스펙트럼을 MassLynx V4.1를 사용하여 분석하였고, MaxEnt1 알고리즘을 사용하여 피크를 디콘볼루션하였다(deconvoluted). 컨쥬게이션 비율 R_c를 다음과 같이 계산하였다:

[0290] R_c =

$$\frac{\Sigma (\text{intensity of conjugated peaks})}{\Sigma (\text{intensity of unconjugated peaks}) + \Sigma (\text{intensity of conjugated peaks})} \quad (1)$$

[0292] 도 3은 3개의 라이브러리 스크리닝 결과를 도시한다. 양전하 아미노산은 컨쥬게이션 반응을 선호하는 반면, 음전하 아미노산은 종종 컨쥬게이션 반응을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 음전하 아미노산은 양전하 아미노산의 도입에 의해 균형을 이룰 수 있다. 이와 같이, 트랜스글루타미나제 효소는 이러한 펩타이드를 수용한다.

[0293] 이들 펩타이드는 기능적이지 않으며, 즉 링커 모이어티, 예를 들어 생체직교적 그룹을 가지지 않지만, 단지 가장 높은 효율로 컨쥬게이트된 라이신-함유 펩타이드를 찾는데 사용되었다.

[0294] 하전된 올리고펩타이드 구조가 비-탈당화된(=천연) 항체의 Q295에 효율적으로 컨쥬게이트될 수 있다는 사실은 유리한데, 이는 피롤로벤조디아제핀-독소(pyrrolobenzodiazepine-toxins) (PBD-독소)와 같은 극소수성인 페이로드도 부착시킬 수 있고, 폴리(에틸렌글리콜)에 기반한 친수성이 제한된 저분자량 기질에 비해 응집 가능성이 최소화된 용액에 효과적으로 유지시킬 수 있기 때문이다.

[0295] **실시예 2: 세포 독성 분석**

[0296] 세포주 및 배양: MDA-MB-231, 및 SK-BR-3를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 얻었고, 표준 세포-배양 프로토콜에 따라 RPMI-1640에서 배양하였다.

[0297] SK-BR-3은 1970년에 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center에 의해 분리된 유방암 세포주이고, 이는 치료 연구, 특히 HER2 표적화와 관련하여 사용되었다. MDA-MB231 세포는 "기저(basal)" 타입의 인간 유방 선암종으로부터 유래되고, 삼중 음성(ER, PR 및 HER2 음성)이다. Adcetris(브렌투시맙 베도틴)는 CD30을 표적으로 하는 상업적으로 이용가능한 항체 약물 컨쥬게이트이고, 따라서 CD30을 발현하지 않는 세포, 즉 MDA-MB-231, 및 SK-BR-3에 대해 활성이 없을 것으로 예상된다. Kadcyla(트라스투주맙 엠탄신)은 Her2를 표적으로 하는 상업적으로 이용가능한 항체 약물 컨쥬게이트이고, 따라서 Her2를 발현하는 세포(예를 들어, SK-BR-3)에 대해 활성이 있을 것으로 예상되며, Her2를 발현하지 않는 세포(예를 들어, MDA-MB-231)에 대해 활성이 없을 것으로 예상된다. ADC(내부)는 비-탈당화된 항체를 사용하여, 본 명세서에 특정된 바와 같은 링커 기술로 생산된 항체 약물 컨쥬게이

트이고, 약물 대 항체 비율이 2인 2개의 엠탄신(DM-1) 분자를 갖는 Her2를 표적화한다. 항-HER2 mAb는 Her2를 표적으로 하는, 비-탈당화된, 컨쥬게이트되지 않은 항체이다.

[0298] 세포 독성 분석: 세포를 웰 당 10,000의 밀도로 96웰 플레이트(흰 벽, 투명하고 평평한 바닥 플레이트)에 시딩하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새 배양하였다. 단일클론항체(mAbs)와 항체-약물 컨쥬게이트(ADCs)를 배지에서 10 µg/mL (66.7 nM)의 시작 농도에서 1:4로 연속 희석하였다. 세포로부터 배지를 제거하고, mAb/ADC 희석액을 첨가하였다. 배지로 처리된 세포를 100% 생존력에 대한 기준으로만 사용하였다. 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 3일동안 항체와 함께 배양하였다.

[0299] 세포 생존력은 제조사의 지시에 따라 여기에 간략하게 설명된 바와 같이 Cell Titer-Glo[®] (Promega)에 의해 평가되었다. 플레이트를 30분동안 실온으로 평형화시켰다. Cell Titer-Glo[®] 시약은 Cell Titer-Glo 버퍼를 기질에 첨가하여 제조하였다. Cell Titer-Glo[®] 시약을 웰 당 50 µL로 첨가하고, 2분동안 진탕시키면서 실온에서 배양한 후, 실온에서 30분동안 추가로 배양하였다. 누적 시간(integration time) 1초를 사용하여 Perkin Elmer 2030 Multilabel Reader Victor[™] X3 plate reader에서 발광을 검출하였다.

[0300] 데이터는 다음과 같이 처리되었다: 배지 만을 처리한 웰의 발광 값을 평균화하고, 100% 생존력에 대한 기준으로 사용하였다. 처리된 웰의 mAb/ADC의 생존율은 다음 식을 사용하여 계산되었다:

[0301]
$$\% \text{ viability} = \left(\frac{\text{Luminescence of treated well}}{\text{Average luminescence of media treated wells}} \right) * 100\%$$

[0302] mAb/ADC 농도의 로그 대 정규화된 생존율을 플롯팅하고 데이터를 GraphPad Prism 7.00를 사용하여 맞추었다.

[0303] 도 22에서 볼 수 있는 바와 같이, ADC(내부)는 Kadcyla와 같이 SK-BR3 세포에 대해 동일한 효능을 갖는다. 따라서, 새로운 링커 기술(제조 용이성, 부위 특이성, 안정한 화학량론, 항체의 탈당화 불필요)에 의해 제공되는 이 점은 세포 독성과 관련하여 어떠한 단점도 갖지 못한다. ADC(내부)는 2의 DAR을 갖는 반면, Kadcyla는 GraphPad Prism 7.00의 평균 DAR을 가지므로, 더 중요하다. 따라서 표적 세포에 더 많은 독소를 전달할 수 있다.

[0304] **실시예 3: 부위-특이적으로 컨쥬게이트된 IgG1 항체의 제조**

[0305] 컨쥬게이션 후 고유 상태로 유지되는 부위-특이적으로 컨쥬게이트된 IgG1 항체의 제조(도 10-12). 하기 컨쥬게이션 조건이 사용되었다: 표준 버퍼(1 mg/mL 최종 농도) 내 천연 IgG1, 80 당량의 아자이드-함유 펩타이드, 12 U/mL의 미생물 트랜스글루타미나제, pH 7.6의 버퍼 (25°C), 37°C에서 20시간 배양. 이어서 컨쥬게이트된 항체를 PD10 컬럼을 사용하여 정제한 다음 Amicon Ultra-4 50 kDa 필터에서 원심분리 단계를 수행하였다. 이어서, DMSO에 용해된, 10 eq DBCO-PEG4-5/6-FAM-염료 또는 10 eq DBCO-PEG4-5/6-카르복시로다민-염료를 암실에서 RT에서 4시간동안의 클릭 반응을 위해 첨가하였다. pH 7.6의 버퍼 및 50 kDa Amicon을 사용하여 반복적 세정 단계로 세척하였다. 항체 농도를 UV-VIS 분광법으로 결정하였다. 컨쥬게이션 정량화는 Aeris WIDEPORE XBC18 컬럼 및 실시예 1에 언급된 조건을 사용하여, LC-MS로 수행하였다.

[0306] **실시예 4: 유세포 분석 실험**

[0307] SKOV3ip 세포(대략. 15 * 10⁶)를 10 mL의 PBS(37°C)로 세척하였다. 상층액을 버리고 2.5 mL의 Accutase를 첨가하여 37°C에서 10-30분동안 표면으로부터 세포를 용해시켰다. 추가의 7.5 mL의 PBS로, 세포를 부드럽게 피펫-혼합하고, 15 mL의 팔콘 튜브로 옮겼다. Neubauer 세포 계수 챔버로 세포를 계수하였다. 팔콘 튜브를 1000 g에서 5분동안 원심분리하고, 상층액을 버린 후 세포 펠렛을 빙냉 FACS 버퍼(PBS + 3 % FCS)로 재현탁하였다. 사용된 버퍼의 양은 100 µL의 시료 당 500'000 세포의 농도에 해당한다. 이제부터는 얼음 위에서 실험하였다. 100 µL의 세포를 96 웰 플레이트에서 대조군 웰에 분취하였다. 5 µg의 인간 IgG1를 첨가하고 피펫팅으로 조심스럽게 혼합하였다. 세포가 있는 96-웰 플레이트 전체를 부드럽게 흔들면서 30분동안 배양하였다. 15분동안 배양한 후, 피펫-혼합 단계를 수행하였다. 그런 다음, 추가의 100 µL의 FACS-버퍼를 웰에 추가하고, 세포를 4°C에서 예비 냉각된 원심분리기로 5분/500g으로 펠렛화하였다. 상층액을 버리고, 세포를 200 µL의 FACS 버퍼로 부드럽게 재현탁시켰다. 세포를 다시 펠렛화하고, 세척 절차를 1회 이상 반복하였다. 이어서, 세포를 재현탁하는데 100 µL의 FACS 버퍼를 사용하고, 1 µL의 2차 염소 항-인간 IgG-FITC(1:75 희석, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 첨가하였다. 나머지 다른 웰에는 100 µL의 세포가 제공되었다. 대조군 웰은 세포만 함유한 반면, 시료 웰에는 5 µg에 반응하는 항체(이소타입 IgG1 대조군을 포함하는 컨쥬게이트된 및 클릭된 IgG1)가 제공되었다. 30분 배양 단

계 및 모든 세척 단계를 앞서 기술한 대로 수행하였다. 제 2 세척 단계 후, 120 μ L의 FACS 버퍼를 사용하여 펠렛을 재현탁하여 Guava easyCyte 유세포 분석기(Merck-Millipore, Switzerland)로 유세포 분석을 수행하였다. 데이터는 FlowJo software (TreeStar Inc, USA)로 분석하였다. 결과를 도 13에 나타내었다.

[0308] 실시예 5: 컨쥬게이션 효율

[0309] 제조사의 지침에 따라 펩타이드를 수득하고, 적절한 스톱 농도(예를 들어, 25 mM)로 용해시켰으며, 분취량을 제조하고 -20°C에서 보관하였다. IgG-서브 클래스의 2개의 항체(항체 1: 항 Her2 IgG1, 항체 2: 항 CD38 IgG1)를 다음과 같이 변형시켰다: 1 mg/mL의 비-탈당화된 항체(~6.67 μ M)를 80 몰 당량의 펩타이드 링커(즉, ~533 μ M), 6 U/mL의 MTG 및 버퍼와 혼합하였다. 반응 혼합물을 37°C에서 20시간동안 배양한 후, 환원 조건 하에서 LC-MS 분석을 수행하였다. Lys(N3)-RAKAR-Lys(N3)를 위해, 12 U/mL의 MTG가 사용되었다.

[0310] 다음의 표는 본 발명에 따른 일부 예시적인 링커의 컨쥬게이션 효율을 나타낸다:

도면 No	3 자리 코드	1 자리 코드	컨쥬게이션 효율 (%)	항체의 Q295 에 대한 컨쥬게이션 효율		펩타이드 링커 수	양성 아미노산 수
				1	2		
2	ArgAlaLysAlaArgLys(N ₃)	RAK ₁ ARK ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	84 %	82%	6	3
9, 16	ArgAlaLysLys(N ₃)	RAK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	90%	90%	4	2
19A	ArgGlyLysLys(N ₃)	RGK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	92%		4	2
19A	ArgSerLysLys(N ₃)	RSK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	91%		4	2
19A	ArgHisLysLys(N ₃)	RHK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	88%		4	2
19A	AlaHisLysLys(N ₃)	AHK ₁ K ₂ , 여기서 K ₂ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	92%		4	2
19A	Lys(N ₃)ArgAlaLysAlaArg	K ₁ RAK ₂ AR 여기서 K ₁ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	83%		6	3
19B	NH ₂ -ArgAlaLysLys(N ₃)-COOH	NH ₂ -RAK ₁ K ₂ -COOH 여기서 K ₁ = Lys(N ₃)	Lys(N ₃)	93%		4	2
7B	Lys(N ₃)CysArgAlaLys	K ₁ CRAK ₂ 여기서 K ₁ =Lys(N ₃)	Lys(N ₃), Cys-SH	85%		5	2
8A	Lys(N ₃)ArgAlaLysAlaArgLys(N ₃)	K ₁ RAK ₂ ARK ₃ , 여기서 K ₁ 및 K ₃ =Lys(N ₃)	Lys(N ₃) (2x)	70%		7	3

[0311]

[0312] 음성 비교로서, 본 발명에 따르지 않는 3개의 링커를 사용하였다.

링커	약어		항체의 Q295 에 대한 컨쥬게이션 효율 1 / 2	
NH ₂ -(PEG) ₃ -TCO	TCO	Spycher et al., ChemBioChem, 2017	18	10
NH ₂ -(PEG) ₃ -N ₃	PEGA	Lhospice et al., Mol Pharm, 2015 Dennler et al., Bioconj Chem, 2014	20	21
Biotin cadaverine	BC	Dennler et al., Bioconj Chem, 2014	16	20

[0313]

[0314] 이들 링커 중 어느 것도 아미노산 측쇄 상에 1차 아민 그룹을 제공하지 않으므로, 비-탈당화된 항체에 대한 컨쥬게이션은 발생하지 않았다.

[0315] **실시예 6: 이중-페이로드 컨쥬게이션 및 세포-결합 연구**

[0316] 6.1. 이중-기능화된 인간화 IgG1 제조

[0317] IgG1 항체를 37°C에서 24시간동안 pH 7.6의 버퍼에서 80 eq의, 펩타이드 NH₂-K(N₃)CRAK-COOH 및 6 U MTG/mg 항체와 함께 배양하였다. 컨쥬게이트된 항체를 Superdex 16/600 HiLoad 200 컬럼에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 과량의 링커 및 MTG 효소로부터 정제하였다. 분획을 Amicon Ultra 원심분리 필터 유닛 30 MWCO에서 농축시켰다. 이어서 항체-링커 컨쥬게이트를 30eq의 디티오프레이트(Dithiothreitol, DTT)로 환원시키고, 정제한다음, 8°C에서 1시간동안 10 당량의 데하이드로아스코르브산(dehydroascorbic acid)에 노출시켰다. 30 MWCO의 Amicon 필터 튜브를 사용하여 기술된 바와 같이 또 다른 세척 단계를 3회 수행하였다. 이어서 항체-컨쥬게이트 시료를 20 당량의 말레이미드-NODAGA와 함께 배양하고, 8°C에서 밤새 두었다. 과량의 링커를 제거하기 위한 Amicon-세척 후, 시료를 20 당량의 DBCO-PEG4-Ahx-DM1과 함께 4시간동안 배양하였다. 정제 후, 시료를 LC-MS로 분석하였다. 결과를 도 23A 및 23B에 나타내었다.

[0318] 6.2. 항체 표지화 및 세포-결합 연구(세포 결합능 분석(Lindmo-Assay))

[0319] 70 μl 기능화된 항체(1.3 mg/mL)는 15 μL 인듐(Indium)-111 (¹¹¹In) (7.7 MBq), 15 μL 및 30 μL의 암모늄 카보네이트 0.5 M에 제공되었다. 혼합물을 1시간동안 37°C에서 배양한 후, Amicon 30 MWCO로 6회 세척하였다. T150 플라스크에서 표적 발현 세포를 먼저 10 mL PBS로 세척하고, 37°C에서 10 mL PBS + 1 mM EDTA로 분리하였다. 10 mL의 완전한 세포 배양 배지를 첨가하고, 세포를 팔콘 튜브로 5분동안 1000 rpm으로 원심분리하였다. 이어서 세포를 PBS로 세척하고, PBS + 1% BSA에 4 * 10⁶ cells / 0.5 mL의 스톱 용액에 현탁시켰다. 세포를 다음 단계를 위해 얼음 위에 두었다. 튜브에서 0.5 mL에서 0.25 Mio 세포로부터 4 Mio 세포까지 5개의 세포 희석액(3중으로)을 만들었다. 50 μL의 표지된 항체(25'000 cpm으로 표준)를 각 튜브에 첨가하였다. 비-특이적 결합을 위한 대조군에는 먼저 15 μg의 표지되지 않은 천연 IgG1-항체가 제공되었다. 튜브를 37°C 및 220 rpm으로 30분 동안 배양하였다. 이어서, 2 mL의 빙냉 PBS + 1 % BSA를 첨가하고, 시료를 4°C에서 1500 rpm으로 5분동안 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 또 다른 2 mL의 PBS + 1 % BSA를 첨가하였다. 이어서 원심분리 단계를 반복하였다. 상층액을 제거한 후, 시료를 감마 카운터(Gamma counter)로 측정하였다. 결과는 이중-표지된 ADC(말레이미드-NODAGA 및 DBCO-PEG4-Ahx-DM1로 컨쥬게이트된)가 여전히 결합 특이성을 유지하고, 효율적으로 인듐-111로 표지될 수 있음을 나타낸다. 결과를 도 24A 및 24B에 나타내었다.

[0320] **실시예 7: Ac-RβAK(N₃)-NH₂ (Ac-ArgβAlaLys(N₃)-NH₂)(즉, 측쇄 상에 1차 아민을 갖는 아미노산을 함유하지 않는 링커)의 인간화 IgG1에 대한 컨쥬게이션 대조군**

[0321] 컨쥬게이션은 실시예 5에서 상술한 바와 같이 수행되었다. LC-MS 분석 후에, 항체 중쇄의 변형은, 예상한대로 검출될 수 없었다. 이는 MTG가, 예를 들어 라이신 잔기, 또는 라이신 유사체 또는 모방체의 1차 아민과 선택적으로 반응함을 나타낸다. 그러나, 알지닌의 측쇄 상의 아민 그룹은 구아니딘 그룹의 일부이고, 따라서 본 발명의 의미에서 1차 아민이 아니다. 결과적으로, 비-탈당화된 항체에 대한 컨쥬게이션은 발생하지 않았다. 결과들도 25에 나타내었다.

- [0322] **실시예 8: 인간 IgG4 항체에 대한 컨쥬게이션**
- [0323] 표준 컨쥬게이션 프로토콜에 따라 Ac-RAKAR-NH₂ 펩타이드를 사용하여 인간 IgG4 항체를 배양하였다. LC-MS 분석은 컨쥬게이션 후 IgG4가 중쇄의 단일 잔기에서만 선택적으로 변형되었음을 나타내었다. 결과를 도 26A, 26B 및 26C에 나타내었다.
- [0324] **실시예 9: 인간화 IgG1로부터 ADC 제조 후 LC-MS**
- [0325] 3.9 mg/ml의 인간화 IgG1 항체를 37°C에서 pH 7.6의 버퍼 내에서 2.4U/mg의 항체 MTG 및 80eq의 Ac-RAK-Lys(N₃)-NH₂ 와 함께 배양하고, 배양 후 >98%의 컨쥬게이션 비율을 달성하였다. 과량의 링커 및 MTG를 제거하기 위한 크기-배제 크로마토그래피 후, 시료를 농축하고 19시간동안 10eq의 DBCO-PEG4-Ahx-DM1로 반응시키고 정제하여 >98%의 클릭킹 효율을 달성하였다. 각 단계 후, LC-MS를 수행하여 ADC 단계별 조립을 보여주었다. 모든 단계에서 중쇄의 변형은 검출되지 않았다. 결과를 도 27A, 27B 및 27C에 나타내었다.
- [0326] **실시예 10: SEC-MALS 실험**
- [0327] 항체 및 항체 컨쥬게이트(허셉틴, 청구된 링커 기술을 사용하는 항-HER2-mAb-링커 구성물, 청구된 링커 기술을 사용하는 항-HER2-mAb-링커 DM1 컨쥬게이트(본 명세서의 다른 곳에서는 내부 ADC라고 함), 및 Kadcylla[®])를 실온에서 3시간동안 버퍼 A(버퍼 A: 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl)에 대해 투석시켰다. 이어서, 투석 버퍼를 0.1 μm 필터를 통해 여과하였다. 안정적인 광 산란 기준선이 달성될 때까지 여과된 투석 버퍼로 실온에서 밤새 Superdex[®] 200 Increase 10/300 GL 컬럼을 평형화시켰다. 시료를 투석 버퍼 A에서 4 mg/ml로 희석하고, 크기 배제 컬럼 상에 30 μL를 로딩하기 전에 5분동안 13000 RPM에서 원심분리하여 제조하였다. 유속을 0.5 mL/min으로 설정하고, 광 산란 및 굴절률을 각각 Wyatt Technologies MiniDAWN TREOS 및 optilab-t-rex detectors로 모니터링하였다. 기준선 보정 및 데이터 분석을 위해 ASTRA 크로마토그래피 소프트웨어를 사용하였다.
- [0328] 결과는 도 28A - D에 도시되어 있다. 내부 ADC는 광 산란(light scattering) 실험(SEC, 피크 선)과 다중 각도 광 산란(multi angle light scattering)(MALS) 실험(중간의 경사 선)에 잘 정의되어 있음을 알 수 있다. 두 값 모두 네이키드(naked) 허셉틴과 비교할 수 있고, 단편 또는 응집체가 없는 것으로 나타났다. 따라서, 본 링커 기술은 간단한 단계에서 매우 순도 높은 제품을 제공한다. 이와 대조적으로, 말레이미드 화학의 수단에 의해 컨쥬게이트된 Kadcylla는 더 넓은 피크를 가지며, 더 많은 단편 및 응집체를 나타낸다.
- [0329] **참고문헌:**
- [0330] Dorywalska et al (2015), Site-Dependent Degradation of a Non-Cleavable Auristatin-Based Linker-Payload in Rodent Plasma and Its Effect on ADC Efficacy. PLoS ONE 10(7): e0132282
- [0331] Dorywalska, M.; et al., Effect of Attachment Site on Stability of Cleavable Antibody Drug Conjugates. Bioconjugate Chemistry 2015, 26 (4), 650-659.
- [0332] van Geel et al (2015), Chemoenzymatic Conjugation of Toxic Payloads to the Globally Conserved N-Glycan of Native mAbs Provides Homogeneous and Highly Efficacious Antibody-Drug Conjugates Bioconjugate Chem, 26 (11), pp 2233-2242
- [0333] Sletten, et al., From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. Accounts of Chemical Research 2011, 44 (9), 666-676.
- [0334] Stokmann et al (2011). "Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules". Organic & Biomolecular Chemistry. 9 (21): 7303.
- [0335] Blackman et al (2008). "The Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation based on Inverse-electron-demand Diels-Alder Reactivity". Journal of the American Chemical Society. 130 (41): 13518-9.
- [0336] Yarema, et al (1998). "Metabolic Delivery of Ketone Groups to Sialic Acid Residues. Application To Cell Surface Glycoform Engineering". Journal of Biological Chemistry. 273 (47): 31168-79.
- [0337] Ning et al (2010). "Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition". Angewandte Chemie International Edition. 49 (17): 3065.

- [0338] Sletten, et al., A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation. *J Am Chem Soc* 2011, 133 (44), 17570-17573.
- [0339] Baskin et al (2007). "Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (43): 16793-7.
- [0340] MacKenzie, DA; Sherratt, AR; Chigrinova, M; Cheung, LL; Pezacki, JP (Aug 2014). "Strain-promoted cycloadditions involving nitrones and alkynes—rapid tunable reactions for bioorthogonal labeling". *Curr Opin Chem Biol*. **21**: 81-8.
- [0341] Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. (2006). "A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides". *ACS Chem. Biol.* **1**: 644-648
- [0342] Kolb, H.C.; Sharpless, B.K. (2003). "The growing impact of click chemistry on drug discovery". *Drug Discov Today*. **8** (24): 1128-1137.
- [0343] Lhospice et al., Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-Cd30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models, *Mol Pharm* 12 (6), 1863-1871. 2015
- [0344] Jeger et al, Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010 Dec 17;49(51):9995-7
- [0345] Strop, et al., Versatility of Microbial Transglutaminase. *Bioconjugate Chemistry* 2014, 25 (5), 855-862.
- [0346] Spycher et al., Dual Site-Specifically Modified Antibodies With Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase. *Chembiochem*. 2017 Aug 03; 18(19): 1923-1927
- [0347] Dennler et al., Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates. *Bioconjug Chem*. 2014 Mar 19;25(3):569-78
- [0348] Dennler et al. Microbial transglutaminase and c-myc-tag: a strong couple for the functionalization of antibody-like protein scaffolds from discovery platforms. *Chembiochem*. 2015 Mar 23;16(5):861-7
- [0349] Mindt, et al., Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase. *Bioconjugate chemistry* 2008, 19 (1), 271-8.
- [0350] Azhdarinia, et al., Dual-labeling strategies for nuclear and fluorescence molecular imaging: a review and analysis. *Mol Imaging Biol* 2012, 14 (3), 261-76.
- [0351] Dubowchik et al., Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjug Chem*. 2002 Jul-Aug; 13(4):855-69.
- [0352] Zheng, et al., The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *Mabs-Austin* 2011, 3 (6), 568-576.
- [0353] Subedi, et al., The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure* 2015, 23 (9), 1573-1583.
- [0354] Caporale, et al., The LQSP tetrapeptide is a new highly efficient substrate of microbial transglutaminase for the site-specific derivatization of peptides and proteins. *Biotechnol J* 2015, 10 (1), 154-161.
- [0355] Kieliszek and Misiewicz, *Folia Microbiol (Praha)*. 2014; 59(3): 241-250
- [0356] Brinkmann and Kontermann, The making of bispecific antibodies. *MAbs*. 2017 Feb-Mar; 9(2): 182-212.
- [0357] Azhdarinia A. et al., Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. *Mol Imaging Biol*. 2012 Jun; 14(3): 261-276.
- [0358] Houghton JL. et al., Site-specifically labeled CA19.9-targeted immunoconjugates for the PET, NIRF, and multimodal PET/NIRF imaging of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 29;112(52):15850-

5

[0359] Levensgood M. et al., Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody-Drug Conjugates *Angewandte Chemie*, Volume56, Issue3, January 16, 2017

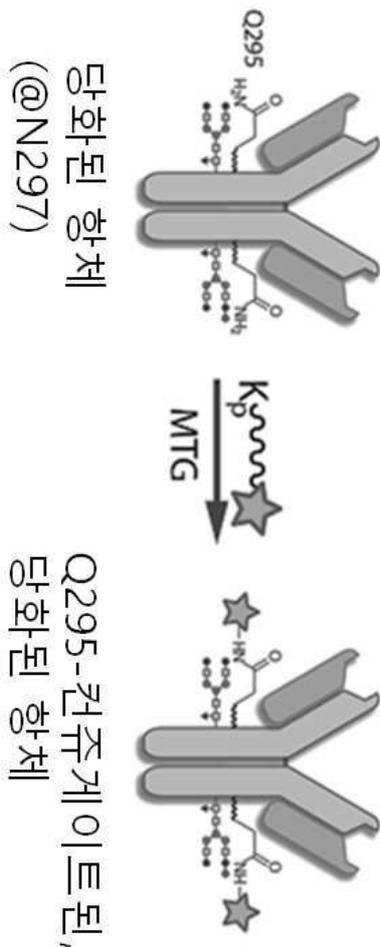
[0360] **권리포기(Disclaimer)**

[0361] 본 명세서에 도시된 일부 링커 펩타이드에서, C-말단에서 모이어티는 단순히 N₃으로 지정됨을 이해하는 것이 중요하다. 그러나, 이는 Lys(N₃)의 약어로 이해되어야 한다. 예를 들어, RAKAR(N₃) 또는 ArgAlaLysAlaArg(N₃)는 실제로 RAK₁ARK₂, 여기서 K₂ = Lys(N₃), 또는 ArgAlaLysAlaArgLys(N₃)를 의미한다.

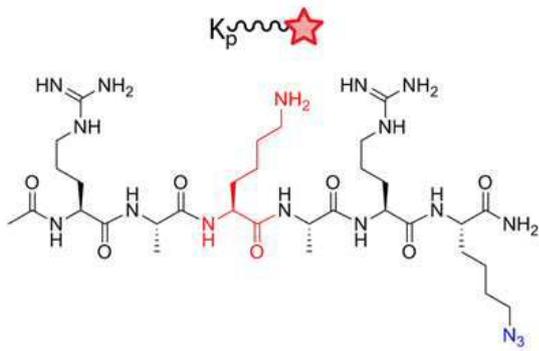
[0362] 또한, 본 명세서에 도시된 다른 링커 펩타이드에서, 달리 도시되더라도, C-말단 및/또는 N-말단은 보호되거나 보호되지 않을 수 있음을 이해하는 것이 중요하다. 보호는 전자의 아미드화, 및/또는 후자의 아세틸화에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 보호된 및 보호되지 않은 링커 펩타이드 둘다 포함된다. 예를 들어, RAKARK(N₃)는 a) 상기 논의된 바와 같이 보호된 말단 둘다, b) 상기 논의된 바와 같이 보호된 오직 N-말단 또는 C-말단, 또는 c) 보호되지 않은 두 말단을 갖는 4개의 변이체를 포함한다.

도면

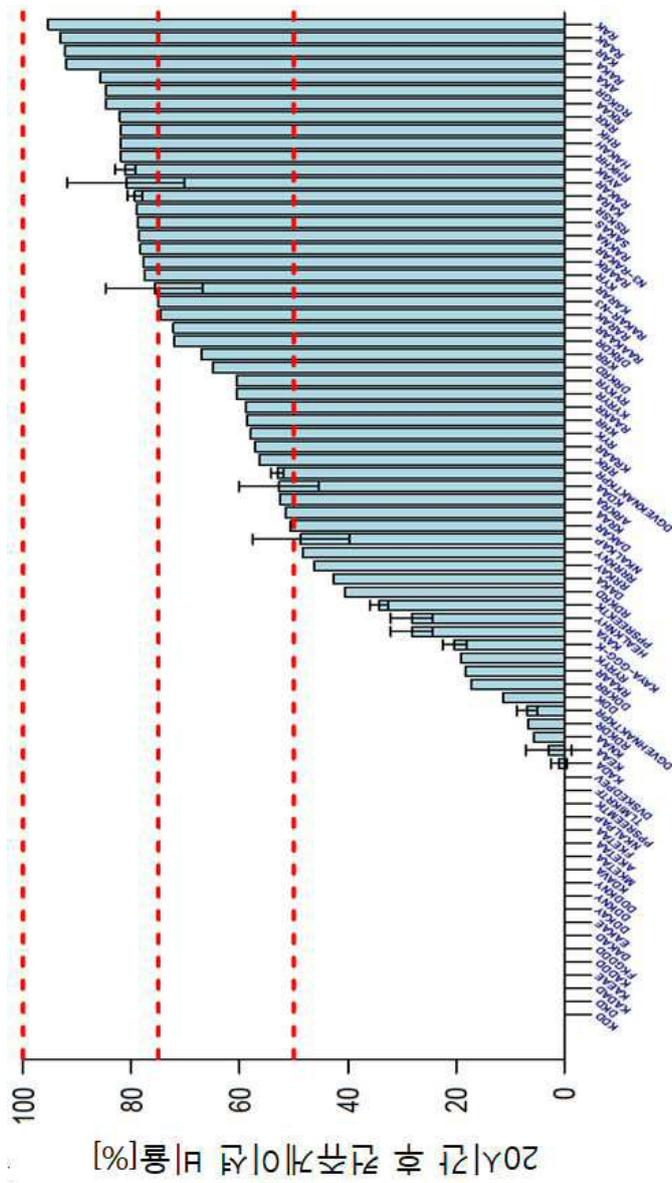
도면1



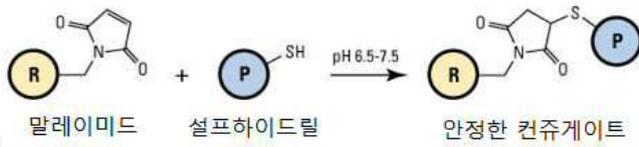
도면2



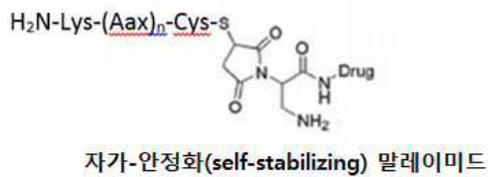
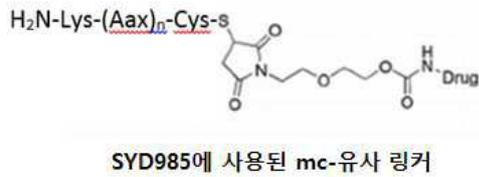
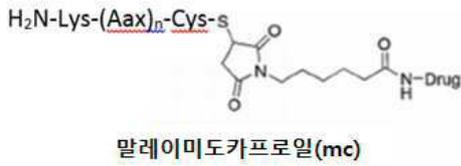
도면3



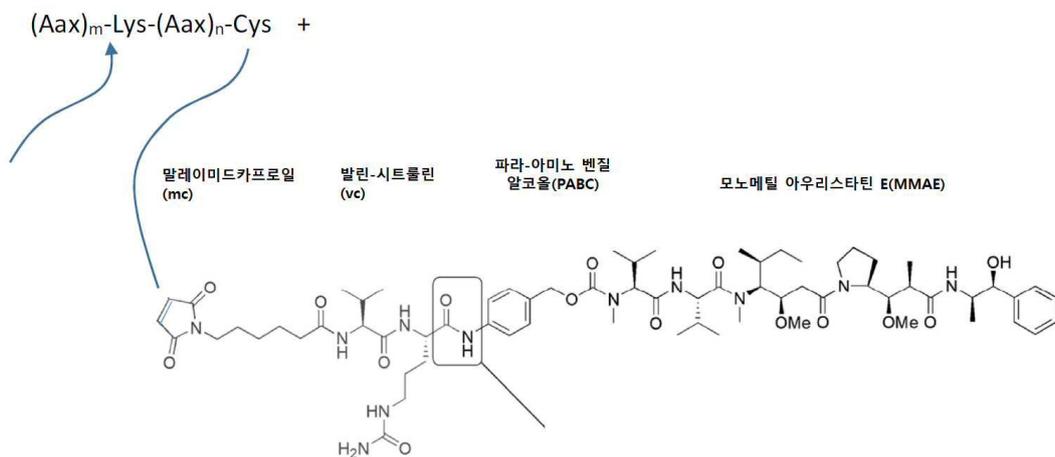
도면4



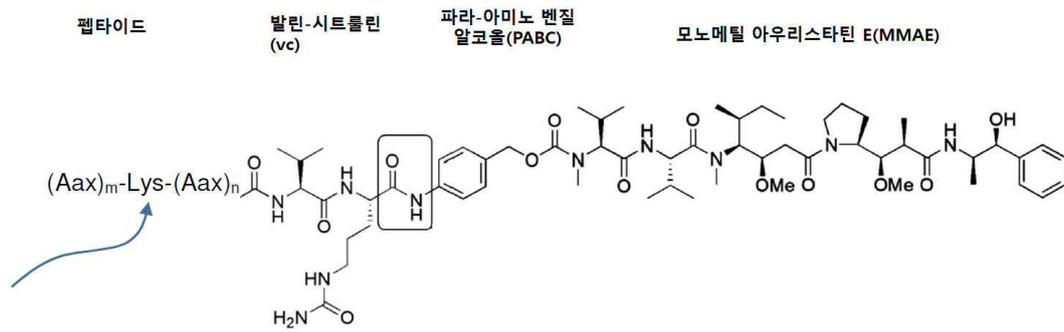
도면5



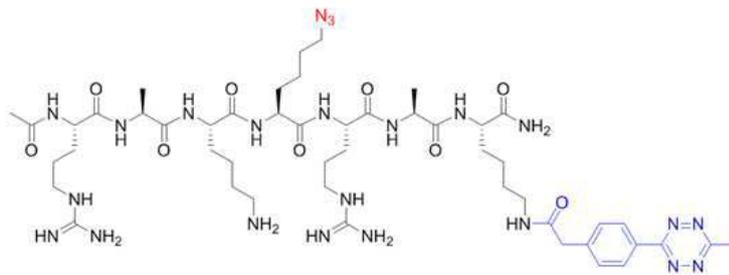
도면6a



도면6b



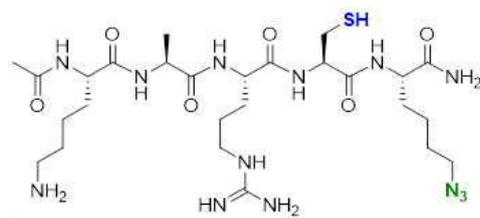
도면7a



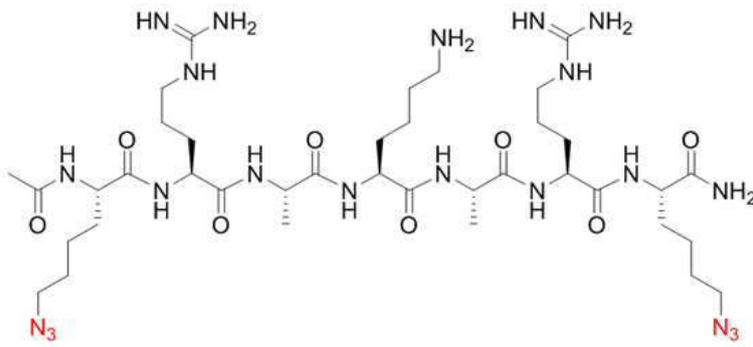
도면7b



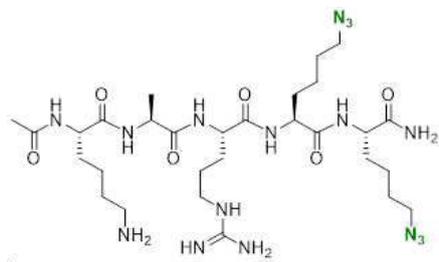
도면7c



도면 8a

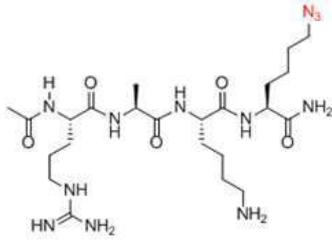


도면 8b

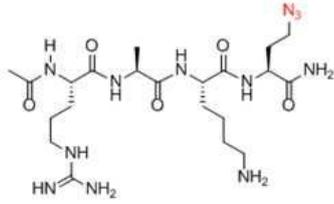


도면9

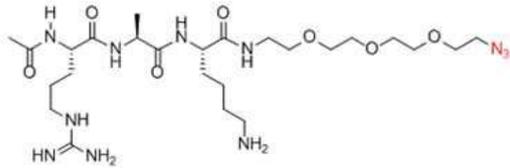
구조 1



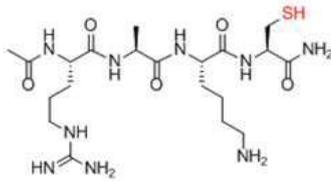
구조 2



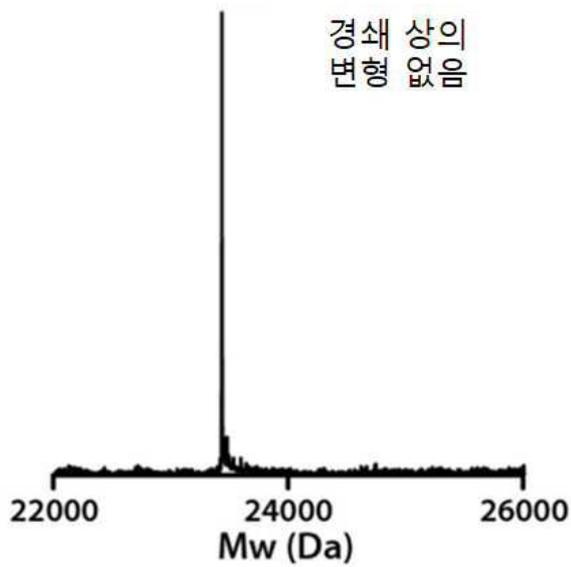
구조 3



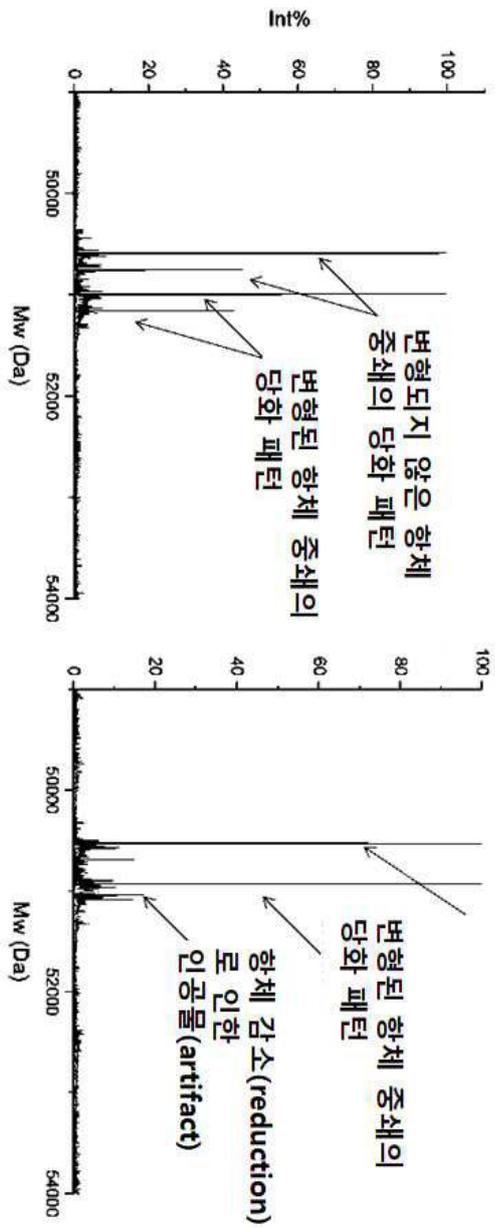
구조 4



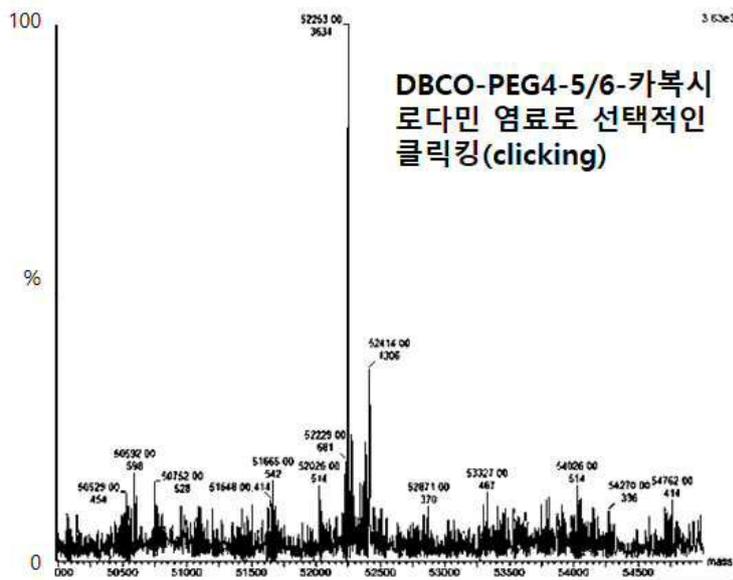
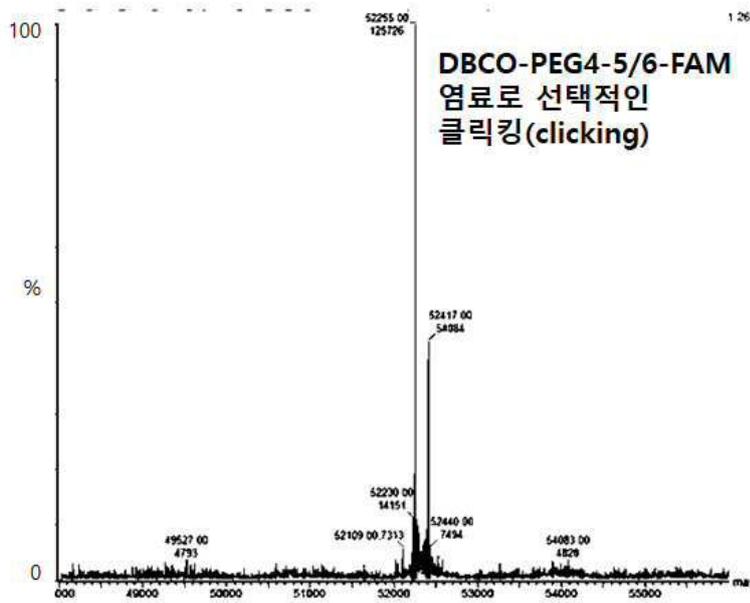
도면10



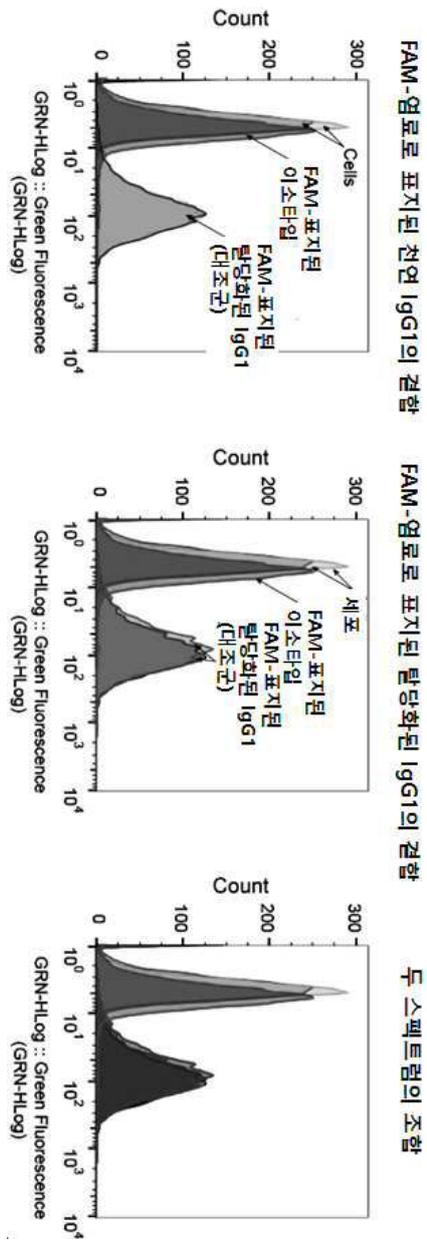
도면11



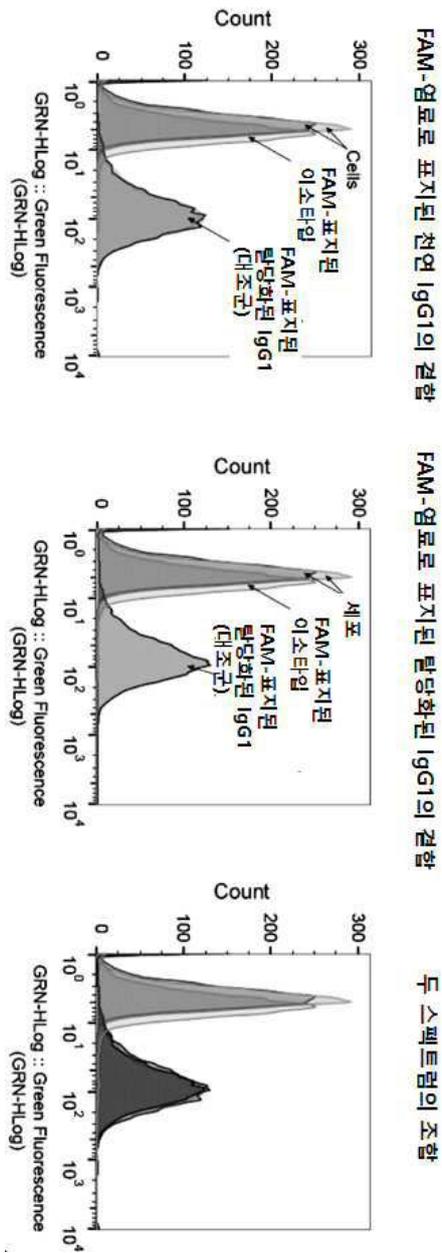
도면12



도면13a



도면13b

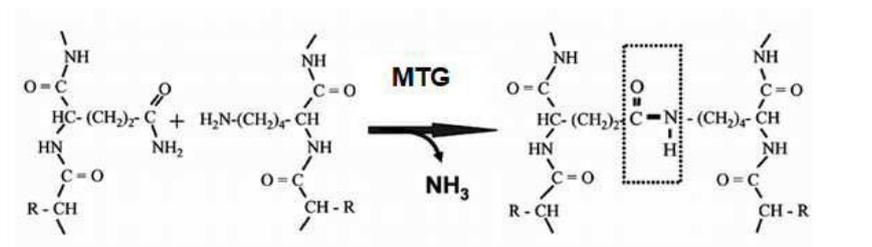


도면14

IMGT unique numbering for C-DOMAIN	CH2		Eu numbering [1] (1) [2] 231-340	Kabat numbering [2]	Strands, turns and loops for C-DOMAIN [5]
	IGHG1 amino acid translation J00228 (1)	IMGT exon numbering 1-110			
1.8	-	-	-	-	
1.7	-	-	-	-	
1.6	[A]	1	231	244	
1.5	P	2	232	245	
1.4	E	3	233	246	
1.3	L	4	234	247	
1.2	L	5	235	248	
1.1	G	6	236	249	
1	G	7	237	250	
2	P	8	238	251	
3	S	9	239	252	
4	V	10	240	253	
5	F	11	241	254	
6	L	12	242	255	
7	F	13	243	256	
8	P	14	244	257	A-STRAND
9	P	15	245	258	
10	K	16	246	259	
11	P	17	247	260	
12	K	18	248	261	
13	D	19	249	262	
14	T	20	250	263	
15	L	21	251	264	
15.1	M	22	252	265	
15.2	I	23	253	266	AB-TURN
15.3	-	-	-	-	
16	S	24	254	267	
17	R	25	255	268	
18	T	26	256	269	
19	P	27	257	270	
20	E	28	258	271	
21	V	29	259	272	B-STRAND
22	T	30	260	273	
23	C	31	261	274	
24	V	32	262	275	
25	V	33	263	276	
26	V	34	264	277	
27	D	35	265	278	
28	V	36	266	279	
29	S	37	267	280	
30	H	38	268	281	
31	E	39	269	282	
34	D	40	270	283	BC-LOOP
35	P	41	271	284	
36	E	42	272	285	
37	V	43	273	286	
38	K	44	274	287	
39	F	45	275	288	
40	N	46	276	289	
41	W	47	277	290	
42	Y	48	278	291	C-STRAND
43	V	49	279	292	
44	D	50	280	293	
45	G	51	281	296	
45.1	V	52	282	299	
45.2	E	53	283	300	
45.3	V	54	284	301	
45.4	H	55	285	302	CD-STRAND
45.5	-	-	-	-	
45.6	-	-	-	-	
45.7	-	-	-	-	

IMGT unique numbering for C-DOMAIN	CH2		Eu numbering [1] (1) [2] 231-340	Kabat numbering [2]	Strands, turns and loops for C-DOMAIN [5]
	IGHG1 amino acid translation J00228 (1)	IMGT exon numbering 1-110			
77	N	56	286	303	
78	A	57	287	304	
79	K	58	288	305	
80	T	59	289	306	D-STRAND
81	K	60	290	307	
82	P	61	291	308	
83	R	62	292	309	
84	E	63	293	310	
84.1	E	64	294	311	
84.2	Q	65	295	312	
84.3	Y	66	296	313	
84.4	N	67	297	314	
84.5	-	-	-	-	
84.6	-	-	-	-	
84.7	-	-	-	-	
85.7	-	-	-	-	DE-TURN
85.6	-	-	-	-	
85.5	-	-	-	-	
85.4	S	68	298	317	
85.3	T	69	299	318	
85.2	Y	70	300	319	
85.1	R	71	301	320	
85	V	72	302	321	
86	V	73	303	322	
87	S	74	304	323	
88	V	75	305	324	
89	L	76	306	325	
90	T	77	307	326	E-STRAND
91	V	78	308	327	
92	L	79	309	328	
93	H	80	310	329	
94	Q	81	311	330	
95	D	82	312	331	
96	W	83	313	332	
96.1	-	-	-	-	EF-TURN
96.2	-	-	-	-	
97	L	84	314	333	
98	N	85	315	334	
99	G	86	316	335	
100	K	87	317	336	F-STRAND
101	E	88	318	337	
102	Y	89	319	338	
103	K	90	320	339	
104	C	91	321	340	
105	K	92	322	341	
106	V	93	323	342	
107	S	94	324	343	
108	N	95	325	344	
109	K	96	326	345	
110	A	97	327	346	FG-LOOP
111	-	-	-	-	
112	-	-	-	-	
113	L	98	328	347	
114	P	99	329	348	
115	A	100	330	349	
116	P	101	331	350	
117	I	102	332	351	
118	E	103	333	352	
119	K	104	334	353	
120	T	105	335	354	
121	I	106	336	355	G-STRAND
122	S	107	337	357	
123	K	108	338	358	
124	A	109	339	359	
125	K	110	340	360	

도면15

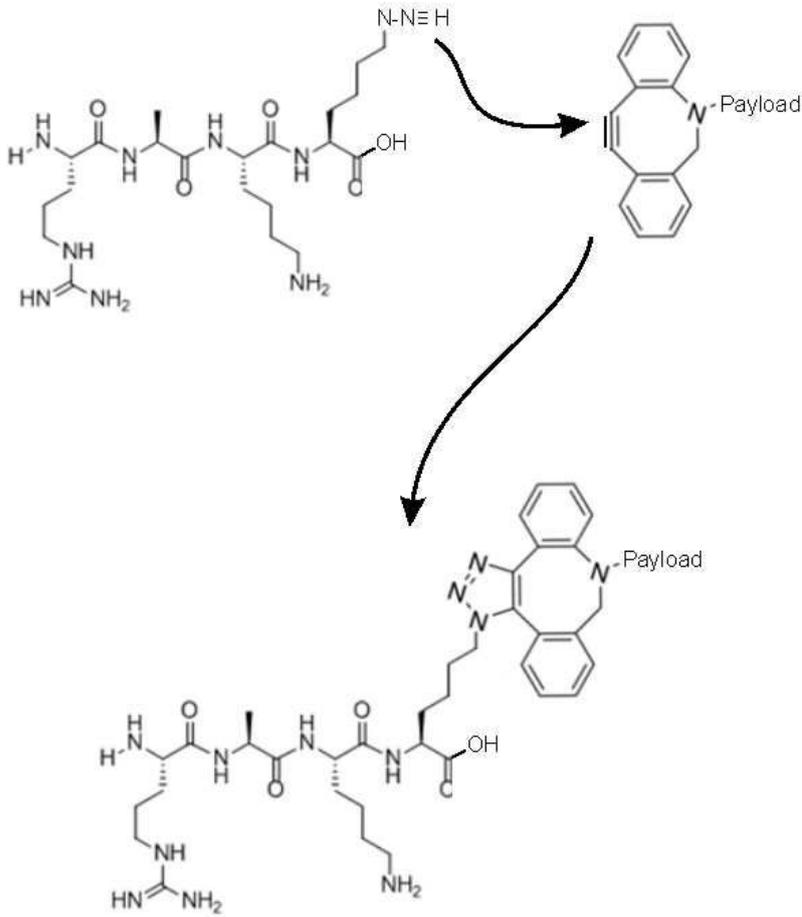


유리 1 차 아민(NH₂)을 갖는 Q295 를 갖는 항체

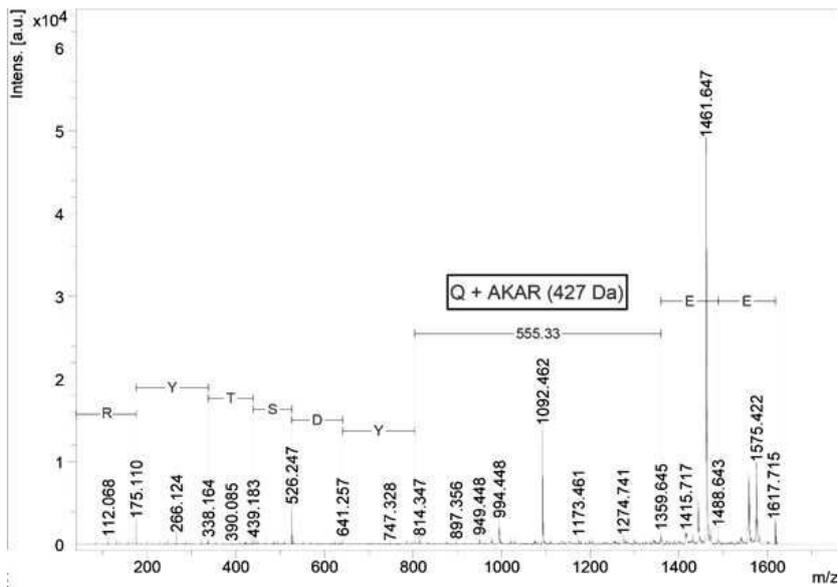
유리 1 차 아민을 갖는 Lys 잔기(사슬내 또는 N-말단)을 갖는 올리고펩타이드 구조

가교 이소펩티달 결합의 형성

도면16



도면17



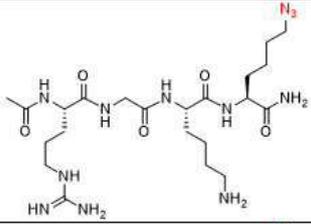
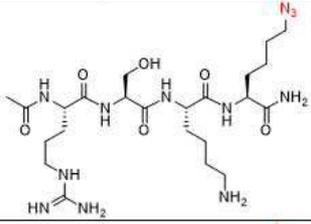
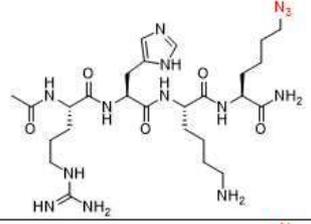
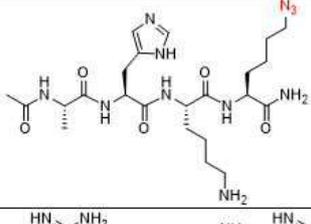
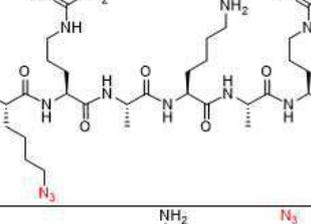
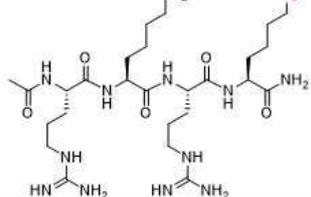
도면18a

	<p>ArgAlaLysLys(N3)</p>	<p>Lys(N3)는 1차 아민 대신 클릭 화학을 위한 아자이드를 포함한다. 다른 Lys는 트랜스 글루타미나제 반응을 위한 1차 아민을 제공한다.</p>
	<p>ArgβAlaLysLys(N3)</p>	<p>βAla는 펩타이드 결합을 만들지 않으므로, 펩타이드 모방제의 예시이다.</p>
	<p>homoArgAlaLysLys(N3)</p>	<p>homoArg는 비-자연적으로 발생하는 아미노산이다.</p>
	<p>homoArgβAlaLysLys(N3)</p>	<p>상단 2개의 조합</p>

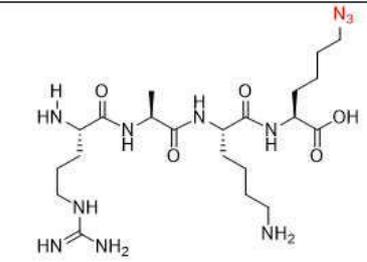
도면18b

	<p>ArgAlaOrnLys(N3)</p>	<p>Orn 는 오르니틴, 즉 Lys 유도체이다.</p>
	<p>ArgAlaDabLys(N3)</p>	<p>Dab 는 α,γ-디아미노부틸릭 애씨드, 즉 Lys 유도체이다.</p>
	<p>ArgAlaβhomolysLys(N3)</p>	<p>βhomolys = L-βhomolysine (S)-3,7-디아미노-헵타노익 애씨드"는 비-자연적으로 발생하는 아미노산이다.</p>
	<p>ArgAlahomolysLys(N3)</p>	<p>homolys 는 Lys 유도체이다.</p>
	<p>ArgAlaD-LysLys(N3)</p>	<p>D-Lys</p>

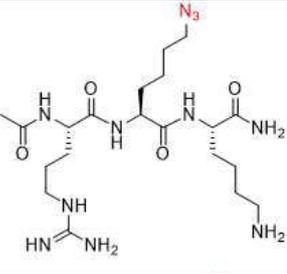
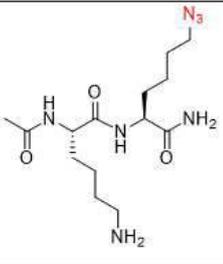
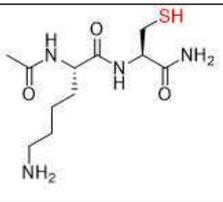
도면19a

	ArgGlyLysLys(N ₃)	
	ArgSerLysLys(N ₃)	
	ArgHisLysLys(N ₃)	
	AlaHisLysLys(N ₃)	
	Lys(N ₃)ArgAlaLysAlaArg	
	ArgLysArgLys(N ₃)	

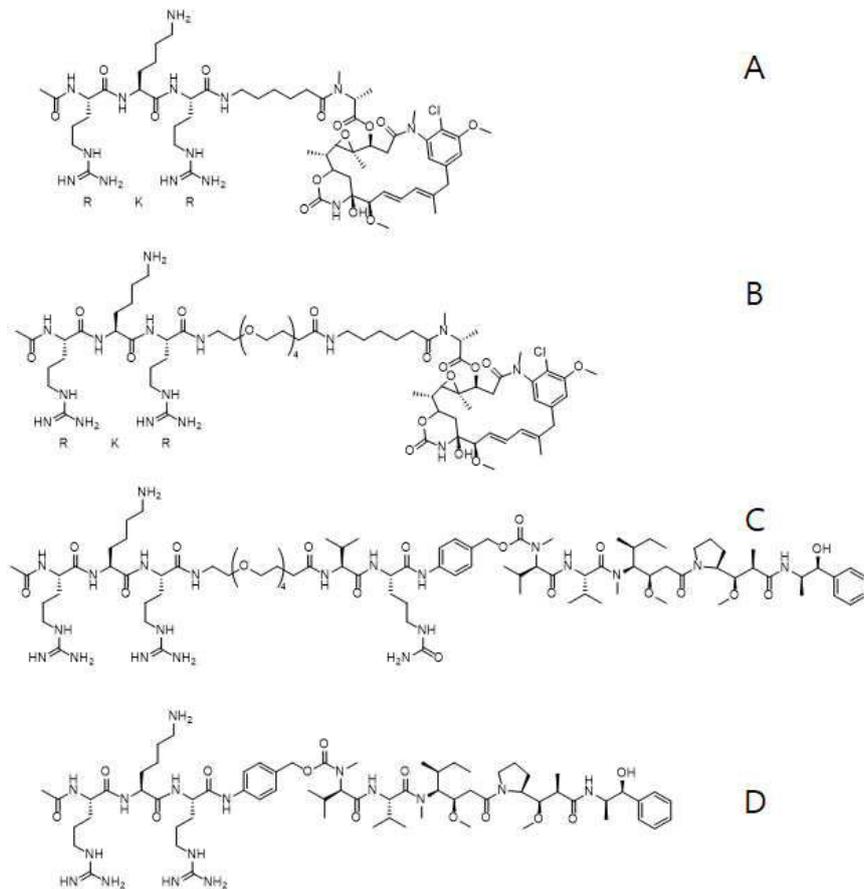
도면19b

	<p>NH₂-RAK₁K₂-COOH with K₁ = Lys(N₃)</p>	
---	---	--

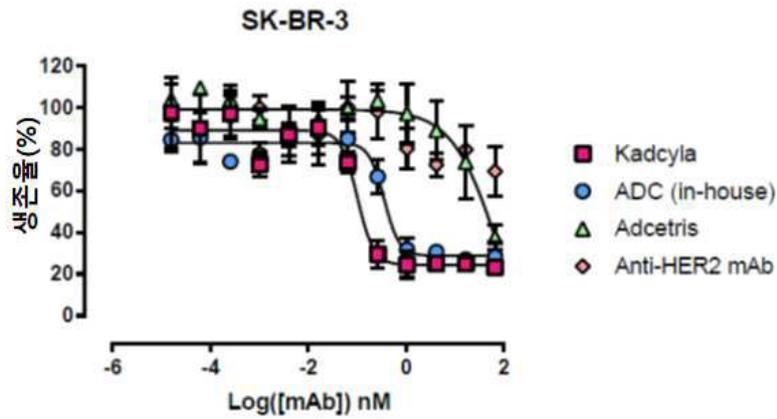
도면20

 <p>Chemical structure of ArgLys(N₃)Lys, showing a tripeptide backbone with an arginine residue (side chain: -(CH₂)₃-NH-C(=NH)-NH₂), a lysine residue with an azido group (side chain: -(CH₂)₄-N₃), and a lysine residue (side chain: -(CH₂)₄-NH₂).</p>	<p>ArgLys(N₃)Lys</p>	
 <p>Chemical structure of LysLys(N₃), showing a dipeptide backbone with a lysine residue (side chain: -(CH₂)₄-NH₂) and a lysine residue with an azido group (side chain: -(CH₂)₄-N₃).</p>	<p>LysLys(N₃)</p>	
 <p>Chemical structure of LysCys, showing a dipeptide backbone with a lysine residue (side chain: -(CH₂)₄-NH₂) and a cysteine residue (side chain: -(CH₂)₂-SH).</p>	<p>LysCys</p>	

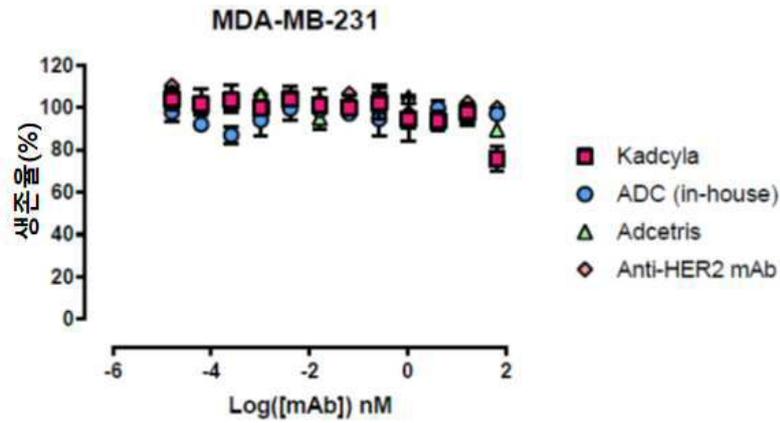
도면21



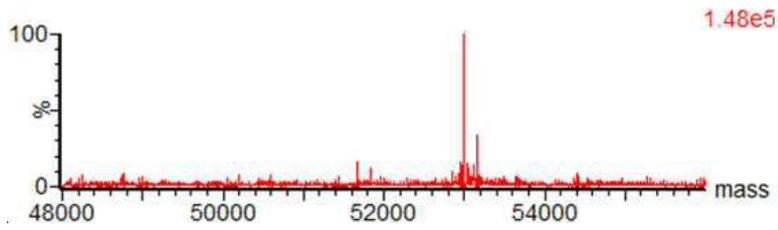
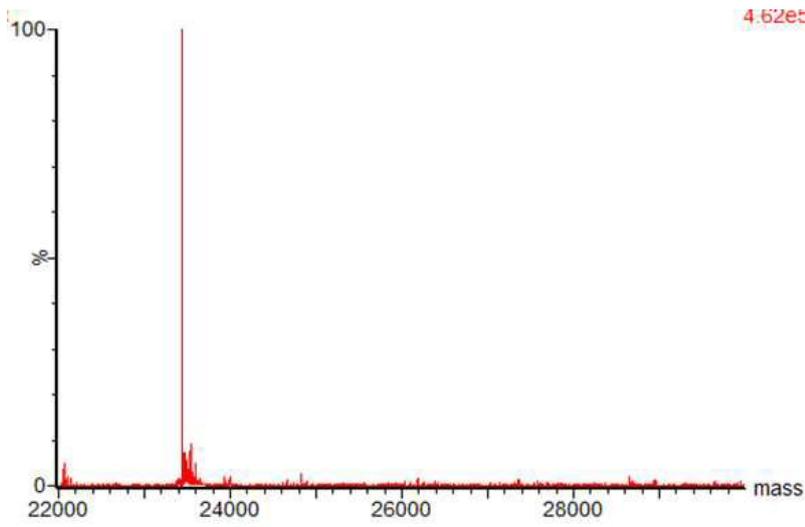
도면22



	Kadcyla	ADC (in-house)	Adcetris
IC50	0.1019	0.359	78.34
Span	64.6	54.23	132.9



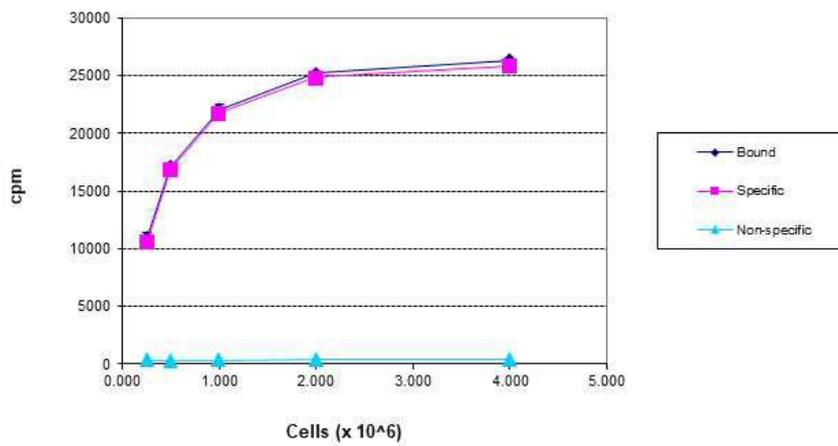
도면23



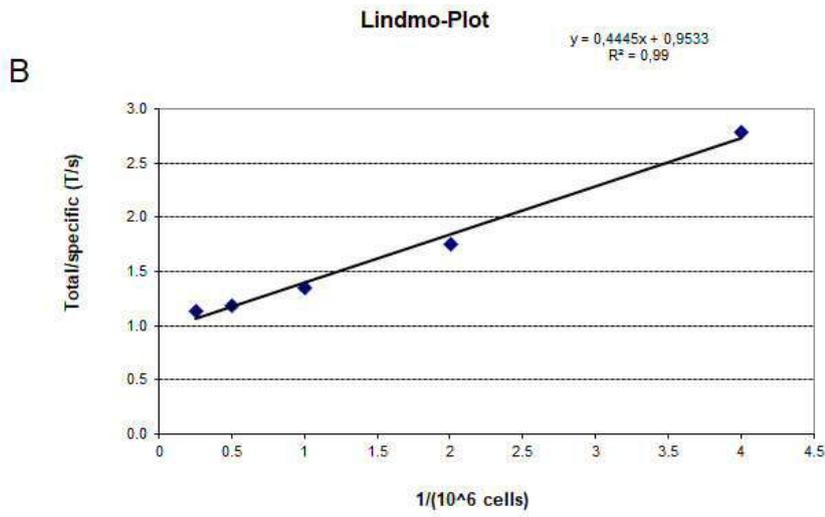
도면24a

포화 결합

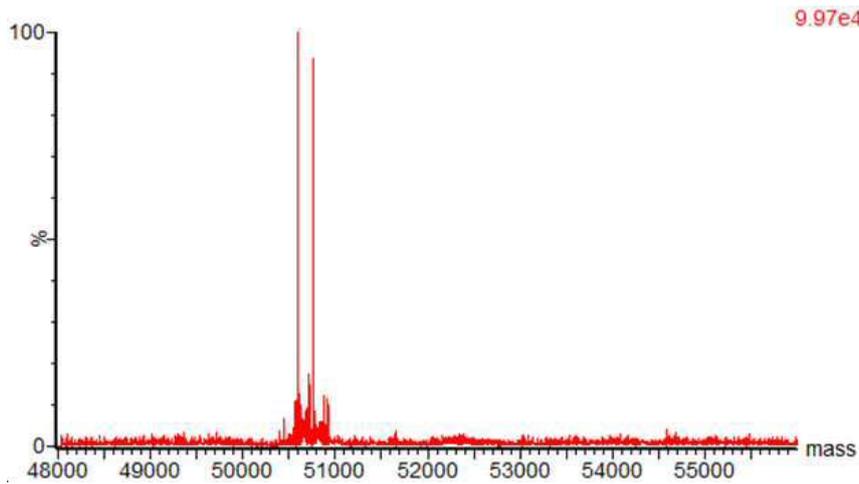
A



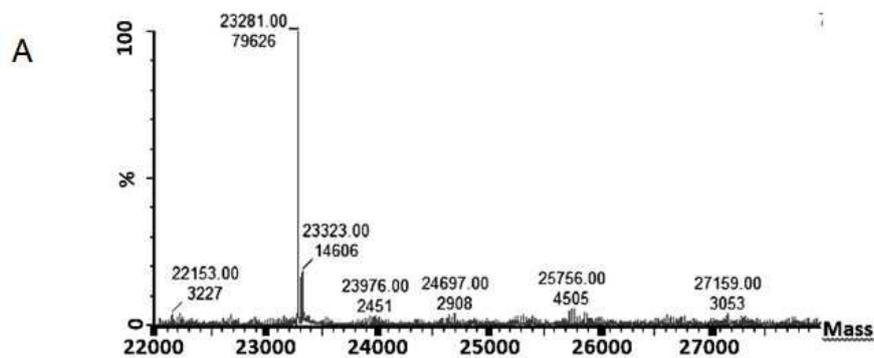
도면24b



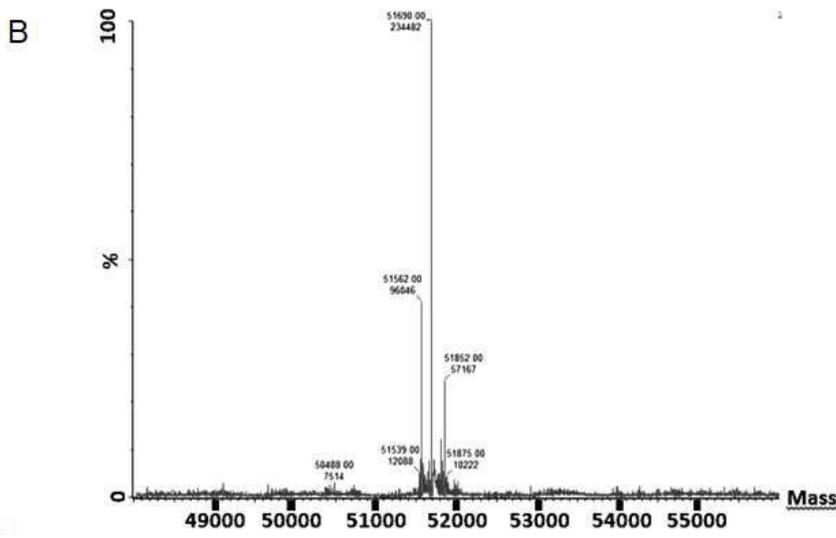
도면25



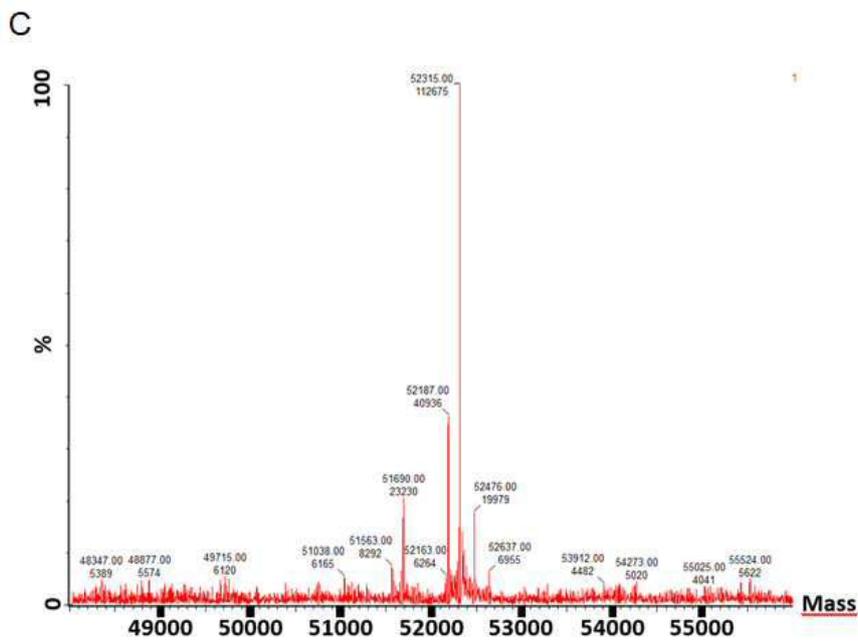
도면26a



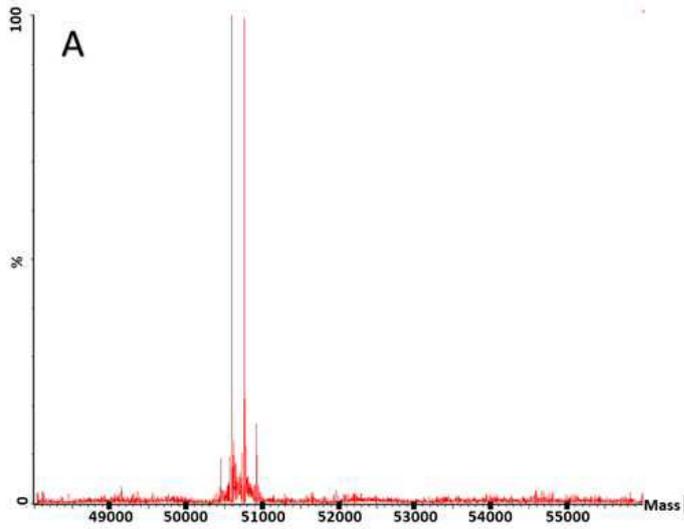
도면26b



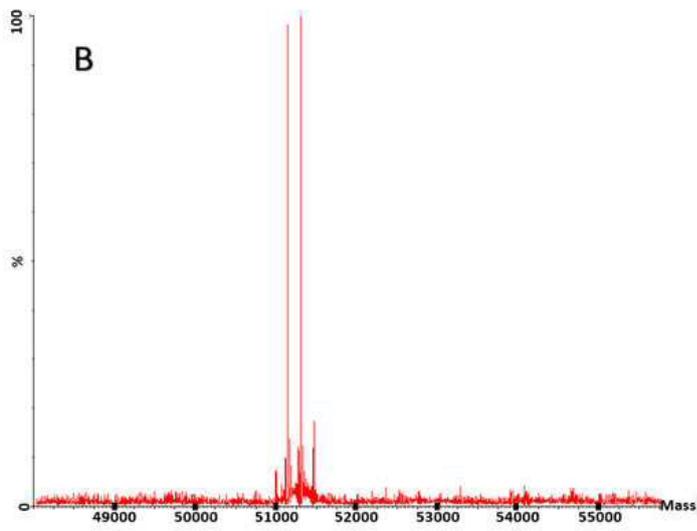
도면26c



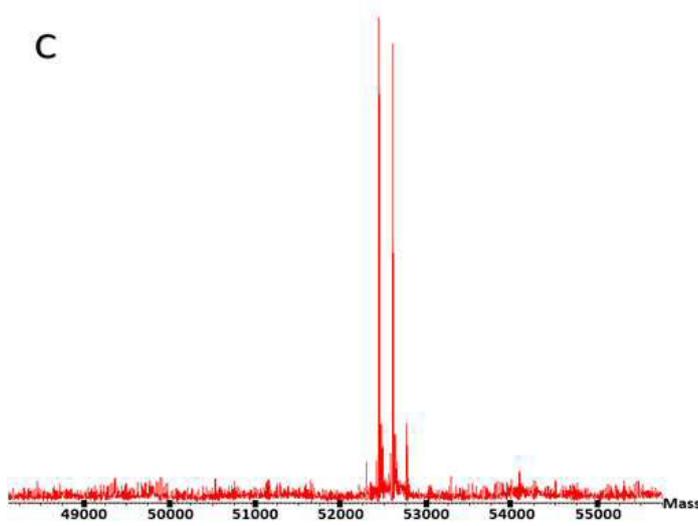
도면27a



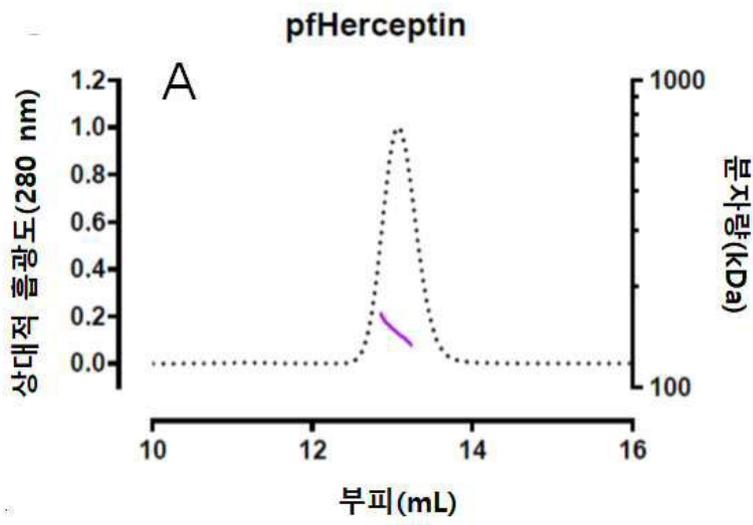
도면27b



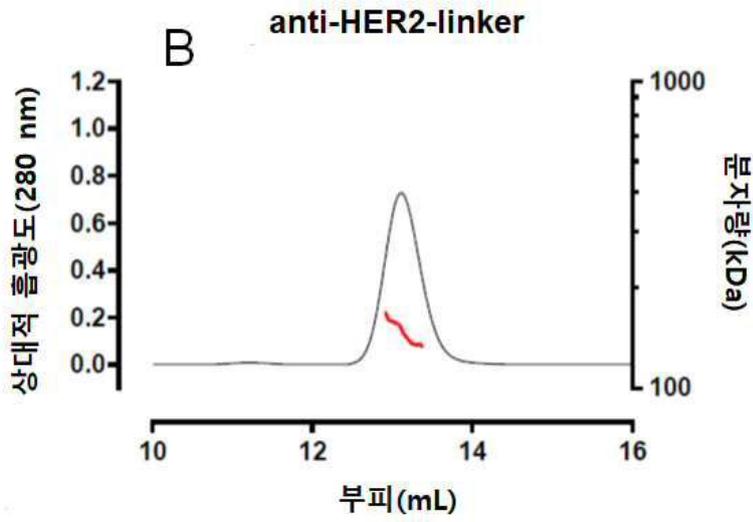
도면27c



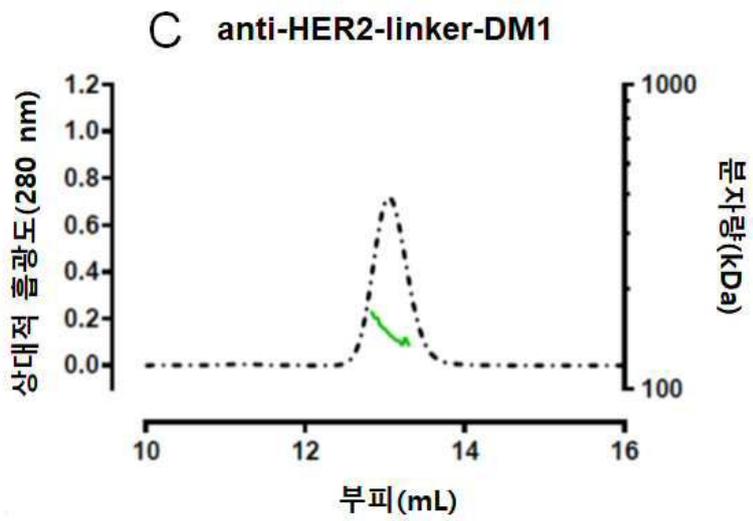
도면28a



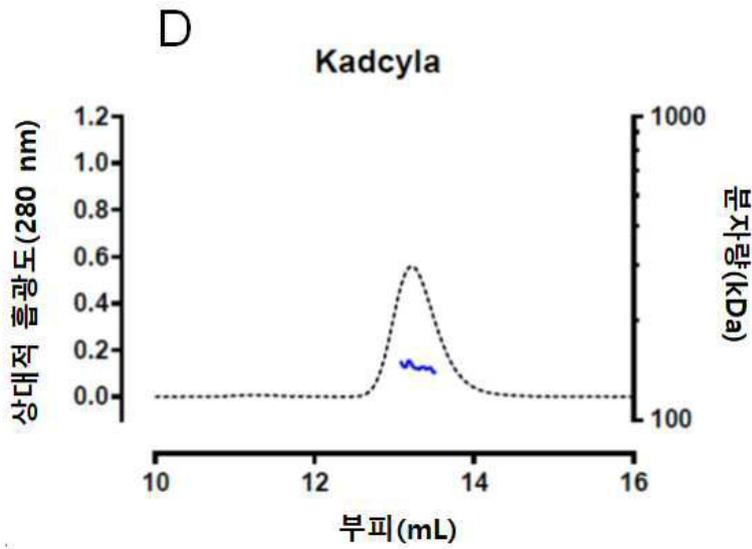
도면28b



도면28c



도면28d



서열 목록

- <110> Paul Scherrer Institut
 - <120> Transglutaminase conjugation method and linker
 - <130> I20010C0036P
 - <150> PCT/EP 2018/075350
 - <151> 2018-09-19
 - <160> 37
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 6
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> linker
 - <220><221> MISC_FEATURE
 - <222> (6)
 - <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 - <400> 1
- Arg Ala Lys Ala Arg Xaa
- 1 5
- <210> 2
 - <211> 4
 - <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 2

Arg Ala Lys Xaa

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is diamnotetranic acid with optionally N3

<400> 3

Arg Ala Lys Xaa

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221>

MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is [PEG]3N3

<400> 4

Arg Ala Lys Xaa

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 5

Arg Ala Lys Cys

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 6

Arg Gly Lys Xaa

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 7

Arg Ser Lys Xaa

1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 8

Arg His Lys Xaa

1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 9

Ala His Lys Xaa

1

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 10

Xaa Arg Ala Lys Ala Arg

1

5

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><

221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 11

Arg Lys Arg Xaa

1

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa is beta Alanine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 12

Arg Xaa Lys Xaa

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa is L-homoarginine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 13

Xaa Ala Lys Xaa

1

<210> 14

<211> 4

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa = L-homoarginine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa = beta-alanine
 <220><221> MISC_FEATURE

 <222> (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <400> 14
 Xaa Xaa Lys Xaa
 1
 <210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)
 <223> Xaa is Ornithine
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <400> 15
 Arg Ala Xaa Xaa
 1
 <210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> Xaa is alpha,gamma,-diaminobutyric acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 16

Arg Ala Xaa Xaa

1

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> Xaa = L-?homolysine (((S)-3,7-Diamino-heptanoic acid)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 17

Arg Ala Xaa Xaa

1

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> Xaa is L-homolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <400> 18

Arg Ala Xaa Xaa

1
 <210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)
 <223> Xaa is D-Lysine

<220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <400> 19

Arg Ala Xaa Xaa

1
 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)
 <223> Xaa is L-Lys(tetrazine)
 <400> 20

Arg Ala Lys Xaa Arg Ala Xaa

1 5
 <210> 21

<211> 5
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <400> 21
 Xaa Cys Arg Ala Lys
 1 5
 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <400> 22
 Lys Ala Arg Cys Xaa
 1 5
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <400> 23

Xaa Arg Ala Lys Ala Arg Xaa

1 5
 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> Xaa is 6-azido-L-lysine (Lys(N3))

<400> 24

Lys Ala Arg Xaa Xaa

1 5
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <400> 25

Arg Ala Ala Arg Lys

1 5
 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker

<400> 26

Arg Arg Lys Ala Tyr

1 5
 <210> 27
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <400> 27
 Arg Arg Lys Asn Tyr
 1 5

<210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <400> 28
 Lys Ala Arg Ala Arg
 1 5

<210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <400> 29
 Lys Ala Arg Ala
 1

<210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> linker
 <400> 30
 Arg Ala Lys Ala Arg
 1 5

<210> 31
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 31

Ala Tyr Ala Lys

1

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 32

Arg Ala Lys Ala Arg Gly Lys

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 33

Arg Ala Lys Lys Asn Arg Ala Lys

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 34

Asn Lys Ala Leu Lys Ala Pro

1 5

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 35

Asp Gly Val Glu Lys Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

1 5 10

<210> 36

<211> 395

<212> PRT

<213> Streptoverticillium ladakanum

<400> 36

Met His Arg Arg Ile His Ala Val Gly Gln Ala Arg Pro Pro Pro Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg

145 150 155 160

Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser

165 170 175

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

<400> 37

Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Glu Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro
 1 5 10 15
 Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu
 20 25 30
 Thr Ile Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His
 35 40 45
 Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu
 50 55 60
 Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro
 65 70 75 80
 Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Phe Phe Asp Glu Asp Lys Tyr Lys Asn
 85 90 95
 Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe
 100 105 110
 Glu Gly Arg Val Ala Lys Asp Ser Phe Asp Glu Ala Lys Gly Phe Gln
 115 120 125
 Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala
 130 135 140
 His Asp Glu Gly Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn
 145 150 155 160
 Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser
 165 170 175
 Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Asp Arg Asn Gly Gly Asn His
 180 185 190
 Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser
 195 200 205
 Gly Gln Asp Arg Ser Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro
 210 215 220
 Glu Ala Phe Arg Pro Asp Arg Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg
 225 230 235 240
 Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Ser Phe Val

245 250 255

Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp

260 265 270

Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335