



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0159544
(43) 공개일자 2024년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01)

(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2023.08)
A61K 47/68031 (2023.08)

(21) 출원번호 10-2024-0057233

(22) 출원일자 2024년04월29일
심사청구일자 2024년04월29일

(30) 우선권주장
1020230055967 2023년04월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 피노바이오

경기도 수원시 영통구 광고로 156, 803호.804호.805호.806호.807호.808호.813호(이의동, 광고비즈니스센터)

(72) 발명자

정두영
경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층 (이의동)

조현용
경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층 (이의동)

이병성
경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층 (이의동)

(74) 대리인
특허법인이플리온

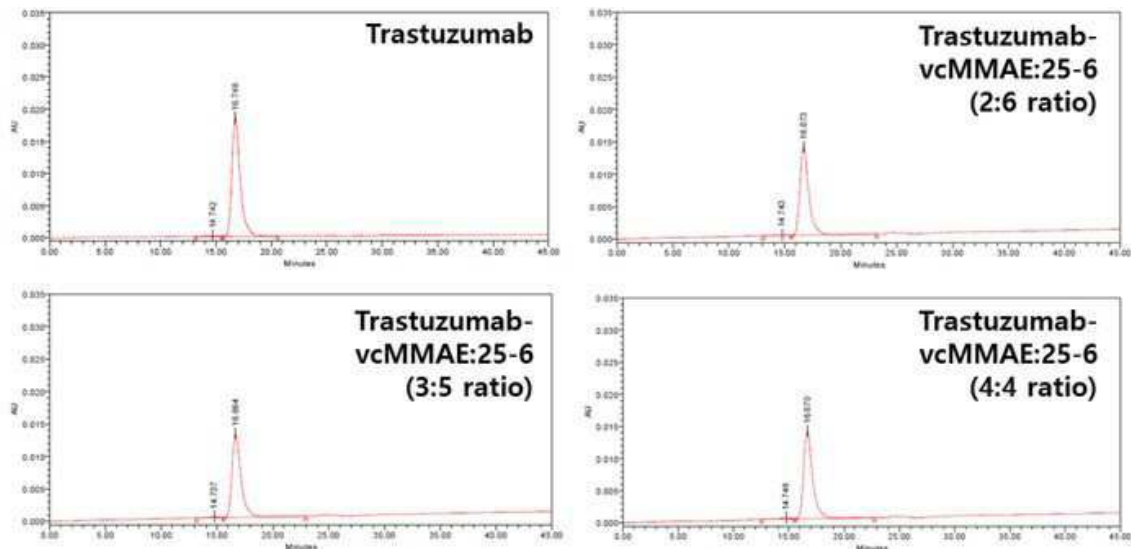
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 결합된 항체-약물 접합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 하나의 항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 연결된 항체-약물 접합체(ADC) 및 이의 효율적인 제조 방법에 관한 것이다. 구체적으로는 캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체 (A); 비캄토테신계 슈퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체 (B); 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및 antiapoptotic protein inhibitor 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체 (D)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 한 종류의 약물-링커 접합체 하나 이상이 각각 항체의 시스테인 및 라이신 잔기에 결합된 것일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/68037 (2023.08)

A61K 47/6817 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

명세서

청구범위

청구항 1

항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 결합된 항체-약물 접합체(ADC)로서,

캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A);

비캄토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B);

캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및

항-세포사멸 단백질 저해 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 한 종류의 약물-링커 접합체 하나 이상이 각각 항체의 시스테인 또는 라이신을 포함하는 아미노산 잔기, 비천연 아미노산 잔기, 또는 당사슬에 결합된 것이 특징인, 항체-약물 접합체(ADC).

청구항 2

하나의 항체에 제1 약물-링커 접합체 및 제2 약물-링커 접합체가 결합된 항체-약물 접합체(ADC)로서,

상기 제1 약물-링커 접합체는 비캄토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B)이고;

상기 제2 약물-링커 접합체는 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C)인, 항체-약물 접합체.

청구항 3

제2항에 있어서,

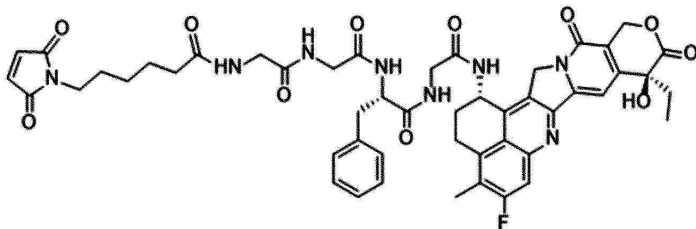
상기 항체-약물 접합체는 약물-항체 비율(DAR)이 4 내지 8인 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체.

청구항 4

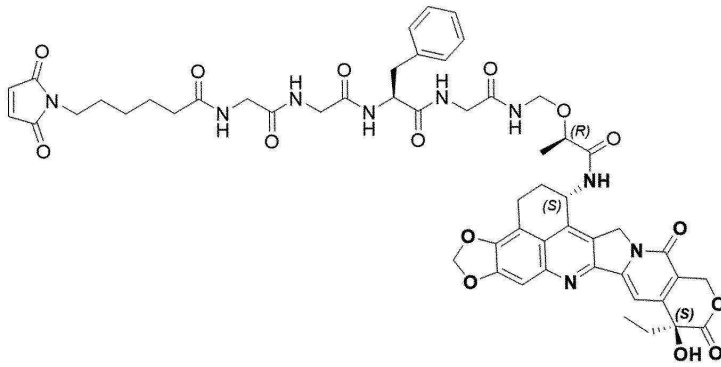
제2항에 있어서,

상기 제1 약물-링커 접합체는 하기 화학식 6 또는 7의 화합물이고, 상기 제2 약물-링커 접합체는 하기 화학식 2 내지 5에서 선택된 어느 하나의 화합물인, 항체-약물 접합체:

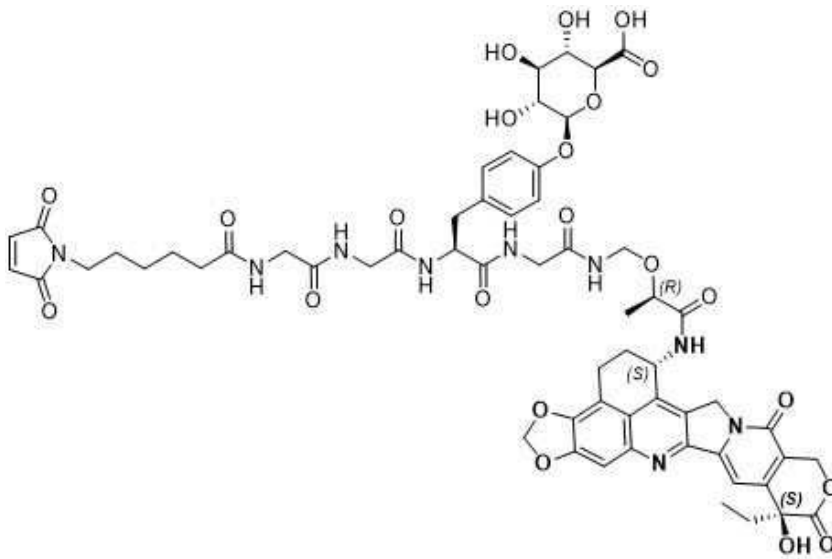
[화학식 2]



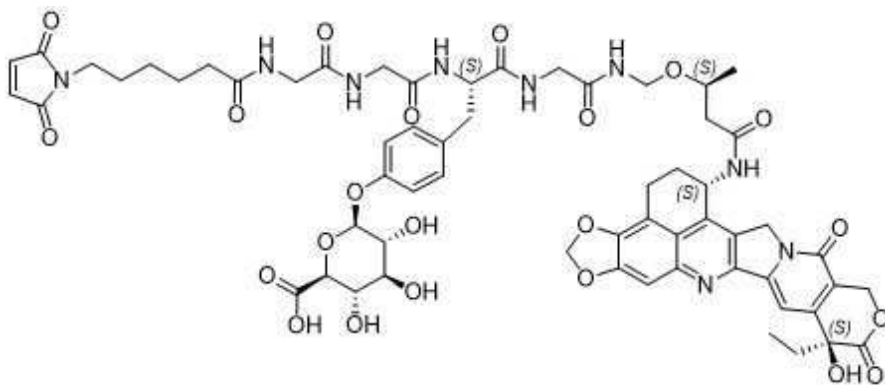
[화학식 3]



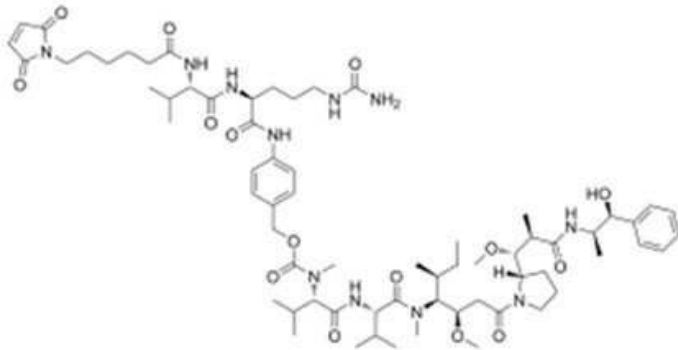
[화학식 4]



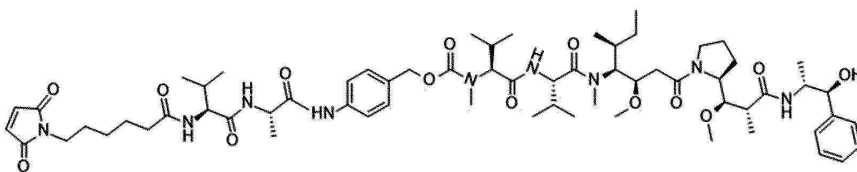
[화학식 5]



[화학식 6]



[화학식 7]



청구항 5

제2항에 있어서,

상기 제1 약물-링커 접합체에 포함되는 약물과 상기 제2 약물-링커 접합체에 포함되는 약물은 항체에 1:1 내지 1:7의 비율로 결합된 것인, 항체-약물 접합체.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 항체-약물 접합체는 순차반응 또는 동시반응으로 제조되는 것을 특징으로 하는 항체-약물 접합체.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 제1 약물-링커 접합체에 포함되는 약물은 오리스타틴(Auristatin)계열 화합물이고,

상기 제2 약물-링커 접합체에 포함되는 약물은 토포이소머라아제 I (Topoisomerase I)을 저해하는 캄토테신계 유도체인, 항체-약물 접합체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제1 약물-링커 접합체에 포함되는 약물은 오리스타틴(Auristatin)계열 화합물로서 MMAE, MMAU, Aur0101, Duostatin 5 및 튜블린 억제제(Microtubule inhibitor)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 화합물이고,

상기 제2 약물-링커 접합체에 포함되는 약물은 토포이소머라아제 I (Topoisomerase I) 저해제이며, 상기 토포이소머라아제 I 저해제는 SN-38, Exatecan, Dxd 및 FL118, 7-aminoalkyl-substituted camptothecin 화합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 화합물 또는 이의 유도체인, 항체-약물 접합체.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 항체는 우렐루맵 (Urelumab), 우토밀루맵 (Utomilumab), 베텔로비맵 (Bebtelovimab), 아두카누맵 (Aducanumab), 바피네주맵 (Bapinezumab), 크레네주맵 (Crenezumab), 도나네맵 (Donanemab), 간테네루맵 (Gantenerumab), 레카네맵 (Lecanemab), 솔라네주맵 (Solanezumab), 네스바쿠맵 (Nesvacumab), 에비나쿠맵 (Evinacumab), 에놀리투주맵 (Enoblituzumab), 움부르타맵 (Omburtamab), 벨리무맵 (Belimumab), 이아나루맵 (Inalimumab), 타발루맵 (Tabalumab), 베르틸리무맵 (Bertilimumab), 모가물리주맵 (Mogamulizumab), 레론리맵 (Leronlimab), 시플리주맵 (Siplizumab), 포랄루맵 (Foralumab), 무로모납-CD3(Muromonab-CD3), 오텔릭시주맵 (Otelixizumab), 테플리주맵 (Teplizumab), 이발리주맵 (Ibalizumab), 트레갈리주맵 (Tregalizumab), 자노리무맵 (Zanolimumab), 이톨리주맵 (Itolizumab), 에팔리주맵 (Efalizumab), 이네빌리주맵 (Inebilizumab), 타파시타맵 (Tafasitamab), 토시투모맵 (Tositumomab), 오크렐리주맵 (Ocrelizumab), 오파투무맵 (Ofatumumab), 리톡시맵 (Rituximab), 우블리톡시맵 (Ublituximab), 벨투주맵 (Veltuzumab), 에프라투주맵 (Epratuzumab), 바실릭시맵 (Basiliximab), 다클리주맵 (Daclizumab), 바르릴루맵 (Varlilumab), 룰리주맵 (Lulizumab), 이라투무맵 (Iratumumab), 린투주맵 (Lintuzumab), 다라투무맵 (Daratumumab), 펠자르타맵 (Felzartamab), 이사톡시맵 (Isatuximab), 메자키타맵 (Mezagitamab), 블레셀루맵 (Bleselumab), 다셋투주맵 (Dacetuzumab), 이스칼리맵 (Iscalimab), 루카투무맵 (Lucatumumab), 미타잘리맵 (Mitazalimab), 소티갈리맵 (Sotigalimab), 다피롤리주맵 (Dapirolizumab), 아파미스타맵 (Apamistamab), 리구팔리맵 (Ligufalimab), 마그롤리맵 (Magrolimab), 알렘투주맵 (Alemtuzumab), 크리잔리주맵 (Crizanlizumab), 인클라쿠맵 (Inclacumab), 쿠사투주맵 (Cusatuzumab), 올레클루맵 (Oleclumab), 밀라투주맵 (Milatuzumab), 갈릭시맵 (Galiximab), 카로톡시맵 (Carotuximab), 아데카투무맵 (Adecatumumab), 엠티네주맵 (Eptinezumab), 에레누맵 (Erenumab), 프레마네주맵 (Fremanezumab), 갈카네주맵 (Galcanezumab), 졸베크시맵 (Zolbetuximab), 오나르투주맵 (Onartuzumab), 에쿨리주맵 (Eculizumab), 포젤리맵 (Pozelimab), 라블리주맵 (Ravulizumab), 라크노투주맵 (Lacnotuzumab), 악사틸리맵 (Axatilimab), 카비랄리주맵 (Cabiralizumab), 에막투주맵 (Emactuzumab), 이필리무맵 (Ipilimumab), 쿠아본리맵 (Quavonlimab), 트레멜리무맵 (Tremelimumab), 잘리프레리맵 (Zalifrelimab), 세톡시맵 (Cetuximab), 데파투시주맵 (Depatuxizumab), 푸톡시맵 (Futuximab), 임가투주맵 (Imgatuzumab), 마투주맵 (Matuzumab), 모도톡시맵 (Modotuximab), 네씨투무맵 (Necitumumab), 니모투주맵 (Nimotuzumab), 파니투무맵 (Panitumumab), 토무조톡시맵 (Tomuzotuximab), 잘루투무맵 (Zalutumumab), 바토클리맵 (Batoclimab), 니포칼리맵 (Nipocalimab), 로자놀릭시주맵 (Rozanolixizumab), 부로수맵 (Burosumab), 팔레투주맵 (Farletuzumab), 디누톡시맵 (Dinutuximab), 낙시타맵 (Naxitamab), 라기필리맵 (Ragifilimab), 김실루맵 (Gimsilumab), 렌질루맵 (Lenzilumab), 마브릴리무맵 (Mavrilimumab), 나밀루맵 (Namilumab), 오티리맵 (Otilimab), 플론마를리맵 (Plonmarlimab), 코드리투주맵 (Codrituzumab), 마르게톡시맵 (Margetuximab), 페르투주맵 (Pertuzumab), 트라스투주맵 (Trastuzumab), 다토포타맵 (Datopotamab), 파트리투맵 (Patritumab), 세리반투맵 (Seribantumab), 둘리고투주맵 (Duligotuzumab), 피클라투주맵 (Ficlatuzumab), 릴로투무맵 (Rilotumumab), 알롬필리맵 (Alomfilimab), 아니프롤루맵 (Anifrolumab), 에마팔루맵 (Emapalumab), 리겔리주맵 (Ligelizumab), 오말리주맵 (Omalizumab), 씩수투무맵 (Cixutumumab), 달로투주맵 (Dalotuzumab), 피키투무맵 (Figitumumab), 가니투맵 (Ganitumab), 테프로투무맵 (Teprotumumab), 베르메키맵 (Bermekimab), 카나기누맵 (Canakinumab), 게보키주맵 (Gevokizumab), 브리아키누맵 (Briakinumab), 우스테키누맵 (Ustekinumab), 안루킨주맵 (Anrukinzumab), 쟌다키맵 (Cendakimab), 레브리키주맵 (Lebrikizumab), 트랄로키누맵 (Tralokinumab), 브로달루맵 (Brodalumab), 비메키주맵 (Bimekizumab), 익세키주맵 (Ixekezumab), 세쿠기누맵 (Secukinumab), 브라지쿠맵 (Brazikumab), 구셀쿠맵 (Guselkumab), 미리키주맵 (Mirikizumab), 리산키주맵 (Risankizumab), 틸드라키주맵 (Tildrakizumab), 네몰리주맵 (Nemolizumab), 임시돌리맵 (Imsidolimab), 스페솔리맵 (Spesolimab), 파스콜리주맵 (Pascolizumab), 두필루맵 (Dupilumab), 데페모키맵 (Depemokimab), 메폴리주맵 (Mepolizumab), 레슬리주맵 (Reslizumab), 벤랄리주맵 (Benralizumab), 클라자키주맵 (Clazakizumab), 올로키주맵 (Olokizumab), 실톡시맵 (Siltuximab), 시루쿠맵 (Sirukumab), 질티베키맵 (Ziltivekimab), 레빌리맵 (Levilimab), 사릴루맵 (Sarilumab), 사트랄리주맵 (Satralizumab), 토셀리주맵 (Tocilizumab), 아비투주맵 (Abituzumab), 파베젤리맵 (Favezelimab), 피안리맵 (Fianlimab), 이에라밀리맵 (Ieramylimab), 렐라틀리맵 (Relatlimab), 심투주맵 (Simtuzumab), 아바고보맵 (Abagovomab), 오레고보맵 (Oregovomab), 타네주맵 (Tanezumab), 이브솔리맵 (Ivuxolimab), 로카틴리맵 (Rocatinlimab), 타볼리맵 (Tavolimab), 텔라조를리맵 (Telazorlimab), 본레롤리주맵 (Vonlerolizumab), 알리로쿠맵 (Alirocumab), 보코씨주맵 (Bococizumab), 에브로누씨맵 (Ebronucimab), 에볼로쿠맵 (Evolocumab), 프로보씨맵 (Frovocimab), 온게리씨맵 (Ongericimab), 타폴레씨맵 (Tafolecimab), 도스타를리맵 (Dostarlimab), 발스틸리맵 (Balstilimab), 캄렐리주맵 (Camrelizumab), 쉐미플리맵 (Cemiplimab), 겐타놀리맵 (Geptanolimab), 니볼루맵 (Nivolumab), 펌브롤리주맵 (Pembrolizumab), 펜풀리맵 (Penpulimab), 피딜리주맵 (Pidilizumab), 프롤골리맵 (Prolgolimab), 레티판리맵 (Retifanlimab), 사산리맵 (Sasanlimab), 세르플루리맵

(Serplulimab), 신틸리맵(Sintilimab), 스파르탈리주맵 (Spartalizumab), 티슬렐리주맵 (Tislelizumab), 토리팔리맵 (Toripalimab), 예자벤리맵 (Ezabenlimab), 짐베렐리맵 (Zimberelimab), 아테졸리주맵 (Atezolizumab), 아벨루맵 (Avelumab), 코시벨리맵 (Cosibelimab), 수게말리맵 (Sugemalimab), 두르발루맵 (Durvalumab), 엔바폴리맵(Envafolimab), 수브라톡수맵 (Suvratoxumab), 데노수맵 (Denosumab), 질로베르타맵 (Zilovertamab), 엘로투주맵 (Elotuzumab), 돔바날리맵 (Domvanalimab), 에티길리맵(Etigilimab), 오씨페를리맵 (Ociperlimab), 티라골루맵 (Tiragolumab), 비보스톨리맵 (Vibostolimab), 수르제비셀리맵 (Surzebiclimab), 코볼리맵 (Cobolimab), 사바톨리맵 (Sabatolimab), 콘썬주맵 (Concizumab), 마르스타씨맵 (Marstacimab), 아달리무맵 (Adalimumab), 골리무맵 (Golimumab), 인플릭시맵 (Infliximab), 쉐르톨리주맵 (Certolizumab), 코나투무맵 (Conatumumab), 티가투주맵 (Tigatuzumab), 테제펠루맵 (Tezepelumab), 가티포투주맵 (Gatipotuzumab), 카비랄리주맵 (Cabiralizumab), 베바씨주맵 (Bevacizumab), 브롤루씨주맵 (Brolucizumab), 라니비주맵 (Ranibizumab), 올린바씨맵 (Olinvacimab), 이크루쿠맵 (Icrucumab), 라무씨루맵 (Ramucirumab), 카프라스씨주맵 (Caplacizumab), 아부릴루맵 (Abrilumab), 에트롤리주맵 (Etrolizumab), 베돌리주맵 (Vedolizumab), 인테투무맵 (Intetumumab), 나탈리주맵 (Natalizumab), 오브린다타맵 (Obrindatamab), 엘라나타맵 (Elranatamab), 린보셀타맵 (Linvoseltamab), 테클리스타맵 (Teclistamab), 엡코리타맵 (Epcoritamab), 글로피타맵 (Glofitamab), 모수네투주맵 (Mosunetuzumab), 오드로넥스타맵 (Odronektamab), 플로테투주맵 (Flotetuzumab), 비베포타맵 (Vibecotamab), 카투막소맵 (Catumaxomab), 씨비사타맵 (Cibisatamab), 탈쿠에타맵 (Talquetamab), 우바마타맵 (Ubatamab), 엠피자타맵 (Emfizatamab), 블리나투모맵 (Blinatumomab), 아미반타맵 (Amivantamab), 에미씨주맵 (Emicizumab), 제노쿠투주맵 (Zenocutuzumab), 자니다타맵 (Zanidatamab), 티블리주맵 (Tibulizumab), 나프투모맵 (Naptumomab), 벨란타맵 (Belantamab), 피베키맵 (Pivekimab), 프랄루자타맵 (Praluzatamab), 콜투시맵 (Coltuximab), 데닌투주맵 (Denintuzumab), 론카스톡시맵 (Loncastuximab), 이브리투모맵 (Ibritumomab), 이노투주맵 (Inotuzumab), 에프라투주맵 (Epratuzumab), 목세투모맵 (Moxetumomab), 브렌톡시맵 (Brentuximab), 겐투주맵 (Gemtuzumab), 바다스톡시맵 (Vadastuximab), 로보투주맵 (Lorvotuzumab), 폴라투주맵 (Polatuzumab), 투사마타맵 (Tusamitamab), 텔리소투주맵 (Telisotuzumab), 로발피투주맵 (Rovalpituzumab), 데파투시주맵 (Depatuxizumab), 파를레투주맵 (Farletuzumab), 미르베포시맵 (Mirvetuximab), 디시타맵 (Disitamab), 아네투맵 (Anetumab), 엔포르투맵 (Enfortumab), 사씨투주맵 고비테칸 (Sacituzumab), 보바릴리주맵 (Vobarilizumab), 카도닐리맵 (Cadonilimab), 부달리맵 (Vudalimab), 테보텔리맵 (Tebotelimab), 이보네스씨맵 (Ivonescimab), 에르폰릴리맵 (Erfonrilimab), 오조랄리주맵 (Ozoralizumab), 파리시맵 (Faricimab), 바누씨주맵 (Vanucizumab) 및 나비씨시주맵 (Navicixizumab)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나인, 항체-약물 접합체.

청구항 10

하나 이상의 약물-링커 접합체가 하나의 항체에 연결된 항체-약물 접합체(ADC)를 제조하는 방법으로서,

캠토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A);

비캠토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B);

캠토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및

항-세포사멸 단백질 저해 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)로 이루어진 군에서 적어도 어느 한 종류의 약물-링커 접합체를 하나 이상을 선정하는 제1단계; 및

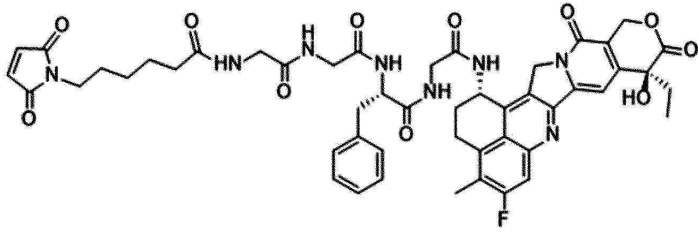
(i) 항체와의 결합 위치의 아미노산 잔기, (ii) 결합 순서 및/또는 (iii) 결합 방법을 약물-링커 접합체에 따라 서로 상이하게 사용하여, 각 약물-링커 접합체를 항체의 아미노산 잔기에 결합시키는 제2단계를 포함하는 것이 특징인, 항체-약물 접합체(ADC)의 제조방법.

청구항 11

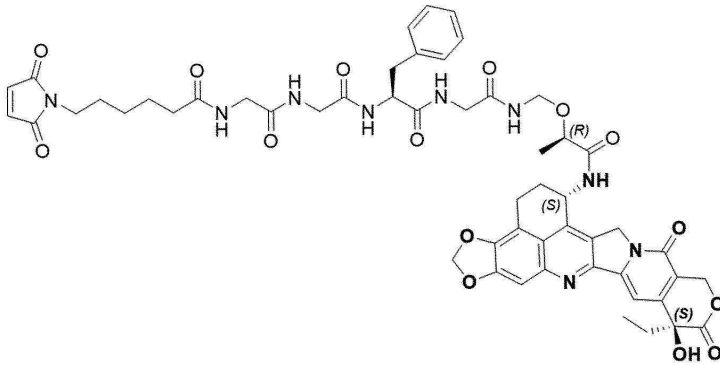
제10항에 있어서,

상기 (B)는 하기 화학식 6 또는 7의 화합물이고, 상기 (C)는 화학식 2 내지 5에서 선택된 어느 하나의 화합물인 것을 특징으로 하는, 항체-약물 접합체의 제조방법.

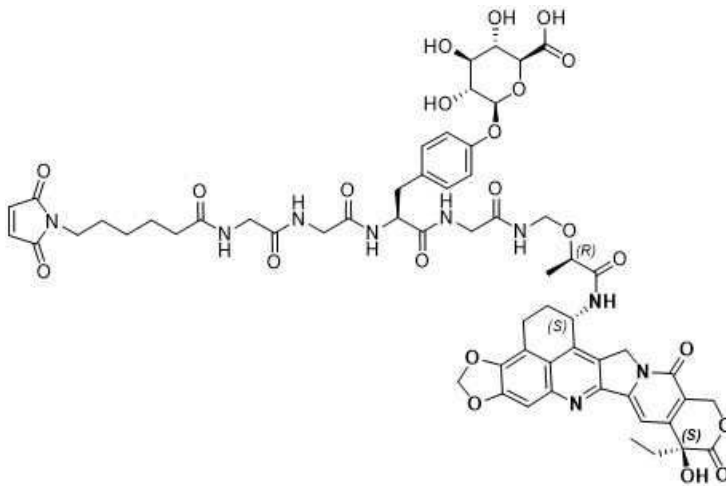
[화학식 2]



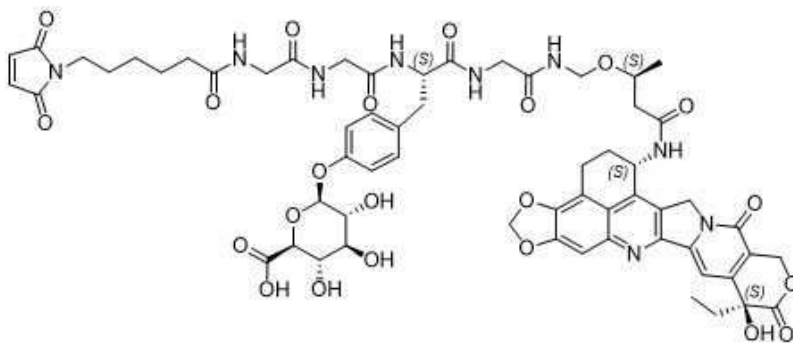
[화학식 3]



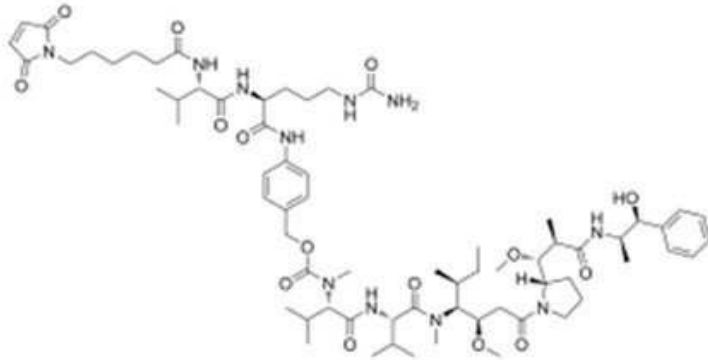
[화학식 4]



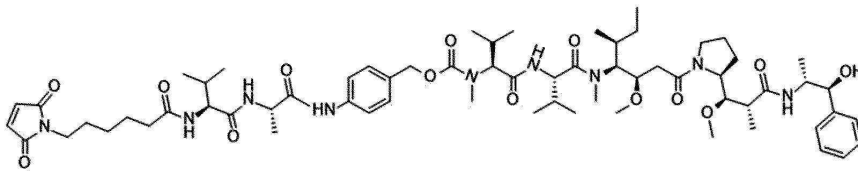
[화학식 5]



[화학식 6]



[화학식 7]



청구항 12

제10항에 있어서,

상기 제2 단계는, 상기 (B)와 (C)의 약물-링커 접합체를 혼합하여 혼합물을 준비하는 단계; 및 상기 혼합물을 환원된 항체와 반응하여 킨주게이션(conjugation)시키는 단계를 포함하는, 항체-약물 접합체의 제조방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 제2단계는, 환원된 항체에 상기 (B)의 약물-링커 접합체를 항체의 몰 당량 대비 2 내지 4배로 첨가하여 1차 반응물을 제조하는 단계 및 상기 1차 반응물에 상기 (C)의 약물-링커를 첨가하여 2차 반응물을 제조하는 단계를 포함하는, 항체-약물 접합체의 제조방법.

청구항 14

항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 연결된 항체-약물 접합체(ADC)를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 항체-약물 접합체(ADC)는,

캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A);

비캄토테신계 슈퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B);

캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및

항-세포사멸 단백질 저해 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 한 종류의 약물-링커 접합체 하나 이상이 각각 항체의 시스테인 또는 라이신을 포함하는 아미노산 잔기, 비천연 아미노산 잔기, 또는 당사슬에 결합된 것이 특징인, 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 암은 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형 성증후군, 교모세

포종, 구강암, 구순암, 근상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프 구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수 체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백 혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팡대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직암, 악성골암, 악성림프종, 악성종괴종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 율름스암, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신용모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문 근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암, 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나인, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 결합(연결)된 항체-약물 접합체(ADC) 및 이의 효율적인 제조 방법에 관한 것이다.
- [0002] 구체적으로는 캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A); 비캄토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B); 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및 항-세포사멸 단백질 저해제(anti-apoptotic protein inhibitor) 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 한 종류의 약물-링커 접합체 하나 이상이 각각 항체의 아미노산 잔기에 결합된 것일 수 있다.

배경 기술

- [0003] 항체-약물 접합체(antibody drug conjugate, ADC)는 항체의 높은 조직 선택성을 이용하여 강한 항암 효능을 가진 페이로드(payload)를 암 조직에만 선택적으로 전달하는 신약 플랫폼이다. ADC는 pM 수준의 낮은 농도에서도 암세포를 사멸하는 강력한 Payload를 암 조직에만 선택적으로 전달하고, 전신으로의 약물 노출은 최소화하여 항암 효능과 안전성을 동시에 확보할 수 있다.
- [0004] ADC 테크놀로지는 암세포의 표면에 발현된 특정 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 약물을 종양세포에 전달하는 방법이다. 대부분 ADC의 세포 내 도입은 clathrin-coated pit 기능으로 진행된다. 세포 내로 이동된 ADC는 clathrin에서 떨어지고 세포 내 다른 vesicles와 융합한 다음 endosome-lysosome 경로로 진행된다. 이어서 endosomes의 산성 환경에 있는 proteases가 링커를 절단 하고, 활성화(active)된 "free" 약물은 lysosomal membrane을 통과하여 cytoplasm로 이동한 후 약물의 molecular 타겟에 결합함으로써 종양세포의 세포주기는 정지되고 apoptosis로 인해 암세포가 죽게된다. 이 중 일정 양의 약물은 세포에서 수동적 확산되거나(passive diffusion), 능동적으로 수송되거나(active transport), 또는 죽은 세포를 통해 세포 밖으로 유출된다. 이때, 유출된 약물이 세포막 투과성을 지니면 주변 세포에도 들어가 소위 by-stander cellkilling 현상이 일어날 수도 있다.
- [0005] 항체-약물 접합체(ADC)는 크게 3가지 요소로 구성되어 있다.
- [0006] (i) 정상 세포에서 제한적으로 발현되는 표적 항원에 대하여 특이적으로 작용하는 항체(antibody).
- [0007] (ii) 표적 암 세포를 사멸하기 위해 고안된 세포 독성 약물(payload).
- [0008] (iii) 항체에 세포 독성 약물을 부착시키는 화학적 연결고리(linker).
- [0009] 즉, ADC는 단일 클론 항체의 표적화 능력과 세포 독성 약물의 강력한 세포 살상 능력을 결합시킨 항체의약품이다.
- [0010] ADC에 결합된 세포 독성 약물(payload)의 효력(potency)은 독성 약물 단독으로 사용할 때의 효력보다 보통 100~1000 배 더 크다. 이처럼 정상 조직에서 심각한 부작용을 유발하지 않으면서 표적 암 세포에 매우 특이적으로 작용하는 약물을 개발하는 것이 ADC의 개발 목적이다.
- [0011] ADC의 개발을 위해서는 표적 항원의 선택, 종양 세포에 의한 ADC의 내포작용, 약물 역가 및 약물과 항체 사이의 링커의 안정성에 대한 이해가 필요하다. 뿐만 아니라 세포 독성 약물과 항체의 접합 방법, 약물-항체

비율(이하, DAR), 항체의 특성 및 링커 종류에 따른 약물 결합력에 대한 효과는 안전하고 효과적인 ADC를 개발하는 데 아주 중요하다.

- [0012] ADC의 저해 요소는 기존 치료제와의 경쟁 및 다른 혁신 항체의약품과의 경쟁, 기존 치료요법과 비교하여 상대적으로 까다로운 제조과정 및 고가의 비용 소요, 링커의 안정성 및 불균일한 약물-항체 비율(DAR) 프로파일이 있다.
- [0013] 특히 항체와 세포 독성 약물을 연결하는 링커의 안정성은 임상시험에서의 독성과 밀접한 관계가 있다.
- [0014] 즉, ADC에서 발생 가능한 가장 큰 문제는 표적 암세포 외의 정상 조직에서 단일클론항체와 세포 독성 약물을 연결하는 링커가 조기에 끊어지면 원하지 않는 독성이 나타날 수 있다는 점이다. 미국 시장의 첫 번째 ADC인 Mylotarg가 2010년에 철수했던 이유는 항체에 부착된 링커의 불안정성과 이로 인한 세포독성 약물의 강력한 독성으로 인한 부작용과 관련된 것으로 알려져 있다. 그 외의 독성 관련 문제는 정상 조직에서도 발견되는 항원을 ADC가 표적화 할 때이다.
- [0015] 현재까지 승인된 ADC와 임상 파이프라인에 속한 ADC는 저분자 세포 독성 약물을 항체의 라이신(lysine)이나 시스테인(cysteine) 잔기에 링커를 통해 결합시켜 제조된다. Adcetris와 Kadcyla, 그리고 2017년 재승인된 Mylotarg에 이르기까지 기존의 제조 공정에서는 항체에 붙는 세포 독성 약물의 수를 제한적으로만 통제할 수 있다. 예를 들어 Kadcyla의 약물-항체 비율(DAR) 프로파일에 대한 연구 결과에 따르면 평균 4개의 약물이 항체에 결합되어 있지만 가용 결합 부위 (lysine 잔기)가 단일클론항체에 약 80개에 달하고, 반응성이 높은 표면의 라이신 (lysine)도 대략 8~10개 정도 되기에 이 DAR 프로파일은 0부터 8까지 다양하다. 2017년 새롭게 승인된 Pfizer의 Besponsa (Inotuzumab ozogamicin)를 포함하여 적절히 결합 가능한 약물-항체 비율(DAR)을 위한 플랫폼 개발이 몇몇 회사에서 이루어지고 있다.
- [0016] 그러나, T-DMI(상품명: 캐싸일라(등록상표))을 비롯한 ADC는 개발 당초부터 그 불균일성이 문제가 되었다. 즉, 항체 중에 70 내지 80 정도 있는 Lys 잔기에 대하여, 저분자 약물을 랜덤으로 반응시키고 있기 때문에, 약물 항체비 (Drug/Antibody Ratio: DAR)나 콘주게이션 위치가 일정하지 않다. 통상 이러한 랜덤 콘주게이션법으로 ADC를 생산하게 되면 DAR이 0 내지 8의 범위가 되고, 약물의 결합 수가 다른 복수의 약제가 생기는 것으로 알려져 있다. 최근 ADC의 약물의 결합 수 및 결합 위치를 변화시키면, 체내 동태나 약물의 방출 속도, 효과가 변화하는 것이 보고되어 있다. 이러한 점에서 차세대형 ADC에서는 콘주게이션하는 약물의 개수와 위치를 제어하는 것이 요구되고 있다. 개수 및 위치가 일정하면, 기대대로의 efficacy, 콘주게이션 약제의 배리에이션, 로트 차이, 이른바 레귤레이션의 문제가 해결될 수 있다.
- [0017] 항체의 위치 선택적 수식법으로, 유전자 공학적 수법 또는 효소를 사용한 수식법이 있다. 유전자 공학적 수식법에 관해서는 위치 선택성, 개수 선택성은 제어할 수 있다.
- [0018] 최근, CCAP(Chemical Conjugation by Affinity Peptide)법이 개발되었다(US 10227383 B2, US 2021/0139548A1, ACS Omega (2019) Vol. 4, pp. 20564 - 20570, 모두 본 명세서에 그 내용이 통합됨). CCAP법은, NHS-활성화된 에스테르 및 약물이 친화성 펩티드(Affinity Peptide)와 연결된 펩티드 시약을 항체와 반응시키는 방법(즉, 펩티드 부분을 포함하는 링커를 통한 ADC의 제작 방법)에 의해, 항체의 위치 선택적인 수식에 성공하고 있다. CCAP 법은 세계에서 처음으로, 화학 합성적 수법에 의해, 약물로 항체 Fc 영역을 위치 선택적으로 수식하는 것에 성공한 것이고, 게다가 실용상 양호한 결과 [반응 시간 30분, 수율 70%(DAR 1의 경우), 위치 선택성 100%]가 확인되고 있다. 펩티드 시약을 5등량 정도 첨가함으로써 DAR를 2로 제어할 수 있는 것이 실증되고 있고, 수식 위치도 제어할 수 있는 점에서 획기적이다.
- [0019] 한편, 약물-항체 비율 (DAR)은 ADC의 약물 동태학적 특성과 생체 내 분포에 영향을 주는 가장 중요한 특성 중 하나이다. 더 높은 DAR을 가진 ADC는 시험관 내 실험에서는 더 큰 효능을 나타낸다. 하지만 높은 DAR을 가진 ADC는 생체 내 효능은 낮는데, 이는 더 많은 약물이 결합된 ADC의 혈장 청소율이 그렇지 않은 ADC의 혈장 청소율보다 높기 때문일 것으로 알려져 있다. 이러한 관찰 결과로 인해 승인된 ADC들을 포함하여 개발 중인 현재의 ADC는 DAR이 2~4로 조절되어 있고, 그로 인해 항체의 시스테인 또는 라이신 잔기에 대한 약물 결합 방식에 사용되는 기술이 주로 사용되고 있다. DAR을 높이려는 시도는 많았으나 대부분 실패했으며, 그 원인은 특히 세포 독성 약물과 링커가 모두 소수성이기 때문이며, 또 다른 이유로는 ADC의 응집, 표적 항원에 대한 친화력의 상실 또는 높은 혈장 청소율 때문이다. 최근에 시스테인 결합을 통해 DAR값이 8인 균질 ADC가 생성되었으나, 이 ADC도 독특한 약물-링커 복합체와 항체에 대한 큰 변형으로 인해 혈장 내 청소율이 높아졌다.
- [0020] "이상적인" ADC의 개념은 표적 암세포에 최대의 세포 독성 약물을 전달하는 것이다. 장기간 혈장 내 존재하는

high-DAR ADC를 개발하기 위해서는 항체에 결합하는 약물의 수와 항체의 변형 정도 간의 정교한 균형을 연구하고 설정해야 한다. 또한 기존 ADC 링커 기술을 극복한 PEG 링커 등의 친수성 링커 또는 분지형 링커에 대한 기술 개발이 더 필요하다.

[0021] 나아가, ADC 기술분야가 발달함에 따라서 이제 단순히 강력한 항암 화학약물이나 Radionuclei를 항체를 이용하여 암 조직에 선택적으로 전달하는 것에 그치는 것이 아니라 다양한 약리 효능을 가지는 payload 또는 이들의 조합을 암 조직에 효율적으로 전달하여 항암 효능을 극대화하는 것이 중요해지고 있다. 특히 ADC의 제조를 위하여 MMAE, Hemiasterlin, PBD 등의 강력한 payload를 사용하더라도 전임상 동물 시험에서와는 다르게 사람에서는 암이 완전히 사라지는 정도의 강력한 항암 효능을 얻지 못함에 따라서 ADC의 효능을 개선하기 위하여 단순히 MMAE, Hemiasterlin, PBD 등의 payload를 많이 사용하는 것보다는 조합을 통하여 최대의 효율을 내기 위한 방법 (예: 항-세포사멸 단백질 저해제(anti-apoptotic protein inhibitor; (Bcl-XL inhibitor (Navitoclax 등)과 MMAE 또는 Top 1 저해제 조합, CHEK1 저해제와 Top 1 저해제의 조합 등))이 시도되고 있으나, 현재까지는 dual payload ADC를 효율적으로 제조하는 방법이 제한되어 있는 문제가 있다. 현재의 임상적 시도들은 대부분 MMAE 나 Top 1 저해제 등의 강력한 항암 약물을 ADC의 형태로 사용하고 항-세포사멸 단백질 저해제(anti-apoptotic protein inhibitor) 등의 콤비 약물을 전신 투여로 사용하는 것이 일반적이다. AbbVie에서 ABBV-155와 같은 Bcl-XL 저해제를 payload로 사용하는 ADC를 개발하고 있으나, 제한된 수의 항원만이 암 세포의 표면에 존재하고 있기 때문에, 두 종류의 ADC를 사용하는 것에 의해서 약물 전달의 효율이 제한될 것이라는 우려가 높으며, 일반적인 항암제에 비하여 높은 약가의 ADC를 2종 이상 사용하는 것에 대한 어려움으로 인해 적용이 제한적일 것으로 예측되고 있다. Debiopharm사에서는 2종의 payload를 1 : 1 비율로 결합한 linker-payload 시스템을 사용하여 2종의 약물을 전달하고 있으나, 아직 상대적으로 높은 aggregation 비율 및 정해진 비율로만 2종의 약물을 전달해야 하는 한계가 있다. 즉, aggregation의 우려를 낮추면서도, 다양한 비율로 하나 이상의 payload를 효율적으로 전달할 수 있는 새로운 구조의 ADC는 아직 실용화되지 않고 있는 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위해, 하나의 항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 링커를 통해 연결되어, 약물 동태학적 특성 및 생체 내 분포가 원하는대로 조절된 항체-약물 접합체(ADC)를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명의 제1양태는 하나의 항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 연결된 항체-약물 접합체(ADC)으로서, 캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A); 비캄토테신계 수퍼 특신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B); 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및 항-세포사멸 단백질 저해제(anti-apoptotic protein inhibitor) 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 한 종류의 약물-링커 접합체 하나 이상이 각각 항체의 시스테인 및 라이신 잔기에 결합된 것이 특징인 항체-약물 접합체 (ADC)를 제공한다.

[0024] 본 발명의 제2양태는 제1양태에 따라, 하나의 항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 연결된 항체-약물 접합체(ADC)를 제조하는 방법으로서, 캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A); 비캄토테신계 수퍼 특신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B); 및 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및 항-세포사멸 단백질 저해제(anti-apoptotic protein inhibitor) 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)로 이루어진 군에서 적어도 어느 한 종류의 약물-링커 접합체를 선정하는 제1단계; 및 (i) 항체와의 결합 위치의 아미노산 잔기, (ii) 결합 순서 및/또는 (iii) 결합 방법을 약물-링커 접합체에 따라 서로 상이하게 사용하여, 각 약물-링커 접합체를 항체의 시스테인 또는 라이신 잔기에 결합시키는 제2단계를 포함하는 것이 특징인 ADC 제조방법을 제공한다.

[0025] 이하, 본 발명을 설명한다.

[0026] 본 명세서에서, 용어 "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 리간드 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론 항체, 단일클론 항체, 전체 (whole) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체 및 이가 (bivalent) 또는 이중특 이성 분자, 디아바디, 트리야바디 및 테트라바디를 포함한다. 상기 용어는 추가로 FcRn에 대한 결합 기능을 보유한 단쇄 항체, 스캐프, 항체 불변영역의 유도체 및 단백질 스캐폴드에 기초한 인공 항체를 포함한다. 전체 항체는 2 개의

전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이 설피이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형 (subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0027]

바람직하게는, 본 발명의 항체는 우렐루맵 (Urelumab), 우토밀루맵 (Utomilumab), 벵텔로비맵 (Bebtelovimab), 아두카누맵 (Aducanumab), 바피네주맵 (Bapinezumab), 크레네주맵 (Crenezumab), 도나네맵 (Donanemab), 간테네루맵 (Gantenerumab), 레카네맵 (Lecanemab), 솔라네주맵 (Solanezumab), 네스바쿠맵 (Nesvacumab), 에비나쿠맵 (Evinacumab), 에놀리투주맵 (Enoblituzumab), 옴부르타맵 (Omburtamab), 벨리루맵 (Belimumab), 이아나루맵 (Ianalumab), 타발루맵 (Tabalumab), 베르틸리루맵 (Bertilimumab), 모가물리주맵 (Mogamulizumab), 레론리맵 (Leronlimab), 시필리주맵 (Siplizumab), 포랄루맵 (Foralumab), 무로모납-CD3 (Muromonab-CD3), 오텔릭시주맵 (Otelixizumab), 테플리주맵 (Teplizumab), 이발리주맵 (Ibalizumab), 트레갈리주맵 (Tregalizumab), 자노리루맵 (Zanolimumab), 이톨리주맵 (Itolizumab), 에팔리주맵 (Efalizumab), 이네빌리주맵 (Inebilizumab), 타파시타맵 (Tafasitamab), 토시투모맵 (Tositumomab), 오크렐리주맵 (Ocrelizumab), 오파투무맵 (Ofatumumab), 리톡시맵 (Rituximab), 우블리톡시맵 (Ublituximab), 벨투주맵 (Veltuzumab), 에프라투주맵 (Epratuzumab), 바실릭시맵 (Basiliximab), 다클리주맵 (Daclizumab), 바르틸루맵 (Varlilumab), 룰리주맵 (Lulizumab), 이라투무맵 (Iratumumab), 린투주맵 (Lintuzumab), 다라투무맵 (Daratumumab), 펠자르타맵 (Felzartamab), 이사톡시맵 (Isatuximab), 메자기타맵 (Mezagitamab), 블레셀루맵 (Bleselumab), 다세투주맵 (Dacetuzumab), 이스칼리맵 (Iscalimab), 루카투무맵 (Lucatumumab), 미타잘리맵 (Mitazalimab), 소티갈리맵 (Sotigalimab), 다피롤리주맵 (Dapirolizumab), 아파미스타맵 (Apamistamab), 리구팔리맵 (Ligufalimab), 마그롤리맵 (Magrolimab), 알렘투주맵 (Alemtuzumab), 크리잔리주맵 (Crizanlizumab), 인클라쿠맵 (Inclacumab), 쿠사투주맵 (Cusatumumab), 올레클루맵 (Oleclumab), 밀라투주맵 (Milatuzumab), 갈릭시맵 (Galiximab), 카로톡시맵 (Carotuximab), 아데카투무맵 (Adecatumumab), 엠티네주맵 (Eptinezumab), 에레누맵 (Erenumab), 프레마네주맵 (Fremanezumab), 갈카네주맵 (Galcanezumab), 졸베크시맵 (Zolbetuximab), 오나르투주맵 (Onartuzumab), 에쿨리주맵 (Eculizumab), 포젤리맵 (Pozelimab), 라블리주맵 (Ravulizumab), 라크노투주맵 (Lacnotuzumab), 악사틸리맵 (Axatilimab), 카비랄리주맵 (Cabiralizumab), 에막투주맵 (Emactuzumab), 이필리루맵 (Ipilimumab), 쿠아본리맵 (Quavonlimab), 트레멜리루맵 (Tremelimumab), 잘리프렐리맵 (Zalifrelimab), 세톡시맵 (Cetuximab), 데파톡시주맵 (Depatuxizumab), 푸톡시맵 (Futuximab), 임가투주맵 (Imgatumumab), 마투주맵 (Matuzumab), 모도톡시맵 (Modotuximab), 네씨투무맵 (Necitumumab), 니모투주맵 (Nimotuzumab), 파니투무맵 (Panitumumab), 토무조톡시맵 (Tomuzotuximab), 잘루투무맵 (Zalutumumab), 바토클리맵 (Batoclimab), 니포칼리맵 (Nipocalimab), 로자놀릭시주맵 (Rozanolixizumab), 부로수맵 (Burosumab), 팔레투주맵 (Farletuzumab), 디누톡시맵 (Dinutuximab), 낙시타맵 (Naxitamab), 라기필리맵 (Ragifilimab), 김실루맵 (Gimsilumab), 렌질루맵 (Lenzilumab), 마브릴리루맵 (Mavrilimumab), 나밀루맵 (Namilumab), 오티리맵 (Otilimab), 플론마를리맵 (Plonmarlimab), 코드리투주맵 (Codrituzumab), 마르게톡시맵 (Margetuximab), 페르투주맵 (Pertuzumab), 트라스트투주맵 (Trastuzumab), 다토포타맵 (Datopotamab), 파트리투맵 (Patritumab), 세리반투맵 (Seribantumab), 둘리고투주맵 (Duligotuzumab), 피클라투주맵 (Ficlatuzumab), 릴로투무맵 (Rilotumumab), 알롬필리맵 (Alomfilimab), 아니프롤루맵 (Anifrolumab), 에마팔루맵 (Emapalumab), 리젤리주맵 (Ligelizumab), 오말리주맵 (Omalizumab), 씩수투무맵 (Cixutumumab), 달로투주맵 (Dalotuzumab), 피키투무맵 (Figitumumab), 가니투맵 (Ganitumab), 테프로투무맵 (Teprotumumab), 베르메키맵 (Bermekimab), 카나기누맵 (Canakinumab), 게보키주맵 (Gevokizumab), 브리아키누맵 (Briakinumab), 우스테키누맵 (Ustekinumab), 안루킨주맵 (Anrukinzumab), 쟌다키맵 (Cendakimab), 레브리키주맵 (Lebrikizumab), 트랄로키누맵 (Tralokinumab), 브로달루맵 (Brodalumab), 비메키주맵 (Bimekizumab), 익세키주맵 (Ixekizumab), 세쿠기누맵 (Secukinumab), 브라지쿠맵 (Brazikumab), 구셀쿠맵 (Guselkumab), 미리키주맵 (Mirikizumab), 리산키주맵 (Risankizumab), 틸드라키주맵 (Tildrakizumab), 네몰리주맵 (Nemolizumab), 임시돌리맵 (Imsidolimab), 스페솔리맵 (Spesolimab), 파스콜리주맵 (Pascalizumab), 두필루맵 (Dupilumab), 데페모키맵 (Depemokimab), 메폴리주맵 (Mepolizumab), 레슬리주맵 (Reslizumab), 벤랄리주맵 (Benralizumab), 클라자키주맵 (Clazakizumab), 올로키주맵 (Olokizumab), 실톡시맵 (Siltuximab), 시루쿠맵 (Sirukumab), 질티베키맵 (Ziltivekimab), 레빌리맵 (Levilimab), 사릴루맵 (Sarilumab), 사트랄리주맵 (Satralizumab), 토셀리주맵 (Tocilizumab), 아비투주맵 (Abituzumab), 파베젤리맵 (Favezelimab), 피안리맵 (Fianlimab), 이에라밀리맵 (Ieramilimab), 렐라틀리맵 (Relatlimab), 심투주맵 (Simtuzumab), 아바고보맵 (Abagovomab), 오레고보맵 (Oregovomab), 타네주맵 (Tanezumab), 이복솔리맵 (Ivuxolimab), 로카틴리맵 (Rocatinlimab), 타볼리맵 (Tavolimab), 텔라조를리맵 (Telazolrimab), 본레롤리주맵 (Vonlerolizumab), 알리로쿠맵 (Alirocumab), 보코씨주맵 (Bococizumab), 에브

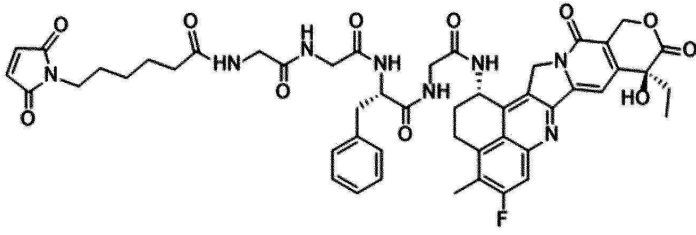
로누씨맵 (Ebronucimab), 에볼로쿠맵 (Evolocumab), 프로보씨맵 (Frovocimab), 온게리씨맵 (Ongericimab), 타폴레씨맵 (Tafolecimab), 도스타를리맵 (Dostarlimab), 발스틸리맵 (Balstilimab), 캄렐리주맵 (Camrelizumab), 쉐미플리맵 (Cemiplimab), 겐타놀리맵 (Geptanolimab), 니볼루맵 (Nivolumab), 펌브롤리주맵 (Pembrolizumab), 펜풀리맵 (Penpulimab), 피딜리주맵 (Pidilizumab), 프롤골리맵 (Prolgolimab), 레티판리맵 (Retifanlimab), 사산리맵 (Sasanlimab), 세르플루리맵 (Serplulimab), 신틸리맵 (Sintilimab), 스파르탈리주맵 (Spartalizumab), 티슬렐리주맵 (Tislelizumab), 토리팔리맵 (Toripalimab), 예자벤리맵 (Ezabenlimab), 짐베렐리맵 (Zimberelimab), 아테졸리주맵 (Atezolizumab), 아벨루맵 (Avelumab), 코시벨리맵 (Cosibelimab), 수게말리맵 (Sugemalimab), 두르발루맵 (Durvalumab), 엔바폴리맵 (Envafofolimab), 수브라톡수맵 (Suvratoxumab), 데노수맵 (Denosumab), 질로베르타맵 (Zilovetamab), 엘로투주맵 (Elotuzumab), 돔바날리맵 (Domvanalimab), 에티길리맵 (Etigilimab), 오씨페를리맵 (Ociperlimab), 티라골루맵 (Tiragolumab), 비보스톨리맵 (Vibostolimab), 수르제비실리맵 (Surzebiclimab), 코볼리맵 (Cobolimab), 사바톨리맵 (Sabatolimab), 콘씨주맵 (Concizumab), 마르스타씨맵 (Marstacimab), 아달리무맵 (Adalimumab), 골리무맵 (Golimumab), 인플릭시맵 (Infliximab), 쉐르톨리주맵 (Certolizumab), 코나투무맵 (Conatumumab), 티가투주맵 (Tigatuzumab), 테제펠루맵 (Tezepelumab), 가티포투주맵 (Gatipotuzumab), 카비랄리주맵 (Cabiralizumab), 베바씨주맵 (Bevacizumab), 브롤루씨주맵 (Brolucizumab), 라니비주맵 (Ranibizumab), 올린바씨맵 (Olinvacimab), 이크루쿠맵 (Icrucumab), 라무씨루맵 (Ramucirumab), 카프라씨주맵 (Caplacizumab), 아부틸루맵 (Abrilumab), 에트로리주맵 (Etralizumab), 베돌리주맵 (Vedolizumab), 인테투무맵 (Intetumumab), 나탈리주맵 (Natalizumab), 오브린다타맵 (Obrindatamab), 엘라나타맵 (Elranatamab), 린보셀타맵 (Linvoseltamab), 테클리스타맵 (Teclistamab), 엡코리타맵 (Epcoritamab), 글로피타맵 (Glofitamab), 모수네투주맵 (Mosunetuzumab), 오드로넥스타맵 (Odronektamab), 플로테투주맵 (Flotetuzumab), 비베크타맵 (Vibecotamab), 카투막소맵 (Catumaxomab), 씨비사타맵 (Cibisatamab), 탈쿠에타맵 (Talquetamab), 우바마타맵 (Ubatamab), 엡피자타맵 (Emfizatamab), 블리나투모맵 (Blinatumomab), 아미반타맵 (Amivantamab), 에미씨주맵 (Emicizumab), 제노쿠투주맵 (Zenocutuzumab), 자니다타맵 (Zanidatamab), 티불리주맵 (Tibulizumab), 나프투모맵 (Naptumomab), 벨란타맵 (Belantamab), 피베키맵 (Pivekimab), 프랄루자타맵 (Praluzatamab), 콜투시맵 (Coltuximab), 데닌투주맵 (Denintuzumab), 론카스투시맵 (Loncastuximab), 이브리투모맵 (Ibritumomab), 이노투주맵 (Inotuzumab), 에프라투주맵 (Epratuzumab), 목세투모맵 (Moxetumomab), 브렌투시맵 (Brentuximab), 겐투주맵 (Gentuzumab), 바다스투시맵 (Vadastuximab), 로보투주맵 (Lorvotuzumab), 폴라투주맵 (Polatuzumab), 투사마타맵 (Tusamitamab), 텔리소투주맵 (Telisotuzumab), 로발피투주맵 (Rovalpituzumab), 데파투시주맵 (Depatuxizumab), 파를레투주맵 (Farletuzumab), 미르베크시맵 (Mirvetuximab), 디시타맵 (Disitamab), 아네투맵 (Anetumab), 엔포르투맵 (Enfortumab), 사씨투주맵 고비테칸 (Sacituzumab), 보바릴리주맵 (Vobarilizumab), 카도닐리맵 (Cadonilimab), 부달리맵 (Vudalimab), 테보텔리맵 (Tebotelimab), 이보네스씨맵 (Ivonescimab), 에르폰릴리맵 (Erfonrilimab), 오조랄리주맵 (Ozoralizumab), 파리시맵 (Faricimab), 바누씨주맵 (Vanucizumab) 및 나비씨시주맵 (Navicixizumab)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나이다.

- [0028] 본 명세서에서, 용어 "약물-링커 접합체"는 항체-약물 접합체(ADC)의 제조를 위한 물질로서 항체가 연결되지 않은 것을 의미한다.
- [0029] 본 명세서에서, 용어 "약물-링커 접합체가 연결된"은 약물 항체비(Drug/Antibody Ratio: DAR) 및/또는 콘쥬게이션 위치가 일정하게 결합되었다는 의미다.
- [0030] 본 발명의 약물-링커 접합체는 하나 이상(바람직하게는, 둘)이 각각 항체의 시스템인 또는 라이신을 포함하는 아미노산 잔기, 비천연 아미노산 잔기, 또는 당사슬에 결합될 수 있다.
- [0031] 같은 항체 아미노산 서열에 붙는 링커일지라도 링커의 종류 및 길이에 따라 그리고 링커가 접합되는 항체의 위치에 따라 입체적인 환경, 전자기적인 환경 측면에서 링커의 탈접합으로 인한 생체 내 변환에 영향을 줄 수 있다. 또한, ADC는 항체가 약물과 결합되기 전의 항체와 같은 친화력을 유지해야 한다. 즉, 항체에 결합된 약물로 인해 항체-항원 결합에 지장이 없어야 한다.
- [0032] 따라서, 이러한 점을 고려하여, 다양한 약물-링커 접합체 조합을 설계할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서는 약물-링커 접합체에 따라 서로 상이한 (i) 항체와의 결합 위치의 아미노산 잔기, (ii) 결합 순서 및/또는 (iii) 결합 방법을 사용하여, 항체의 시스템인 및 라이신 잔기에 균질하게 대칭적으로 결합되는 하나 이상의 약물-링커 접합체를 선정하기 위해, 캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A); 비 캄토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B); 캄토테신계 약물 및 효소민감성

링커 조합의 약물-링커 접합체(C); 및 항-세포사멸 단백질 저해제(anti-apoptotic protein inhibitor) 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)로 분류하는 것이 특징이다. 그러나, 서로 다른 enzymatic cleavable linker를 사용한다든지, 다른 class의 약물 두 가지를 붙이는 것도 본 발명의 범주에 속한다.

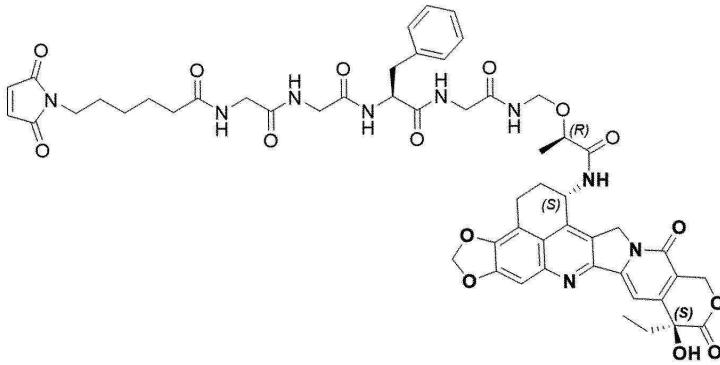
- [0034] cytotoxicity가 다른 2종인 약물인 한, 각각 본 발명의 캄토테신계 약물 및 비캄토테신계 수퍼 독신 약물 범주에 속한다.
- [0035] 예컨대, 본 발명의 항체-약물 접합체는 각각 상기 (B)와 (C)의 약물-링커 접합체에 해당하는 2종의 화합물이 결합된 것일 수 있다.
- [0036] 이때, 항체-약물 접합체는 선택된 약물-링커 접합체를 혼합하여 혼합물을 준비하고, 상기 혼합물을 환원된 항체와 반응하여 컨주게이션(conjugation)시켜 제조할 수 있다.
- [0037] 또 다른 구체예에서, 환원된 항체에 상기 (B)의 약물-링커 접합체를 항체의 몰 당량 대비 2 내지 4배로 첨가하여 1차 반응물을 제조한 후, 상기 1차 반응물에 상기 (C)의 약물-링커를 첨가하여 2차 반응물을 제조하는 방법으로 항체-약물 접합체를 제조할 수 있다.
- [0038] cytotoxicity가 다른 2종인 약물인 한, 각각 본 발명의 캄 토테신계 약물 및 비캄토테신계 수퍼 독신 약물 범주에 속한다.
- [0039] 본 발명에 따른 이중약물 ADC(하나의 항체에 두 개의 약물-링커가 결합된 항체-약물 접합체; 이하, Dual-payload ADC라고도 함)는 두 종류의 payload를 정해진 비율로 homogeneous한 구조를 가지는 ADC라는 특징을 가지며, 자유롭게 두 종류 이상의 payload를 도입하여 다양한 약리 효능을 얻을 수 있는 특징이 있다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 항체-약물 접합체(ADC)는 하나의 항체에 제1 약물-링커 접합체 및 제2 약물-링커 접합체가 결합된 것이다. 상기 제1 약물-링커 접합체 및 제2 약물-링커 접합체는 각각 약물-링커 접합체 4개 그룹(A, B, C, D)에서 선택된 어느 한 종류의 접합체이다. 본 발명에서 상기 제1 약물-링커 접합체 및 제2 약물-링커 접합체 각각에 포함된 링커는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 예컨대, 상기 제1 약물-링커 접합체 또는 제2 약물-링커 접합체에 포함된 링커는, GGFG, val-cit 및 이들의 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 어느 하나의 구조를 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 구체예에서, 항체-약물 접합체(ADC)는 하나의 항체에 제1 약물-링커 접합체 및 제2 약물-링커 접합체가 결합된 것으로서, 상기 제1 약물-링커 접합체는 비캄토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B)이고, 상기 제2 약물-링커 접합체는 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C)이다. 본 발명에서, 항체-약물 접합체의 DAR은 4 내지 8일 수 있다. 전체 DAR 8인 경우, 제1 약물 접합체에 포함되는 약물과 제2 약물 접합체에 포함되는 약물은 1:1 내지 1:7 (예컨대, 1:7, 2:6, 3:4 또는 4:4)로 항체에 결합할 수 있으며, 전체 DAR이 6인 경우 1:1 내지 1:5 (예컨대, 1:5, 2:4, 3:3), 전체 DAR이 4인 경우 1:1 내지 1:3 (예컨대, 1:3, 2:2)의 구성으로 항체에 결합할 수 있다.
- [0042] 상기 제1 약물-링커 접합체 및 제2 약물-링커 접합체 각각에 포함된 링커는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 상기 제1 약물-링커 접합체에 포함되는 약물은 오리스타틴(Auristatin)계열 화합물이고, 상기 제2 약물-링커 접합체에 포함되는 약물은 토포이소머라아제 I (Topoisomerase I) 저해제이다. 여기서, 상기 토포이소머라아제 I 저해제는 SN-38, Exatecan, Dxd, FL118 및 7-aminoalkyl-substituted camptothecin 계열의 화합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 화합물 또는 이의 유도체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 암 세포 내부에서 Topoisomerase I 효소를 강력하게 저해하여 암 세포의 사멸 효과를 가지고 올 수 있는 화합물이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 제1 약물-링커 접합체의 약물/항체 비(Drug-to antibody ratio)는 다양하게 필요에 따라 조절할 수 있다.
- [0044] 상기 토포이소머라아제 I (Topoisomerase I) 저해제를 약물로 포함하는 약물-링커 접합체는 다음 화학식 2 내지 5 중 어느 하나로 표현되는 것일 수 있다.

[0045] [화학식 2]



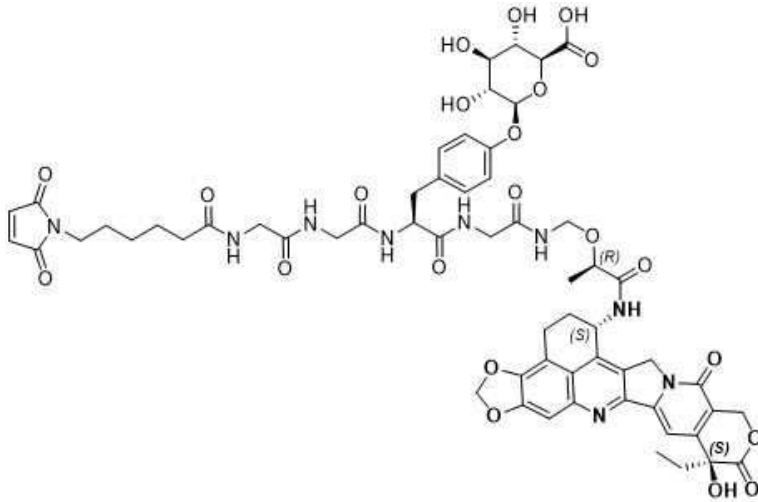
[0046]

[0047] [화학식 3]



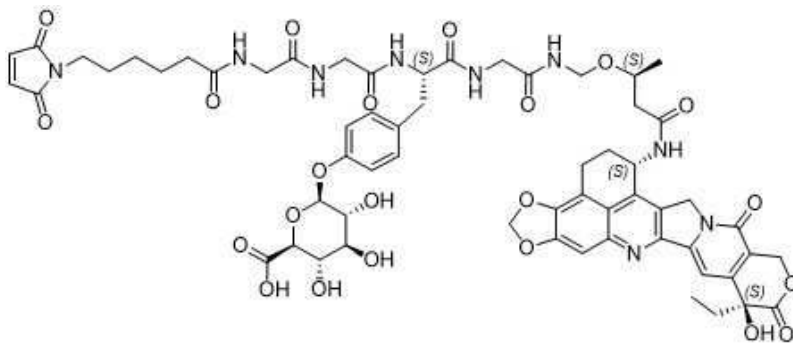
[0048]

[0049] [화학식 4]



[0050]

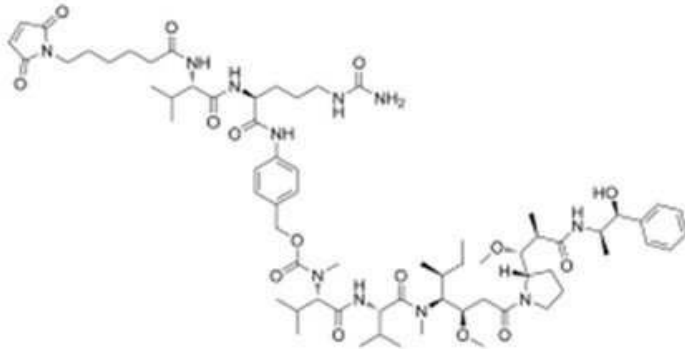
[0051] [화학식 5]



[0052]

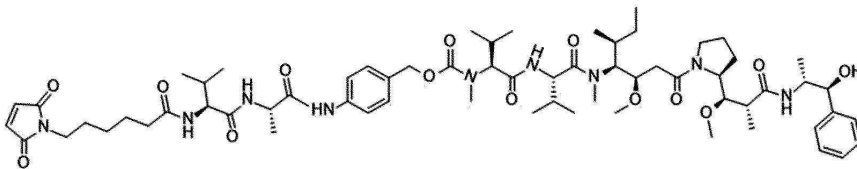
[0054] 상기 오리스타틴(Auristatin)계열 화합물을 약물로 포함하는 약물-링커 접합체는 다음 화학식 6 또는 7 중 어느 하나로 표현되는 것일 수 있다.

[0055] [화학식 6]



[0056]

[0057] [화학식 7]



[0058]

[0060] 본 발명에서 링커는 암 세포 내부 또는 종양 미세환경에서 선택적으로 활성화되어 있는 효소에 의하여 용이하게 절단되어 약물을 방출하는 링커들을 사용할 수 있으며 구체적으로는 GGFG 링커, AAA 링커, Val-Cit 링커, Val-Ala 링커, 기타 다른 효소에 의하여 절단되는 Glucuronidase 절단 링커, Legumarin 절단 링커 등도 용이하게 사용할 수 있다. 또한, 하나의 효소가 아니라 두개의 효소에 의하여 절단이 이루어진 후에야 약물을 방출하는 tandem 링커 역시 사용이 가능하다.

[0062] [세포 독성 약물]

[0063] 타겟 세포에 결합한 후에는, receptor-mediated endocytosis라는 프 로세스에 의해 ADC는 세포 내로 내재화 (internalize)된다. 이때 충분한 농도의 활성약물이 세포 내로 들어가야 하지만, 항원-항체 complex에 의한 internalization 과정은 일반적으로 비효율적이고 세포 표면에 있는 항원의 수도 일반적으로 $<1 \times 10^5$ receptors/cell로 제한되어 있어서, 매우 강력한 약물을 사용하여 낮은 농도의 약물에서도 충분히 종양 세포를 죽일 수 있어야 한다. 따라서 항체에 결합되어 ADC 로 사용될 약물은 보편적으로 사용되는 항암제보다 100-1000 배 이상 세포독성이 있는 약물을 사용한다.

[0064] ADC에 도입된 강력한 세포독성약물대부분은 독성이 너무 강하고 방관자 효과로 인해 정상세포에도 영향을 미친다. 또한 항체에 영향을 적게 주면서 약물을 접합하여야 하기 때문에 운반할 수 있는 payload의 양은 한정적이다. 이는 ADC에 적용하기 위한 세포독성약물은 낮은 농도 (nM 또는 pM)에서 대부분의 종양세 포를 죽일 수 있어야 하며, 약물 방출 조절이 되면서 치료효과를 나타낼 필요가 있음을 나타낸다. 따라서 payload로 적용할 수 있는 세포독성약물은 매우 다양하다. 면역원성이 낮아야 하며 체내 순환 중에 안정적인 특성을 갖고 있어야 한다. 안정하지 않은 cytotoxic payload는 conjugate 또는 보관하는 동안 약물의 변형이 올 수 있기 때문이다. 현재 승인 또는 임상중인 ADC에서 사용되는 세포독성약물은 크게 미세소관 파괴 약물과 DNA 변형 약물 2가지로 나뉘며 최근 topoisomerase inhibitor 약물이 승인을 받으면서 다양한 기전의 약물에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0065] ADC에 사용되는 2가지 범주의 주요 세포 독성 약물로는 미세소관 파괴 약물과 DNA 변형 약물이 주를 이루며, 또한 anti-apoptotic protein 저해제도 사용되고 있다.

[0066] 미세 소관은 세포주기에서 매우 중요한 역할을 하는데, 미세 소관에서 이상이 발생하는 경우 세포 분열이 일어날 수 없다. 대부분의 알려진 미세 소관 파괴 제제는 천연물에서 유래되었으며 높은 세포 독성을 나타낸다. 미세 소관에 영향을 미치고 세포 주기의 특정 단계에서만 작용하는 약물과 달리, DNA 변형 제제는 어느 시점에서나 세포를 죽일 수 있다.

[0067] 세포 독성 약물인 monomethyl auristatin E (MMAE, 약물명으로 'vedotin')는 MMAE는 미세소관에 결합하여 세포 주기를 멈추고 세포 사멸을 유발한다.

[0068] 표 1에는 임상 단계의 ADC에 주로 사용되는 세포 독성 약물을 작용 기전에 따라 분류하였다.

표 1

세포 독성 약물	작용기전
Auristatins	Tubulin polymerase inhibitor
Maytansines	Tubulin depolymerisation
Calicheamicins	DNA cleavage
Duocarmycins	DNA minor groove alkylating agent
PBD dimers	DNA minor groove cross-linker
SN-38	DNA topoisomerase inhibitor

[0070] 대표적으로 사용되는 미세 소관 파괴 약물은 Seattle Genetics의 auristatin 계열이다. Monomethyl Auristatin E (MMAE) 또는 vedotin이라 불리는 세포 독성 약물은 인도양 바다의 Dolabella auricularia로부터 분리된 자연 세포 독성 유사 펩타이드인 dolastatin 10의 유도체로 강력한 미세 소관 중합 억제제이다. 이 약물은 Cathepsin B 효소에 의해 항체에서 절단되어 방출되도록 고안된 반면 2차 유도체인 MMAF의 경우 비-분해성 링커에 결합되어 세포 방출이 제한된 형태로 개발 중이다.

[0071] 또 다른 미세 소관 억제제로 Immunogen에서 개발한 ansamycin 항생제는 Maytenus serrata속의 에티오피아 관목에서 분리된 천연물 maytansine에서 유래된 것이다. Maytansine은 tubulin에 결합하여 미세 소관 집합을 억제하고 미세 소관 해체를 유도하여 세포 분열을 방해한다. Maytansine은 많은 종양 세포주에서 세포 독성을 나타내 종양 성장을 억제할 수 있다. 이러한 유도체는 thiol기를 통해 링커에 접합시키도록 설계되었다. DM1의 경우 세포 내부의 환원성 조건에서 쉽게 절단된다. 반면 DM4의 경우 이황화 결합(disulfide bond)에 대해 메틸기가 치환되어 환원이 쉽게 일어나지 않는다.

[0072] 암 세포와 같이 빠르게 분열하는 세포는 천천히 분열하는 정상 세포 보다 세포 독성 물질의 영향에 훨씬 더 민감하기 때문에 DNA 변형 제제를 사용하여 암세포를 제거할 수 있다. DNA 손상은 가장 보편적으로 사용되는 많은 화학 요법 제제의 작용기전이지만, 임상에서 사용되는 치료제는 효력이 증가함에 따라 치료역 (therapeutic window)이 좁아짐으로 인한 독성의 위험으로 치료제로 사용하기 어려 워진다. 하지만 이러한 강력한 효력을 가진 약물을 표적성이 높은 항체에 결합하면 약물의 안전성과 효력을 동시에 높일 수 있게 된다.

[0073] 대부분의 DNA 변형 제제도 천연물로부터 유래했다. Bristol-Myers Squibb와 Medarex는 돌연변이 유발을 일으키기 위해 DNA 알킬화 기전의 다양한 천연물 유래 원료의약품을 개발했다. 네덜란드 기반 Synthron(구 Syntarga)의 duocarmycin 유사체라고 불리는 합성 독소물질도 이 방식으로 DNA에 결합한다. 현재 Synthron에서 개발하여 임상 3상에 진입한 SYD985 (Trastuzumab duocarmazine)은 duocarmycin을 이용한 것으로 알려져 있다.

[0074] DNA 변형 제제로 쓰이는 그 외 약물로 calicheamicin, pyrrolobenzodiazepine (PBD), SN-38 (irinotecan의 활성 대사체) 등이 있다. Pfizer가 세균에서 분리한 calicheamicin은 DNA minor groove에 결합한 후 DNA 가닥을 절단시킨다. Calicheamicin은 Pfizer의 Mylotarg와 Besponsa 두 개의 ADC에 모두 사용되고 있다. PBD 이량체의 경우 Seattle Genetics에서 auristatin 계열의 ADC 플랫폼 이후로 새로 개발한 세포 독성약물로 CD-70을 표적화하는 ADC에 적용하여 임상에 진입하였으나 현재 개발이 중단된 상태이다. SN-38은 irinotecan의 활성 대사체로 DNA topoisomerase를 저해하는 역할을 한다. 기존 승인 ADC에 사용된 세포 독성 약물인 auristatin, maytansinoid, calicheamicin에 비하여 저효력 약물로 알려져 있다. 이로 인하여 부작용을 낮추되 약물-항체 비율을 높인 ADC 개발이 가능하다. 현재 Immunomedics에서 개발하여 임상 단계에 있는 IMMU-130 및 IMMU-132가 대표적으로 SN-38을 세포 독성 약물로 적용한 ADC이다.

[0075] [캄토테신계 약물]

- [0076] 암(cancer)은 무분별한 세포증식, 무제한 분열이라는 특징을 갖는 질환이다. 일반적인 세포에는 세포주기 검문 지점(cell cycle checkpoint)라는 것이 있어서 세포분열 시 유전자의 손상, 세포의 손상에 대해 점검이 일어난다. DNA 손상이 발견되면 수리 또는 손상이 심할 경우에는 세포사멸이 일어난다. 하지만 이런 DNA 손상이 있음에도 불구하고 수리되지 않고 계속 분열하게 된다면 암이 생긴다. 가장 대표적인 예가 암을 억제해주는 역할을 하는 BRCA 유전자로, 상동재조합을 통한 DNA이중가닥절단을 복구하는데 중요한 역할을 한다. DNA 복구에 중요한 역할을 하는 BRCA 유전자에 돌연변이가 있는 상태에서 DNA 손상이 발생했을 때, 올바른 DNA복구가 일어나지 않게 되고, 이는 다른 유전자의 돌연변이를 증가시킨다. 실제로 BRCA 유전자에 변이가 생기면 유방암, 난소암 등 여성암의 발병률이 매우 높아진다. BRCA 유전자에 변이를 가진 여성의 경우는 유방암에 걸리는 비율이 일반적인 경우보다 5~6배 정도 증가하고 난소암이 발병하는 비율은 10배 정도 증가하는 것으로 알려져 있다. 이를 통해, DNA 손상이 제대로 복구되지 않아 세포의 유전적 불안정성을 일으키게 됨으로써 암을 유발한다는 것을 알 수 있다.
- [0077] 암이 갖는 공통된 특성은 유전적 불안정성이다. 대부분의 암에서 DNA 손상반응의 어떤 결함에 의해 암세포가 생기고 발달하는지를 구체적으로는 알지 못하지만, DNA 손상 반응의 결함과 암 사이의 연관 관계는 반박할 여지가 없다.
- [0078] 예를 들어, 15%의 산발성 직장 종양 (sporadic colorectal tumour)은 비정상적으로 짧거나 긴 dinucleotide repeat sequences를 가지고 있다. 이러한 DNA돌연변이는 microsatellite instability라고 하는데, 불일치복구가 제기능을 못하여 축적된 DNA replication error때문에 생기는 것으로 추측된다. Microsatellite instability는 산발성 직장 종양뿐만 아니라 유전성 비선성 대장암 (hereditary non-polypsis colorectal cancer)에서도 나타난다. 유전성 비선성 대장암은 MSH2와 MLH1과 같은 불일치복구 유전자의 기능상실변이(loss of function mutation)와 연관되어 있다.
- [0079] 마찬가지로 상동재조합복구(homologous recombination repair)에 결함이 생겨 산발성 또는 유전성 종양이 생긴다는 보고가 있다. 연구 결과에 따르면 high-grade serous ovarian adeno carcinoma의 500개 표본을 분석했을 때 50%의 표 본에서 상동재조합복구에 결함을 보였다.
- [0080] 상동재조합복구에 결함이 생기는 이유는 주로 BRCA 유전자에 돌연변이가 생기거나 후생학적 사일런싱(epigenetic silencing)이 발생하기 때문이다. 다른 보고에 의하면 BRCA1, BRCA2, ATM, RAD51C, RAD51D 등 상동재조합복구에 관여 하는 유전자들의 기능상실변이가 유전성 유방암, 자궁암, 췌장암 등에서 발견되었다.
- [0081] 암세포는 DNA 손상 반응에 결함을 내포하고 있다. 암세포는 DNA 손상에 적절하게 대처할 수 없다. 그렇기 때문에 DNA 손상을 줄 수 있는 물질을 항암 제로 사용하여 암세포의 세포 사멸을 유도하는 것이다.
- [0082] 항암제의 최근 전략은 DNA 손상반응에 참여하는 특정 단백질의 활성을 공략하는 것인데 이런 항암제를 표적치료제(targeted therapy)라고 한다. 표적 치료제의 예시로는 topoisomerase 억제제가 있다. Topoisomerase의 기능은 꼬인 DNA구조를 풀기 위해서 DNA의 phosphodiester backbone을 부수고 다시 붙이는 기능을 하여 전사 및 DNA 복제가 원활하게 일어나게 한다. Topoisomerase 억제제는 이러한 기능을 억제하고 DNA가 부수진 채로 놔두어 직장암, 폐암 등 몇몇 암 종류에서 효과적인 항암제로 쓰인다.
- [0083] 제1형 토포이소머라아제(Topoisomerase I)의 저해제(Irinotecan, Topotecan 등)는 임상에서 효능/안전성이 검증된 항암기전으로, 임상에서 대장암, 폐암, 유방암, 난소암 등 다양한 난치성 고형암에서 뛰어난 항암 효능이 검증되었다. 캄토테신계 약물로 Exatecan, SN-38 등이 ADC용 Payload로 개발되어 있다.
- [0084] 캄토테신(camptothecin)은 DNA의 복제 및 재조합 등에 관여하는 이 성질화 효소인 제1형 토포이소머라제(topoisomerase-1)의 선택적인 억제제이다. 이미 1966년 미국의 Wall 등에 의해 중국 원산지의 희수 나무(Camptotheca acuminata)에서 단리된 천연 항종양 알칼로이드이다. in vitro에서 강력한 세포독성(cytotoxicity)을 나타낸 것으로 판명된 이래 미국 암연구센터(NCI) 등에서 임상 시험을 통한 개발에 착수되었으나 극히 난용성이라는 한계로 인해 그와 관련된 골수억제 및 출혈성 방광염 등의 다양한 부작용을 보임에 따라 개발이 중단되었다. 그러나 1990년 이후, 캄토테신이 가지는 독특한 작용기전, 즉 DNA 제2형 토포이소머라제(topoisomerase-2) 저해기전과는 달리 DNA 제1형 토포이소머라제를 선택적으로 억제하여 항종양효과를 나타냄이 확인되었다.
- [0085] DNA 토포이소머라제는 기라아제(gyrase) 효소군의 일원이다. 이들은 핵내의 효소들로서, 복제나 전사를 위해 세포가 유전 물질에 접근이 요구될 때 일시적으로 DNA의 절단하거나 이중 나선을 푸는 역할을 한다. 이들은 또한 염색체 농축 및 재조합, DNA 수리 등 다양한 세포내 활동에 참여한다. 토포이소머라제 효소의 유전암호는 종들

간에 상당히 보존적이다.

- [0086] 캄토테신의 약물 표적인 제1형 토포이소머라제는 다양한 악성 종양에서 그 수준이 증가하는 것이 관찰되었다. 이 약물은 유리효소를 억제하지는 못하나 토포-DNA 복합체의 공유결합을 안정화시켜 절단된 DNA 조각들이 다시 연결되는 것을 방해한다. 따라서, 이러한 토포이소머라제-대상 약물에 대한 세포의 민감성은 핵내 존재하는 효소의 수준과 관련이 있다. 이 약물은 DNA의 재결합을 방해함으로써 전사가 진행되는 것을 불가능하게 한다. 제1형 토포이소머라제의 양이 더 많을 수록, 더 많은 절단가능한 복합체를 형성하며 이는 약제 감수성이 높음을 의미한다. 이것은 중요한 임상적 관련성을 가지는데, 제1형 토포이소머라제 억제제는 제2형 토포이소머라제의 발현을 증가시키는데 사용되어 이는 제2형 토포이소머라제 억제제에 더욱 감수성을 가지게 한다. 이러한 결과는 제1형 토포이소머라제와 제2형 토포이소머라제 간의 대립 관계에 의해 지지된다. 이러한 제1형 토포이소머라제는 제2형 토포이소머라제와 달리 정상 조직에서는 증식과 밀접한 관련이 없으며, 임파종으로 포함한 대장암, 난소암, 식도암 등의 세포분열이 왕성한 "S"기의 고형암에 주변의 정상 조직에 비해 다량 존재하며, 실제적으로 세포주기상 "S"기에 종양세포 내에 유전자의 복제 및 전사를 차단함으로써 세포사를 유발할 수 있다고 알려져 있다.
- [0087] 캄토테신(CPT)은 낮은 수용해도를 가지며, 임상 시험을 준비하기 위해서 국립 암 연구소(NCI)는 수용성인 나트륨 염(NSC100880)을 제조하였다. I 기 및 II 기의 임상 시험은 상기 화합물에 의해 나타난 높은 독성(출혈 방광염, 위장 독성, 예를들어 오심, 구토, 설사, 및 골수 억제, 특히 백혈구 감소증 및 저혈소판 증)으로 인해 완료되지 못했다.
- [0088] 후속적으로, 다수의 CPT 동족체들이 보다 낮은 독성과 보다 높은 수용해도를 갖는 화합물을 수득하기 위해 합성되었다. 2개의 약물, 이리노테칸(CPT- 11)과 토포테칸이 있다.
- [0089] 일본의 Dallchi 및 Yakult에 의해 공동개발된 이리노테칸 (irinotecan, CPT-11)이 1994년 세계 최초의 캄토테신계 항암제로서, 폐암(소세포, 비소세포성 폐암)에 유효성을 입증받아 유럽과 일본에서 발매되었으며, 1995년에는 대장암, 유방암에 대한 유효성을 추가로 입증받은 바 있다. 또한, Glaxo Smith Kline사에서 개발된 토포테칸(topotecan)이 1995년 4월에 미국 FDA에서 전이성 난소암에 대한 유효성을 승인받아 발매되었다. 최근 국내에서 개발된 새로운 캄토테신 유도체인 CKD-602(belotecan)는 강력한 제1형 토포이소머라제 억제제 효과와 더불어 수용성으로서 기존의 난용성으로 인한 독성을 성공적으로 극복하였다.
- [0090] 지금까지 확인된 모든 캄토테신 유도체들은 세포독성에 필수적인 5 개의 고리를 갖는 모 구조를 함유한다. 분자 구조상 E-고리와 A-, B- 고리 부위가 중요부위로 확인되었다. 캄토테신은 세포독성에 필수적인 E-고리에 락톤을 갖는 펜타사이클릭 구조로 이루어진다. 이중 E-고리의 20번 탄소에 위치한 락톤기와 알파수산화기는 제1형 토포이소머라제-DNA 부산물의 안정을 위해 중요하며, A- 및 B-고리의 변형이 수용성과 활성도를 증가시킬 수 있다는 사실이 증명되었다. 첫 번째 고리상의 변형은, 예를 들어 상기 언급한 약물의 경우에 수용해도를 증가시키고 상기 약물의 보다 큰 허용성을 허용하는 것으로 입증되었다.
- [0091] CKD-602 역시 수용성 및 항암효과의 증가를 위해 7번 탄소의 B-고리 부위의 치환을 시도하였다. Lee 등은 CKD-602가 광범위한 암세포주에서 캄토테신 (camptothecin)과 토포테칸(topotecan)에 비해 우수한 항암효과가 있다고 하였다. 또한 L1210 백혈병 누드마우스모델에서 최대내성용량(maximum tolerated dose, MTD)이 25mg/kg로 비교적 안전한 약물임을 확인하였다. 일반적으로 알려진 캄토테신계 약물의 부작용은 크게 혈액학적 부작용과 비혈액학적 부작용으로 분류할 수 있다. 혈액학적 부작용으로는 발열을 동반한 호중구감소증, 폐혈증, 출혈 등이 있으며, 비혈액학적 부작용으로는 구역, 구토, 탈모 등 피부계 부작용 및 위장관, 신장, 신경계에 대한 독성을 들 수 있다. Kim 등은 CKD-602의 동물 연구에서 이러한 캄토테신계 약물의 부작용 중 임상적용이 가능한 용량보다 10배 이상의 고용량의 투여시에도 위액분비 증가를 제외한 이상약물반응은 발견되지 않았다. 또한 최근 국내 임상 연구들에서도 심각한 전신적인 독성 보다는 호중구감소증 및 백혈구감소 증의 가역적이며 조절가능한 수준의 부작용만이 보고되는 등 비교적 안정성이 입증 되고 있다. 하지만 현재까지는 표준 화학요법에 실패하거나 표준 화학요법을 시행 할 수 없는 환자, 즉 표준치료 후에 재발 또는 악화되어 더 이상의 항암화학요법, 수술로 효과를 보기 어려울 것으로 판단되는 저항성(refractory) 또는 재발성(recurrent) 난소암 및 대장암의 치료, 1차화학요법에 실패한 저항성 또는 재발성 제한병기(limited disease) 소세포성 폐암의 치료, 진행병기(extensive disease) 소세포성 폐암의 치료에 주된 적응증을 두고 제한적으로 사용되고 있다.
- [0092] 엑사테칸(Exatecan)은 캄토테신 유도체로서, 제1형 토포이소머라아제를 저해하는 항종양성 저분자 화합물이다. 엑사테칸은 SN-38 보다 5 - 10배 강력한 세포독성(Cellular Cytotoxicity)이 확인된 물질이다.

- [0093] Dxd(ADC용 Exatecan 유도체)는, HER2 표적 ADC(DS-8201a)의 접합 약물로 사용되는 IC₅₀이 0.31 μM인, 강력한 DNA 토포이소머라제 I 억제제이다.
- [0094] FL118 약물은 강력한 Topoisomerase I 저해제로서 기존 상용화된 Top 1 저해제인 SN-38, Topotecan, Exatecan 등과 동일한 Camptothecin 모핵 구조를 가지나, 단독 투여 시에도 다양한 암세포 및 동물 모델에서 SN-38 대비 차별화 된 항암 효능과 우수한 안전성을 갖추어 넓은 치료 윈도우(therapeutic window)를 확보한 항암제이다.
- [0095] 구체적으로, FL118 약물은 암세포에서 SN-38과 동등 이상 수준의 Top1 저해 효능을 가지고 있으며, 다양한 암 세포주에서 SN-38에 비하여 5 - 20배 강력한, 즉 낮은 수준의 IC₅₀ 수치로 세포독성(Cytotoxicity)를 보이며, 다양한 암 종에서 기원한 140개의 세포주에 대한 평가 결과에서도 대다수의 암세포에 대하여 < 100nM의 IC₅₀를 보이는 매우 강력한 항암 효능을 보이고 있다.
- [0096] [비감토테신계 슈퍼 독신 약물]
- [0097] 기존 MMAE, Hemiasterlin, Calicheamicin, PBD 등 슈퍼독신(super toxin)을 활용한 ADC의 경우 약물이 암 조직에 도달하기 전에 혈중에서 분리되는 것을 최소화하는 것을 목표로 하는 Stable Linker 시스템을 활용(2세대 ADC의 특징)하였다.
- [0098] 대부분의 2세대 ADC가 암세포에서 작동하는 원리는 첫 단계로 ADC를 구성하는 항체부분이 암세포에서 과발현된 항원에 결합하고, 두번째 단계로 항원- 항체 반응에 의해 암세포 표면에서 항원에 결합된 ADC가 엔도솜, 리소솜을 거치며 암세포 내부로 이송되며, 세번째 단계로 리소솜에서 항원-항체 부분이 분해되고, 효소 (cathepsin B) 약물이 방출되며, 마지막 단계로 암세포 내부에서 방출된 약물에 의해 암세포가 사멸하게 된다.
- [0099] 미세소관 파괴 약물로, 유사 퀘타이드계 미세 소관 중합 억제제인 MMAE(monomethyl auristatin E) 또는 MMAF 등이 있다.
- [0100] PBD(Pyrrolebenzodiazepine)는 DNA alkylating agent로 SG3199, SG2057 이 있다.
- [0101] PBD(Pyrrolebenzodiazepine) 계열과 같은 세포독성 약물은 기존 세포독성 약물들보다 효능이 매우 우수하지만 그 만큼 전신 노출 시에 독성 문제를 보인다.
- [0102] [anti-apoptotic protein inhibitor 약물]
- [0103] 항암제 내성의 주원인인 Anti-apoptotic Protein으로 Survivin, cIAP2, XIAP 등이 있다.
- [0104] anti-apoptotic protein inhibitor 약물의 예로는 Bcl-XL 저해제, Survivin 억제제, MCL-1 억제제, CHK 억제제 등이 있다.
- [0105] 일반적으로 세포사멸사 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해효소에 의해 세포내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는 일련의 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포사멸사와 관련되어 있다. Caspase-8은 TNF-α 또는 Fas ligand와 같은 세포사멸 유도 물질에 의해 활성화되며 일련의 다른 caspase를 활성화시키면서 세포사멸을 유발시킨다. 한편 세포사멸 과정에서 cytochrome c는 미토콘드리아 막에 존재하는 통로를 통해 방출되며 통로를 구성하고 있는 BCL-2계 단백질들에 의해 조절된다. 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9을 활성화시키고 caspase-9에 의해 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어 있다.
- [0106] 종양의 성장을 결정짓는 데는 두 가지 요소가 있는데, 우선은 세포의 증식이며, 다른 면은 세포의 사멸이다. 세포독성물질에 의해 종양세포의 세포주기가 정지되면 apoptosis로 인해 종양세포가 죽게된다.
- [0107] B세포 림프종(B-cell lymphoma, BCL)-2는 세포사멸사 (Apoptosis)를 매개한다.
- [0108] 암 치료법이 여러 종류의 세포 죽음을 유발하지만, 발암성 kinase 억제제와 세포독성물질에 의한 치료효능에는 BCL-2에 의해 조절되는 세포사멸 pathway의 활성화가 가장 핵심적이다. 하지만 Mitochondrial 세포사멸 pathway의 결합은 여러 암들로 하여금 세포독성약물에 대해 내성을 나타내도록 한다.
- [0109] BCL-2 과발현은 종양세포 생존을 증대하는 만성 림프구성 백혈병 (Chronic Lymphocytic leukemia, CLL) 세포에서 입증되었으며 화학요법에 대한 내성과 관련이 있다.
- [0110] 베네토클락스(Venetoclax)은 항세포사멸 단백질인 BCL-2의 강력하고 선택적인, 저분자 저해제이다. 즉, 베네토클락스(Venetoclax)는 세포사멸사 (apoptosis) 유도 항암제이다. 베네토클락스(Venetoclax)은 BCL-2의 BH3-결

합 흡에 직접 결합하여, BIM과 같은 BH3 모티프 함유 전세포사멸 단백질을 대체하고, 이로 인해 BCL-2에 결합되지 않은 BIM은 미토콘드리아 외막투과(mitochondrial membrane permeabilization, MOMP), 카스파제 활성화 및 세포자멸사(apoptosis)를 개시한다. 비임상시험들에서 이 약은 BCL-2가 과발현된 종양세포에서 세포 독성을 보였다.

[0111] Survivin은 주로 암세포에 분포하므로 항암제 개발에 있어서 survivin 억제물질은 survivin과 결합하여 활성을 억제함으로써 세포자멸사를 유도하기 때문에 암세포에만 선택적으로 작용할 수 있어 인체에 부작용을 최소화할 가능성이 크다.

[0112] [링커]

[0113] ADC를 구성하는 요소 중 항체와 세포 독성 약물을 결합시키는 것이 링커이다.

[0114] 링커는 혈류에 안정(stable)하여 약물이 항체로부터 분리되는 것을 막아 타겟에 도달할 때까지 prodrug 상태로 유지되어 정상적인 조직에 입히는 피해를 최소화해야 한다.

[0115] 가장 이상적인 링커는 ADC가 전신 순환될 때는 안정하면서도 표적 세포 내에서는 절단되어 세포 독성 약물을 적절히 방출시켜 ADC가 효과와 안전성을 동시에 갖도록 하는 것이다. 안전하고 효과적인 ADC 개발을 위한 주요 과제 중 하나는 세포 독성 약물과 단일 클론 항체 사이에 적절한 화학적 링커를 개발하는데 있다. 링커의 합성은 상당히 복잡하며 어떤 링커를 사용하는지에 따라 세포 독성 약물의 효율적인 방출에 영향을 주게된다.

[0116] 1) 링커 안정성

[0117] 링커의 개발은 단일 클론 항체(mAb)의 장점인 긴 반감기를 반영하여 mAb가 전신 순환 중에는 안정해야 하며, 링커와 세포 독성 약물의 결합이 항체의 안정성 및 약물동태에 영향을 주지 않는 것이 중요하다. 적절한 링커를 사용하지 못해서 초기에 유망한 전임상 데이터를 보여준 여러 ADC가 그 잠재력에도 불구하고 임상 개발에 실패한 사례도 많다. 임상 개발에서 실패한 ADC에 사용된 링커는 항체에 결합된 세포독성 약물을 조기에 방출하였음이 밝혀졌다. 따라서 ADC 개발과정에서 링커 제조 전략의 중요성이 더욱 부각되고있다. 개선된 링커 기술을 보유한 신규 ADC 임상 파이프라인은 기존 ADC와 비교하여 더 안전하고 좋은 약효의 잠재력을 보여주고 있다.

[0118] 일반적으로, 링커-세포독성 약물 관련 전신 혈액 순환 중 발생할 수 있는 이화 작용들은 다음과 같으며, 그 외에도 밝혀지지 않은 다양한 이화작용들이 있다.

[0119] 히드라존기 절단(hydrazone cleavage), 단백분해 효소 매기 디펩티드 절단(protease-mediated dipeptide cleavage), 에스테르기 분해효소 매개 카바메이트 절단(esterase-mediated carbamate cleavage), 아세테이트 에스테르 가수분해 (hydrolysis of acetate ester), 이황화 절단(disulfide cleavage), 석신이미드 고리 개방 (succinimide ring opening)

[0120] 링커-세포독성 약물의 특정 위치에서 발생하는 이화 작용은 경우에 따라 세포독성 효과를 유지하여 표적에서 활성을 나타내기도 하며, 전신 혈액 순환 중에서는 독성을 일으킬 수 있다. 반대로 세포독성 효과를 잃어버리는 경우 약물이 표적에 도달할지라도 약리 효과를 기대하기 어려울 수 있다. 예를 들어 splicesome 억제제로서 payload로 개발된 thailanstatin의 경우 에스테르기 가수분해가 일어나도 활성을 유지하는 반면, tubulin inhibitor인 cyptophycin이나 tubulysin의 경우 에스테르기 가수분해가 일어날 경우 활성을 잃어버린다.

[0121] 현재 임상 개발중인 대부분의 ADC는 hydrazone, disulfide, peptide 또는 thioether 결합을 포함하여 제한된 종류의 화학적 링커를 사용한다.

표 2

[0122]	링커	약물 방출 메커니즘
	Hydrazone	세포질 내의 산성환경에서 약물 방출
	Peptide	Cathepsin B와 같은 리소좀 단백분해효소에 의해 효소적 가수분해
	Disulfide	세포 내 글루타치온의 thiol과의 disulfide exchange에 의해 분해
	Thioether	세포 내 단백질 가수분해에 의한 분해

[0123] 원칙적으로, 이러한 화학적 링커는 세포 내 pH, 효소 농도의 차이 등을 이용하여 암세포 내에서 세포 독성 약물 방출을 유도한다. 투약 후 신체 내 약물-링커의 안정성을 확보하는 것은 ADC 개발과정에서 가장 큰 어려움인데, 화학적으로 불안정한 hydrazone과 disulfide 링커는 혈장에서 충분히 안정하지 않다. 펩타이드 기반의 링커는

우수한 혈장 내 안정성을 가지면서도 잘 조절된 약물-링커 안정성과 약물 방출 능력을 가지고 있다. Valine-Alanine (Val-Ala) 및 Valine-Citrulline (Val-Cit)와 같은 절단 가능한 dipeptide 링커는 리소 줌 추출물 또는 정제된 인간 cathepsin B의 존재 하에서 신속한 가수 분해를 거치기 때문에 링커의 절단 원리는 세포 내부의 환경에 의존한다.

[0124] 한편, 기존 Val-Cit 또는 MAC-glucuronide Linker 시스템의 제한된 약물전달 효율로는 충분한 양의 약물을 전달 하기가 어렵다.

[0125] 2) 비절단성 링커와 절단성 링커

[0126] 현재 일반적으로 사용되는 링커는 크게 절단성 (cleavable)과 비절 단성 (non-cleavable) 링커로 구분되며 대표 적으로 절단성 링커 종류에는 acidlabile, oxidation-reduction reaction과 enzyme labile 링커가 있고, 비절 단성 링커에는 thioether 링커가 있다 (표 3).

표 3

Linker type	Mechanism of Action	Example
Acid-labile	Acidic enviroament in the cytoplasm	Hydrazone, Silyl ether
Cleavable Oxidation-reduction reaction	Redox reaction by intracellular glutathione	Disulfide
Enzyme labile	Hydrolyzed by intracellular proteolytic enzymes	Peptide, β -glucuronide
Non-cleavable	Degradation of antibodies	Thioether

[0127] Acid-labile 링커는 화학적으로 불안정한 링커로 ADC 개발 초기에 개발되어 안정성이 낮지만 지금도 사용되고 있다. 대표적인 링커는 hydrazone 링커로 혈액의 중성 환경인 pH 7.3~7.5에서는 안정적이지만 종양세포 주변 (pH 6.5~7.2)이나 세포내 내재화가 일어나 엔도솜 (pH 5.0~6.5)과 리소솜(pH 4.5~5.0) 같은 약산성 환경에서 가수분해되어 약물을 방출하는 메커니즘을 갖고 있다. 그러나 산성 상태는 종양 미세환경에 국한되어 있지 않고 종종 세포외부에서도 발견되기 때문에 비특이적 약물 방출이 일어날 수 있다. FDA가 최초로 승인한 ADC인 Mylotarg®가 hydrazone 링커를 사용한 대표적인 예이며 혈장에서의 안정성이 낮아 2010년 미국시장에서 철수하였으나 2017년 다시 재승인이 이루어졌다. 최근에는 Silyl ether 링커가 연구되고 있는데 혈장에서 높은 안정성을 가지며 혈장 반감기는 7일 이상으로 2~3일인 hydrazone 보다 크게 개선되었다.

[0128] Oxidation-reduction reaction linker 관련하여, Disulfide 링커도 화학적으로 불안정한 링커의 한 종류로 산화-환원 반응을 기반으로 한다. 내재화된 ADC는 효소에 의해 항체가 분해된 뒤 이황화 교환이나 글루타티온과 같은 환원제를 통해 링커가 분해되면서 약물이 방출된다. 글루타티온(glutathione)은 저분자량 티올로 세포 증식 및 사멸 조절을 하며 염증 및 산화 스트레스 등으로부터 세포를 보호하는 항산화제로 알려져 있다. 글루타티온은 세포내에서 0.5~10 mM의 농도로 존재하나 저산소 상태인 종양에서는 최대 1000배 높은 농도로 존재한다. 혈장에서는 낮은 농도(2~20 μ M)로 존재하여 disulfide 링커는 높은 혈장 안정성을 가짐으로써 비특이적 약물방출이 줄어들어 상대적 안전하게 종양 특이적으로 반응하는 링커이다.

[0129] Enzyme-labile linker 관련하여, Peptide 링커는 ADC가 내재화되면 리소솜 내 단백질 분해 효소에 의해 인식되고 절단되는 dipeptide 또는 tetrapeptide로 구성된다. Tetrapeptide는 개발 초기에 사용되었으며 비교적 느린 약물 방출 및 소수성 약물과 결합하여 응집이 일어날 수 있는 한계가 나타났다. 이러한 문제는 Val-Cit, Phe-Lys, Val-Lys 및 Val-Ala과 같은 dipeptide linker의 개발로 해결되었으며 Adcetris®, Vedotin®과 같은 몇몇 ADC에 성공적으로 적용되었다.

[0130] β -glucuronide 링커는 리소솜 내의 당분해효소인 β -glucuronidase 에 의해 가수 분해되어 세포독성 약물을 방출하는 링커로 SeattleGenetics 사에 의 해 2006년에 도입되었다. β -glucuronidase는 리소솜 내부에 풍부하게 존재하며 일부 종양에서 과발현되는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 낮은 pH에서 활성이 높으나 중성 pH에서는 10 %로 떨어지는데 이러한 특성으로 인해 β -glucuronide 링커를 가진 ADC는 혈장에서의 안정성이 향상되어 표 적 외에서 약물이 방출되는 것을 방지 한다. β -glucuronide 링커의 혈장 안정성을 확인하기 위해 Val-Cit 링커 와 함께 쥐 혈장에서 실험을 진행하였을 때 각각 7일 후 89 %와 50 % 미만으로 β - glucuronide 링커가 훨씬 안정한 것으로 나타났으며 반감기는 약 81일과 6일로 측정되었다. 또한 β -glucuronide 링커를 가진 ADC는 세포독성약물을 고용량(최대 8 개)으로 결합하였음에도 높은 안정성과 효능을 나타냈다.

[0132] 비절단성 링커(Non-cleavable linker)에는 Thioether 링커가 대표적인데 절단성 링커와 비교하여 더 높은 혈장 안정성을 갖고 있다. 비절단성 링커는 절단성 링커와는 다르게 링커 자체의 분해가 일어나지 않기 때문에 ADC 형태로 세포내 도입 이후에 항체의 분해가 이루어져야 약물의 방출이 가능한 특성을 갖고 있다.

[0133] 이렇게 방출된 약물은 전하를 띠며 주변 세포로 확산(bystander effect, 방관자 효과)이 일어날 가능성이 낮다. 주변 세포에 대한 독성은 나타내는 방관자 효과는 없지만 표적 세포 내재화 후 표적 세포에만 효과가 나타나기 때문에 상대적으로 안전성이 높다는 것을 의미하며 비절단성 링커에 의해 제조된 ADC는 표적 세포내 생물학적 기전에 더 의존적임을 알 수 있다. 많은 연구에서 비절단성 링커를 갖는 ADC가 높은 안정성과 효능을 보여 ADC 개발을 위한 링커로 활용되고 있으며 현재 이 기술이 적용된 ADC는 Kadcycla®가 있다.

[0134] Brentuximab vedotin (Adcetris)의 경우 표적 암세포의 리소솜에 존재하는 cathepsin B에 의해 선택적으로 분해되어 MMAE를 방출하는 절단성 Val-Cit dipeptide 링커로 구성되며, 체내에서 순환할 때는 안정하다. Val-Ala 및 Val-Cit와 같은 절단 가능한 dipeptide 링커가 사용된 ADC는 표적 암세포의 항원에 ADC의 항체영역이 결합하여 ADC-항원 복합체를 형성한 후 endosomal-lysosomal 경로로 암세포 내부로 내포화 된다. 이 경우 세포 독성 약물의 세포 내 방출은 엔도솜/리소솜의 내부 환경에 의해 조절된다. 즉, hydrazone 링커는 산성에서 불안정하여 분해되면서 약물을 방출하고, Val-Cit dipeptide 링커는 리소솜 내의 단백분해효소인 cathepsin B에 의해 MMAE를 방출한다.

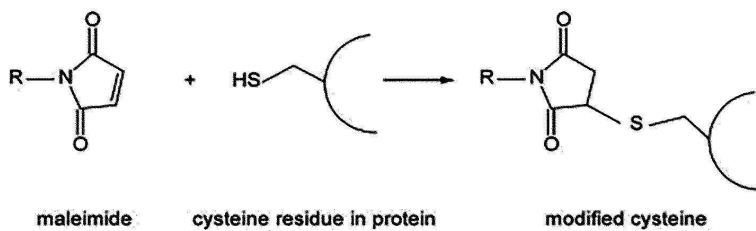
[0135] 반면 ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla)의 경우 비절단성 SMCC 링커를 갖는다. 비절단성 링커는 표적 세포 내에 유입된 ADC가 리소솜에 의해 분해 되면서 세포 독성 약물을 유리시키므로 불필요한 체내 약물 방출을 피할 수 있을 뿐만 아니라 결합된 약물의 화학적 성질을 변경하여 운반체에 대한 친화성을 조정하거나 효능을 향상시킬 수도 있다.

[0136] 표적으로 이동하는 동안의 ADC 안정성은 절단성, 비절단성 링커 등 어떤 종류의 링커를 사용하던지 간에 원하는 치료 지표를 달성하는데 아주 중요하다.

[0137] [click 반응]

[0138] 본 발명에서, [링커]-[항체]의 연결은 상기 항체에 포함된 티올기가 산 민감성(acid-sensitive) 링커의 말레이미드기(maleimide) 또는 말레이크 하이드 라자이드기(maleic hydrazide)에 반응식 1의 "click" 반응을 통해 결합된 것일 수 있다.

[0139] [반응식 1]



[0140]

[0141] [친수성 스페이서]

[0142] 유기 용매와 수용액 모두에서 높은 용해도를 나타내는 sulfonate- 또는 PEG-를 함유한 친수성 링커는 소수성 링커에서 관찰되는 여러 문제점을 해결 한다. PEG 링커는 수용성, 낮은 독성, 낮은 면역원성 및 조절된 링커 사슬 길이 등의 장점을 가지고 있다. 이와 관련하여 PEG 링커를 사용하면 생체 내 약물동태 프로파일이 크게 향상되고 반감기 및 혈장 농도가 증가하여 혈장 농도-시간 곡선 (AUC)이 증가하는 연구가 보고되었다.

[0144] [효소민감성 링커]

[0145] 본 발명의 일구체에 따른 효소민감성 링커는 -S-Maleimide-Spacer- Enzymatic cleavable site-Self immolative spacer-(Payload) 또는 -S-Dibromaleimide- Spacer-Enzymatic cleavable site-Self immolative spacer-(Payload)일 수 있다.

[0146] 링커 탈접합(deconjugation)으로 인한 생체 내 변환은 화학적인 분리 또는 효소에 의한 절단으로 인해 나타날 수 있다.

[0147] 라이신 잔기에 아마이드 결합으로 링커가 연결된 ADC의 경우 효소에 의한 아마이드 가수분해로 인해 링커-세포 독성약물 형태로 떨어져 나갈 수 있으며, 시스테인 잔기에 말레이미드기(maleimide)를 포함하는 링커나 다이설파이드기(disulfide)를 포함하는 링커가 연결된 ADC의 경우 시스테인 잔기의 S가 환원이 이 루어지며 맞교환(exchange) 방식으로 접합된 링커-세포독성약물이 떨어져 나갈 수 있다. 떨어져 나간 상태에서 단일클론 항체의 시스테인 잔기는 다른 시스테인 아미 노산이나 글루타치온(GSH, glutathione)과 같은 S를 포함하는 내인성 또는 외인성 물질들과 이황화 결합되는 상태로 존재할 수 있다. 따라서, ADC는 세포독성 약물로 인한 표적에서의 활성 기전을 잃어버리는 동시에, 떨어진 링커-세포독성 약물은 또 다른 단백질이나 효소 등에 부가물을 형성하거나 대사되어 활성을 나타내 독성을 일으킬 수도 있다.

[0148] [산 민감성(acid-sensitive) 링커]

[0149] 본 발명에서, 산 민감성(acid-sensitive) 링커는 혈액의 중성 환경인 pH 7.3~7.5에서는 안정적이지만 종양세포 주변 (pH 6.5~7.2)이나 세포내 내재화가 일어나 엔도솜 (pH 5.0~6.5)과 리소솜(pH 4.5~5.0) 같은 약산성 환경에서 가수 분해되어 약물을 방출하는 링커를 의미한다. 따라서, 본 발명에서 산 민감성 링커는 가수분해 환경을 조성하도록 친수성 분자 구조를 가진다. 이를 위해, 산 민감성 링커는 예컨대 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 스페이서를 포함할 수 있다.

[0150] 산성 분위기(pH ≤7)에서 분해되고 산 민감성 링커 분해시 유리형 캄토테신계 약물이 방출되도록, 캄토테신계 약물과 산 민감성 링커는 탄산염 또는 에스테르 결합으로 연결된 것이 바람직하다.

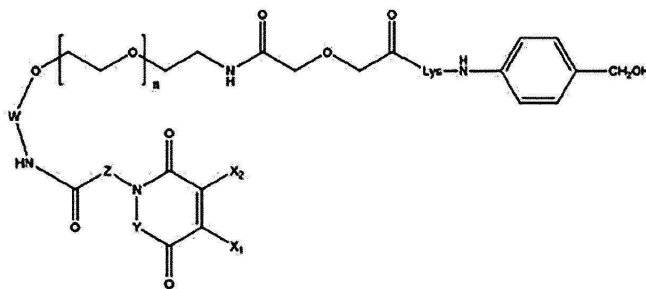
[0151] Tetrapeptide 링커는 소수성 약물과 결합하여 ADC 응집이 일어날 수 있는 한계가 나타났다.

[0152] 기존 FDA 승인된 ADC인 Trodelvy에 사용된 링커인 CL2A는 (i) 제조 후 보관 안정성, (ii) 투여 시 혈중에서의 안정성 (Plasma 중에 Free Payload 노출 이 거의 없음), (iii) 암 조직에서 Payload의 빠른 방출 등의 특성을 모두 만족하는 링커이다.

[0153] 최초 CL2 유도체에 삽입된 Phe-Lys 펩타이드는 카텝신 B를 통해 절 단을 가능하게 한다. 합성 과정을 간소화시키기 위한 일환으로, CL2A에서 페닐알라 닌이 제거되었고, 이에 따라 카텝신 B 절단 부위가 제거되었다. 이러한 변화는 접합체 결합, 안정성, 또는 효능에 대해 영향을 주지 않았다. 이는 CL2에서의 카텝신 B 절단 부위가 아니라, SN-38의 락톤 고리에 대한 pH 민감성 탄산 벤질 결합(pHsensitive benzyl carbonate bond)의 절단에 의해 주로 접합체로부터 방출되었음을 시사한다.

[0154] 본 발명에서 사용되는 산 민감성 링커는, CL2A 링커를 활용할 수 있으며, 캄토테신계 약물을 암 조직에 선택적, 효율적으로 전달하도록 하기 화학식 1과 같이 설계될 수 있다. 즉, 본 발명에서 산 민감성 링커는 하기 화학식 1의 화 합물로부터 유래되는 것일 수 있다:

[0155] [화학식 1]



[0156] 여기서, X₁ 및 X₂는 각각 독립적으로 -H 또는 -할로젠이고;

[0158] Y는 -NH-, -NR_A-, 또는 직접 결합이며;

[0159] Z는 -C1-C4알킬렌-, -C3-C6시클로알킬렌-, -(C1-C2알킬렌)-(C3-C6시클로알킬렌)-, -(C3-C6시클로알킬렌)-(C1-C2알킬렌)-, 또는 -(C1-C2알킬렌)-(C3-C6시클로알킬렌)-(C1-C2 알킬렌)-이고;

[0160] W는 -R_B-, -M-, -R_B-M-, -M-R_B- 또는 -R_B-M-R_C-이며;

[0161] R_A 내지 R_C 는 각각 독립적으로 C1-C4알킬렌이고;



[0162] M은 이며; 및

[0163] n은 5 내지 9의 정수임.

[0164] 바람직하게는 상기 화학식 1에서,

[0165] X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 -H 또는 -할로젠이고;

[0166] Y는 $-NR_A-$, 또는 직접 연결이며;

[0167] Z는 -C1-C4알킬렌-, -(C1-C2알킬렌)-(C3-C6시클로알킬렌)-, 또는 -(C3-C6시클로알킬렌)-(C1-C2알킬렌)-이고;

[0168] W는 $-R_B-$ 또는 $-R_B-M-R_C-$ 이며;

[0169] R_A 내지 R_C 는 각각 독립적으로 C1-C4알킬이고;



[0170] M은 이며; 및

[0171] n은 5 내지 9의 정수일 수 있다.

[0172] 본 발명에서, 링커의 길이, 즉 상기 화학식 1에서 n은 5 내지 9의 정수일 수 있고, 구체적으로 n은 6 내지 8의 정수일 수 있으며, 더욱 구체적으로 n은 7일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 위 범위를 벗어나는 경우라도, 링커 길 이 변화에 따른 별다른 효과 차이가 없는 경우에는 당연히 모두 본 발명의 균등 범위 내에 포함된다.

[0173] 약물의 수분산도는 약물과 운반체 사이에 폴리에틸렌글리콜(PEG) 스페이서를 배치하여 향상될 수 있으므로, 화학식 1의 링커는 한정된 수(n=5 내지 9)의 PEG 모노머를 포함하는 저분자량 PEG 모이어티를 포함한다.

[0174] 화학식 1의 산 민감성 링커는 Targeting 대상, Payload, Carrier의 특성에 따라 최적화 가능한 맞춤형 링커이다.

[0175] 캄토테신계 약물은 운반체-약물 접합체 제작을 위하여 다양한 링커와 부착이 용이한 Site를 가지고 있다. 예컨대, 캄토테신계 약물의 알코올기 부위를 링커와의 부착 부위(site)로 사용할 수 있다.

[0176] 따라서, 본 발명에서 [캄토테신계 약물]-[산 민감성 링커]는 캄토테신계 약물의 알코올기 부위와 화학식 1의 산 민감성 링커의 알코올기 부위가 연결 된 것일 수 있다.

[0177] [캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A)를 구비한 ADC의 작용기전]

[0178] 본 명세서에서, 용어 "면역접합체"는 항체 또는 이의 항원 결합 단 편에 세포 독성 약물-링커 접합체가 연결된 복합체를 의미하며, 본 발명 ADC의 범주에 속한다.

[0179] 항체-약물 접합체(ADC)은 면역접합체의 일레이므로, 본 발명에서 ADC에 대한 설명 및 면역접합체에 대한 설명은 서로 혼용하여 사용될 수 있다.

[0180] 상기 면역접합체는 생체 내 투여될 경우 그 일 구성인 항체 또는 이의 항원결합부위 함유 단편이 표적하는 항원에 결합한 후 약물을 방출함으로써 표적 세포 및/또는 주변세포들에 약물이 작용할 수 있도록 하여, 표적 약물로서 우수한 약효와 감소된 부작용을 기대할 수 있다.

[0181] 면역접합체의 효과에 중요한 영향을 미치는 요소는 특히, (1) 약물 효능 (drug potency), (2) 약물 링커 안정성 (drug linker stability), (3) 효율적인 표적 약물 방출 (efficient on-target drug release) 등이 있다. 효과에 여러 요소가 복합적으로 영향을 미치기 때문에 각각의 요소에 대해 알려진 사실만을 바탕으로 이들의 조합인 면역접합체의 효과를 예측하는 것은 대단히 곤란하다.

[0182] 내재화 (internalization)된 후 약물을 방출하도록 설계된 면역접합체는 내재화 과정이 비효율적인 경우 충분한 농도의 활성 약물이 세포 내부로 전달 되지 못하는 문제점이 있고, 소수성 약물을 세포 독성 약물로 채택하더라

도 주변 세포에 대한 by-stander cell-killing 현상을 기대하기 어렵다는 단점을 가진다.

- [0183] 이러한 문제점을 해결하기 위해, 본 발명의 면역접합체는
- [0184] (i) 암 주변의 종양 미세 환경(pH ≤7)에서, 세포막을 관통할 수 있고 세포 내부에서 제역할을 할 수 있는 소수성 약물을 유리시킨 후, 다량의 유리형 소수성 약물을 세포 안으로 도입시키기 위해, 산 민감성(acid-sensitive) 링커를 사용하고;
- [0185] (ii) 암세포 주변 산성 분위기(pH ≤7)에서 산 민감성 링커가 분해 되어 약물을 유리하고 다량의 유리형 약물이 세포막을 관통해 세포내에 농축시키기 위해, 세포막을 관통할 수 있는 소수성 약물인 캄토테신계 약물을 사용한 것이 특징이다.
- [0186] 캄토테신계 약물은 세포막을 투과할 수 있는 소수성 저분자이므로, 암조직에 빠르게 축적되어 장시간 높은 농도를 유지 가능하고, 세포 내부로 확산 및 세포독성을 발휘하여 세포를 사멸시킨 후 방출되어 연속적으로 주변 세포에도 세포막을 관통해 세포내로 이동하여 작용할 수 있다.
- [0187] 본 발명의 면역접합체는 전술한 바와 같이 캄토테신계 약물과 산 민감성 링커를 조합하는 것에 기술적 특징이 있으므로, 원하는 목적에 따라 임의의 항체 또는 이의 항원결합부위 함유 단편을 결합하여 면역접합체를 설계할 수 있으며, 이는 모두 본 발명의 범주 내에 포함된다. 예컨대, 우수한 항암 효과를 위해, 본 발명의 캄토테신계 약물-산 민감성 링커 접합체에 트라스투주맙, 세특시맙 및 사시투주맙 (sacituzumab)을 결합시켜 면역접합체를 제조할 수 있다.
- [0188] 본 발명에 따라 산 민감성 링커를 통해 캄토테신계 약물이 연결된 항체는 2세대 ADC가 암세포에서 작동하는 첫 단계와 동일하게 암세포 표면에 과발현된 항원에 항체가 결합하지만, 일부는 2세대 ADC와 동일하게 세포 내 처리 단계를 거치고 이외의 상당 부분은 암세포 주위의 낮은 pH에 의해 약물을 방출할 수 있다. 이후 암 조직에서 방출된 약물은 확산에 의해 암세포 내부로 이동하여 엔도솜, 리소솜을 거치지 않을 뿐만 아니라 효소 (cathepsin B) 반응 없이 바로 암세포에 작동하여 세포사멸을 유도한다. 이로 인해 효소 반응에 의해서만 약물 방출이 가능한 2세대 ADC들과 비교하면 암세포의 항원선택성은 동일하지만, pH 민감성 링커를 사용하여 약물 방출 및 암세포 내로의 전달 효율을 극대화시킬 수 있다는 것이 본 발명의 면역 접합체의 주요한 특징이다.
- [0189] 또한, 링커는 혈류에 안정(stable)하여 약물이 항체로부터 분리되는 것을 막아 타겟에 도달할 때까지 prodrug 상태로 유지되어 정상적인 조직에 입히는 피해를 최소화해야 함에도 불구하고, 본 발명은 가수분해 환경을 조성 하도록 친수성 분자 구조를 가진 산 민감성 링커를 사용하여, 소수성 약물과 결합하여 ADC 응집이 일어나는 문제를 완화시킬 수 있다.
- [0190] 링커의 종류에 따라 상이한 대사체(catabolite)가 형성된다. 이와 관련하여, 본 발명의 [캄토테신계 약물]-[산 민감성 링커]는, 산 민감성 링커 분해 시 유리형 캄토테신계 약물이 방출되도록, 캄토테신계 약물과 산 민감성 링커는 탄산염 또는 에스테르 결합으로 연결된 것이 바람직하다.
- [0191] 일반적으로 가수분해와 관련하여 에스테르 및 탄산염 결합에 비해 카르바메이트 결합(Carbamate bonds)이 우수한 약물 링커 안정성을 제공한다. 그러나, 본 발명은 캄토테신계 약물이 암세포 주변 산성 분위기(pH)에서 암세포 주변 세포 밖 및 세포 내에서 모두 약물 링커로부터 분리가 가능하게 설계하기 위해, 카르 바메이트 결합 (Carbamate bonds) 대신, 불안정한 에스테르 또는 탄산염 결합 (carbonate bonds)를 사용하는 것이 특징이다.
- [0192] 혈액은 pH가 7.3~7.4로 일정하게 유지된다. 따라서, 혈액 중에서 산 민감성 링커로부터 캄토테신계 약물은 절단 되지 않으며, 절단되더라도 혈청의 중성 pH에서 캄토테신계 약물의 ADC로부터 방출 속도는 산성 분위기의 종양 조직에서 보다 훨씬 감소된다.
- [0193] 본 발명에서, 상기 면역접합체는 평균 약물/항체 비 (Drug-toantibody ratio, DAR)가 DAR 4 내지 8, 바람직하게는 DAR 4 또는 8일 수 있다.
- [0194] [캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A); 및 비캄토테신계 슈퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B)를 구비한 ADC의 작용기전]
- [0195] Group A로부터 빠른 속도로 drug release가 진행되어 암세포를 1차 공격하고, Group B로부터 느리지만 강력한 항암효력을 갖는 super toxin을 release 시킴으로 암세포를 2차 공격하여 암세포 사멸을 진행시킬 수 있다. 예컨대, MMAE, Hemiasterlin와 같은 super toxin의 경우 ADC 제조시 독성으로 인해 DAR 4이상을 사용할 수 없으나, DAR4 이하로 MMAE를 사용하고 부족한 독성을 TOP1 저해제인 캄토테신계 약물로 해결할 수 있다.

- [0196] 단일항체의 외부에 노출된 모든 disulfide 결합에 Group A와 Group B의 Drug-linker가 conjugation될 수 있고, 이때 DAR 8 (Group A: 4~7, Group B: 1~4)일 수 있으며, 비제한적인 예로 (MMAE-Cit-Val)₂-Trastuzumab-(CL2A-FL118)₆가 있다.
- [0197] [캄토테신계 약물 및 산민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(A); 및 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(C)를 구비한 ADC의 작용기전]
- [0198] 동일한 payload(또는 유사한 성능의 payload)를 2종의 linker system을 이용하여 drug release 속도를 다르게 구성할 수 있다.
- [0199] 종양미세환경에서 높은 효율로 drug release가 이루어지는 Group A 로 부터 빠른 속도로 drug release가 진행되고, 상대적으로 느린 속도로 Group B로 부터 drug release가 이루어짐으로서 시간차를 두고 암세포 사멸을 진행시킬 수 있다.
- [0200] 단일항체의 외부에 노출된 모든 disulfide 결합에 Group A와 Group C의 Drug-linker가 conjugation 될 수 있고, 이때 DAR 8 (Group A: 1~7, Group C: 1~7) 일 수 있으며, 비제한적인 예로 (Dxd-GFGG)₄-Trastuzumab-(CL2A-Dxd)₄ 가 있다.
- [0201] [비캄토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B); 및 캄토테신계 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체 (C)를 구비한 ADC의 작용기전]
- [0202] Group B와 Group C 모두 상대적으로 느린 속도로 (지속적으로) 암세포에 투입이 가능하여, 일반적으로 독성으로 인해 DAR4 이상 사용할 수 없는 super toxin의 단점을 TOP1 저해제로 보강할 수 있다. Group B와 Group C는 경쟁적으로 암세포 내로 전달되어 암세포 사멸을 일으킬 수 있다.
- [0203] 단일항체의 외부에 노출된 모든 disulfide 결합에 Group B와 Group C의 Drug-linker가 conjugation 될 수 있고, 이때 항체-약물 접합체는 DAR 8 (Group A: 4~7, Group B: 1~4) 일 수 있으며, 비제한적인 예로 (MMAE-Cit-Val)₂-Trastuzumab-(GGFG-Dxd)₆ 가 있다.
- [0204] [비캄토테신계 수퍼 독신 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(B); 및 항-세포사멸 단백질 저해제 (anti-apoptotic protein inhibitor) 약물 및 효소민감성 링커 조합의 약물-링커 접합체(D)를 구비한 ADC의 작용기전]
- [0205] Group B와 Group D 모두 상대적으로 느린 속도로 (지속적으로) 암세포에 투입이 가능하여, 일반적으로 독성으로 인해 DAR4 이상 사용할 수 없는 super toxin의 단점을 항-세포사멸 단백질 저해제(anti-apoptotic protein inhibitor) 로 보강할 수 있다. Group B과 Group D는 경쟁적으로 암세포 내로 전달되어 암세포 사멸을 일으킬 수 있다.
- [0206] 또한, Group B의 약물의 작용 효과를 증가시켜줄 수 있는 Group D의 사용으로, 강력한 항암 효과를 일으킬 수 있다. Group B와 Group D는 1:2 또는 1:4 의 비율로 조정할 수 있고, 이 약물들을 단일항체의 외부에 노출된 모든 disulfide 결합에 Drug-linker가 conjugation 될 수 있다. 비제한적인 예로 (MMAE-Cit-Val)₂- Mirzotamab-(Val-Ala-Clezutoclax)₄가 있다.
- [0207] [표적 항원]
- [0208] 강력한 세포독성약물을 특정 암세포에만 전달하기 위해서는 표적화 할 항원을 결정하는 것이 ADC 개발의 첫 번째 주요 단계이다. 항체를 사용함으로써 표적에 대한 높은 특이성과 긴 반감기로 장기적인 전신 순환을 가능하게 하는데 이로 인해 세포독성약물을 종양세포에만 선택적으로 축적이 가능하게 하고 정상조직 의 노출을 최소화해 손상을 줄여 부작용을 줄이고 치료효과를 증가시킬 수 있다. 이를 위해 종양세포를 특정할 수 있는 표적 항원을 찾아야 하는데 다음과 같은 조건이 필요하다. 첫 번째로 표적 항원은 종양 세포 표면에서 균일하게 과발현되어야 하며 정상 세포에서는 상대적으로 발현이 적거나 없어야 한다. 대표적인 예로 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 수용체가 있으며 HER2 양성 유방암에서는 정상 세포보다 100배 이상 더 많이 발현이 되는 것으로 알려져 있다. 그래서 항체를 만들기 전에 다양한 프로파일링을 통해 표적 항원의 종양 발현을 분석하여 특정 항원의 과발현을 확인하면 이 항원을 인식하는 단일 클론 항체를 생성한다. 두 번째는 항원에 대한 결합력인데 수용체를 매개로 내재화가 일어나는 항체의 특징으로 인해 항원의 에피토프 (epitope)에 결합하는 힘이 강할수록 더 많은 내재화가 일어날 수 있어 치료효과를 증가시킬 수 있기 때문이다. 추가적으로 낮은 면역원성이 있다. 초기에는 쥐를 통해 항체를 생산한 항체를 사용하여 1세대 ADC를 생산했다. 1세대 ADC는 인간에게 쥐의 항체를 주입하였는데 투여한 mouse antibody 에 대한 인체내 면역 반응으로 인한 부작용 및 항체 중화작용

이 발생하여 항암 효과를 보기 어려웠다. 면역 반응에 대한 문제점은 유전공학 기술의 발전에 따라 키 메라 항체 (chimeric antibody), 인간화 항체 (humanized antibody) 및 완전 인간 항체 (human antibody)를 제조하게 되면서 많은 개선을 보였다.

- [0209] 암세포의 항원을 인지한 항체는 약물과 함께 세포 내재화가 일어나야 한다. 암세포에서 세포 내재화를 높이기 위해 이중특이성 항체(bispecific antibody)가 개발되고 있다.
- [0210] Medimmune과 Astrazeneca에서 개발 중인 MEDI4267 (Trastuzumab- META)은 HER2에서 두 개의 비중첩 에피토프를 표적으로 하는 2중 파라토프 항체 (biparatopic antibody)가 HER2 수용체 클러스터링을 유도하고 이를 통해 세포 내재화, 리소좀 trafficking 및 분해를 촉진함을 보여주었다.
- [0211] 또한, 종양 표적 항체와 함께 리소좀 마커인 CD63 또는 APLP2, 프로락틴 수용체를 도입한 이중특이성 항체는 종양항원인식과 함께 단일 항체 대비 세포 내재화가 향상되는 것을 보여주었다. HER2를 표적으로 하는 trastuzumab과 CD63 의 bispecific ADC (HER2xCD63-duostatin-3, Creative biolabs)가 있는데 정상 조직으로 전달을 낮춰주고 암세포 특이적으로 전달하게 해 강력한 항암효과를 보여주었다.
- [0212] 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC) 또는 면역접합체 (Immunoconjugate) 설계시 표적화하는 대상은 암세포뿐만 아니라, 감염성 질환 유기체 및/또는 자가면역 질환과 관련된 세포까지 확장될 수 있다.
- [0213] 따라서, 항체 또는 이의 항원결합부위 함유 단편이 표적화하는 세포는, 암 세포, 감염성 질환 유기체 및/또는 자가면역 질환과 관련된 세포일 수 있다.
- [0214] 표적 항원의 비제한적인 예로, Her2, FcR, PSMA 등 암 표면에 선택 적으로 분포하는 항원 및 Trop2 등 정상 조직에도 소수 분포하는 암세포 과발현 항원이 있다.
- [0215] 암 세포 표적 항원은 예컨대, 5T4, ABL, ABCF1, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, ADORA2A, AFP, Aggrecan, AGR2, AICDA, AIF1, AIG1, AKAP1, AKAP2, ALCAM, ALK, AMH, AMHR2, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, ANPEP, APC, APOC1, AR, 아로마타제 (aromatase), ASPH, ATX, AX1, AXL, AZGP1 (zinc-*α*-glycoprotein), B4GALNT1, B7, B7.1, B7.2, B7-H1, B7-H3, B7-H4, B7-H6, BAD, BAFF, BAG1, BAI1, BCR, BCL2, BCL6, BCMA, BDNF, BLNK, BLR1 (MDR15), BlyS, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, BMP10, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BPAG1 (플렉틴), BRCA1, C19orf10 (IL27w), C3, C4A, C5, C5R1, CA6, CA9, CANT1, CAPRIN-1, CASP1, CASP4, CAV1, CCBP2 (D6/JAB61), CCL1 (1-309), CCL11 (에오타신), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-Id), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), MCAF, CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MEP-2), SLC, exodus-2, CCL22(MDC/STC-I), CCL23 (MPIF-I), CCL24 (MPIF-2/에오타신-2), CCL25 (TECK), CCL26(에오타신-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP1b), CCL5(RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-IRB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5(CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 또는 CDw198 (CMKBR8/TERI/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), CD13, CD164, CD19, CDH6, CDIC, CD2, CD20, CD21, CD200, CD22, CD23, CD24, CD27, CD28, CD29, CD3, CD33, CD35, CD37, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD47, CD52, CD56, CD69, CD70, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD97, CD99, CD117, CD125, CD137, CD147, CD179b, CD223, CD279, CD152, CD274, CDH1 (E-카드헤린), CDH10, CDH12, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH3, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDH17, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CDKN1B (p27Kip1), CDKN1C, CDKN2A (p16INK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, CEA, CEACAM5, CEACAM6, CEBPB, CER1, CFC1B, CHGA, CHGB, 키티나제 (Chitinase), CHST10, CIK, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, CLDN3, CLDN6, CLDN7 (클라우딘- 7), CLDN18, CLEC5A, CLEC6A, CLEC11A, CLEC14A, CLN3, CLU (클러스테린), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CNR1, C-MET, COL18A1, COL1A1, COL4A3, COL6A1, CR2, Cripto, CRP, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), CTAG1B (NY-ESO-1), CTLA4, CTL8, CTNNB1 (b-카테닌), CTSB (카텝신 B), CX3CL1 (SCYD1), CX3CR1 (V28), CXCL1 (GRO1), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (1-TAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78/LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR4, CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), CYB5, CYC1, CYSLTR1, DAB2IP, DES, DKFZp451J0118, DLK1, DNCL1, DPP4, E2F1, Engel, Edge, Fennel, EFNA3, EFNB2, EGF, EGFR, ELAC2, ENG, Enola, ENO2, ENO3, EpCAM, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, EPHB6, EPHRIN-A1, EPHRIN-A2, EPHRINA3, EPHRIN-A4, EPHRIN-A5, EPHRIN-A6, EPHRIN-B1, EPHRIN-B2, EPHRIN-B3, EPHB4, EPG, ERBB2 (HER-2), ERBB3, ERBB4, EREG, ERK8, 에스트로겐 수용체, Ear1, ESR2, F3 (TF), FADD,

FAP, 파르네실트란스퍼라제, FasL, FASnf, FCER1A, FCER2, FCGR3A, FGF, FGF1 (aFGF), FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2 (bFGF), FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF8, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FIGF (VEGFD), FIL1(EPSILON), FBL1 (ZETA), FLJ12584, FLJ25530, FLRT1 (피브로넥틴), FLT1, FLT-3, FOLR1, FOS, FOSL1(FRA-1), FR-알파, FY (DARC), GABRP (GABAa), GAGEB1, GAGEC1, GALNAC4S-6ST, GATA3, GD2, GD3, GDF5, GF11, GFRA1, GGT1, GMCSF, GNAS1, GNRH1, GPC1, GPC3, GPNB, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR44, GPR81 (FKSG80), GRCC10 (C10), GRP, GSN (Gelsolin), GSTP1, GUCY2C, HAVCR1, HAVCR2, HDAC, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, Hedgehog, HER3, HGF, HIF1A, HIP1, 히스타민 및 히스타민 수용체, HLA-A, HLA-DR, HLA-DRA, HLA-E, HM74, HMOXI, HSP90, HUMCYT2A, ICEBERG, ICOSL, ID2, IFN-a, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, EFNA6, BFNA7, IFNB1, IFN감마, IFNW1, IGBP1, IGF1, IGFIR, IGF2, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP6, DL-1, IL10, ILIORA, ILIORB, IL-1, IL1R1 (CD121a), IL1R2(CD121b), ILIRA, IL-2, IL2RA (CD25), IL2RB(CD122), IL2RG(CD132), IL-4, IL-4R(CD123), IL-5, IL5RA(CD125), IL3RB(CD131), IL-6, IL6RA, (CD126), IR6RB(CD130), IL-7, IL7RA(CD127), IL-8, CXCR1 (IL8RA), CXCR2, (IL8RB/CD128), IL-9, IL9R(CD129), IL-10, IL10RA(CD210), IL10RB(CD210B), IL-11, IL11RA, IL-12, IL-12A, IL-12B, IL-12RB1, IL-12RB2, IL-13, IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17A, IL17B, IL17C, IL17R, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, ILIA, ILIB, ILIF10, ILIF5, ILIF6, ILIF7, ILIF8, DLIF9, ILIHYI, ILIR1, IL1R2, ILIRAP, ILIRAPLI, ILIRAPL2, ILIRL1, ILIRL2, ILIRN, IL2, IL20, IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2, IL23, DL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL30, IL3RA, IL4, IL4, IL6ST (당단백질 130), ILK, INHA, INHBA, INSL3, INSL4, IRAK1, IRAK2, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA6 (α6 인테그린), ITGAV, ITGB3, ITGB4 (α4 인테그린), JAG1, JAK1, JAK3, JTB, JUN, K6HF, KAI1, KDR, KIT, KITLG, KLF5 (GC Box BP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9, KRT1, KRT19 (케라틴 19), KRT2A, KRTHB6 (헤어 (hair)-특이적 타입 II 케라틴), L1CAM, LAG3, LAMA5, LAMP1, LEP (렙틴), Lewis Y 항원 ("LeY"), LILRB1, Lingo-p75, Lingo-Troy, LGALS3BP, LRRC15, LPS, LTA (TNFb), LTβ, LTβ4R (GPR16), LTβ4R2, LTβR, LY75, LYPD3, MACMARCKS, MAG 또는 OMgp, MAGEA3, MAGEA6, MAP2K7 (c-Jun), MCP-1, MDK, MIB1, midkine, MIF, MISRII, MJP-2, MLSN, MK, MKI67 (Ki-67), MMP2, MMP9, MS4A1, MSMB, MT3 (메탈로티오넥틴-UI), mTOR, MTSS1, MUC1 (mucin), MUC16, MYC, MYD88, NCK2, NCR3LG1, 뉴로칸 (neurocan), NFKB1, NFKB2, NGFB (NGF), NGFR, Ngr-Lingo, NgrNogo66, (Nogo), Ngr-p75, Ngr-Troy, NMEI (NM23A), NOTCH, NOTCH1, NOTCH3, NOX5, NPPB, NROB1, NROB2, NR1D1, NR1D2, NR1H2, NR1H3, NR1H4, NR112, NR113, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2, NR6A1, NRP1, NRP2, NT5E, NTN4, NY-ESO1, ODZI, OPRDI, P2RX7, PAP, PART1, PATE, PAWR, P-카드헤린, PCA3, PCD1, PD-L1, PCDGF, PCNA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAMI, L1-CAM, peg-아스파라기나제, PF4 (CXCL4), PGF, PGR, 포스파칸 (phosphacan), PIAS2, PI3 키나제, PIK3CG, PLAU (uPA), PLG, PLXDCI, PKC, PKC-베타, PPBP (CXCL7), PPID, PR1, PRAME, PRKCQ, PRKD1, PRL, PROC, PROK2, PSAP, PSCA, PSMA, PTAFR, PTEN, PTHR2, PTGS2 (COX-2), PTN, PVRIG, RAC2 (P21Rac2), RANK, RANK 리간드, RARB, RGS1, RGS13, RGS3, RNF110 (ZNF144), Ron, ROBO2, ROR1, RXR, S100A2, SCGB 1D2 (리포필린 B), SCGB2A1 (맘마글로빈 2), SCGB2A2 (맘마글로빈 1), SCYE1 (내피 단핵구-활성화 사이토키인), SDF2, SERPENA1, SERPINA3, SERPINB5 (마스핀), SERPINE1 (PAI-I), SERPINFI, SHIP-1, SHIP-2, SHB1, SHB2, SHBG, SfcAZ, SLAMF7, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, SLC44A4, SLC34A2, SLIT2, SPP1, SPRR1B (Spr1), ST6GAL1, ST8SIA1, STAB1, STATE, STEAP, STEAP2, TB4R2, TBX21, TCP10, TDGF1, TEK, TGFA, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB1R1, TGFB1R2, TGFB1R3, THIL, THBS1 (트롬보스폰딘-1), THBS2, THBS4, THPO, TIE (Tie-1), TIMP3, 조직 인자 (tissue factor), TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TNF, TNF-a, TNFAIP2 (B94), TNFAIP3, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF5, TNFRSF6 (Fas), TNFRSF7, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFSF10 (TRAIL), TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF12A, TNFRSF17, TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM), TNFRSF14 (HVEM), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, TNFSF4 (OX40 리간드), TNFSF5 (CD40 리간드), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27 리간드), TNFSF8 (CD30 리간드), TNFSF9 (4-1BB 리간드), TOLLIP, Toll-유사 수용체, TOP2A (토포이소머라제 Iia), TP53, TPM1, TPM2, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, TRKA, TREM1, TREM2, TROP2, TRPC6, TSLP, TWEAK, 티로시나제 (Tyrosinase), uPAR, VEGF, VEGFB, VEGFC, 베르시칸 (versican), VHL C5, VLA-4, WT1, Wnt-1, XCL1 (림포락틴), XCL2 (SCM-1b), XCRI (GPR5/CCXCR1), YY1, ZFPM2, CLEC4C (BDCA-2, DLEC, CD303, CDH6, CLECSF7), CLEC4D (MCL, CLECSF8), CLEC4E (Mincle), CLEC6A (렉틴-2), CLEC5A (MDL-1, CLECSF5), CLEC1B (CLEC-2), CLEC9A (DNGR-1), CLEC7A (렉틴-1), CLEC11A, PDGFRa, SLAMF7, GP6 (GPVI), LILRA1 (CD851), LILRA2 (CD85H, ILT1), LILRA4 (CD85G, ILT7), LILRA5 (CD85F, ILT11), LILRA6 (CD85b,

ILT8), LILRB1, NCR1 (CD335, LY94, NKp46), NCR3 (CD335, LY94, NKp46), NCR3 (CD337, NKp30), OSCAR, TARM1, CD30, CD300C, CD300E, CD300LB (CD300B), CD300LD (CD300D), KIR2DL4 (CD158D), KIR2DS, KLRC2 (CD159C, NKG2C), KLRK1 (CD314, NKG2D), NCR2 (CD336, NKp44), PILRB, SIGLEC1 (CD169, SN), SIGLEC5, SIGLEC6, SIGLEC7, SIGLEC8, SIGLEC9, SIGLEC10, SIGLEC11, SIGLEC12, SIGLEC14, SIGLEC15 (CD33L3), SIGLEC16, SIRPA, SIRPB1 (CD172B), TREM1 (CD354), TREM2, KLRF1 (NKp80), 17-1A, SLAMF7, MSLN, CTAG1B/NY-ESO-1, MAGEA3/A6, ATP5I (Q06185), OAT (P29758), AIFM1 (Q9Z0X1), AOFA (Q64133), MTDC (P18155), CMC1 (Q8BH59), PREP (Q8K411), YMEL1 (O88967), LPPRC (Q6PB66), LONM (Q8CGK3), ACON (Q99K10), ODO1 (Q60597), IDHP (P54071), ALDH2 (P47738), ATPB (P56480), AATM (P05202), TMM93 (Q9CQW0), ERG13 (Q9CQE7), RTN4 (Q99P72), CL041 (Q8BQR4), ERLN2 (Q8BFZ9), TERA (Q01853), DAD1 (P61804), CALX (P35564), CALU (O35887), VAPA (Q9WV55), MOGS (Q80UM7), GANAB (Q8BHN3), ERO1A (Q8R180), UGGG1 (Q6P5E4), P4HA1 (Q60715), HYEP (Q9D379), CALR (P14211), AT2A2 (O55143), PDIA4 (P08003), PDIA1 (P09103), PDIA3 (P27773), PDIA6 (Q922R8), CLH (Q68FD5), PPIB (P24369), TCPG (P80318), MOT4 (P57787), NICA (P57716), BASI (P18572), VAPA (Q9WV55), ENV2 (P11370), VAT1 (Q62465), 4F2 (P10852), ENOA (P17182), ILK (O55222), GPNMB (Q99P91), ENV1 (P10404), ERO1A (Q8R180), CLH (Q68FD5), DSG1A (Q61495), AT1A1 (Q8VDN2), HYOU1 (Q9JKR6), TRAP1 (Q9CQN1), GRP75 (P38647), ENPL (P08113), CH60 (P63038), 또는 CH10 (Q64433)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0216] 표적 항원은 정상세포 대비 암세포에 10배 이상 많이 분포하는 항원 일 수 있다.
- [0217] [약학적으로 허용가능한 염]
- [0218] 본 명세서에서, 약학적으로 허용가능한 염은 제약업계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 리튬, 구리, 망간, 아연, 철 등을 비롯한 무기이온의 염과 염산, 인산, 황산과 같은 무기 산의 염이 있으며, 그 외에 아스코르브산, 시트르산, 타르타르산, 락트산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 글리콜산, 숙신산, 프로피온산, 아세트산, 오로테이트산, 아세 탈살리실산과 같은 유기산의 염 등과 라이신, 아르기닌, 구아니딘 등의 아미노산 염이 있다. 또한 약학적인 반응, 정제 및 분리과정에서 사용될 수 있는 테트라메틸 암모늄, 테트라에틸 암모늄, 테트라프로필 암모늄, 테트라부틸 암모늄, 벤질 트리메틸 암모늄, 벤제토늄 등의 유기이온의 염이 있다. 다만, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.
- [0219] [다양한 운반체-약물 접합체(Carrier-Drug Conjugate)]
- [0220] 본 발명에 따라 선정된 2종의 약물-링커 접합체는 항체 이외에 다양한 종류의 약물 운반체(Carrier)에 적용이 가능하며, 항체와는 다르게 암 조직의 심부까지 잘 침투가 가능하고 CMC가 용이한 특성을 가지고 있는 운반체를 사용하여, 다양한 용도로의 응용에 잘 활용될 수 있다.
- [0221] 운반체(Carrier)는 항체의 항원결합부위, 리피바디, 및/또는 aptamer 일 수 있다.
- [0222] aptamer는 DNA/RNA 기반의 생체 고분자로 항체와 마찬가지로 수 nM 수준의 항원 Binding Affinity를 가지고 있어, 약물의 암 조직 선택적 Carrier로 사용될 수 있다.
- [0223] 리피바디(Repebody)는 어류에서 발견된 새로운 클래스의 면역 단백질로 항체 및 나노바디 (라마 등 포유류 유래의 Single Chain Antibody)와 마찬가지로 항원을 인식할 수 있으며, 항원에 대하여 수 nM 수준의 항원 Binding Affinity를 가지고 있어, 약물의 암 조직 선택적 Carrier로 사용될 수 있다. 특히, 면역원성이 없어 약물의 carrier로 사용될 수 있으며 동시에 낮은 분자량으로 암세포 침투력을 높일 수 있고, 균일한 품질의 리피바디를 지속적으로 생산하기에 용이 하여 암 조직 침투력을 높인 약물 복합체의 제조에 적합하다.
- [0224] [암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물]
- [0225] 본 발명은 전술한 본 발명에 따른 항체-약물 접합체(ADC) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0226] 또한 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 항체-약물 접합체(ADC)의 치료학적으로 유효한 양을, 이를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 대상(subject)은 치료 목적이 된 질병이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등의 모든 동물을 의미하며, 인간을 제외한 것일 수 있다.
- [0227] 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC)는 암 세포의 항원에 특이적으로 결합하고 암 세포 내외에서 약물을 방출하여

세포 독성을 나타내므로, 암의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 면역접합체가 갖는 항암 활성은 전술한 바와 같다.

[0228] 본 발명에서, 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있다. 예컨대, 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형 성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프 구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수 체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백 혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터펩대부 암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위 불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신유모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척 수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상 피세포암, 피부암, 항문암, 횡문 근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암, 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되 는 1 종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 암은 원발성 암뿐 아니라 전이성 암도 포함한다.

[0229] 본 발명에서 사용되는 "치료학적으로 유효한 양"이라는 용어는 암의 치료 또는 예방에 유효한 상기 면역접합체 의 양을 나타낸다. 구체적으로, "치료학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비 율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 증정도, 연령, 성별, 질병의 종 류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치 료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 시판되는 치료제와는 순차적으로 또는 동시에 투여 될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 본 발명의 면역접합체는 용량 의존적인 효과를 나타내 므로 투여 용량은 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분은 안전성이 우수하므로, 결정된 투여 용량 이상으로도 사용될 수 있다.

[0230] 또한 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명은 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제 (medicament)의 제 조에 사용하기 위한, 상기 면역접합체의 용도(use)를 제공한다. 약제의 제조를 위한 상기 면역접합체는 허용되 는 보조제, 희석제, 담체 등을 혼합할 수 있으며, 기타 활성제제와 함께 복합 제제로 제조 되어 활성 성분들의 상승 작용을 가질 수 있다.

[0231] 본 발명의 용도, 조성물, 치료 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

[0232] 본 발명에 따라 하나의 항체에 하나 이상의 약물-링커 접합체가 링커를 통해 연결된 항체-약물 접합체(ADC)는 약물 동태학적 특성 및 생체 내 분포가 원하는 대로 조절할 수 있다. 이에 따라, 예컨대 혈류에서의 체류 시간 을 증대시켜 장시간 혈중 약물농도를 고농도로 유지할 수 있을 뿐만 아니라, 항체-약물 접합체(ADC)에 원하는 간청소율(hepatic clearance) 프로파일 및 혈액 순환 프로파일을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0233] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 동시반응으로 얻어진 dual-payload ADC의 size exclusion chromatography (SEC) 분석 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 동시반응으로 제조된 dual-payload ADC의 hydrophobic interaction chromatography (HIC) 분석 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 동시반응으로 제조된 dual-payload ADC의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 동시반응으로 제조된 dual-payload ADC의 혼합비율과 DAR 간의 상관관계를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 dual-payload ADC의 처리에 따른 세포 생존율을 분석한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 dual-payload ADC의 처리에 따른 세포 생존율을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0234] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0235] [실시예]

[0236] 실시예 1: 비교군 Single payload ADC의 제조

[0237] 항체를 PD-10 desalting column을 이용하여 Reduction buffer (150mM NaCl, 50mM Histidine pH 6.0)로 buffer 교체 후 4mg/ml의 항체에 9배 물 당량의 TCEP을 25℃에서 2시간 처리하여 항체의 disulfide bond를 환원시켰다.

[0238] 환원시킨 항체를 PD-10 desalting column을 이용하여 여분의 TCEP을 제거하고, 10% DMSO를 포함하는 Reaction buffer (25mM Histidine pH6.0)에서 2mg/ml의 환원된 항체와 12배 물 당량의 25-6 (하기 화학식 3) 링커-페이로드를 25℃에서 1시간 반응하여 conjugation 반응을 진행하였다.

[0239] Conjugation 반응 후 여분의 링커-페이로드 혼합물을 PD-10 desalting column을 이용하여 제거하고 최종 ADC 0 (DAR 8; 25-6이 DAR 8로 결합된 ADC)을 얻었다.

[0241] 실시예 2: Payload 1과 2가 다른 경우의 dual-payload ADC의 제조방법

[0242] 2-1. 두 링커-페이로드의 동시반응을 통한 dual-payload ADC 제조 방법

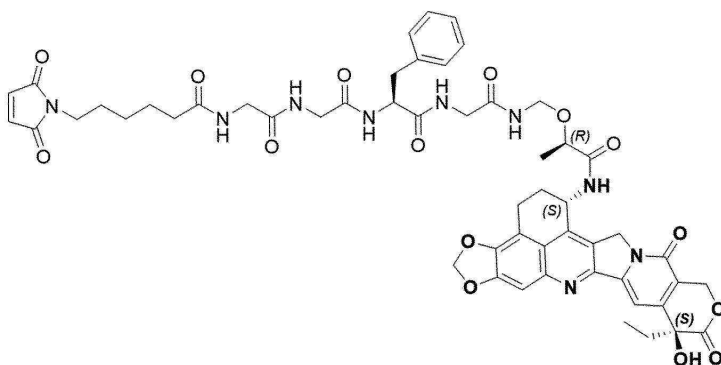
[0243] 항체를 PD-10 desalting column을 이용하여 Reduction buffer (150mM NaCl, 50mM Histidine pH 6.0)로 buffer 교체 후 4mg/ml의 항체에 9배 물 당량의 TCEP을 25℃에서 2시간 처리하여 항체의 disulfide bond를 환원시켰다.

[0244] DMSO에 녹인 mc-val-cit-PAB-MMAE(Maleimide-Caproyl amide-Val-Cit-PAB-MMAE; 이하, vcMME)와 25-6(하기 화학식 3) 링커-페이로드를 물 비율 2:6, 3:5, 4:4으로 혼합한 세 가지의 혼합물을 준비하였다.

[0245] 환원시킨 항체를 PD-10 desalting column을 이용하여 여분의 TCEP을 제거하고, 10% DMSO를 포함하는 Reaction buffer (25mM Histidine pH6.0)에서 2mg/ml의 환원된 항체와 12배 물 당량의 링커-페이로드 혼합물 각각을 25℃에서 1시간 반응하여 conjugation 반응을 진행하였다.

[0246] Conjugation 반응 후 여분의 링커-페이로드 혼합물을 PD-10 desalting column을 이용하여 제거하고 최종 dual-payload ADC 1~7을 얻었다.

[0247] [화학식 3]



[0248]

[0249] 본 실시예에 따라 제조된 dual-payload ADC의 size exclusion chromatography (SEC) 분석결과는 도 1, hydrophobic interaction chromatography (HIC) 분석 결과는 도 2, dual-payload ADC의 SDS-PAGE 분석 결과는 도 3, DAR 분석 결과는 하기 표 4, dual-payload ADC의 반응비율과 DAR 간의 상관관계는 도 4에 나타나있다.

표 4

[0250] 동시반응으로 얻어진 dual-payload ADC의 DAR 분석

ADC 명	혼합비율		DAR	
	vcMMAE	25-6	vcMMAE	25-6
ADC 1	2	6	1.06	6.94
ADC 2	3	5	1.71	6.29
ADC 3	4	4	2.49	5.51

표 5

[0251] 동시반응 dual-payload ADC의 제조 반복성 확인

ADC 명	혼합비율		DAR	
	vcMMAE	25-6	vcMMAE	25-6
ADC 4	2	6	1.15	6.85
ADC 5			0.96	7.04
ADC 6	4	4	2.44	5.56
ADC 7			2.52	5.48

[0252] 2-2. 두 링커-페이로드의 순차반응을 통한 dual-payload ADC 제조 방법

[0253] 항체를 PD-10 desalting column을 이용하여 Reduction buffer (150mM NaCl, 50mM Histidine pH 6.0)로 buffer 교체 후 4mg/ml의 항체에 9배 물 당량의 TCEP을 25℃에서 2시간 처리하여 항체의 disulfide bond를 환원시켰다.

[0254] 환원시킨 항체를 PD-10 desalting column을 이용하여 여분의 TCEP을 제거하고, 10% DMSO를 포함하는 Reaction buffer (25mM Histidine pH6.0)에서 2mg/ml의 환원된 항체와 2.0, 2.1, 2.2 또는 4.0, 4.1, 4.2배 물 당량의 mc-vc-MMAE 링커-페이로드를 25℃에서 1시간 반응하여 1차 conjugation 반응을 진행하였다.

[0255] 1차 반응물에 12배 물 당량의 25-6 링커-페이로드를 넣어 25℃에서 1시간 반응하여 2차 conjugation 반응을 진행하였다.

[0256] 모든 반응 후 여분의 링커-페이로드 혼합물을 PD-10 desalting column을 이용하여 제거하고 최종 dual-payload ADC 8-13을 얻었다.

표 6

[0258] 순차반응으로 얻어진 dual-payload ADC의 SDS-PAGE 분석

ADC 명	반응당량		DAR	
	vcMMAE	25-6	vcMMAE	25-6
ADC 8	2.0	12	1.96	6.04
ADC 9	2.1		1.99	6.01
ADC 10	2.2		2.13	5.87
ADC 11	4.0	12	3.81	4.19
ADC 12	4.1		3.97	4.03
ADC 13	4.2		4.01	3.99

[0260] 2-3. Cell viability assay

[0261] 다양한 암 종의 세포주를 대상으로 96well plate에 well당 3000개의 세포주(KPL4, FaDu, BT474, MDA-MB-468)들을 파종(seeding)하고 항온배양(37℃ 5% CO2)하였다. 24시간 후, 9개 농도(1000nM부터 1/5씩 serial dilution)의 ADC 시료(100ul)를 세포에 처리하였다. 이 때, single payload ADC 인 Tra-25-6(DAR8) 및 Dual payload ADC인 Tra-vcMMAE-25-6(DAR1+7)을 처리하였고, ADC 시료를 처리하지 않은 대조군(ADC 농도 0)도 준비하였다. 6일 동안 항온배양(37℃ 5% CO2) 시킨 후, 각 well에 CellTiter-Glo reagent(CellTiter-Glo® Luminescent Cell

Viability Assay kit (Promega, G7571))을 100ul씩 추가한 후 파이펫팅 해 준 다음, 10분동안 상온배양(RT) 후 luminescence를 측정하였다. ADC 농도가 0일 때의 발광 값을 100%로 볼 때, 50%의 발광 값을 나타내는 농도가 IC₅₀값이다.

[0263] **2-4. Cell viability assay 결과**

[0264] 항체의 타겟인 HER2 발현에 따른 Single payload ADC 효능 대비 Dual payload ADC의 in vitro 효능을 평가하고자, HER2 발현양의 차이를 보이는 다양한 암 세포주에 single payload ADC 인 Tra-25-6(DAR8) 및 Dual payload ADC 인 Tra-vcMMAE-25-6(DAR1+7)을 각각 처리하고, 6일간 incubation을 통해 Cell viability를 관찰하였다.

[0265] 도 5 및 도 6을 참조하면, HER2 발현 양성 세포주에서 ADC 0(Tra-25-6(DAR(0+8)))대비 Dual-payload ADC인 ADC 4와 ADC 6에서 낮은 IC₅₀ 수치를 보였으며, 강력한 cytotoxicity 효능을 보이는 것을 확인하였다. 또한 HER2 발현양에 따라서도 높은 발현을 보이는 세포주(KPL4, BT474)에서나 상대적으로 마일드한 발현을 보이는 세포주(FaDu)에서도 공히 Dual payload ADC 인 ADC 4와 ADC 6이 Single payload ADC인 ADC 0보다 더 낮은 IC₅₀ 수치를 보이는 것을 통해, Dual-payload ADC의 cell killing 효과가 Single payload ADC보다 더 강력하다는 것을 확인하였다.

[0266] 이는 작용기전이 다른 두 가지 페이로드 (Topoisomerase I inhibitor, Microtubule inhibitor)가 함께 작용하여 효능적인 측면에서 시너지 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0267] 반면, HER2 발현 음성 세포주에서는 Tra-25-6(DAR8) 및 Tra-vcMMAE-25-6(DAR1+7) ADC 가 비슷한 수준의 IC₅₀ 값을 보이고 있음을 통해, cell killing 효과가 더 크게 유도되지 않고 동등한 수준의 cytotoxicity 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0268] 또한, 각종 암 세포주별로 약물 페이로드에 대한 민감성 정도에 따라, 페이로드에 대한 cytotoxicity 정도의 차이가 나타나는 것으로 보였다.

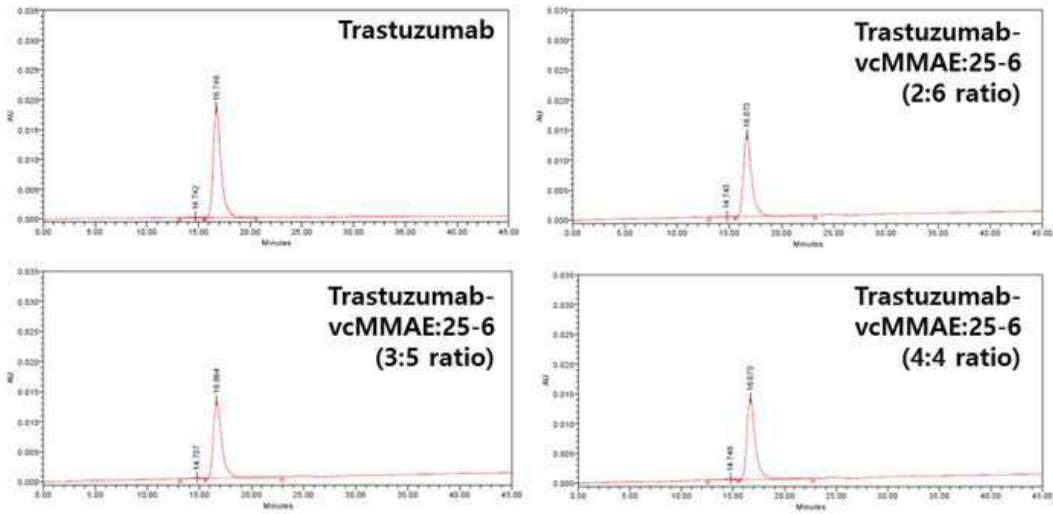
[0270] 즉, 본 실시예에 따르면, 항체-약물 접합체(ADC)는 하나 이상의 약물-링커 접합체를 포함할 수 있으며, 각각의 약물-링커 접합체에 포함된 약물이 서로 다른 종류인 경우 암 세포의 사멸에 유의한 시너지 효과를 나타낸다.

[0272] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다.

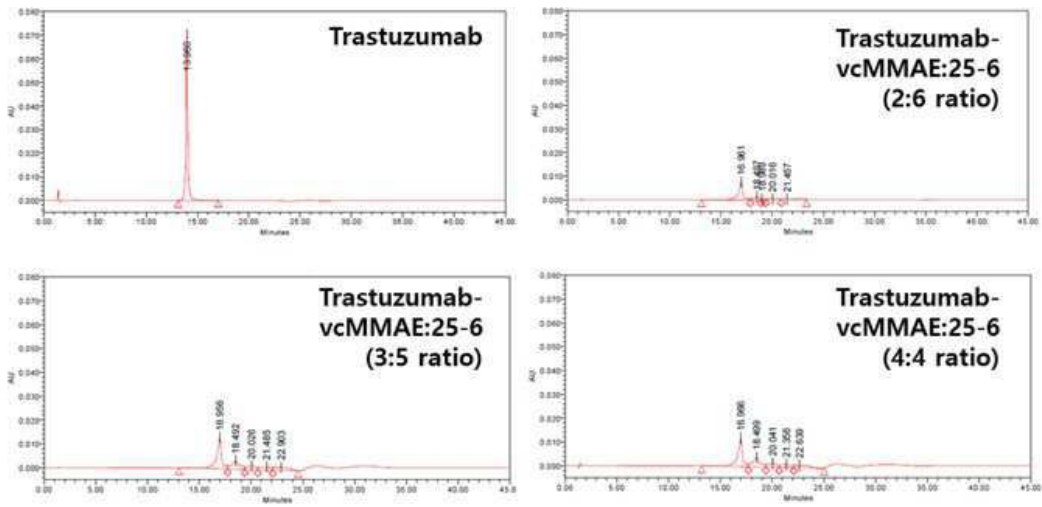
[0273] 실시예에서는 두 가지의 서로 다른 payload 1과 2로 구성된 DAR 8의 Dual payload ADC를 제조함에 있어, payload 1과 2의 각각의 DAR이 1과 7, 2와 6, 3과 5, 4와 4가 되도록 자유롭게 조절할 수 있음을 보여 주었다. 이는 반응물의 몰 당량 비를 조정하여 동시반응 또는 순차반응을 통해 가능하며, 본 발명의 방법을 통해 DAR 4 또는 DAR 6의 Dual payload ADC를 제조 가능하다. 즉, DAR 4의 Dual payload ADC를 제조 시, 각각의 payload의 DAR이 1과 3, 2와 2가 되도록 자유롭게 조절할 수 있고, DAR 6의 경우에는 1과 5, 2와 4, 3과 3이 되도록 조절이 가능하다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

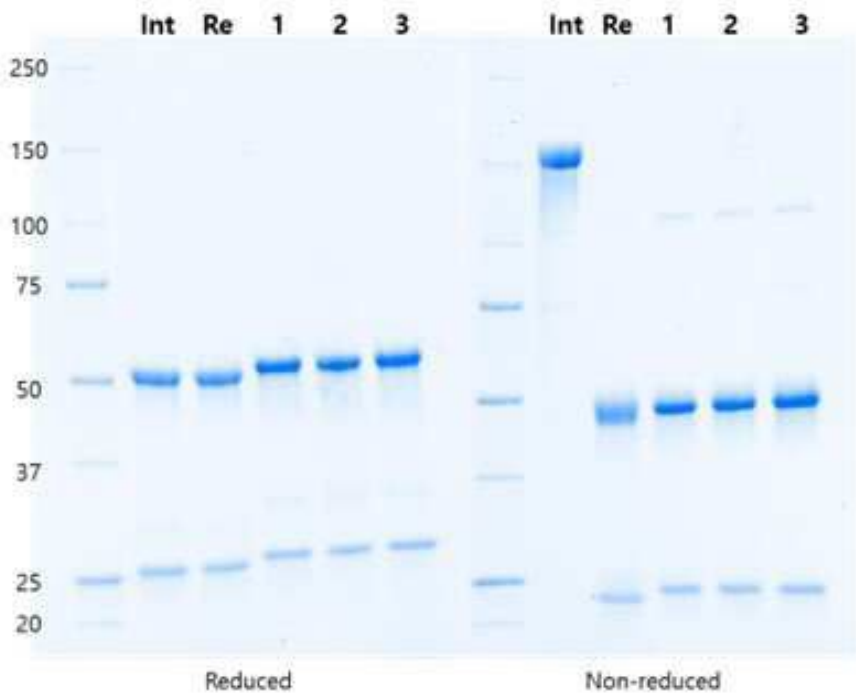
도면1



도면2

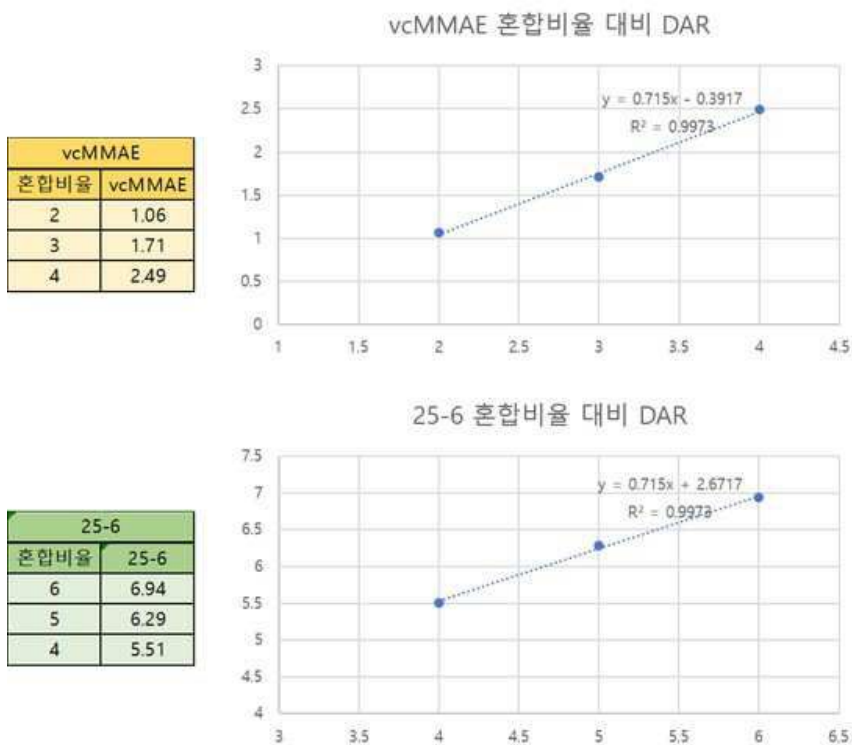


도면3

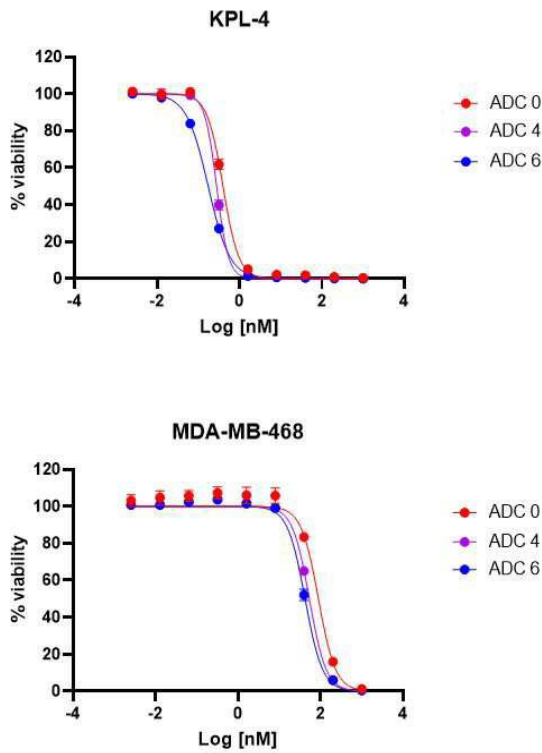


Int : Intact Tra
 Re : Reduced Tra
 1 : Tra-vcMMAE-25-6 (2:6 ratio)
 2 : Tra-vcMMAE-25-6 (3:5 ratio)
 3 : Tra-vcMMAE-25-6 (4:4 ratio)

도면4

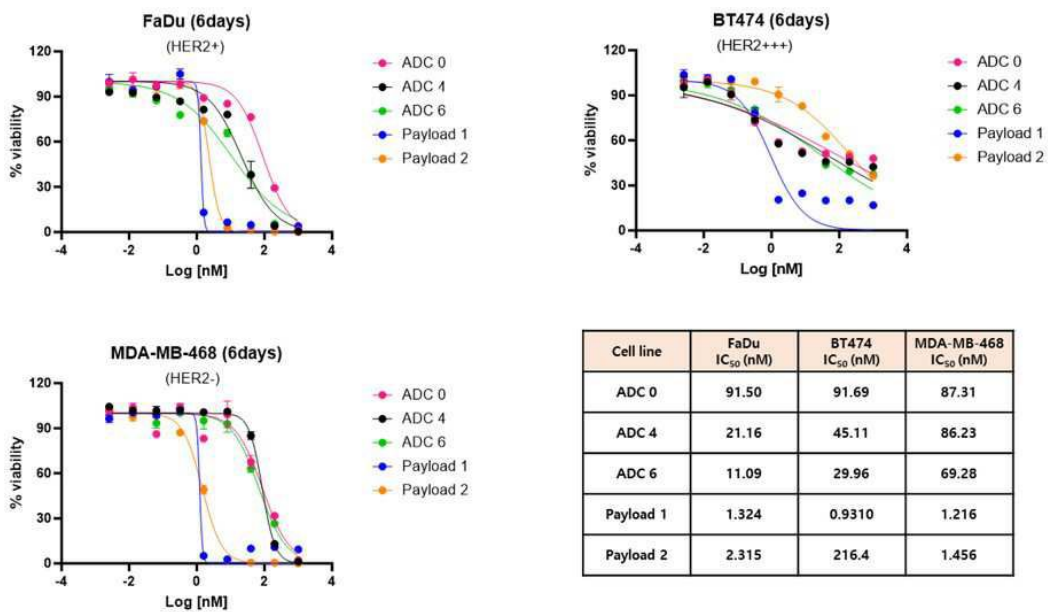


도면5



ADCs	KPL-4 IC ₅₀ (nM)	MDA-MB-468 IC ₅₀ (nM)
ADC 0	0.3988	88.95
ADC 4	0.2791	53.61
ADC 6	0.174	42.22

도면6



Cell line	FaDu IC ₅₀ (nM)	BT474 IC ₅₀ (nM)	MDA-MB-468 IC ₅₀ (nM)
ADC 0	91.50	91.69	87.31
ADC 4	21.16	45.11	86.23
ADC 6	11.09	29.96	69.28
Payload 1	1.324	0.9310	1.216
Payload 2	2.315	216.4	1.456