



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월11일
(11) 등록번호 10-2683876
(24) 등록일자 2024년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/59 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/59 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-0122669
(22) 출원일자 2021년09월14일
심사청구일자 2021년09월14일
(65) 공개번호 10-2022-0064293
(43) 공개일자 2022년05월18일
(30) 우선권주장
1020200150142 2020년11월11일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Diana Rafael, Chemical Engineering
Journal(2018), vol. 340, p.81-93*
US20200282072 A1*
US20180369377 A1*
Hyung Park et al., Biomaterials(2013), vol.
34, p.6992-7000*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
(72) 발명자
나건
경기도 부천시 옥산로 7, 중동 13층 A1302호(
중동, 리첸시아 중동)
김다혜
서울특별시 영등포구 도영로7길 15, 103동 307호
(도림동, 쌍용플래티넘시티1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 7 항

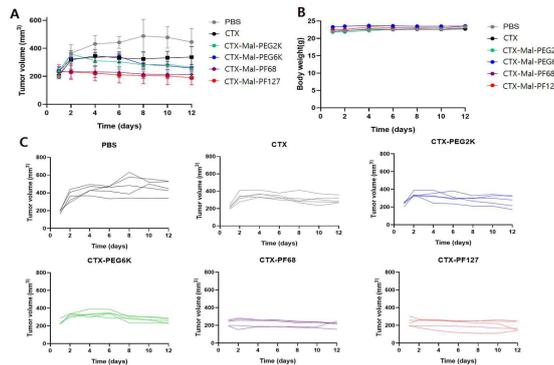
심사관 : 하재욱

(54) 발명의 명칭 표적 치료제의 치료 효과 증진을 위한 항체 기반 컨주게이트

(57) 요약

본 발명은 암 치료용 항체, 링커 및 PEO와 PPO를 포함하는 블록 공중합체를 포함하는 컨주게이트 및 저분자 화합물을 추가로 포함하는 컨주게이트에 관한 것으로 상기 컨주게이트는 암세포 표적능이 우수하고, 항체의 반감기를 증가시켜 암세포를 효율적으로 증가시킬 수 있으므로 암 치료 용도로 유효하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도26



(52) CPC특허분류

C07K 16/2863 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

안민지

서울특별시 양천구 목동서로 280, 810동 805호(신정동, 목동신시가지아파트8단지)

박나은

인천광역시 연수구 경원대로119번길 21, 113동 706호(동춘동, 연수2차풍림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111770
과제번호	2017R1A2B3010038
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	암 치료를 위한 자극 민감성 국소 면역 모듈레이터
기여율	1/1
과제수행기관명	가톨릭대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 항 EGFR 항체, 항 HER2 항체, 항 VEGFR2 항체, 항 PD-L1 항체로 이루어진 군에서 선택되는 암 치료용 항체;
- (b) 상기 암 치료용 항체에 -S- 결합 또는 아마이드 결합으로 연결된 링커; 및
- (c) 상기 링커에 축합중합으로 연결된 PEO(poly(ethylene oxide)) 및 PPO(poly(propylene oxide))로 이루어지는 블록 공중합체;로 이루어지는 컨쥬게이트로서,

상기 링커는 6-말레이미도헥사노익에시드 또는 석시닉 안하이드라이드이고,

상기 블록 공중합체는 PPO의 반복 수가 20-80인, 컨쥬게이트.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 PEO 및 PPO로 이루어지는 블록 공중합체는 폴록사머 188 또는 폴록사머 407인 것인, 컨쥬게이트.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 컨쥬게이트는 블록 공중합체의 말단에 광감각제가 추가로 결합된 것인, 컨쥬게이트.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 광감각제는 클로린류, 박테리오클로린류, 포르피린류, 포르피센류 및 프탈로시아닌류로 이루어진 군에서 선택되는 것인 컨쥬게이트.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 클로린류 광감각제는 클로린 e6인 것인, 컨쥬게이트.

청구항 11

제1항의 컨쥬게이트를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 암은 암세포 표면에 표피 성장 인자 수용체 (epidermal growth factor receptor), 사람

상피세포 성장인자 수용체 2 (human epidermal growth factor receptor 2), 1형 세포 예정사 리간드 (programmed death-ligand 1) 및 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2)로 이루어진 군에서 선택되는 유전자를 발현하는 것인, 암 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 치료제의 치료 효과를 증진시킬 수 있는 항체, 링커 및 PEO(poly(ethylene oxide))와 PPO(poly(propylene oxide))를 포함하는 블록 공중합체를 포함하는 컨쥬게이트, 상기 컨쥬게이트에 저분자 화합물이 추가로 결합된 컨쥬게이트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전통적인 화학 요법은 암의 필수적인 치료법 중의 하나이며 항암 임상에 사용되는 대부분의 화학 요법 항암제의 효능은 세포주기를 표적하므로 독성이 암세포의 증식 정도에 의존적이다. 또한, 임상 치료 효과를 얻기 위해 일반적으로 최대 허용량 근처에서 사용되고 있으며, 다양한 약물을 이용한 치료가 암 치료의 표준 치료요법이 되었다. 하지만, 항암제는 빠르게 증식하는 세포를 죽일 뿐, 정상 세포와 종양 세포 또는 종양 조직을 차별화하지 못한다. 이러한 단점 때문에 전신독성과 세포독성이 나타나며 장기로 치료하면 항암제에 대한 내성을 야기시킬 수 있어 세포독성 약물로 암세포만 표적하여 사멸시키는 향상된 치료 요법이 절실히 요구되고 있다.

[0004] 세포독성 약물과는 달리, 종양 세포의 표면에 있는 특정 항원에 결합하는 단일클론 항체는 종양에 특이적으로 결합하므로 전신 독성을 낮추는 대안 치료요법이다. 실제로 발현 프로파일링 연구를 통해 암세포의 표면에 우선적 또는 독점적으로 발현되는 항원들이 확인되었고 종양과 관련된 항원에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 제작 및 생산할 수 있다. 분자 단위의 약의 형태로서 특정한 형태의 분자 표적 치료는 발암과 종양의 성장에 관여하는 신호를 차단함으로써 암세포의 증식을 막는다. 암세포 표적 치료 방법은 정상 세포에 해롭지 않으면서 기존의 방법보다 효과적인 방법으로 예측되고 있다. 이러한 단일클론 항체들은 계속적으로 개발이 이루어지고 있고, 이미 미국 식품의약국 (Food and Drug Administration, FDA)에서 승인된 치료제들도 존재한다. 승인된 단일클론 항체로는 리투시맙 (rituximab), 트라스투주맙 (trastuzumab), 알렘투주맙 (alemtuzumab), 세툽시맙 (cetuximab), 베바시주맙 (bevacizumab), 이필리무맙 (ipilimumab) 등이 있다.

[0005] 그러나 소수의 항체만이 암 치료용으로 유용하며, 이는 대부분의 항체가 암세포를 죽이는 효능이 그리 효율적이지 않기 때문이다. 항체 기반 표적 항암제가 효율적으로 이용되려면 단일 주입만으로 효과적인 암세포 사멸을 유도하고 강한 결합력으로 항원-항체 결합을 오랫동안 유지하는 것이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0062515호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이러한 상황에서 본 발명자들은 항체 기반 표적 항암제가 단일 주입만으로 효과적인 암세포 사멸을 유도하고 강한 결합력으로 항원-항체 결합을 오랫동안 유지하여 효율적으로 이용될 수 있는 방법을 연구하였다.

[0009] 그 결과, 암세포에 과발현된 표적 인자에 선택적으로 결합하는 단일클론 항체에 링커 및 PEO와 PPO를 포함하는 블록 공중합체를 연결한 컨쥬게이트를 제조하였고, 이러한 컨쥬게이트가 보다 오랫동안 체내에 머무르고 세포막과의 상호작용을 통해 기존의 치료제에 비해 더 나은 항암효과를 유발할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0010] 또한, 상기 컨쥬게이트의 일 말단에 저분자 화합물이 접합된 컨쥬게이트를 추가로 제조하였고, 추가로 제조한 컨쥬게이트가 단일클론항체의 한계점과 저분자 화합물의 한계점 모두를 극복하고, PEO 및 PPO를 포함하는 블록 공중합체에 의한 시너지 효과로 더 나은 항암효과를 유발할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 체내 반감기와 치료 효과가 증진된 암 치료용 항체 기반 컨주게이트 및 이를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 (a) 암 치료용 항체; (b) 상기 항체에 공유결합으로 연결된 링커; 및 (c) 상기 링커에 공유결합으로 연결된 PEO 및 PPO를 포함하는 블록 공중합체;를 포함하는 컨주게이트를 제공한다.

[0014] 본 명세서에 사용된 용어, "암 치료용 항체"는 암 치료 용도로 사용되는 항체를 의미하며, 항체의 기원에 따라 동물 유래 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체로 나눌 수 있다.

[0015] 동물 유래 항체(animal-derived antibody)는 인간 이외의 동물에 항원을 주입하여 생성된 항체를 말하며, 키메라 항체(chimeric antibody)는 동물 유래 항체에서 면역원성을 가장 많이 유발하는 불변영역을 인간 항체의 불변영역으로 치환한 항체를 말한다.

[0016] 인간화 항체(humanized antibody)는 동물 유래 항체의 면역원성을 제거하기 위해 동물 유래 항체에서 항원 결합 부위인 상보적 결정 영역(complementarity determining region, CDR) 서열을 제외한 나머지 서열을 인간 항체 서열로 치환한 항체를 말한다.

[0017] 또한, 인간 항체(human antibody)는 인간 항체 라이브러리의 파지 디스플레이(phage display) 기술로 특정 항원에 대한 항체를 선별한 뒤 해당 항체 유전자를 마우스에 도입하여 생산된 항체를 말한다.

[0018] 또한, 암 치료용 항체는 작용 기전에 따라 수용체 표적 항체와 면역관문 억제제 (immune checkpoint inhibitor 또는 immune checkpoint blockade)로 나눌 수 있다.

[0019] 수용체 표적 항체는 암세포 표면의 특정 수용체에 특이적으로 결합하는 항체를 말한다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 특정 수용체는 표피 성장 인자 수용체 (epidermal growth factor receptor, EGFR), 사람 상피세포 성장인자 수용체 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 및 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 면역관문 억제제는 암세포의 1형 세포 예정사 리간드 (programmed death-ligand 1, PD-L1)가 T 세포의 PD-1과 결합하는 것을 방해하여 T 세포의 면역 기능을 유지시킨다.

[0021] 표피 성장 인자 수용체(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)는 세포의 성장, 분열 및 사멸을 조절하는 세포막 수용체의 그룹이다. 170 kDa의 제1형 막 단백질로서 다양한 종류의 종양 (폐암, 두경부종양, 대장암, 췌장암, 유방암 등의 고형암)에서 과잉 발현되는 것으로 알려져 있는데 이는 수용체의 증폭과 발현 때문이다. 표피 성장 인자 수용체가 과잉 발현된 종양 조직은 더 침습적이고 더 전이를 잘하며 항암요법에 더 저항적인 경향이 있어 예후도 좋지 않다. 이를 극복하기 위해 표피 성장 인자 수용체를 표적하는 항체를 사용하는 표적 치료법이 시행되고 있다. 표피 성장 인자 수용체에 항체가 결합하여 표피 성장 인자가 결합하는 것을 저해함으로써 암세포의 신호와 성장을 억제하여 암을 치료한다.

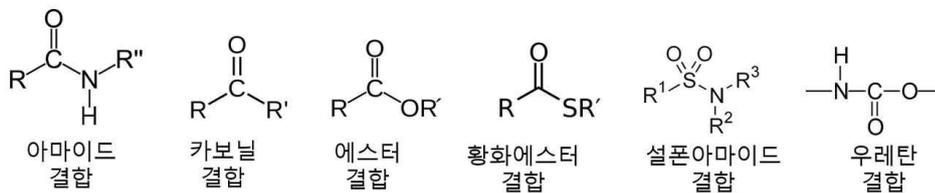
[0022] 키메라 항체의 한 종류인 세톡시맙(cetuximab)은 세포 표면의 상피세포 증식 인자 수용체 (EGFR)에 결합하여 리간드의 결합을 방해함으로써 수용체 활성화를 저해하고, 수용체의 세포 내부로의 합입을 증대시키며, 수용체의 발현을 감소시킨다. 그 결과 세포 주기를 G0-G1에서 정지시키며, Rb 유전자의 탈인산화를 유도하고, 세포 증식을 저해하며, 세포 자멸사를 유도하고, VEGF와 같은 혈관 신생인자의 생성을 억제한다.

[0023] 사람 상피세포 성장인자 수용체 (Human epidermal growth factor receptor 2; HER2)는 세포 표면에 존재하는 분자량 185kDa의 티로신 인산화 성장인자 수용체이다. HER2 분자 내에 리간드 결합 부위가 존재하지는 않으나, EGFR, HER3, HER4와 같은 다른 수용체와 쉽게 이합체를 이루어 활성화된다. 수용체-리간드의 접합으로 다양한 세포 신호전달 경로를 통하여 세포증식, 세포생존, 전이, 혈관신생 등의 작용을 나타낸다. 유방암의 20-30%, 위암, 난소암, 폐암, 전립선암 등 다양한 암종에서 과발현된다. 이들의 과발현으로 세포의 생존, 증식, 혈관 생성 및 전이를 촉진하는 기능이 더욱 증진된다.

[0024] 인간화 항체의 한 종류인 트라스투주맙 (trastuzumab)은 HER2 단백질의 세포외 도메인 (extracellular domain) 부위를 표적으로 하는 재조합 인간 단일클론 항체로 처음으로 FDA 승인을 받았다. HER2 과발현 종양세포 내 신호전달 경로를 억제하고 세포 내 G1/S 세포주기 억제를 통해 세포 사멸을 유도하고, 백금 제제, 탁산, 독소루비신, 사이클로포스파마이드 등의 항암제에 대한 감수성을 증가시킨다. 또한 HER2의 세포 바깥 영역에 항체가 결

합하면 HER2 수용체가 감소한다.

- [0025] 1형 세포 예정사 리간드 (Programmed death ligand 1; PD-L1)는 40 kDa의 타입 1 막관통 단백질로 암세포에서 많이 발현되는 단백질의 일종이다. T 세포 표면에 존재하는 PD-1 수용체와 상호작용하여 면역세포의 공격을 피하는 역할을 한다. 이들의 상호작용은 림프절에서 항원 특이적 T 세포의 증식을 감소시키면서 동시에 조절 세포의 세포자멸사를 감소시킴으로서 암세포가 항암 면역 반응을 회피하도록 한다.
- [0026] 인간 항체의 한 종류인 아벨루맙 (avelumab)은 면역관문억제제의 하나로서, 암세포에 과발현된 PD-L1을 표적하는 인간 단일클론항체이다. 이 항체는 T 세포의 PD-1과 암세포의 PD-L1 상호작용을 막아 암세포 내 형성되어 있는 면역억제환경을 활성화시킨다. 면역체크포인트 역할을 하는 PD-L1 단백질의 활성을 차단하여 암 종류와 관계없이 PD-L1이 발현되어 있는 암에 대해 효과를 발휘할 수 있다는 장점이 있다. 비소세포폐암, 흑색종, 대장암, 신장암, 간세포암종 등에 효과가 있다고 알려져 있다.
- [0027] 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)는 혈관 및 림프계 내피세포에서 발현되며, VEGF-A, VEGF-E 등과 결합하여 혈관 증식 및 혈관 내피세포 이동을 촉진한다.
- [0028] 인간 항체의 한 종류인 라무시루맙(ramucirumab)은 VEGFR2 길항제로 리간드 결합을 차단하여 결과적으로 수용체의 활성화를 억제하며, 대장암, 비소성 폐암 및 위암 치료에 사용되고 있다.
- [0029] 본 명세서에 사용된 용어, "링커(linker)"는 암 표적화용 항체와 PEO-PPO-PEO (Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)) 블록 공중합체를 연결시키는 물질을 말한다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 링커는 말레이미드, 석시닉 안하이드라이드 및 엔-하이드록시석시닉이미드 에스터 로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 말레이미드 또는 석시닉 안하이드라이드일 수 있다.
- [0030] 본 명세서에 사용된 용어, "PEO 및 PPO를 포함하는 블록 공중합체(이하, PEO-PPO 블록 공중합체로 기재함)"는 폴리프로필렌옥사이드 (polypropylene oxide) 블록 및 폴리에틸렌옥사이드 (polyethylene oxide) 블록을 교대로 포함하는 공중합체를 말한다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 PEO-PPO 블록 공중합체는 폴리프로필렌옥사이드 블록 및 폴리에틸렌옥사이드 블록을 교대로 포함하는 삼중 공중합체인 PEO-PPO-PEO 블록 공중합체일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 PEO-PPO 블록 공중합체는 폴록사머 68 (poloxamer 68), 폴록사머 124, 폴록사머 127, 폴록사머 184, 폴록사머 185, 폴록사머 188, 폴록사머 237, 폴록사머 338 및 폴록사머 407로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는 상기 PEO-PPO-PEO 블록 공중합체는 폴록사머 188 (플루로닉 F-68) 또는 폴록사머 407 (플루로닉 F-127)일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서, 상기 암 치료용 항체와 링커, 링커와 PEO-PPO-PEO 블록 공중합체는 각각 공유결합에 의해 연결될 수 있다. 공유결합은 아마이드 결합(amide bond), 카보닐 결합(carbonyl bond), 에스터 결합(ester bond), 황화 에스터 결합(thioester bond), 설펜 아마이드 결합(sulfonamide bond) 및 우레탄 결합(urethane bond)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.



- [0034]
- [0035] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 키주게이트는 링커와 PEO-PPO 블록 공중합체를 먼저 결합시킨 후 암 표적화용 항체를 추가로 결합시키거나, 암 표적화용 항체와 링커를 먼저 결합시키고 PEO-PPO 블록 공중합체를 결합시키는 방법으로 제조될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 키주게이트는 일 말단에 저분자 화합물을 추가로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 PEO-PPO 블록 공중합체의 말단에 저분자 화합물이 결합될 수 있다.
- [0037] 본 발명에서, 상기 저분자 화합물은 항암제 또는 광감각제일 수 있으며, 항암제는 세포독성 항암제일 수 있고, 광감각제는 클로린류 (chlorins), 박테리오클로린류 (bacteriochlorins), 포르피린류 (phorphyrins), 포르피센류 (porphycenes) 및 프탈로시아닌류 (phthalocyanine)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 포르피

린류 광감각제로는 메조테트라 아미노페닐 포르피린, 아연프로토포르피린, 프로토포르피린, 헤마토포르피린이 사용될 수 있고, 프탈로시아닌류 광감각제로는 알루미늄 프탈로시아닌이 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 클로린류 광감각제는 클로린 e6일 수 있다. 상기 클로린 e6는 이미 언급한 바와 같이 PEO-PPO 블록 공중합체의 말단에 결합될 수 있다.

[0039] 본 발명자들은 암 치료용 항체, 링커, PEO-PPO 블록 공중합체가 연결된 컨쥬게이트가 항체의 암세포 표적능을 증진시켜 효과적인 세포 사멸을 유도하고, 항체 자체의 체내 반감기를 증진시키는 것을 확인하였다. 또한, 저분자 화합물이 추가로 결합된 컨쥬게이트는 상기 효과와 더불어 광감각제로 인한 암세포 사멸 효과를 발휘하므로 암세포를 효율적으로 사멸시킬 수 있는 것을 확인하였다.

[0041] 따라서, 본 발명의 다른 양상은 상기 컨쥬게이트를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 이 약학적 조성물은 상기 암 치료용 항체-링커-PEO-PPO 블록 공중합체 컨쥬게이트 또는 암 치료용 항체-링커-PEO-PPO 블록 공중합체-저분자 화합물 컨쥬게이트를 유효성분으로 사용하므로 이 둘 사이에 중복되는 내용은 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여의 목적으로 본 발명의 유효성분을 정제, 캡셀제, 츄잉정, 분말제, 액제, 현탁제 등의 제제로 제형화하는 경우, 아라비아 고무, 옥수수 전분, 미세결정질 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 인산이칼슘 또는 락토스와 같은 부형제, 알긴산, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 붕해제, 스테아르산마그네슘과 같은 활택제, 슈크로스 또는 사카린과 같은 감미제 및 페퍼민트, 메틸 살리실산염 또는 과일향과 같은 향미제가 포함될 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 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 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 일 예에 따른 암 표적화용 항체, 링커 및 PEO 및 PPO를 포함하는 블록 공중합체를 포함하는 컨쥬게이트 및 저분자 화합물을 추가로 포함하는 컨쥬게이트는 암세포 표적능이 우수하고, 항체의 반감기를 증가시켜 암세포를 효율적으로 사멸시킬 수 있으므로 암 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 말레이미드-플루로닉 F68(Ma1-PF68)의 ¹H-NMR 스펙트럼을 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 예에 따른 말레이미드-플루로닉 F127(Ma1-PF127)의 ¹H-NMR 스펙트럼을 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 예에 따른 석시닐-플루로닉 F68(Suc-PF68)의 ¹H-NMR 스펙트럼을 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 예에 따른 석시닐-플루로닉 F127(Suc-PF127)의 ¹H-NMR 스펙트럼을 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 예에 따른 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k의 ¹H-NMR 스펙트럼을 확인한 결과이다.

- 도 6은 본 발명의 일 예에 따른 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6k의 ¹H-NMR 스펙트럼을 확인한 결과이다.
- 도 7은 MALDI-TOF/MS 스펙트럼으로 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68 (CTX-Ma1-PF68)의 분자량을 확인한 결과이다.
- 도 8은 MALDI-TOF/MS 스펙트럼으로 트라스트주맙-말레이미드-플루로닉 F68 (TRA-Ma1-PF68) 및 트라스트주맙-석시닐-플루로닉 F68 (TRA-Suc-PF68)의 분자량을 확인한 결과이다.
- 도 9는 MALDI-TOF/MS 스펙트럼으로 아벨루주맙-말레이미드-플루로닉 F68 (AVE-Ma1-PF68) 및 아벨루맙-석시닐-플루로닉 F68 (AVE-Suc-PF68)의 분자량을 확인한 결과이다.
- 도 10은 MALDI-TOF/MS 스펙트럼으로 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 F68 (RAM-Ma1-PF68)의 분자량을 확인한 결과이다.
- 도 11은 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68/F127 컨쥬게이트 (CTX-Ma1-PF68/PF127) (A), 트라스트주맙-말레이미드-플루로닉 F68/F127 컨쥬게이트 (TRA-Ma1-PF68/PF127) (B), 아벨루맙-말레이미드-플루로닉 F68/F127 컨쥬게이트 (AVE-Ma1-PF68/PF127) (C) 및 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 F68/F127 컨쥬게이트 (RAM-Ma1-PF68/PF127) (D)의 원편광 이색성을 측정된 결과이다.
- 도 12는 EGFR (epidermal growth factor receptor) 미발현 정상세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트, 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 또는 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 13은 EGFR 발현 난소암 세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 세톡시맙 또는 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 14는 HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) 미발현 정상세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트, 트라스트주맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 또는 트라스트주맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 15는 HER2 발현 유방암 세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 세톡시맙 또는 트라스트주맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 16은 PD-L1 (programmed death-ligand 1) 미발현 정상세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트, 아벨루맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 또는 아벨루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 17은 PD-L1 발현 암세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 아벨루맙 또는 아벨루맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 18은 VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) 미발현 정상세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트, 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 또는 라무시루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 19는 PD-L1 발현 암세포주에 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트, 라무시루맙 또는 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 20은 HER2 발현 유방암 세포주에 석시닐-플루로닉 컨쥬게이트, 석시닐-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트, 트라스트주맙-석시닐-플루로닉 컨쥬게이트 또는 트라스트주맙-석시닐-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 21은 PD-L1 발현 암세포주에 석시닐-플루로닉 컨쥬게이트, 석시닐-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트, 아벨루맙-석시닐-플루로닉 컨쥬게이트 또는 아벨루맙-석시닐-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트를 처리한 후 세포 독성을 확인한 결과이다.
- 도 22는 세포에 말레이미드-플루로닉F68-클로린 e6, 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6, 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 또는 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 컨쥬게이트를 처리한 후 EGFR 발현 유무에 따라 컨쥬게이트의 세포 표적 여부를 유세포 분석으로 확인한 결과이다.
- 도 23은 세포에 말레이미드-플루로닉F68-클로린 e6, 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6, 세톡시맙-말레이

이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 또는 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 컨쥬게이트를 처리한 후 EGFR 발현 유무에 따라 컨쥬게이트의 세포 표적 여부를 공초점 현미경으로 확인한 결과이다.

도 24는 마우스에 아벨루맵-클로린 e6, 아벨루맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 또는 아벨루맵-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트를 주입한 후 컨쥬게이트의 생체내 거동을 확인한 결과이다.

도 25는 마우스에 암 형성을 유도한 후 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 또는 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트를 주입하여 암 조직에서 컨쥬게이트의 거동을 확인한 결과이다.

도 26은 마우스에 암 형성을 유도한 후 세톡시맵, 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k, 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6k, 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F68 또는 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 127 컨쥬게이트를 주입하여 암 조직의 크기 변화를 확인한 결과이다.

도 27은 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜/플루로닉-클로린 e6 (A) 또는 트라스트주맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜/플루로닉-클로린 e6 (B) 컨쥬게이트의 수용액에서의 일항 산소 (singlet oxygen) 생성능을 확인한 결과이다.

도 28은 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜/플루로닉-클로린 e6 컨쥬게이트 자체의 세포 독성을 NIH-3T3 (A), SKOV-3 (B) 및 A-2780 (C) 세포에서 확인한 결과이다.

도 29는 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜/플루로닉-클로린 e6 컨쥬게이트의 광역학 매개 세포 독성을 NIH-3T3 (A), A-2780 (B) 및 SKOV-3 (C) 세포에서 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] **실시예 1: 링커-플루로닉 컨쥬게이트 제조**

[0052] **1-1. 말레이미드-플루로닉 F68 컨쥬게이트**

[0053] 6-말레이미도헥사노익에시드 (6-maleimidohexanoic acid, Mal) 253 mg, 디사이클로헥실카보디이미드 (dicyclohexylcarbodiimide, DCC) 297 mg 및 디부틸히드록시톨루엔 (butylated hydroxytoluene, BHT) 317 mg을 디메틸포름아마이드 (dimethylformamide, DMF) 3 ml에 용해시켰다. 플루로닉 68 고분자를 1 g을 디메틸포름아마이드 15 ml에 용해시켰다. 각각 6시간 동안 교반시킨 후, 말레이미도헥사노익에시드가 용해된 용액을 플루로닉 68 고분자가 용해된 수용액에 첨가하여 48시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 정제를 위해, 디에틸에테르 (diethylether) 40 ml에 결정화시켰다. 침전물 이외의 상층액은 버리고, 다시 디에틸에테르를 넣어 재결정시키는 과정을 총 3번 수행하여 반응하지 않은 부산물들을 제거하였다. 이후, 침전물을 감압 건조하여 말레이미드-플루로닉 68 분말 (Mal-PF68)을 얻었다. 합성 결과는 핵자기 공명스펙트럼 (¹H-NMR)으로 확인하였다 (도 1).

[0055] **1-2. 말레이미드-플루로닉 F127 컨쥬게이트**

[0056] 6-말레이미도헥사노익에시드 169 mg, 디사이클로헥실카보디이미드 198 mg, 및 디부틸히드록시톨루엔 212 mg을 디메틸포름아마이드 3 ml에 용해시켰다. 플루로닉 127 고분자를 1 g을 디메틸포름아마이드 15 ml에 용해시켰다. 각 용액을 6시간 동안 교반시키고, 상기 실시예 1-1과 동일한 과정을 거쳐 말레이미드-플루로닉 127 분말 (Mal-PF127)을 얻었다. 합성 결과는 핵자기 공명스펙트럼 (¹H-NMR)으로 확인하였다 (도 2).

[0058] **1-3. 석시닐-플루로닉 F68 컨쥬게이트 제조**

[0059] 석시닉 안하이드라이드 (Succinic anhydride, Suc) 240 mg 및 4-다이메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 260 mg을 다이메틸설폭사이드 (Dimethylsulfoxide, DMSO) 10 ml에 용해시켰다. 플루로닉 F68 1 g을 다이메틸설폭사이드 50 ml에 용해시켰다. 각 용액을 6시간 동안 교반시키고, 석시닉 안하이드라이드가 용해된 용액을 플루로닉 68 고분자가 용해되어 있는 수용액에 첨가한 후 24시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 용액을 투석막 (MWCO 3,500)으로 2일 동안 투석하여 정제하였다. 이후, 물에 용해된 석시닐-플루로닉 F68을 동결 건조하여 최종 분말(Suc-PF68)을 얻었다. 합성 결과는 핵자기공명스펙트럼 (¹H-NMR)으로 확인하였다 (도 3).

- [0061] **1-4. 석시닐-플루로닉 F127 컨쥬게이트 제조**
- [0062] 석시닐 안하이드라이드 (Suc) 163 mg 및 4-다이메틸아미노피리딘(DMAP) 179 mg을 다이메틸설폭사이드 (DMSO) 10 ml에 용해시켰다. 플루로닉 F127 1 g을 다이메틸설폭사이드 (DMSO) 50 ml에 용해시켰다. 이후 상기 실시예 1-3과 동일한 과정을 거쳐 최종 분말(Suc-PF127)을 얻었다. 합성 결과는 핵자기공명스펙트럼 (¹H-NMR)으로 확인하였다 (도 4).
- [0064] **실시예 2: 항체-링커-플루로닉 컨쥬게이트 제조**
- [0065] **2-1. 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**
- [0066] 염을 제거하기 위해 세톡시맵 (cetuximab, CTX) 주사 제형을 0.1 M PBS 버퍼 (pH 7.4)를 이동상 용매로 하여 PD10 컬럼에 통과시켜 부형제나 첨가물을 제거하였다. 수득물은 1 ml씩 회수하여 BCA(bicinchoninic acid) 방법으로 항체를 정량하였다. 2 mg의 트라우트 시약(Traut's reagent)에서 18 μl만 취하고, 세톡시맵 수용액 4 mg에 분산시켜 항체의 아민기(amine group)를 1시간 동안 티올화(thiolation)시켰다. 1시간 후 PD10 컬럼으로 정제하여 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 세톡시맵 1 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-플루로닉 F68 (Mal-PF68) 1.13 mg 또는 말레이미드-플루로닉 F127 (Mal-PF127) 1.63 mg을 각각 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 (Amicon Ultra 15 ml, molecular weight cut-off size: 100,000 Da) 튜브에서 원심분리(14,000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물 (CTX-Mal-PF68 및 CTX-Mal-PF127)은 냉장 보관하였다.
- [0068] **2-2. 트라스투주맵-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**
- [0069] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 트라스투주맵(trastuzumab, Tra) 주사 제형에서 염을 제거하고, 트라스투주맵의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 트라스투주맵 1 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-플루로닉 F68 1.21 mg 또는 말레이미드-플루로닉 F127 1.75 mg을 각각 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물 (Tra-Mal-PF68 및 Tra-Mal-PF127)은 냉장 보관하였다.
- [0071] **2-3. 아벨루맵-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**
- [0072] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 아벨루맵(avelumab, AVE) 주사 제형에서 염을 제거하고, 아벨루맵의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 아벨루맵 1 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-플루로닉 F68 1.2 mg 또는 말레이미드-플루로닉 F127 1.72 mg을 각각 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(AVE-Mal-PF68 및 AVE-Mal-PF127)은 냉장 보관하였다.
- [0074] **2-4. 라무시루맵-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**
- [0075] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 라무시루맵(ramucirumab) 주사 제형에서 염을 제거하고, 라무시루맵의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 라무시루맵 1 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-플루로닉 F68 1.2 mg 또는 말레이미드-플루로닉 F127 1.72 mg을 각각 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(RAM-Mal-PF68 및 RAM-Mal-PF127)은 냉장 보관하였다.
- [0077] **2-5. 트라스트주맵-석시닐-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**
- [0078] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 트라스트주맵 주사 제형에서 염을 제거하고, 항체를 정량하여 0.5M MES 버퍼에 1 mg을 용해시켰다. 1-3-Dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide (EDC) 0.031 mg, N-hydroxysuccinimide (NHS) 0.0188 mg 및 석시닐-플루로닉 F68 1.2 mg 또는 석시닐-플루로닉 F127 1.9 mg을 0.5 M MES 버퍼에서 1시간 동안 교반시켰다. 이 용액을 항체가 용해된 용액에 첨가하여 4℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(Tra-Suc-PF68 및 Tra-Suc-PF127)은 냉장 보관하였다.
- [0080] **2-6. 아벨루맵-석시닐-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트 제조**
- [0081] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 아벨루맵 주사 제형에서 염을 제거하고, 항체를 정량하여 0.5M MES 버퍼에 1 mg을 용해시켰다. 이후 실시예 2-5와 동일한 과정으로 최종 산물(AVE-Suc-PF68 및 AVE-Suc-PF127)을 제조하여 냉

장 보관하였다.

[0083] **실시예 3: 항체-링커플루로닉-광감각제 컨쥬게이트 제조**

[0084] **3-1. 플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트**

[0085] 클로린 e6(Ce6) 110 mg, 디사이클로헥실카보디이미드(DCC) 45 mg 및 4-디메틸아미노피리딘 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 26 mg을 20 ml 플라스크에서 디클로로메탄(DCM) 5 ml에 용해시켰다. 플루로닉 F68 (Pluronic F68; PF68, 8400 g/mol) 1 g을 디클로로메탄 10 ml에 용해시켰다. 각 용액을 6시간 동안 교반시킨 후, 두 용액을 섞어 상온에서 48시간 동안 교반시키고, 디에틸에테르 45 ml에서 결정화시켰다. 침전물 이외의 상층액은 버리고 다시 디에틸에테르를 넣어 재결정시키는 과정을 총 3번 거쳐 반응하지 않은 부산물들을 제거한 후, 감압 건조하여 분말을 얻었다. 이 분말을 다시 메탄올에 20 mg/ml의 농도로 용해시키고, 열린 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 합성된 플루로닉 F68-클로린 e6 (PF68-Ce6)를 수득하였다.

[0087] **3-2. 말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트**

[0088] 6-말레이미도헥사노익에시드(Mal) 23.2 mg, 디사이클로헥실카보디이미드 (DCC) 27.2 mg 및 디부틸히드록시톨루엔 (BHT) 29.1 mg을 디메틸포름아마이드 2 ml에 용해시켰다. 상기 실시예 3-1에서 수득한 플루로닉 F68-클로린 e6 (PF68-Ce6) 컨쥬게이트 200 mg을 디메틸포름아마이드 3 ml에 용해시켰다. 각 용액을 6시간 동안 교반시킨 후, 말레이미도헥사노익에시드가 용해된 용액을 플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트가 용해된 수용액에 첨가하여 48시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 정제를 위해, 디에틸에테르 45 ml에서 결정화 시켰다. 침전물 이외의 상층액을 버리고 다시 디에틸에테르를 넣어 재결정시키는 과정을 총 3번 거쳐 반응하지 않은 부산물들을 제거한 후, 감압 건조하여 최종 분말 (Mal-PF68-Ce6)을 얻었다.

[0090] **3-3. 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트**

[0091] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 세톡시맵 주사 제형에서 염을 제거하고, 세톡시맵의 아민기를 티올화시킨 후 트라우 시약을 제거하였다. 이후 실시예 3-2에서 제조한 말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 (Mal-PF68-Ce6) 3.63 mg을 세톡시맵 1 mg이 용해된 수용액에 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(CTX-Mal-PF68-Ce6)은 냉장 보관하였다.

[0093] **3-4. 트라스트주맵-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트**

[0094] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 트라스트주맵 주사 제형에서 염을 제거하고, 트라스트주맵의 아민기를 티올화시킨 후 트라우 시약을 제거하였다. 이후 실시예 3-2에서 제조한 말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 2.72 mg을 트라스트주맵 5 mg이 용해된 수용액에 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(Tra-Mal-PF68-Ce6)은 냉장 보관하였다.

[0096] **3-5. 아벨루맵-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트**

[0097] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 아벨루맵 주사 제형에서 염을 제거하고, 아벨루맵의 아민기를 티올화시킨 후 트라우 시약을 제거하였다. 이후 3-2에서 제조한 말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 1.28 mg을 아벨루맵 2 mg이 용해된 수용액에 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(AVE-Mal-PF68-Ce6)은 냉장 보관하였다.

[0099] **비교예 1: 링커-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 제조**

[0100] **1-1. 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K 컨쥬게이트**

[0101] 6-말레이미도헥사노익에시드 211 mg, 디사이클로헥실카보디이미드 247 mg, 및 NHS 138 mg을 디메틸포름아마이드 5 ml에 용해시켰다. 폴리에틸렌글리콜 2K 고분자 0.2 g을 디메틸포름아마이드 10 ml에 용해시켰다. 각각의 용액을 4시간 동안 교반시킨 후, 말레이미도헥사노익에시드가 용해된 용액을 폴리에틸렌글리콜 2k 고분자가 용해된 수용액에 첨가하여 24시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 정제를 위해, 반응물을 디에틸에테르 40 ml로 결정화시켰다. 침전물 이외의 상층액은 버리고, 다시 디에틸에테르를 넣어 재결정시키는 과정을 총 3번 수행하여 반응하지 않은 부산물들을 제거하였다. 이후 침전물을 감압 건조하여 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k 분말 (Mal-PEG2K)을 얻었다. 합성 결과는 핵자기공명스펙트럼 (¹H-NMR)으로 확인하였다 (도 5).

[0103] **1-2. 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6K 컨쥬게이트**

[0104] 6-말레이미도헥사노익에시드 70.3 mg, 디사이클로헥실카보디이미드 82.5 mg, NHS 40.6 mg을 디메틸포름아마이드 5 ml에 용해시켰다. 폴리에틸렌글리콜 6K 고분자 0.2 g을 디메틸포름아마이드 10 ml에 용해시켰다. 각 용액을 4시간 동안 교반시킨 후, 말레이미도헥사노익에시드가 용해된 용액을 폴리에틸렌글리콜 6K 고분자가 용해된 수용액에 첨가하여 24시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 정제를 위해, 반응물을 디에틸에테르 40 ml에 결정화시켰다. 침전물 이외의 상층액은 버리고, 다시 디에틸에테르를 넣어 재결정시키는 과정을 총 3번 수행하여 반응하지 않은 부산물들을 제거하였다. 이후 침전물을 감압 건조하여 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6K 분말 (Ma1-PEG6K)을 얻었다. 합성 결과는 핵자기공명스펙트럼 (¹H-NMR)으로 확인하였다 (도 6).

[0106] **비교예 2: 항체-링커-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 제조**

[0107] **2-1. 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K, 폴리에틸렌글리콜 6K 컨쥬게이트**

[0108] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 세톡시맵 주사 제형에서 염을 제거하고, 세톡시맵의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 세톡시맵 3 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K 0.44 mg 또는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6k 1.24 mg을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(CTX-Ma1-PEG2K 및 CTX-Ma1-PEG6K)은 냉장 보관하였다.

[0110] **2-2. 트라스트주맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K, 폴리에틸렌글리콜 6K 컨쥬게이트**

[0111] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 트라스트주맙 주사 제형에서 염을 제거하고, 트라스트주맙의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 트라스트주맙 5 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k 0.75 mg 또는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6k 2.1 mg을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(Tra-Ma1-PEG2K 및 Tra-Ma1-PEG6K)은 냉장 보관하였다.

[0113] **2-3. 아벨루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K, 폴리에틸렌글리콜 6K 컨쥬게이트**

[0114] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 아벨루맙 주사 제형에서 염을 제거하고, 아벨루맙의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 아벨루맙 2 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K 0.301 mg 또는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6K 0.845 mg을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(AVE-Ma1-PEG2K 및 AVE-Ma1-PEG6K)은 냉장 보관하였다.

[0116] **2-4. 라무시루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K, 폴리에틸렌글리콜 6K 컨쥬게이트**

[0117] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 라무시루맙 주사 제형에서 염을 제거하고, 라무시루맙의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 라무시루맙 2 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K 0.301 mg 또는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 6K 0.845 mg을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(RAM-Ma1-PEG2K 및 RAM-Ma1-PEG6K)은 냉장 보관하였다.

[0119] **2-5. 트라스트주맙-석시닐-폴리에틸렌글리콜 2K, 폴리에틸렌글리콜 5K 컨쥬게이트**

[0120] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 트라스트주맙 주사 제형에서 염을 제거하고, 항체를 정량하여 0.5M MES 버퍼에 1 mg을 용해시켰다. EDC 0.031 mg, NHS 0.0188 mg 및 석시닐-폴리에틸렌글리콜 2K 0.27 mg 또는 석시닐-폴리에틸렌글리콜 5K 0.82 mg을 0.5 M MES 버퍼에서 1시간 동안 교반시켰다. 이 용액을 항체가 용해된 용액에 첨가하여 4℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(Tra-Suc-PEG2K 및 Tra-Suc-PEG6k)은 냉장 보관하였다.

[0122] **2-6. 아벨루맙-석시닐-폴리에틸렌글리콜 2K, 폴리에틸렌글리콜 5K 컨쥬게이트 제조**

[0123] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 아벨루맙 주사 제형에서 염을 제거하고, 항체를 정량하여 0.5M MES 버퍼에 1 mg을 용해시켰다. EDC 0.031 mg, NHS 0.0188 mg 및 석시닐-폴리에틸렌글리콜 2K 0.27 mg 또는 석시닐-폴리에틸렌글리콜 5K 0.82 mg을 0.5 M MES 버퍼에서 1시간 동안 교반시켰다. 이 용액을 항체가 용해된 용액에 첨가하여 4℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하

여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(AVE-Suc-PEG2K 및 AVE-Suc-PEG6k)은 냉장 보관하였다.

[0125] **비교예 3: 항체-폴리에틸렌글리콜-광감각제 컨주게이트 제조**

[0126] **3-1. 세톡시말-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6 컨주게이트**

[0127] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 세톡시말 주사 제형에서 염을 제거하고, 세톡시말의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 세톡시말 1 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 1.85 mg을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(CTX-Ma1-PEG2K-Ce6)은 냉장 보관하였다.

[0129] **3-2. 트라스트주말-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6 컨주게이트**

[0130] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 트라스트주말 주사 제형에서 염을 제거하고, 트라스트주말의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 트라스트주말 5 mg이 용해된 수용액에 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 0.949 mg을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(Tra-Ma1-PEG2K-Ce6)은 냉장 보관하였다.

[0132] **3-3. 아벨루말-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6 컨주게이트**

[0133] 실시예 2-1과 동일한 방법으로 아벨루말 주사 제형에서 염을 제거하고, 아벨루말의 아민기를 티올화시킨 후 트라우트 시약을 제거하였다. 이후 아벨루말 2 mg이 용해된 수용액에 후 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6 0.764 mg을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 아미콘 울트라 튜브에서 원심분리(14000 g, 10분)하여 미반응물을 제거하였다. 최종 산물(AVE-Ma1-PEG2K-Ce6)은 냉장 보관하였다.

[0135] **실험예 1: 항체-링커-플루로닉 컨주게이트의 말디 토프 분석**

[0136] 상기 실시예 2-1 내지 2-6에서 제조한 항체-플루로닉 F68의 접합 여부를 확인하기 위하여 말디 토프 (MALDI-TOF) 분석기기로 각 컨주게이트의 분자량을 측정하였다.

[0137] 그 결과, 세톡시말-말레이미드-플루로닉 F68, 트라스트주말-말레이미드-플루로닉 F68, 아벨루말-말레이미드-플루로닉 F68 및 라무시루말-말레이미드-플루로닉 F68의 분자량이 세톡시말 (152 kDa), 트라스트주말 (148 kDa), 아벨루말 (147 kDa), 라무시루말 (147 kDa)과 말레이미드-플루로닉 F68 컨주게이트 (8611 g/mol)의 분자량을 더한 약 161, 157, 155 및 156 kDa으로 측정되었다 (도 7, 8의 A, 9의 A 및 10).

[0138] 또한, 트라스트주말-석시닐-플루로닉 F68, 아벨루말-석시닐-플루로닉 F68의 분자량은 트라스트주말 (148 kDa), 아벨루말 (147 kDa)과 석시닐-플루로닉 F68 컨주게이트 (9033 g/mol)의 분자량을 더한 약 157 kDa, 156 kDa으로 측정되었다 (도 8의 B 및 도 9의 B).

[0139] 도 7 내지 10의 결과로부터 항체 기반 플루로닉 컨주게이트가 정상적으로 합성된 것을 확인하였다.

[0141] **실험예 2: 항체-링커-플루로닉 컨주게이트의 구조 안정성 평가**

[0142] 상기 실시예 2-1 내지 2-4에서 제조한 항체-말레이미드-플루로닉 F68과 항체-말레이미드-플루로닉 F127 컨주게이트의 구조 안정성을 2차 구조를 통해 확인하기 위하여 원편광 이색성을 측정하였다. 단일클론 항체를 구성하는 면역글로불린 G는 고유 2차 구조를 가지고 있고 이러한 구조로 인하여 원편광 이색성에서 202 nm에서 양의 값을, 218 nm에서 음의 값을 갖는다. 따라서, 원편광 이색성을 측정함으로써 항체 구조의 유지 여부를 간접적으로 확인할 수 있다.

[0143] 측정 결과, 원물질인 단일클론항체의 2차 구조가 항체-말레이미드-플루로닉 컨주게이트에서 잘 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다 (도 11).

[0145] **실험예 3: 항체-링커-플루로닉 컨주게이트의 암세포 사멸 효능 확인**

[0146] 상기 실시예 2-1 내지 2-6에서 제조한 항체-링커-플루로닉 F68, F127 컨주게이트의 효과를 항체 단독의 효과와 비교하기 위해 상피세포 성장인자 수용체 발현량이 다른 암세포에서 자체적인 사멸능을 확인하였다. 비교군 (비교예 2-1 내지 2-6)으로는 PEO 블록(block)만 갖는 항체-폴리에틸렌글리콜 2K, 5K 또는 6K 컨주게이트를 이용하였다.

[0148] **3-1. 세톡시말-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨주게이트**

- [0149] EGFR (epidermal growth factor receptor)을 발현하지 않는 L929 및 NIH3T3 정상세포, EGFR을 발현하는 난소암 세포주인 SKOV3 세포를 배양하고, 세톡시맵 (CTX), 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F68 (CTX-Ma1-PF68) 또는 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F127 (CTX-Ma1-PF127)을 상기 세포에 4시간 동안 처리하였다. 이후 세포를 완충용액으로 세척하고 깨끗한 배양액을 첨가하여 하루 동안 더 배양하였다.
- [0150] 배양이 끝난 세포에 MTT 시약을 처리하여 3시간 동안 추가로 배양한 후 배양액과 MTT 시약을 모두 제거하고, 디메틸설폭사이드를 가하여 세포에 형성된 포르마잔을 용해시켰다. 이후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 형성된 포르마잔 양을 비교하고, 암세포의 생존율 및 세포 독성을 분석하였다.
- [0151] 분석 결과, EGFR을 발현하지 않는 정상세포인 L929 및 NIH3T3 세포에서 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 (Ma1-PF68 및 Ma1-PF127), 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 (Ma1-PEG2K 및 Ma1-PEG6K), 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 (CTX-Ma1-PF68/PF127) 및 세톡시맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 (CTX-Ma1-PEG2K/PEG6K) 자체는 세포 독성이 없는 것을 확인하였다 (도 12의 A 내지 D).
- [0152] EGFR을 발현하는 난소암 세포주에서도 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 (Ma1-PF68/PF127)는 세포 독성이 없었다. 그러나 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F68 (CTX-Ma1-PF68) 또는 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F127 (CTX-Ma1-PF127) 처리군에서는 세톡시맵 항체(CTX) 처리군보다 세포 사멸이 증가하였다 (도 13의 A 및 B).
- [0153] 상기 결과를 통해 세톡시맵 항체 단독보다 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F68 또는 세톡시맵-말레이미드-플루로닉 F127을 사용했을 때 보다 효과적인 암 치료가 가능한 것을 알 수 있다.
- [0155] **3-2. 트라스트주맵-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**
- [0156] HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)를 발현하지 않는 L929 및 NIH3T3 정상세포, HER2를 발현하는 유방암 세포주 (HER2 발현 정도: MDA-MB-231<MCF-7<SK-BR3)를 배양한 후, 서로 다른 농도의 트라스트주맵-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트를 처리하였다. 이후 실험에 2-1과 동일한 방법으로 세포의 생존율 및 세포 독성을 분석하였다.
- [0157] 그 결과, HER2를 발현하지 않는 L929 및 NIH3T3 세포에서 말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 (Ma1-PF68 및 Ma1-PF127), 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 (Ma1-PEG2K 및 Ma1-PEG6K), 트라스트주맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 (Tra-Ma1-PEG2K 및 Tra-Ma1-PEG6K) 및 트라스트주맵-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 (Tra-Ma1-PF68 및 Tra-Ma1-PF127) 모두 세포 독성이 없는 것을 확인하였다 (도 14의 A 내지 D).
- [0158] 또한, HER2를 발현하는 유방암 세포주에서도 말레이미드-플루로닉 (Ma1-PF68 및 Ma1-PF127) 및 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 (Ma1-PEG2K 및 Ma1-PEG6K) 컨쥬게이트 자체는 독성이 없었다 (도 15의 A, C 및 E). 그러나 트라스트주맵 항체 단독 또는 트라스트주맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 처리군에 비해 트라스트주맵-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 처리군에서 세포 독성이 증가하는 것으로 나타나 효과적인 암 치료가 가능한 것을 확인하였다 (도 15의 B, D 및 F). 또한, 세포주의 HER2 발현물에 비례하여 트라스트주맵-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트의 독성이 증가하는 것을 통해 항원 특이적 치료 효과를 확인하였다.
- [0160] **3-3. 아벨루맵-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**
- [0161] PD-L1 (programmed death-ligand 1)을 발현하지 않는 정상세포인 L929 및 NIH3T3 세포주, PD-L1을 발현하는 흑색종, 대장암, 폐암 세포주 (각각 B16F10, HCT116 및 A549)를 배양한 후, 아벨루맵-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트를 처리하였다. 이후 실험에 2-1과 동일한 방법으로 세포의 생존율 및 세포 독성을 분석하였다.
- [0162] 그 결과, PD-L1을 발현하지 않는 L929 및 NIH3T3 세포에서 말레이미드-플루로닉 (Ma1-PF68 및 Ma1-PF127) 또는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 (Ma1-PEG2K 및 Ma1-PEG6K) 자체는 독성이 없었다 (도 16의 A 및 C). 아벨루맵-말레이미드-플루로닉 (AVE-Ma1-PF68 및 AVE-Ma1-PF127) 또는 아벨루맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 (AVE-Ma1-PEG2K 및 AVE-Ma1-PEG6K) 컨쥬게이트도 10 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 농도에서는 모두 독성이 없음을 확인하였다 (도 17의 B 및 D).
- [0163] 또한, PD-L1을 발현하는 암세포에서도 말레이미드-플루로닉 (Ma1-PF68 및 Ma1-PF127) 및 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 (Ma1-PEG2K 및 Ma1-PEG6K) 컨쥬게이트 자체는 독성이 없었다 (도 17의 A, C 및 E). 그러나 아벨루맵-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 처리군은 5 $\mu\text{g/ml}$ 또는 그 이하의 농도에서 독성이 나타나 아벨루맵 항체 단독 (AVE) 또는 아벨루맵-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 처리군에 비해 세포 독성이 더욱 증가하였으며 (도 17의 B, D 및 F), 이를 통해 효과적인 암 치료가 가능한 것을 확인하였다.

[0165] **3-4. 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 F68, 플루로닉 F127 컨쥬게이트**

[0166] VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2)를 발현하지 않는 L929 및 NIH3T3 정상세포, VEGFR2를 발현하는 위암 세포주(AGS), 비소세포폐암 (HCC15)를 배양한 후, 서로 다른 농도의 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트를 처리하였다. 이후 실험에 2-1과 동일한 방법으로 세포의 생존율 및 세포 독성을 분석하였다.

[0167] 확인 결과, VEGFR2를 발현하지 않는 정상세포에서 말레이미드-플루로닉 (Mal-PF68 및 Mal-PF127) 및 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 (Mal-PEG2K 및 Mal-PEG6K) 컨쥬게이트는 세포 독성이 없었고 (도 18의 A 및 C), 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 (RAM-Mal-PF68 및 RAM-Mal-PF127) 및 라무시루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 (RAM-Mal-PEG2K 및 RAM-Mal-PEG6K) 컨쥬게이트 또한 독성이 없음을 확인하였다 (도 18의 B 및 D).

[0168] 또한, VEGFR2를 발현하는 세포주에서도 말레이미드-플루로닉 (Mal-PF68 및 Mal-PF127) 및 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 (Mal-PEG2K 및 Mal-PEG6K) 컨쥬게이트는 세포 독성이 없었다 (도 19의 A 및 C). 그러나 라무시루맙 항체 단독(RAM) 또는 라무시루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 처리군에 비해 라무시루맙-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트 처리군에서는 세포 독성이 더욱 증가하여 (도 19의 B 및 D), 이를 통해 효과적인 암 치료가 가능한 것을 확인하였다.

[0170] **3-5. 트라스트주맙-석시닐-플루로닉 컨쥬게이트**

[0171] HER2를 발현하는 유방암주 (SK-BR3)를 배양한 후 트라스트주맙-석시닐-플루로닉 컨쥬게이트를 처리하고, 실험에 2-1과 동일한 방법으로 세포의 생존율 및 세포 독성을 분석하였다.

[0172] 그 결과, HER2를 발현하는 유방암 세포주 SK-BR3에서 석시닐-플루로닉 컨쥬게이트(Suc-PF68, Suc-PF127) 및 석시닐-폴리에틸렌글리콜 (Suc-PEG2K, Suc-PEG5K) 컨쥬게이트 모두 50 µg/ml 미만의 농도에서 독성이 없는 것을 확인하였다 (도 20의 A). 반면, 트라스트주맙 단독 처리군 또는 트라스트주맙-석시닐-폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트 처리군과 비교하여 트라스트주맙-석시닐-플루로닉 처리군에서는 세포 독성이 더욱 증가하는 확인하여 효과적인 암 치료가 가능하다는 것을 알 수 있었다 (도 20의 B).

[0174] **3-6. 아벨루맙-석시닐-플루로닉 컨쥬게이트**

[0175] PD-L1을 발현하는 폐암 및 대장암 세포주 (각각 A549 및 HCT116)를 배양한 후, 아벨루맙-석시닐-플루로닉 컨쥬게이트를 처리하였다. 이후 실험에 2-1과 동일한 방법으로 세포의 생존율 및 세포 독성을 분석하였다.

[0176] 그 결과, PD-L1을 발현하는 암세포에서 석시닐-플루로닉 (Suc-PF68 및 Suc-PF127), 석시닐-폴리에틸렌글리콜 (Suc-PEG2K 및 Suc-PEG5K) 컨쥬게이트 자체는 세포 독성이 없는 것을 확인하였다 (도 21의 A 및 C). 그러나 아벨루맙-석시닐-플루로닉 컨쥬게이트 (AVE-Suc-PF68/PF127) 처리군은 5 µg/ml 또는 그 이하의 농도에서 독성이 나타나 아벨루맙 항체 단독(AVE) 또는 아벨루맙-석시닐-폴리에틸렌글리콜 (AVE-Suc-PEG2K/PEG5K) 처리군에 비해 세포 독성이 더욱 증가하였으며 (도 21의 B 및 D), 이를 통해 효과적인 암 치료가 가능한 것을 확인하였다.

[0178] **실험예 4: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 암세포 수용체 발현 정도에 따른 표적능 정량 평가**

[0179] 상기 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트의 상피세포 증식 인자 수용체(EGFR) 발현량이 다른 세포에 따른 표적능을 비교군인 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6와 비교하여 정량적으로 확인하였다.

[0180] 정상세포이며 EGFR을 발현하지 않는 NIH-3T3, 암세포이며 EGFR 발현량이 낮은 A2780, 그리고 암세포이며 EGFR 발현량이 높은 SKOV3 세포들을 각각 배양한 후, 항체-링커-플루로닉-형광물질 컨쥬게이트를 각 세포에 2시간 동안 처리하였다. 이후 완충용액으로 세포를 세척하고 유세포 분석기로 각 세포에 따른 표적능을 분석하였다.

[0181] 그 결과, NIH-3T3 세포는 EGFR을 발현하지 않아 항체와 연결되지 않은 컨쥬게이트 (말레이미드-플루로닉F68-클로린 e6, 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6)가 비특이적으로 세포 내로 유입되므로 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 (CTX-Mal-PF68-Ce6) 또는 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 (CTX-Mal-PEG2K-Ce6) 컨쥬게이트 처리군보다 말레이미드-플루로닉F68-클로린 e6 (Mal-PF68-Ce6) 또는 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K-클로린 e6 (Mal-PEG2K-Ce6) 처리군에서 형광 신호가 증가하였다 (도 22).

[0182] EGFR을 발현하는 A2780와 SKOV3 세포에서는 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 처리군에 비해 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 처리군에서 형광이 높아 표적능이 증진된 것을 확인하였다 (도 22). 이를 통해 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68이 폴리에틸렌 고분자에 비해 항체의 표적능을 더욱 증진시

키는 것을 확인하였다.

- [0183] 상기 결과로부터 항체-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트가 상피세포 성장인자 수용체를 갖는 암세포를 더욱 효과적으로 표적화할 수 있음을 확인하였다.
- [0185] **실험예 5: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 암세포 수용체 발현 정도에 따른 세포 표적화 확인 (형광 강도)**
- [0186] 상기 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6의 EGFR 발현량이 다른 세포에 따른 세포 표적화를 비교군인 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6와 비교하여 공초점현미경 (Confocal laser scanning microscopy)으로 시각적으로 확인하였다.
- [0187] 정상세포이며 EGFR을 발현하지 않는 NIH-3T3, 암세포이며 EGFR 발현량이 낮은 A2780, 그리고 암세포이며 EGFR 발현량이 높은 SKOV3 세포들을 각각 배양한 후 항체-링커-플루로닉-형광물질 컨쥬게이트를 각 세포에 2시간 동안 처리하였다. 이후 완충용액으로 세척하고 4% 파라포름알데히드로 고정하였다.
- [0188] 그 결과, 정상세포인 NIH-3T3에서는 세톡시맙을 도입하기 전과 후 모두 형광 신호가 거의 발견되지 않았고 (도 23의 C), 암세포에서는 EGFR 발현량에 비례하여 항체를 도입하기 전과 후에 형광 신호가 크게 차이 나는 것을 확인하였다. 특히 EGFR 발현량이 가장 높은 SKOV3 세포는 A2780 세포에 비해 세톡시맙 도입 후 형광 강도가 증가한 것을 명확하게 시각적으로 확인할 수 있었다. 또한, 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 (CTX-Ma1-PEG2K-Ce6) 처리군과 비교하여 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 (CTX-Ma1-PF68-Ce6) 처리군에서 형광 강도가 더 강한 것을 확인하였다 (도 23의 A 및 B).
- [0189] 상기 결과로부터 항체 기반 플루로닉 고분자 조성물이 상피세포 성장인자 수용체를 갖는 암세포를 더욱 효과적으로 표적화할 수 있음을 확인하였다.
- [0191] **실험예 6: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 생체 내 분포**
- [0192] 수컷 무흉선 누드 쥐(BALB/c nude mouse, 5주령)에 아벨루맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 (AVE-Ma1-PF68-Ce6)를 클로린 e6 기준 1.78 mg/kg의 농도로 정맥 주사한 후 FOBI(Fluorescence labeled Organism Bioimaging, NeoScience, Suwon, Korea) 기기로 144시간 동안 형광 이미지를 획득하여 컨쥬게이트의 거동을 확인하였다. 비교군으로는 아벨루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 (AVE-Ma1-Peg2K-Ce6), 아벨루맙-클로린 e6 (AVE-Ce6) 컨쥬게이트를 사용하였다.
- [0193] 확인 결과, 아벨루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 및 아벨루맙-클로린 e6 주입군과 비교하여 아벨루맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 주입군에서 더 강한 형광을 현저히 오랜 시간 동안 확인할 수 있었다 (도 24의 A). 형광 신호를 수치로 표현하기 위해 0시간째 형광을 1로 나타낸 후 각 시간대에 따른 형광 신호를 수치화한 결과, 144시간 쯤에는 비교군인 아벨루맙-클로린 e6 또는 아벨루맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 주입군보다 약 2.7배 높은 형광이 관찰되는 것을 확인하였다 (도 24의 B).
- [0194] 상기 결과로부터 항체-말레이미드-플루로닉 컨쥬게이트가 반감기 증가로 인해 체내에 더욱 오랜 시간 동안 머물러 있음을 확인하였다.
- [0196] **실험예 7: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 생체 내 암 표적능 평가**
- [0197] 수컷 무흉선 누드 쥐(BALB/c nude mouse, 5주령)에 ASPC-1 암세포 1×10^7 개를 피하주사한 후, 15일 뒤 암의 크기가 80 mm³에 도달하였을 때, 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6 컨쥬게이트 (CTX-Ma1-PF68-Ce6)를 클로린 e6 기준 0.5 mg/kg의 농도로 정맥 주사하였다. 이후 FOBI(Fluorescence labeled Organism Bioimaging, NeoScience, Suwon, Korea) 기기로 암 조직의 형광 이미지를 획득하여 120시간 동안 컨쥬게이트의 거동을 확인하였다.
- [0198] 확인 결과, 비교군인 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6 (CTX-Ma1-PEG2K-Ce6) 주입군과 비교하여 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68-클로린 e6를 주입한 쥐의 암 조직에서 광감각제의 형광이 더 강하게 관찰되었다. 이를 수치화한 결과에서도 비교군보다 형광 신호가 약 2배 높은 것을 확인하였다 (도 25의 A 및 B).
- [0199] 상기 결과로부터 항체 기반 플루로닉 고분자 조성물의 표적능 증진으로 인해 더욱 오랜 시간 동안 암 조직 내에 축적되어 있음을 확인하였다.
- [0201] **실험예 8: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 생체 내 암세포 성장 억제**

- [0202] 생쥐(BALB/c mouse, 5주령)에 A431 암세포 1x10⁷개를 피하주사한 후, 15일 뒤 암의 크기가 200 mm³에 도달하였을 때, 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68 또는 플루로닉 F127 컨쥬게이트를 항체 기준 10 mg/kg의 농도로 5번 정맥 주사하였다. 이후 2-3일에 한 번씩 암 조직의 크기와 무게를 측정하여 암세포의 성장 억제 효과를 확인하였다. 비교군으로는 PBS, 세톡시맙 단독, 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K, 6K를 사용하였다.
- [0203] 확인 결과, 첫 번째 정맥주사를 진행한 뒤 대조군인 PBS 주입군에서는 종양이 빠르게 성장하는 것을 알 수 있었다. 대조군과 비교하여 세톡시맙 (CTX), 세톡시맙-말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2K, 6K 주입군 (CTX-Ma1-PEG2K, -PEG6K)에서 종양은 덜 빠르게 성장하는 반면, 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F-68, 127 주입군 (CTX-Ma1-PF68, -PF127)에서는 암 성장이 저해되는 것을 확인하였다 (도 26의 A 및 C). 이를 통해 세톡시맙-말레이미드-플루로닉 F68, 127그룹이 폴리에틸렌 고분자에 비해 항체의 표적능을 더욱 증진시키는 것을 확인하였다. 또한 마우스의 몸무게의 큰 변화가 없었으므로 모든 주입군이 독성이 없는 것을 간접적으로 확인하였다 (도 26의 B).
- [0205] **실험예 9: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 일항 산소 생성능 분석**
- [0206] 상기 실시예 3에서 제조한 세톡시맙/트라스트주맙-말레이미드-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 일항 산소 생성능을 비교예 3에서 제조한 항체-폴리에틸렌글리콜-광감각제 컨쥬게이트를 비교군으로 하여 수상에서 형광분광광도계 (RF)로 분석하였다.
- [0207] 일항 산소와 반응하여 형광이 증가하는 SOSG (singlet oxygen sensor green) 용액을 2 μM 농도로 제조하고, 이 용액 1 ml와 컨쥬게이트 샘플 1 ml를 혼합하였다. 671 nm 파장의 레이저를 50 mW/cm²의 세기로 설정하여 상기 혼합 샘플에 10초 간격으로 조사하면서 Ex 504 nm, Em 525 nm에서 SOSG의 형광을 측정하였다.
- [0208] 측정 결과, 비교군보다 플루로닉을 포함하는 컨쥬게이트가 더욱 효과적으로 광활성을 나타내는 것을 확인하여 일항 산소 생성능이 우수한 것을 알 수 있었다 (도 27).
- [0210] **실험예 10: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 일항 산소 생성능 분석**
- [0211] 상피세포 성장인자 수용체(HER2) 발현량이 다른 암세포에서 세톡시맙-말레이미드-플루로닉-클로린 e6 컨쥬게이트의 세포 사멸능을 확인하였다.
- [0212] 정상세포이며 상피세포 증식 인자 수용체를 갖지 않는 NIH-3T3, 암세포이며 상피세포 증식 인자 수용체 발현량이 낮은 A2780, 그리고 암세포이며 수용체 발현량이 높은 SKOV3 세포들을 각각 배양한 후, 세톡시맙-말레이미드-플루로닉-클로린 e6 컨쥬게이트를 각 세포에 4시간 동안 처리하였다. 이후 완충용액으로 세포를 세척하고 새로운 배양액을 추가하여 24시간 동안 추가로 배양하였다.
- [0213] 배양이 끝난 세포에 MTT 시약을 처리하여 3시간 동안 배양시킨 후 배양액과 MTT 시약 등을 모두 제거하고 디메틸설폭사이드를 가하여 세포에 형성된 포르마잔을 용해시켰다. 그 후 570 nm에서 흡광도를 측정하고, 형성된 포르마잔 양을 비교하여 각 세포의 생존율 및 세톡시맙 기반 광감각제 조성물의 세포 독성을 분석하였다.
- [0214] 그 결과, 정상세포인 NIH-3T3에서는 세톡시맙을 도입하기 전과 후의 세포 독성이 차이가 크지 않지만(도 28의 A), 암세포는 HER2 발현량에 비례하여 항체를 도입하기 전후의 세포 독성에 차이가 나타나는 것을 확인하였다 (도 29의 B 및 C). 특히 상피세포 성장인자 수용체 발현량이 가장 높은 SKOV3 세포에서는 A2780 세포와 비교하여 세톡시맙 도입 후 빛을 조사하지 않았음에도 불구하고 자체적인 세포 독성 효과를 확인할 수 있었다.
- [0216] **실험예 11: 항체-링커-플루로닉-광감각제 컨쥬게이트의 세포 광독성 확인**
- [0217] 앞의 실험 결과로부터 상기 실시예 3에서 제조한 세톡시맙-말레이미드-플루로닉-클로린 e6 컨쥬게이트의 상피세포 증식 인자 수용체(HER2) 특이적인 분포 양상을 확인하였다. 추가적으로 상기 컨쥬게이트를 세포에 세포 독성 효과가 없는 농도로 처리하고 레이저를 조사한 후 정상세포 또는 암세포에서 세포 생존율의 변화를 분석하였다.
- [0218] 정상세포인 NIH-3T3과 상피세포 증식 인자 수용체를 발현하는 암세포인 A2780, SKOV3를 배양한 후 항체 기반 광감각제 조성물과 비교군인 말레이미드-폴리에틸렌글리콜 2k-클로린 e6(Ma1-PEG 2k-Ce6)를 4시간 동안 처리하고, 레이저를 2J/cm² 세기로 조사한 후 다시 배양기에서 하루 동안 배양하였다.
- [0219] 배양이 끝난 세포에 MTT 시약을 처리하여 3시간 동안 배양시킨 후 배양액과 MTT 시약 등을 모두 제거하고, 디메틸설폭사이드를 가하여 세포에 형성된 포르마잔을 용해시켰다. 그 후 570 nm에서 흡광도를 측정하고, 형성된

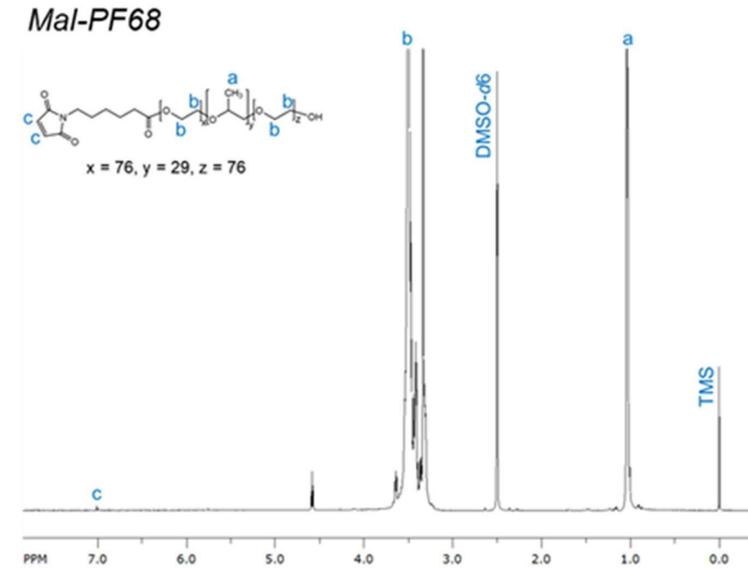
포르마잔 양을 비교하여 각 세포의 생존을 및 항체 기반 광감각제 조성물의 세포 독성을 분석하였다.

[0220]

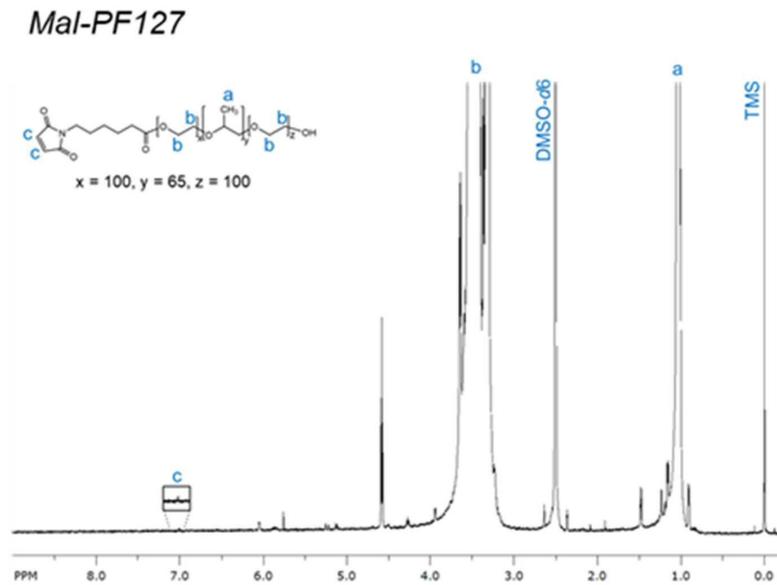
그 결과, 정상세포인 NIH-3T3에서는 세톡시말을 도입하기 전과 후에서 광독성이 나타나지 않는 반면(도 29의 A), 암세포에서는 HER2 발현량, 세톡시말 처리 및 레이저 조사에 따라 광독성이 증가하는 것을 확인하였으며, 이러한 광독성은 HER2 발현량에 비례하였다 (도 29의 B 및 C).

도면

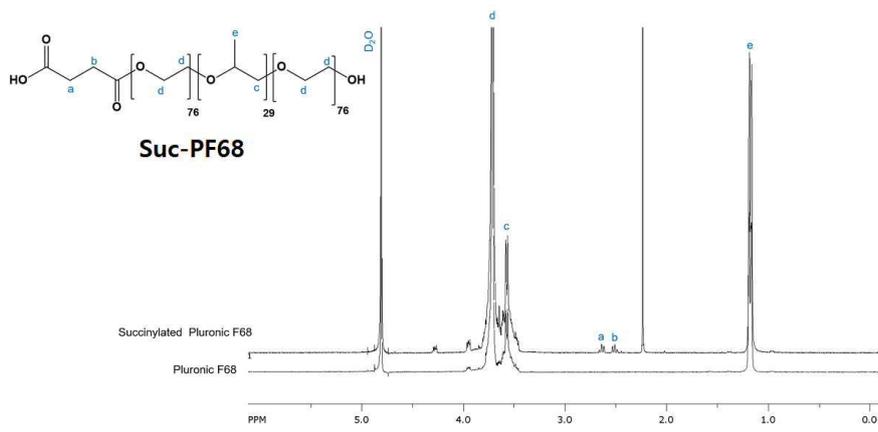
도면1



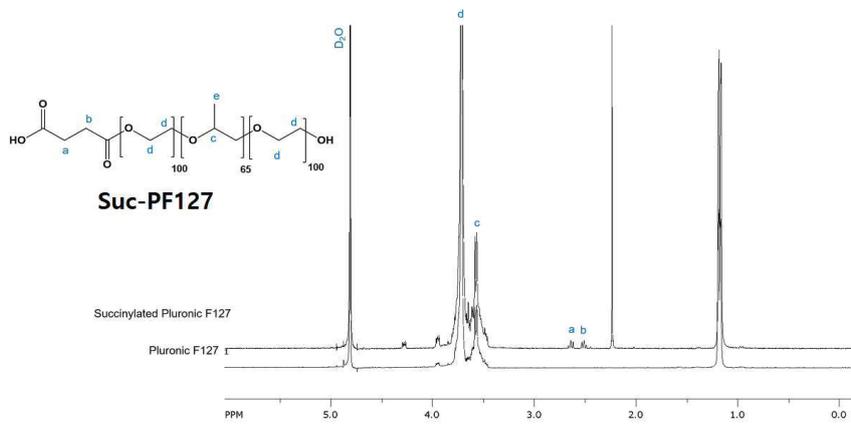
도면2



도면3

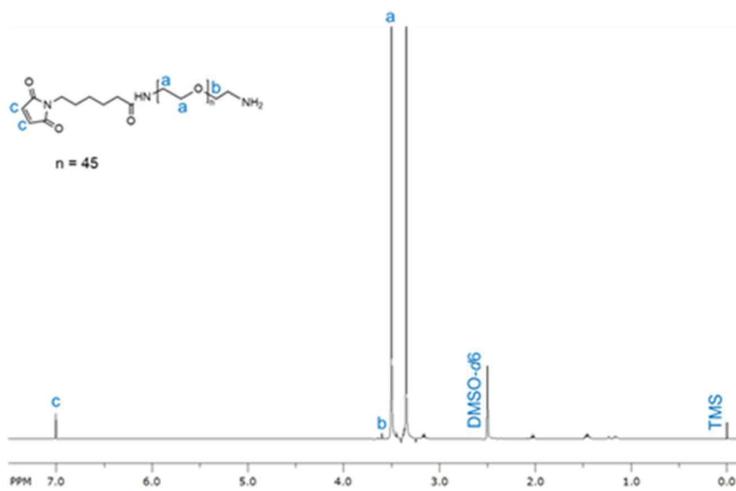


도면4



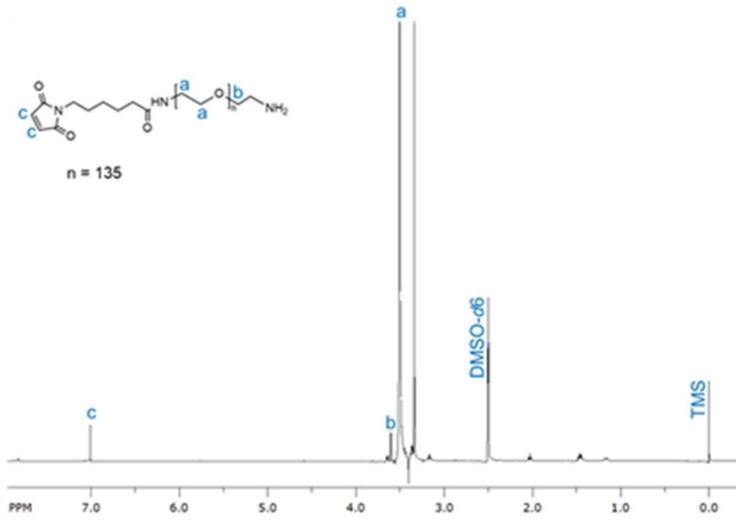
도면5

Mal-PEG2k



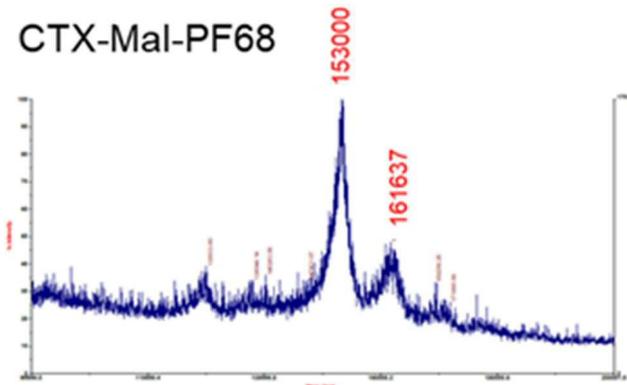
도면6

Mal-PEG6k



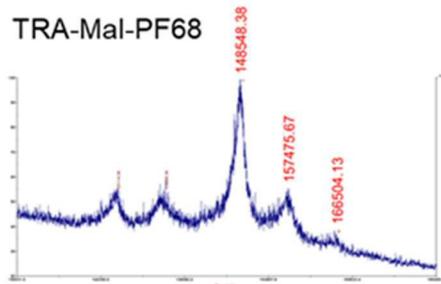
도면7

CTX-Mal-PF68

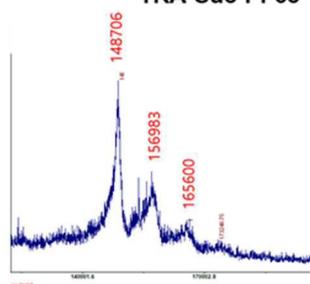


도면8

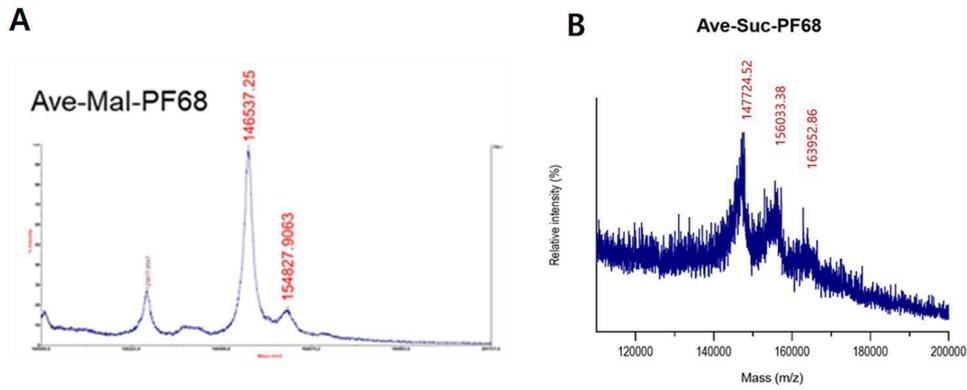
A
TRA-Mal-PF68



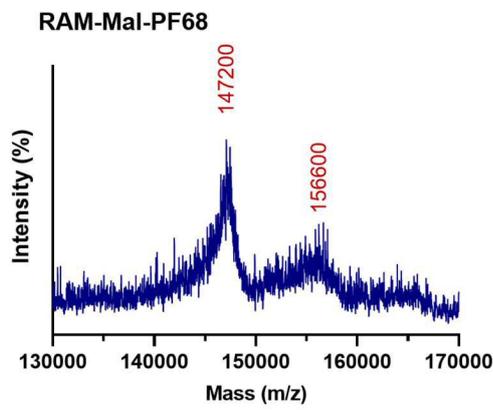
B
TRA-Suc-PF68



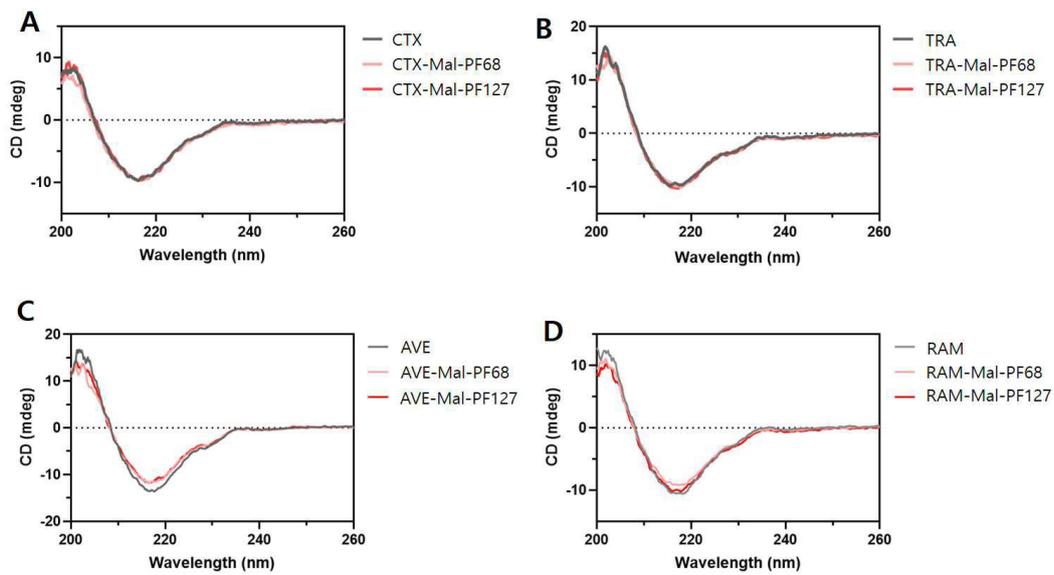
도면9



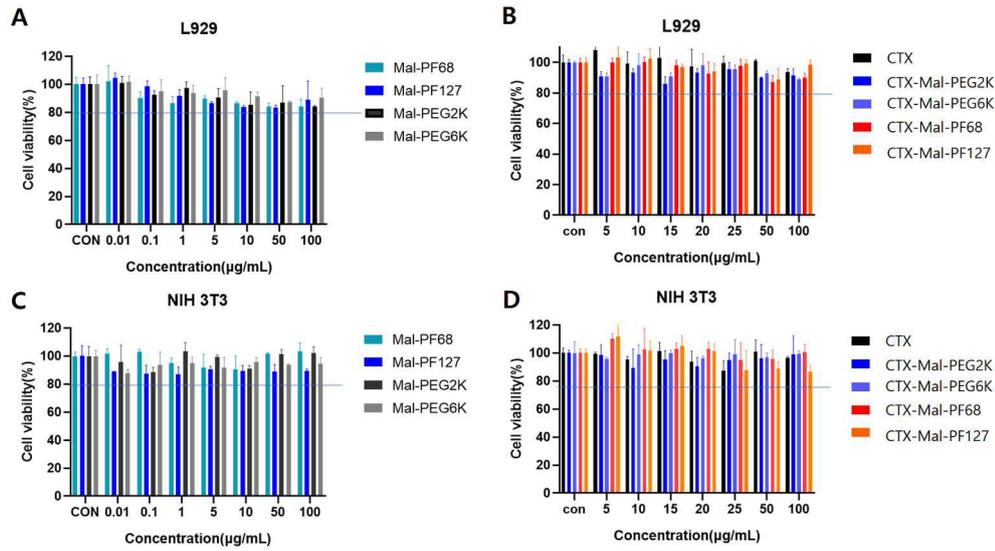
도면10



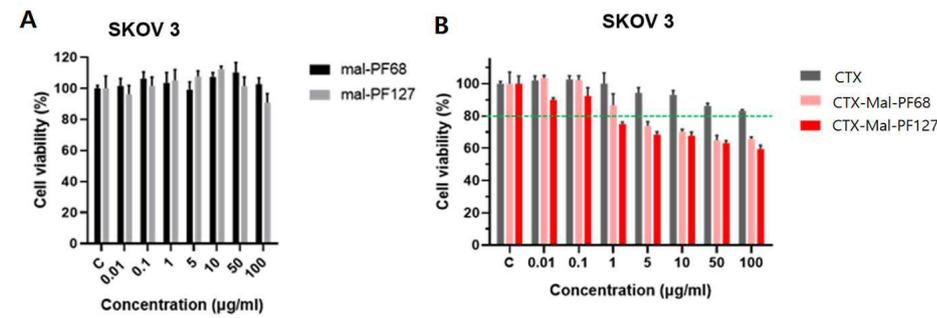
도면11



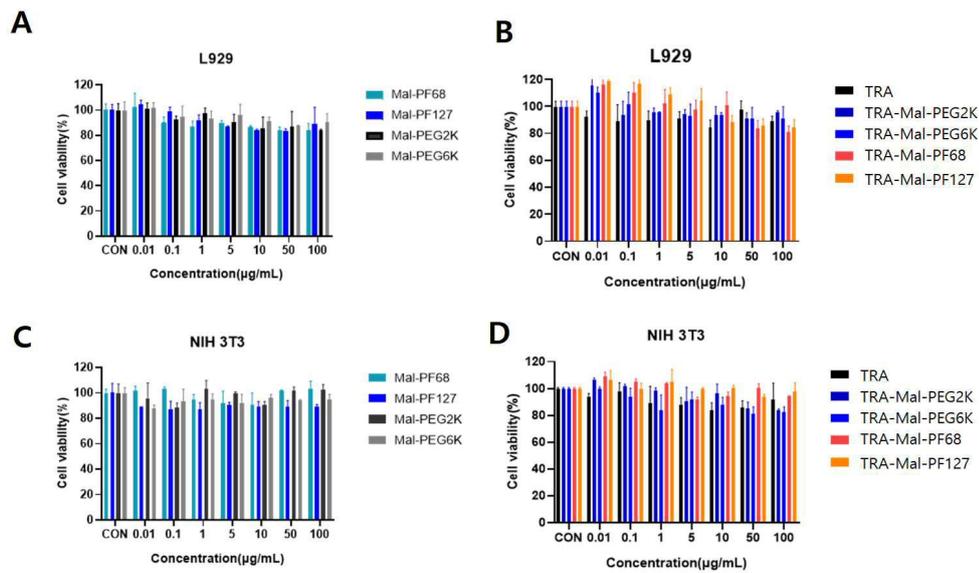
도면12



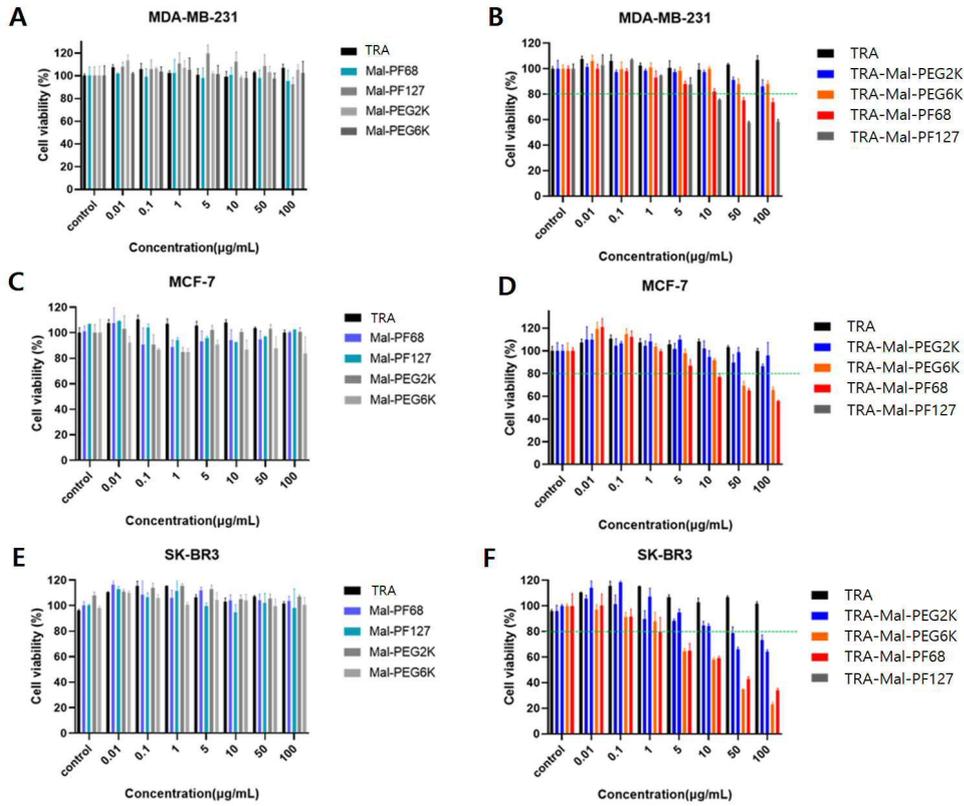
도면13



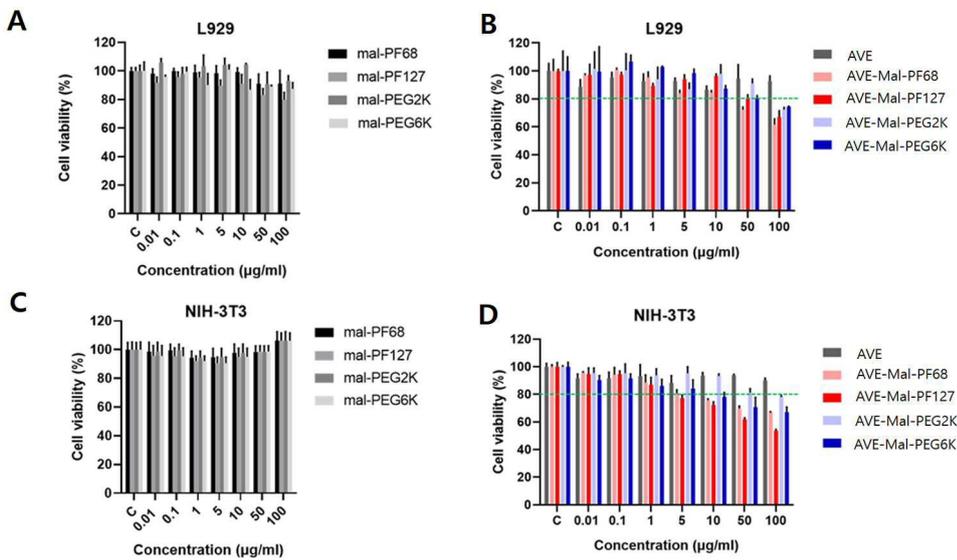
도면14



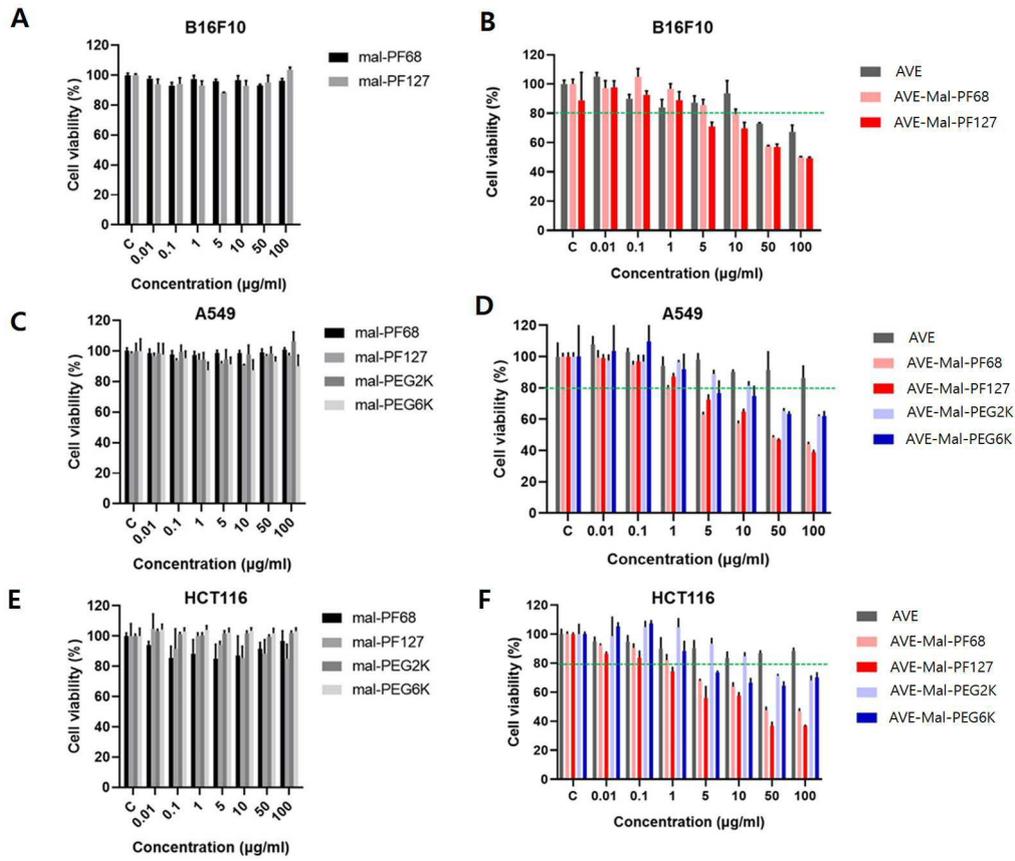
도면15



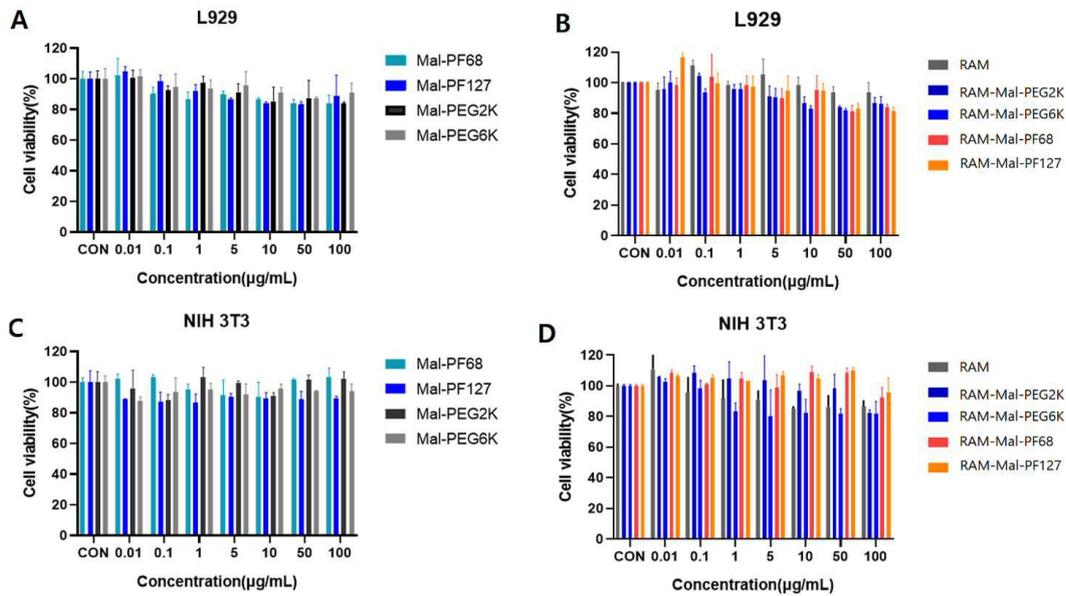
도면16



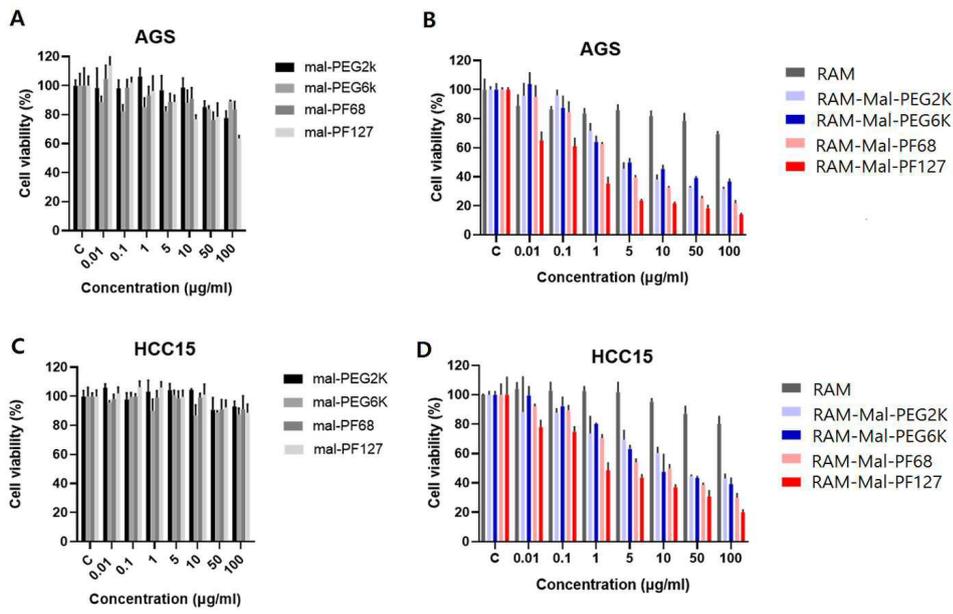
도면17



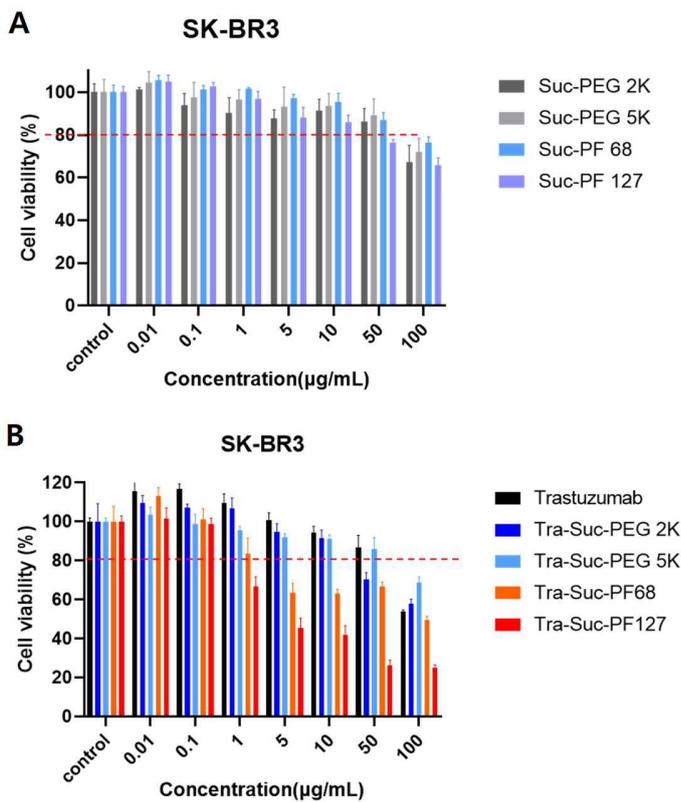
도면18



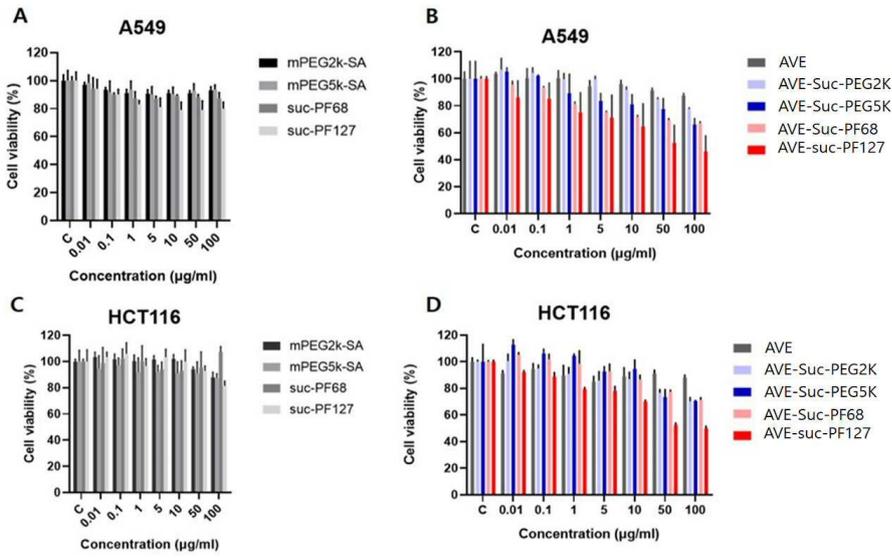
도면19



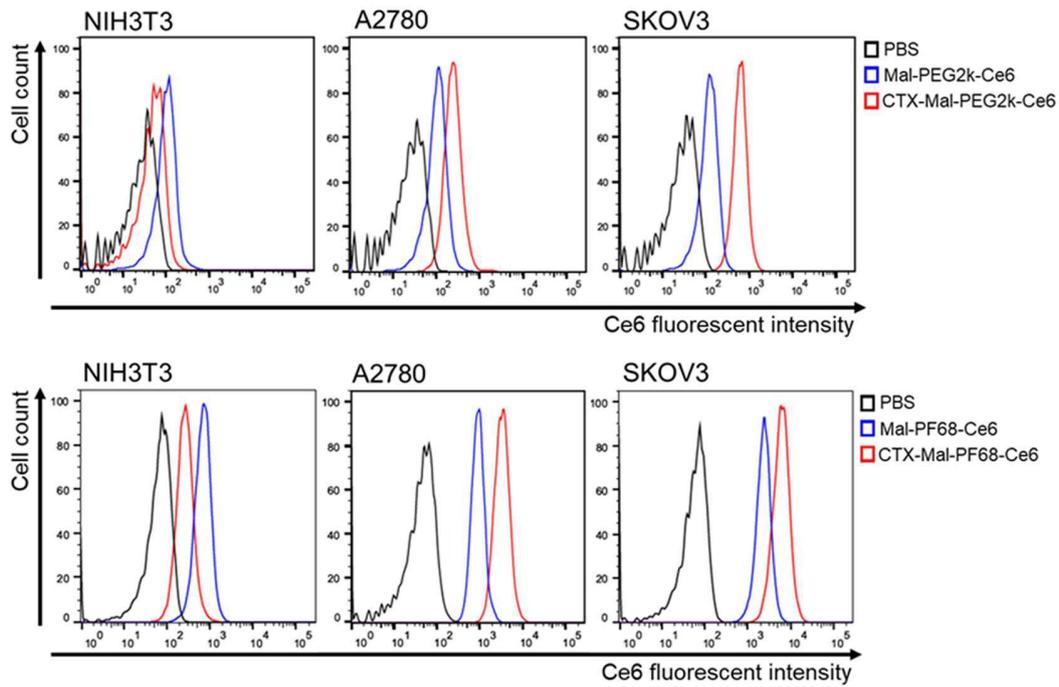
도면20



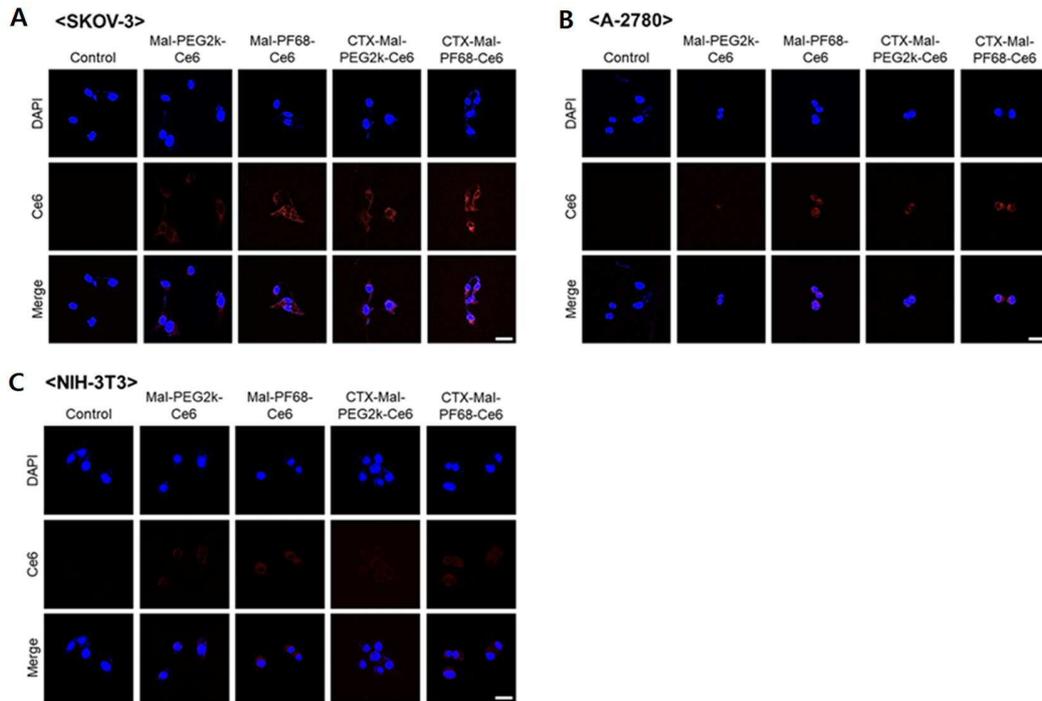
도면21



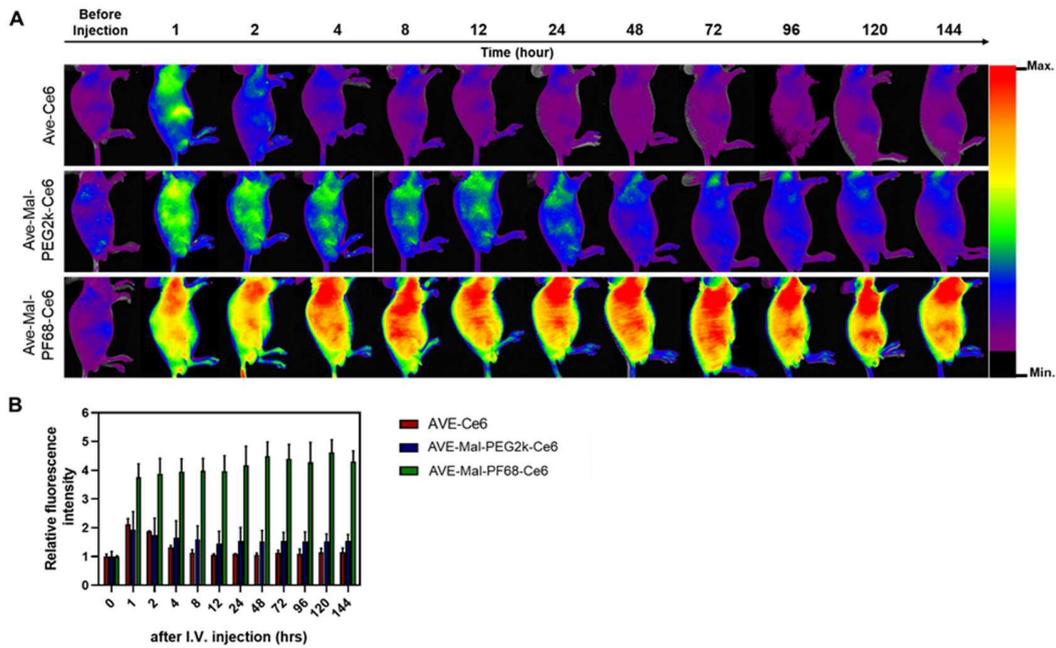
도면22



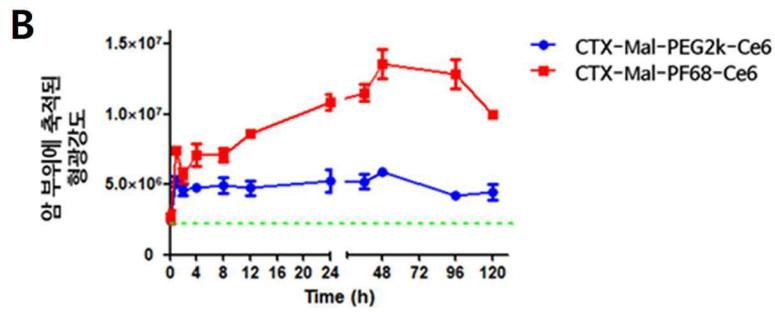
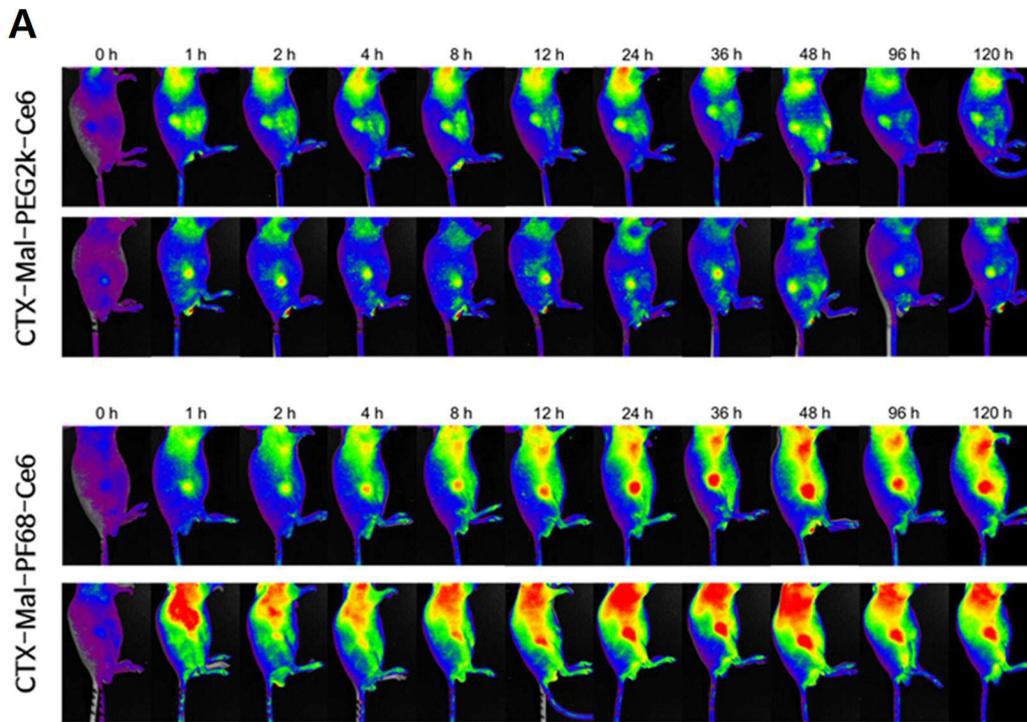
도면23



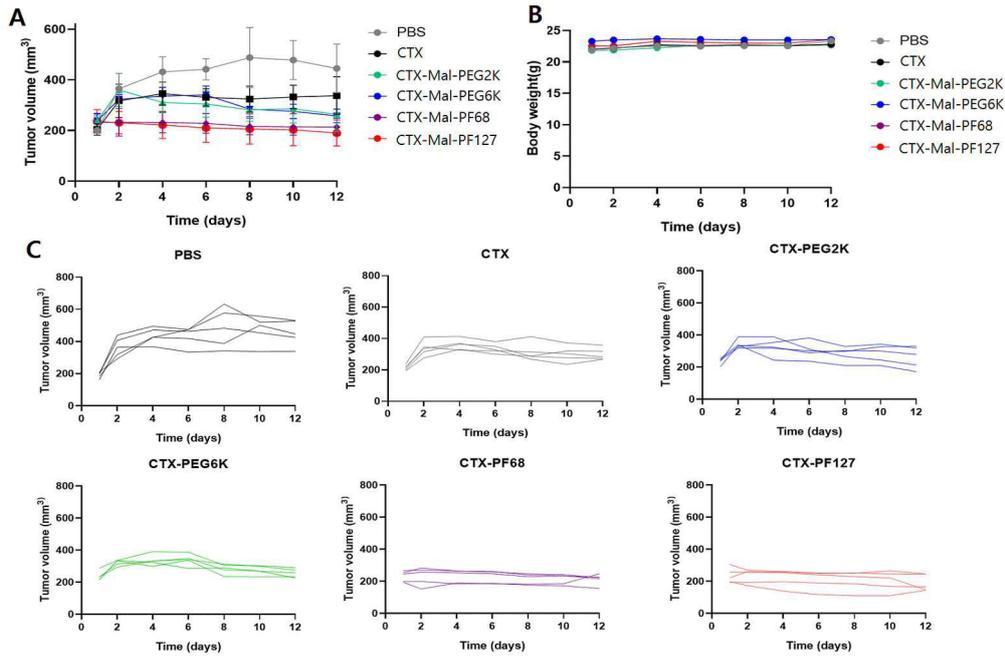
도면24



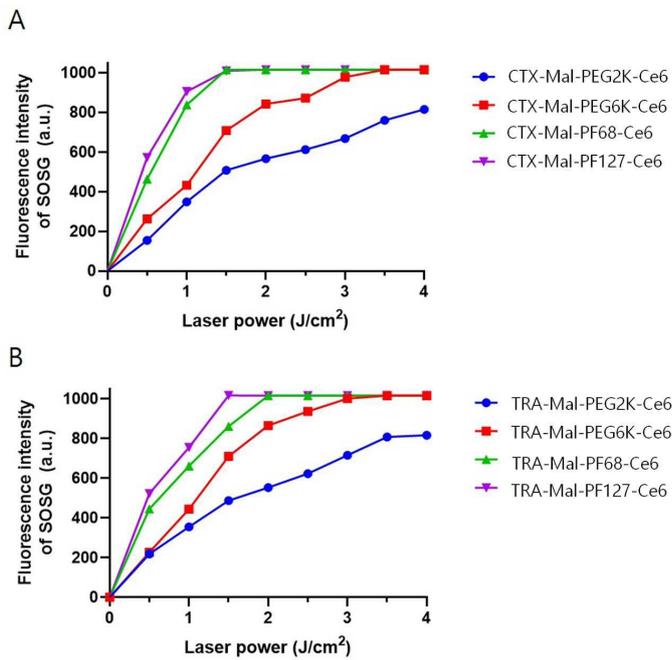
도면25



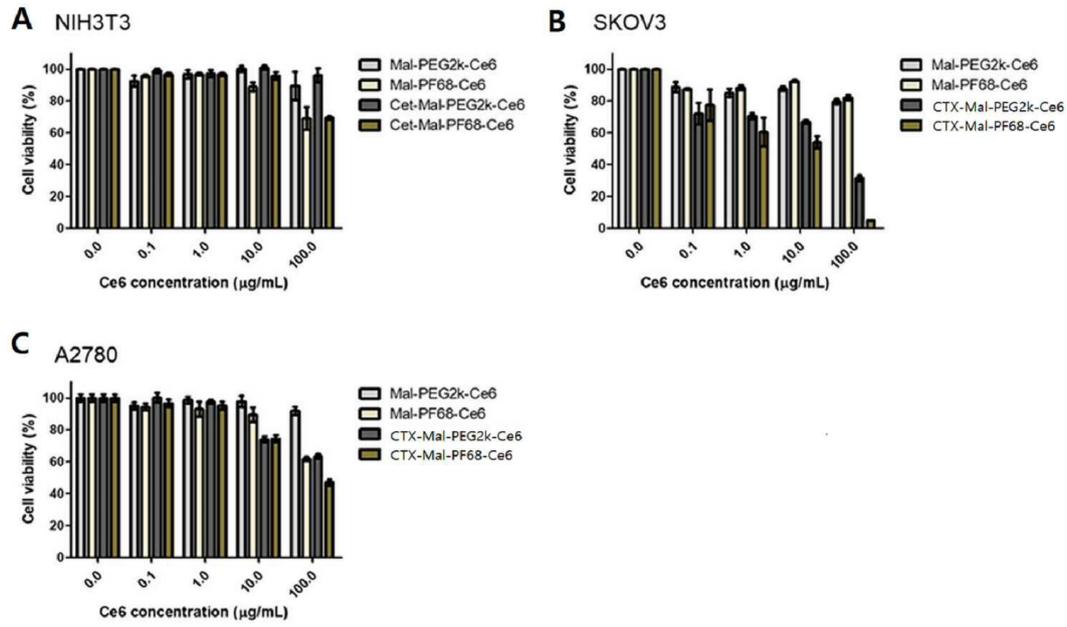
도면26



도면27



도면28



도면29

