(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0104828
(43) 공개일자 2021년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 47/61* (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 47/61 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2021-7022461
(22) 출원일자(국제) 2019년12월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년07월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/067228
(87) 국제공개번호 WO 2020/132100
국제공개일자 2020년06월25일
(30) 우선권주장
62/782,193 2018년12월19일 미국(US)
62/932,347 2019년11월07일 미국(US)

(71) 출원인
더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 쥬니어 유니버시티
미국 캘리포니아 94305-2038 스탠포드 피오박스 20386 메인 쿼드 오피스 오브 더 제너럴 카운셀 빌딩170 3층
(72) 발명자
베르토찌 캐롤린
미국 캘리포니아 94305-4401 스탠포드 로스 웨이 380 엠씨: 5080 스탠포드 디파트먼트 오브 케미스트
바니크 스티븐
미국 캘리포니아 94063 레드우드 시티 브로드웨이 스트리트 415 2층 엠씨8854
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

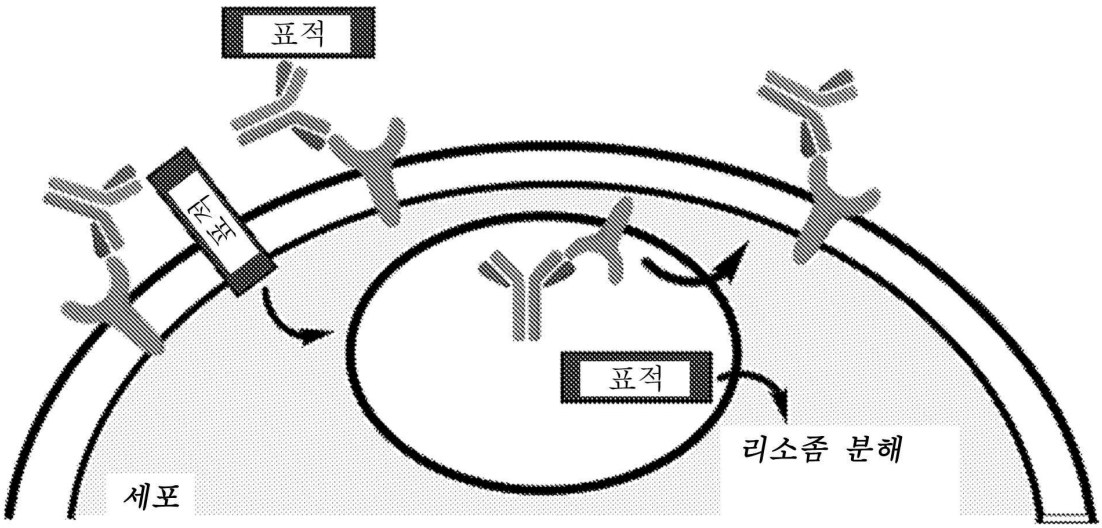
전체 청구항 수 : 총 120 항

(54) 발명의 명칭 **리소좀 표적화를 위한 이작용성 분자 및 관련된 조성물 및 방법**

(57) 요 약

세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티 및 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자가 제공된다. 이작용성 분자는 엔도솜/리소좀 경로를 통해 예를 들어 세포 표면 및 세포외 분자(예를 들어, 단백질)의 표적화된 분해에 사용된다. 이작용성 분자를 포함하는 조성물 및 키트, 및 이작용성 분자를 사용하는 방법이 또한 제공된다. 이작용성 분자를 제조하는 방법이 또한 제공된다.

대 표 도 - 도19



(52) CPC특허분류
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
A61K 47/6873 (2017.08)
A61K 47/6897 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 16/2881 (2013.01)
(72) 발명자
페드람 카이본
미국 캘리포니아 94063 레드우드 시티 브로드웨이 스트리트 415 2층 엠씨8854
안 그린
미국 캘리포니아 94305 스탠포드 캠퍼스 드라이브 333 스탠포드 디파트먼트 오브 케미스트리

명 세 서

청구범위

청구항 1

이작용성 분자로서,

세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티; 및

리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시키는, 이작용성 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 모이어티는 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포 표면 분자는 세포 표면 수용체인, 이작용성 분자.

청구항 5

제4항에 있어서, 세포 표면 수용체는 성장 인자 수용체인, 이작용성 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 표면 분자는 암 세포에 존재하는, 이작용성 분자.

청구항 7

제6항에 있어서, 세포 표면 분자는 종양 연관된 항원 또는 종양 특이적 항원인, 이작용성 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 표면 분자는 면역 세포에 존재하는, 이작용성 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 면역 세포는 자연 살해(NK: natural killer) 세포, 대식세포, 단핵구, 중성구, 수지상 세포, T 세포, B 세포, 비만 세포, 호염기구 및 호산구로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 10

제8항에 있어서, 세포 표면 분자는 억제 면역 수용체인, 이작용성 분자.

청구항 11

제10항에 있어서, 세포 표면 분자는 억제 면역 수용체의 리간드인, 이작용성 분자.

청구항 12

제8항에 있어서, 세포 표면 분자는 면역 관문 분자인, 이작용성 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 면역 관문 분자는 PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, TIGIT 및 B7 패밀리의 구성원으로 이루

어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 14

제1항에 있어서, 제1 모이어티는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, 세포외 분자는 세포 표면 수용체에 대한 리간드인, 이작용성 분자.

청구항 16

제15항에 있어서, 세포외 분자는 성장 인자인, 이작용성 분자.

청구항 17

제15항에 있어서, 세포외 분자는 사이토카인 또는 케모카인인, 이작용성 분자.

청구항 18

제14항에 있어서, 세포외 분자는 항체인, 이작용성 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 항체는 자가항체인, 이작용성 분자.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 항체는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드, 리간드, 압타머, 나노입자 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 22

제21항에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드인, 이작용성 분자.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 모이어티는 항체인, 이작용성 분자.

청구항 24

제23항에 있어서, 항체는 IgG, 단쇄 Fv(scFv), Fab, $(Fab)_2$, $(scFv')_2$ 또는 나노바디인, 이작용성 분자.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 폴리펩타이드, 리간드, 압타머, 나노입자 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR: mannose-6-phosphate receptor)인, 이작용성 분자.

청구항 27

제26항에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 28

제27항에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P: mannose-6-phosphate)를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 30

제29항에 있어서, 하나 이상의 M6P 유사체는 하나 이상의 만노스-6-포스포네이트(M6Pn: mannose-6-phosphonate)를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 31

제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 1개 내지 500개의 M6PR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 32

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드를 나타내는 중합체 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 33

제32항에 있어서, 중합체 스캐폴드는 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함하는 글리코폴리머인, 이작용성 분자.

청구항 34

제33항에 있어서, 글리코폴리머는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 당단백질인, 이작용성 분자.

청구항 35

제34항에 있어서, 당단백질은 N-카복시언하이드라이드(NCA: N-carboxyanhydride) 유래 당단백질인, 이작용성 분자.

청구항 36

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 간 세포의 표면에서 발현되는, 이작용성 분자.

청구항 37

제36항에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 간세포의 표면에서 발현되는, 이작용성 분자.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 간세포 암종(HCC: hepatocellular carcinoma) 세포, 섬유증 간 세포 또는 둘 다의 표면에서 발현되는, 이작용성 분자.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 아시알로당단백질 수용체(ASGPR: asialoglycoprotein receptor)인, 이작용성 분자.

청구항 40

제39항에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 41

제40항에 있어서, 하나 이상의 ASGPR 리간드는 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc: N-

acetylgalactosamine)을 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 하나 이상의 ASGPR 리간드는 하나 이상의 갈락토스를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 ASGPR 리간드는 하나 이상의 글루코스를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 44

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 1개 내지 500개의 ASGPR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 45

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함하는 중합체를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 46

제45항에 있어서, 제2 모이어티는 폴리(GalNAc-코-Ala)를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 47

제41항에 있어서, 제2 모이어티는 1가, 2가 또는 3가 GalNAc 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 48

제47항에 있어서, 제2 모이어티는 3가 GalNAc 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 49

제42항에 있어서, 제2 모이어티는 1가, 2가 또는 3가 갈락토스 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 50

제49항에 있어서, 제2 모이어티는 3가 갈락토스 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 51

제36항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모이어티는 간세포에 발현된 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

청구항 52

제51항에 있어서, 세포 표면 분자는 성장 인자 수용체인, 이작용성 분자.

청구항 53

제52항에 있어서, 성장 인자 수용체는 표피 성장 인자 수용체(EGFR: epidermal growth factor receptor), C-Met, 인슐린양 성장 인자 1 수용체(IGF1R: insulin like growth factor 1 receptor), 섬유아세포 성장 인자 수용체 4(FGFR4: fibroblast growth factor receptor 4) 및 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR: platelet-derived growth factor receptor)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드이고, 제2 모이어티는 폴리펩타이드이

고, 이작용성 분자는 제2 모이어티에 융합된 제1 모이어티를 포함하는 융합 단백질인, 이작용성 분자.

청구항 55

제54항에 있어서, 제1 모이어티는 제2 모이어티에 직접 융합된, 이작용성 분자.

청구항 56

제54항에 있어서, 제1 모이어티와 제2 모이어티 사이에 스페이서 도메인을 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 이작용성 분자는

세포 표면 분자 또는 세포외 분자; 및

리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체인, 이작용성 분자.

청구항 58

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 이작용성 분자는 제2 모이어티에 접합된 제1 모이어티를 포함하는 접합체인, 이작용성 분자.

청구항 59

제58항에 있어서, 제1 모이어티는 항체인, 이작용성 분자.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 제2 모이어티를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 61

제58항 또는 제59항에 있어서, 제40항 내지 제50항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 제2 모이어티를 포함하는, 이작용성 분자.

청구항 62

제54항 내지 제57항 중 어느 한 항의 이작용성 분자를 암호화하는 핵산.

청구항 63

제62항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 64

제62항의 핵산 또는 제63항의 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 65

제64항의 세포를 제조하는 방법으로서, 제62항의 핵산 또는 제63항의 발현 벡터를 세포로 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 66

제58항 또는 제59항의 이작용성 분자를 제조하는 방법으로서, 제1 모이어티를 제2 모이어티에 접합하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 접합하는 단계는 제1 모이어티를 제2 모이어티에 부위 특이적으로 접합하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드를 포함하고, 접합하는 단계는 제2 모이어티를 제1 모이어티의 미리 선택된 아미노산에 부위 특이적으로 접합하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 미리 결정된 아미노산은 제1 모이어티의 N 말단 또는 C 말단에 있는, 방법.

청구항 70

제68항에 있어서, 미리 결정된 아미노산은 제1 모이어티의 내부에 있는, 방법.

청구항 71

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 미리 결정된 아미노산은 비천연 아미노산인, 방법.

청구항 72

제66항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모이어티는 항체인, 방법.

청구항 73

제66항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 방법.

청구항 74

제66항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 제40항 내지 제50항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 방법.

청구항 75

제66항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 접합하는 단계는 알킨-아지드 고리화첨가에 의한, 방법.

청구항 76

세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하는 방법으로서,

리소좀 표적화 분자가 분해를 위해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 리소좀에 실어나르는 조건 하에 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 이작용성 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시키는, 방법.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 상기 방법은 시험관내 수행되는, 방법.

청구항 79

제76항 또는 제77항에 있어서, 상기 방법은 생체외 수행되는, 방법.

청구항 80

약제학적 조성물로서,

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 이작용성 분자; 및

약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 조성물은 비경구 투여를 위해 제형화된, 방법.

청구항 82

제80항 또는 제81항의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 83

제80항 또는 제81항의 약제학적 조성물의 유효량을 암을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 제1 모이어티는 암 세포 상의 세포 표면 분자, 암 세포 상의 세포 표면 분자에 대한 리간드, 면역 세포 상의 세포 표면 분자, 면역 세포 상의 세포 표면 분자에 대한 리간드, 억제 면역 수용체 및 억제 면역 수용체의 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, 개체는 간세포 암종(HCC)을 갖고, 제1 모이어티는 개체의 HCC 세포 상의 세포 표면 분자에 결합하고, 제2 모이어티는 ASGPR에 결합하는, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 제1 모이어티는 개체의 HCC 세포 상의 성장 인자에 결합하는, 방법.

청구항 87

제90항에 있어서, 제1 모이어티는 EGFR, C-Met, IGF1R 및 FGFR4로 이루어진 군으로부터 선택되는 성장 인자에 결합하는, 방법.

청구항 88

제85항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 제36항 내지 제50항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 방법.

청구항 89

제80항 또는 제81항의 약제학적 조성물을 ADCC를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 항체 의존적 세포 독성(ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity)을 향상시키는 방법.

청구항 90

제80항 또는 제81항의 약제학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암의 면역원성을 향상시키는 방법.

청구항 91

제89항 또는 제90항에 있어서, 제1 모이어티는 억제 면역 수용체 및 억제 면역 수용체의 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 92

제82항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 투여하는 단계는 비경구 투여에 의한, 방법.

청구항 93

제82항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시키는, 방법.

청구항 94

키트로서,

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 이작용성 분자; 및

제1 모이어티가 특이적으로 결합하는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 지침을 포함하는, 키트.

청구항 95

제94항에 있어서, 지침은 시험관내 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 것인, 키트.

청구항 96

제94항에 있어서, 지침은 생체내 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 것인, 키트.

청구항 97

키트로서,

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 이작용성 분자 또는 제80항 또는 제81항의 약제학적 조성물; 및

이작용성 분자 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 지침을 포함하는, 키트.

청구항 98

제97항에 있어서, 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은 1개 이상의 단위 투여량으로 존재하는, 키트.

청구항 99

제97항에 있어서, 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은 2개 이상의 단위 투여량으로 존재하는, 키트.

청구항 100

글리코폴리머로서,

중합체 스캐폴드; 및

중합체 스캐폴드에 부착된 하나 이상의 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR) 리간드를 포함하는, 글리코폴리머.

청구항 101

제100항에 있어서, 글리코폴리머는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 당단백질인, 글리코폴리머.

청구항 102

제101항에 있어서, 당단백질은 N-카복시언하이드라이드(NCA) 유래 당단백질인, 글리코폴리머.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함하는, 글리코폴리머.

청구항 104

제100항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체를 포함하는, 글리코폴리머.

청구항 105

제104항에 있어서, 하나 이상의 M6P 유사체는 하나 이상의 만노스-6-포스포네이트(M6Pn)를 포함하는, 글리코폴리머.

청구항 106

제100항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 스캐폴드는 1개 내지 500개의 M6PR 리간드를 포함하는, 글리코폴리머.

청구항 107

제100항 내지 제106항 중 어느 한 항의 글리코폴리머를 제조하는 방법으로서,

하나 이상의 M6PR 리간드를 중합체 스캐폴드에 부착하는 단계; 또는

하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 단량체로부터 중합체 스캐폴드를 합성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 스캐폴드는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 단량체로부터 중합되고, 합성하는 단계는 고상 합성에 의한, 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 글리코폴리머는 당단백질 중합체이고, 합성하는 단계는 고상 펩타이드 합성에 의한, 방법.

청구항 110

키트로서,

제100항 내지 제106항 중 어느 한 항의 글리코폴리머; 및

글리코폴리머를 관심 분자에 접합하기 위한 지침을 포함하는, 키트.

청구항 111

제110항에 있어서, 글리코폴리머를 관심 분자에 접합하기 위한 시약을 추가로 포함하는, 키트.

청구항 112

제110항 또는 제111항에 있어서, 관심 분자는 폴리펩타이드인, 키트.

청구항 113

제112항에 있어서, 폴리펩타이드는 항체인, 키트.

청구항 114

제110항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 분자는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는, 키트.

청구항 115

하나 이상의 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR) 리간드로 작용기화된 단량체.

청구항 116

제115항에 있어서, 단량체는 아미노산인, 단량체.

청구항 117

제115항에 있어서, 단량체는 비천연 아미노산인, 단량체.

청구항 118

제115항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함하는, 단량체.

청구항 119

제115항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체를 포함하는, 단량체.

청구항 120

제119항에 있어서, 하나 이상의 M6P 유사체는 하나 이상의 만노스-6-포스포네이트(M6Pn)를 포함하는, 단량체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2018년 12월 19일자 출원된 미국 임시 출원 제62/782,193호 및 2019년 11월 7일자 출원된 미국 임시 출원 제62/932,347호의 우선권의 이익을 주장하며, 이들은 그 전문이 본원에 인용되어 포함된다.

[0003] 정부 지원의 성명

[0004] 본 발명은 미국 국립 보건원(National Institutes of Health)이 수여한 계약 CA227942, GM059907 및 GM123636 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 가진다.

발명의 내용

[0005] 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티 및 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자가 제공된다. 이작용성 분자는 엔도솜/리소좀 경로를 통해 예를 들어 세포 표면 및 세포외 분자(예를 들어, 단백질)의 표적화된 분해에 사용된다. 이작용성 분자를 포함하는 조성물 및 키트, 및 이작용성 분자를 사용하는 방법이 또한 제공된다. 이작용성 분자를 제조하는 방법이 또한 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0006] **도 1** 본 개시내용의 일 실시형태에 따른 이작용성 분자 및 이의 용도의 도식적 예시.

도 2 일 실시형태에 따른 만노스-6-포스페이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 반응식. 이 경로는 예를 들어 N-카복시언하이드라이드 중합에서 단량체로서 사용하기 위한 세린 잔기에 연결된 만노스-6-포스페이트 글리칸에 대한 접근을 허용한다.

도 3 일 실시형태에 따른 만노스-6-포스포네이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 반응식. 이 경로는 예를 들어 N-카복시언하이드라이드 중합에서 단량체로서 사용하기 위한 세린 잔기에 연결된 만노스-6-포스포네이트 글리칸에 대한 접근을 허용한다. 포스포네이트기는 포스페이트기의 가수분해적으로 안정한 변형이고, 이것은 만노스-6-포스페이트 글리칸과 비교하여 더 양호한 혈청 안정성을 이전에 나타냈다.

도 4 일 실시형태에 따른 만노스-6-카복실레이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 반응식. 이 경로는 예를 들어 N-카복시언하이드라이드 중합에서 단량체로서 사용하기 위한 세린 잔기에 연결된 만노스-6-카복실레이트 글리칸에 대한 접근을 허용한다. 카복실레이트기는 포스페이트기의 가수분해적으로 안정한 변형이고, 이것은 만노스-6-포스페이트 글리칸과 비교하여 더 양호한 혈청 안정성을 이전에 나타냈다. 만노스-6-카복실레이트 글리칸은 만노스-6-포스페이트 글리칸과 비교하여 양이온 독립적 M6PR(CIM6PR)에 대해 0.3의 상대 결합 친화도를 이전에 나타냈다. 수용체-리간드 상호작용을 화학적으로 조율하는 능력은 오프 타깃 결합 사건을 줄이기 위해 생물학적 분야에서 더 높은 제어를 허용한다.

도 5 일 실시형태에 따른 만노스-6-아크릴레이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 반응식. 이 경로는 예를 들어 N-카복시언하이드라이드 중합에서 단량체로서 사용하기 위한 세린 잔기에 연결된 만노스-6-아크릴레이트 글리칸에 대한 접근을 허용한다. 아크릴레이트기는 포스페이트기의 가수분해적으로 안정한 변형이고, 이것은 만노스-6-포스페이트 글리칸과 비교하여 더 양호한 혈청 안정성을 이전에 나타냈다. 만노스-6-아크릴레이트 글리칸은 만노스-6-포스페이트 글리칸과 비교하여 CIM6PR에 대해 0.7의 상대 결합 친화도를 이전에 나타냈다. 수용체-리간드 상호작용을 화학적으로 조율하는 능력은 오프 타깃 결합 사건을 줄이기 위해 생물학적 분야에서

더 높은 제어를 허용한다.

도 6 일 실시형태에 따른 글루코스-6-포스포네이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 반응식. 이 경로는 예를 들어 N-카복시언하이드라이드 중합에서 단량체로서 사용하기 위한 세린 잔기에 연결된 글루코스-6-포스포네이트 글리칸에 대한 접근을 허용한다. 글루코스-6-포스포네이트 잔기는 만노스 함유 글리칸과 비교하여 CIM6PR에 대한 유의미하게 더 약한 결합 친화도를 갖는다.

도 7 일 실시형태에 따른 만노스-6-포스포네이트 이소티오시아네이트를 합성하기 위한 반응식. 이 경로는 예를 들어 단백질에서 리신 잔기에 직접 접합될 수 있는 만노스-6-포스포네이트 이소티오시아네이트(M6Pn-ITC)에 대한 접근을 허용한다. 주어진 단백질 내의 다수의 아미노산(예를 들어, 리신)에 대한 다수의 M6Pn-ITC의 접합은 M6Pn 글리칸의 다가 제시를 허용한다.

도 8 일 실시형태에 따른 M6P 리간드를 나타내기 위한 스캐폴드를 합성하기 위한 일반적인 NCA 중합 체계의 예시. 다른 아미노산 유래 NCA를 갖는 공중합체는 유사하게 용이하게 합성되고, 다수의 M6P 리간드 잔기를 보유하는 변하는 구조 및 조성을 갖는 많은 중합체에 대한 접근을 제공한다. 이들 물질은 후속하여 완전 폴리펩타이드/글리칸 구조를 제공하도록 탈보호된다.

도 9 일 실시형태에 따른 만노스-6-포스포네이트 펩타이드 올리고머의 고상 펩타이드 합성에 대한 반응식. 도시된 것처럼, M6P 리간드를 나타내기 위한 스캐폴드는 M6P, M6Pn 등 아미노산으로부터 시작하여 고상 펩타이드 합성을 이용하여 또한 합성될 수 있다. 이 합성 경로는 NCA 중합 경로와 비교하여 폴리펩타이드 길이 및 조성에 비해 더 우수한 제어를 허용하고, NCA 중합 유래 물질과 비교하여 특수 합성 조건을 요하지 않는다.

도 10 비오틴 캡으로 작용기화된 M6Pn 중합체가 분해를 위해 세포외 공간으로부터 리소좀으로의 세포외 NeutrAvidin-647(NA647 - 비오틴이 강하게 결합하는 단백질)의 이동을 매개할 수 있다는 것을 입증하는 실험의 도식적 예시(상부) 및 형광 영상화 결과(하부). 단백질 및 리소좀 염색 염료의 동시국재화가 관찰된다.

도 11 몇몇 세포주가 M6Pn 중합체 의존적 방식으로 NA647의 흡수를 나타낸다는 것을 입증하는 데이터. 이 결과의 관점에서, M6PR(예를 들어, CIM6PR)을 보유하는 임의의 세포주가 이 방법에 의해 단백질을 리소좀에 실어나르는 것을 허용할 것이고, 본 연구에서 시험된 세포주로 제한되지 않는 것으로 기대된다.

도 12 자연적 겔 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)이 M6P 중합체에 의해 단백질(항체 포함)의 작용기화를 모니터링하기 위해 사용될 수 있다는 것을 입증하는 데이터. 이 예에서, 작용기화는 반응성 알킨(예를 들어, 바이사이클로[6.1.0]노닌, BCN)이 끼어든 단백질을 처음에 표지한 후, 아지드 함유 중합체(바이오-오소고날 구리 비함유 균주 촉진된 클릭 반응)와 항온처리하여 수행되었다.

도 13 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 이의 결합 파트너를 리소좀에 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 도식적 예시(상부) 및 형광 영상화 데이터(하부). 이 예에서, 마우스 IgG-488을 단백질 및 리소좀 염색 염료 둘 다의 동시국재화(병합)로 폴리(M6Pn) 태그를 보유하는 항-마우스 IgG 항체와 항온처리하였다.

도 14 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 이의 결합 파트너를 세포내 구획에 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 도식적 예시(상부) 및 데이터(하부). 이 예에서, 재조합 인간 apoE4를 마우스 유래 항-인간 apoE4 항체, 항-마우스 IgG 항체 또는 폴리(M6Pn) 태그를 보유하는 항-마우스 항체와 항온처리하였다. M6Pn 함유 이차 항체로 유의미하게 더 많은 흡수가 관찰된다.

도 15 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 분해를 위해 이의 결합 파트너를 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 데이터. 이 예에서, 세포를 M6Pn 태그를 보유하는 세툭시맙과 항온처리하여 EGFR 분해를 평가하였다. 총 EGFR의 소실은 세툭시맙 또는 모의 중합체(GalNAc)를 보유하는 세툭시맙과 비교하여 시험된 모든 세포주에 관찰된다. EGF는 EGFR 분해에 대한 양성 대조군이다. 레인 1: 대조군. 레인 2: EGF (100 ng/mL, 1시간, + 대조군). 레인 3: 세툭시맙. 레인 4: 세툭시맙-GalNAc 접합체. 레인 5: 세툭시맙-M6P 접합체(긴). 레인 6: 세툭시맙-M6P 접합체(짧은). 대조군의 퍼센트는 농도계측에 의해 결정되었다.

도 16 폴리(M6Pn) 표지된 항체 단편이 이의 결합 파트너를 리소좀에 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 데이터. 이 예에서, 세포를 M6Pn 태그를 보유하는 세툭시맙 유래 Fab 부분과 항온처리하여 EGFR 분해를 평가하였다. 총 EGFR의 소실은 세툭시맙 Fab 단독 또는 모의 중합체(GalNAc)를 보유하는 세툭시맙 Fab와 비교하여 관찰된다.

도 17 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 분해를 위해 이의 결합 파트너를 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 데이터. 이 예에서, 세포를 CD71에 대한 일차 마우스 유래 항체, 항-마우스 IgG 항체 또는 폴리(M6Pn) 태그를 보유하는 항-마우스 항체와 항온처리하여 CD71(트랜스페린 수용체)의 분해를 평가하였다. M6P 태그를 함유하는 시스템은

유의미하게 분해를 더 생성시킨다.

도 18 폴리(M6Pn) 표지된 항체 단편이 분해를 위해 이의 결합 파트너를 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 데이터. 이 예에서, 세포를 항-PDL1 항체 또는 M6P 태그를 보유하는 항-PDL1 항체와 항온처리하여 PDL1 분해를 평가하였다. 분해는 오직 M6P 표지된 항-PDL1 항체로 관찰된다.

도 19 이중특이적 항체인 이작용성 분자를 사용한 표적화된 세포외 단백질 분해의 도식적 예시. 이 예에서, CIM6PR 및 주어진 표적에 대한 이중특이적 항체는 엔도솜의 낮아진 pH에서 표적으로부터 분리된다. 이 전략은 주어진 이중특이적 항체가 수용체와 순환하게 허용하고, 카고(cargo) 및 표적을 항체의 분해 없이 리소좀에 계속해서 전달한다.

도 20 본 개시내용의 실시형태에 따른 이작용성 분자의 제2 모이어티가 결합할 수 있는 리소좀 표적화 분자의 도식적 예시. 이 예에서, 리소좀 표적화 분자는 간 세포, 예를 들어 간세포에서 실질적으로 배타적으로 발현되는 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)이다. 오른쪽에 도시된 것처럼, ASGPR은 항시적으로 혈장 막과 엔도솜 사이에 재순환하고, 이로써 세포외 당단백질을 리소좀에서 분해를 위해 세포 내에 가져온다. 항체(예를 들어, 간세포의 표면에 발현된 분자 또는 간세포의 세포외 공간에 존재하는 분자에 결합하는 항체)인 제1 모이어티 및 ASGPR에 결합하기 위해 다가 ASGPR 리간드를 포함하는 제2 모이어티를 포함하는 예시적인 이작용성 분자가 하부 왼쪽에 도시된다. 이 예에서, 제2 모이어티는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)의 중합체, 특히 도시된 바와 같은 폴리(GalNAc-코-Ala) 중합체를 포함한다.

도 21 도 20에 도시된 표적 분자에 결합하는 제1 모이어티(이 예에서, 항체) 및 GalNAc 함유 중합체를 포함하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자를 사용하여 HEPG2(간세포 암종) 세포로 표적 분자의 유입을 입증하는 도식적 예시.

도 22 HUH7(간세포 암종) 세포에서 ASGPR을 통한 효과적인 세포 흡수를 입증하는 도식적 예시 및 데이터.

도 23 도 20에 도시된 GalNAc 함유 중합체를 포함하는 제2 모이어티에 접합된 세툭시맙(제1 모이어티)을 포함하는 이작용성 분자를 사용하여 HEP3B(간세포 암종) 세포에서 EGFR의 효과적인 분해를 입증하는 도식적 예시 및 데이터. M6PR 리간드를 포함하는 제2 모이어티에 접합된 세툭시맙(제1 모이어티)을 포함하는 접합체에 대한 EGFR 분해 데이터가 또한 도시된다.

도 24 도 20에 도시된 GalNAc 함유 중합체를 포함하는 제2 모이어티에 접합된 세툭시맙(제1 모이어티)을 포함하는 이작용성 분자를 사용하여 HEPG2 세포에서 EGFR의 효과적인 분해를 입증하는 데이터. M6PR 리간드를 포함하는 제2 모이어티에 접합된 세툭시맙(제1 모이어티)을 포함하는 접합체에 대한 EGFR 분해 데이터가 또한 도시된다.

도 25 HEP3B 세포에서 시간에 따른 EGFR 분해를 평가하는 시간 경과 연구로부터의 데이터.

도 26 상기 기재된 세툭시맙 접합체를 사용한 HEP3B 세포의 치료가 막 EGFR의 대부분을 분해하는 반면, 잔류 EGFR이 세포에 내부라는 것을 입증하는 면역형광 데이터.

도 27 트라스투주맙 단독 또는 GalNAc 함유 중합체에 접합된 트라스투주맙의 존재 하의 HUH7 및 HEPG2 세포에서의 HER2의 분해의 정도를 보여주는 웨스턴 블롯 데이터.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티 및 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자가 제공된다. 이작용성 분자는 엔도솜/리소좀 경로를 통해 예를 들어 세포 표면 및 세포외 분자(예를 들어, 단백질)의 표적화된 분해에 사용된다. 이작용성 분자를 포함하는 조성물 및 키트, 및 이작용성 분자를 사용하는 방법이 또한 제공된다. 이작용성 분자를 제조하는 방법이 또한 제공된다.

[0008] 본 개시내용의 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법을 보다 상세하게 기재하기 전에, 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법이 기재된 특정 실시형태에 제한되지 않으며, 당연히 변할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 기재하기 위한 목적이며, 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 제한하고자 하는 것이 아니라고 이해된다.

[0009] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 해당 범위의 상한과 하한 사이의, 하한 단위의 1/10까지의 각각의 사이에 있는 값, 및 상기 명시된 범위에서 임의의 다른 명시된 또는 사이에 있는 값

이 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법에 포함된다고 이해된다. 이러한 보다 작은 범위의 상한 및 하한은, 독립적으로 보다 작은 범위에 포함될 수 있으며, 이는 또한 명시된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계를 조건으로, 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법 내에 포함된다. 명시된 범위가 양쪽 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 어느 하나 또는 둘 모두를 배제하는 범위 또한 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법에 포함된다.

[0010] 특정 범위가 용어 "약"이 선행되는 수치 값으로 본원에 제시된다. 용어 "약"은, 그것이 선행하는 정확한 숫자에 대한 문자 그대로의 뒷받침일 뿐만 아니라, 그 용어가 선행하는 숫자의 근사치이거나 그에 근접한 숫자를 제공하기 위해 본원에 사용된다. 한 숫자가 구체적으로 인용된 숫자의 근사치이거나 그에 근접한 숫자인지를 결정하는 데 있어서, 인접한 또는 근사치인 언급되지 않은 숫자는, 그것이 제시된 문맥에서, 구체적으로 언급된 숫자와 실질적으로 동등한 것을 제공하는 숫자일 수 있다.

[0011] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법이 속하는 업계의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법이 또한 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 대표적인 예시적인 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법이 여기서 기재된다.

[0012] 본 명세서에 인용된 모든 출판물 및 특허는, 각각의 개별 출판물 또는 특허가 구체적으로 및 개별적으로 인용되어 포함되는 것으로 표시된 바와 같이, 본원에 인용되어 포함되고, 그 인용된 출판물과 관련된 물질 및/또는 방법을 개시하고 기재하기 위해 본원에 인용되어 포함된다. 임의의 출판물의 인용은 출원일 전에 개시된 것에 대한 것이며, 제공된 공개 날짜는 실제 공개 날짜와 상이할 수 있어서 독자적으로 확인해야 할 필요가 있을 수 있기 때문에, 본 발명의 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법이 그러한 출판물에 앞서 있을 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

[0013] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태의 표현은, 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 언급 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다. 나아가, 청구범위는 임의의 선택적 요소를 배제하도록 작성될 수 있다는 것에 유의해야 한다. 이와 같이, 이러한 설명은 청구 요소의 인용 또는 "부정적인" 한정의 사용과 관련하여 "단독으로", "오로지" 등과 같은 배타적인 용어의 사용에 대한 선행 기준으로서 역할을 하기 위한 것이다.

[0014] 명확성을 위해, 별도의 실시형태의 맥락에서 기재된 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법의 특정한 특징은 또한 단일 실시형태에서 조합으로 제공될 수 있다고 이해된다. 반대로, 간결성을 위해, 단일 실시형태의 맥락에서 기재된 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법의 다양한 특징은 또한 별도로 또는 임의의 적합한 하위 조합으로 제공될 수 있다. 실시형태의 모든 조합은 본 개시내용에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 조합 및 모든 조합이 개별적으로 및 명시적으로 개시된 바와 같이, 그러한 조합이 실행 가능한 방법 및/또는 조성물을 포함하는 정도까지 본원에 개시된다. 또한, 그러한 변수를 설명하는 실시형태에 열거된 모든 하위 조합이 또한 이작용성 분자, 조성물, 키트 및 방법에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 조합 및 모든 하위 조합이 개별적으로 및 명시적으로 개시된 바와 같이 본원에 개시된다.

[0015] 본 개시내용을 읽을 때 당업자에게 명백한 바와 같이, 본원에 기재되고 예시된 각각의 개별 실시형태는, 본 발명의 방법의 범위 또는 사상을 벗어나지 않는 한, 임의의 다른 몇몇 실시형태의 특징으로부터 쉽게 분리되거나 조합될 수 있는 별개의 구성요소 및 특징을 갖는다. 임의의 인용된 방법은 인용된 사건의 순서대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0016] 이작용성 분자

[0017] 본 개시내용은 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티 및 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자를 제공한다. 이작용성 분자의 소정의 비제한적인 실시형태가 이제 기재될 것이다.

[0018] 상기 요약된 것처럼, 본 개시내용의 이작용성 분자는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 모이어티는 세포 표면 분자에 특이적으로 결합한다. "세포 표면 분자"란 세포막과 연관된 분자를 의미하는데, 예를 들어 분자가 세포막으로 삽입하거나 이에 걸친 도메인, 예를 들어 세포막 테터링된 도메인 또는 막관통 도메인을 가지기 때문이다. 세포 표면 분자는 엔도솜/리소좀 경로를 통한 표적화된 분해에 원해지는 임의의 세포 표면 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 표면 분자는

세포 표면 수용체이다. 관심 세포 표면 수용체는 줄기 세포 수용체, 면역 세포 수용체, 성장 인자 수용체, 사이토카인 수용체, 호르몬 수용체, 수용체 티로신 키나제, 표피 성장 인자 수용체(EGFR: epidermal growth factor receptor) 패밀리에서의 수용체(예를 들어, HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2) 등), 섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR: fibroblast growth factor receptor) 패밀리에서의 수용체, 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor) 패밀리에서의 수용체, 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR: platelet derived growth factor receptor) 패밀리에서의 수용체, 형질주입 동안 재배열된(RET: rearranged during transfection) 수용체 패밀리에서의 수용체, Eph 수용체 패밀리에서의 수용체, 디스코이딘 도메인 수용체(DDR) 패밀리에서의 수용체 및 뮤신 단백질(예를 들어, MUC1: discoidin domain receptor)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 표면 분자는 CD71(인터페린 수용체)이다. 소정의 양태에서, 세포 표면 수용체는 T 세포 수용체, B 세포 수용체, 자연 살해(NK) 세포 수용체, 대식세포 수용체, 단핵구 수용체, 중성구 수용체, 수지상 세포 수용체, 비만 세포 수용체, 호염기구 수용체 및 호산구 수용체로부터 선택된 면역 세포 수용체이다.

[0019] 일부 실시형태에서, 제1 모이어티는 특이적 분자 상호작용이 아니라(그리고 이에 따라 차단에 민감하지 않음), 벌크 생물물리학적 또는 응집체 효과를 통해 이의 효과를 매개하는 세포 표면 분자에 특이적으로 결합한다. 이러한 세포 표면 분자의 비제한적인 예는 뮤신이다. 뮤신의 예는 MUC1, MUC16, MUC2, MUC5AC, MUC4, CD43, CD45, GPIb 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0020] 일부 실시형태에서, 제1 모이어티가 세포 표면 분자에 특이적으로 결합할 때, 세포 표면 분자는 암 세포에 존재한다. "암 세포"란 예를 들어 비정상 세포 성장, 비정상 세포 증식, 밀도 의존적 성장 저해의 소실, 정착 독립적 성장 가능성, 면역저하된 비인간 동물 모델에서 종양 성장 및/또는 발생을 촉진시키는 능력 및/또는 세포 형질전환의 임의의 적절한 지표 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있는 신생물성 세포 표현형을 나타내는 세포를 의미한다. "암 세포"는 "종양 세포", "악성 세포" 또는 "암성 세포"와 본원에 상호교환적으로 사용될 수 있고, 고형 종양, 반고형 종양, 혈액학적 악성상태(예를 들어, 백혈병 세포, 림프종 세포, 골수종 세포 등), 원발성 종양, 전이성 종양 등의 암 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 세포에 존재하는 세포 표면 분자는 종양 연관된 항원 또는 종양 특이적 항원이다.

[0021] 소정의 양태에서, 제1 모이어티가 세포 표면 분자에 특이적으로 결합할 때, 세포 표면 분자는 면역 세포에 존재한다. 일부 실시형태에서, 세포 표면 분자는 T 세포, B 세포, 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 중성구, 수지상 세포, 비만 세포, 호염기구 및 호산구로부터 선택되는 면역 세포에 존재한다. 소정의 양태에서, 면역 세포에 존재하는 세포 표면 분자는 억제 면역 수용체이다. 본원에 사용된 바대로, "억제 면역 수용체"는 면역 반응을 부정적으로 조절하는 면역 세포에 존재하는 수용체이다. 본 개시내용의 방법에 따라 억제될 수 있는 억제 면역 수용체의 예는 Ig 슈퍼패밀리의 억제 면역 수용체, 비제한적인 예로서 CD200R, CD300a(IRp60; 마우스 MAIR-I), CD300f(IREM-1), CEACAM1(CD66a), FcɣRIIb, ILT-2(LIR-1; LILRB1; CD85j), ILT-3(LIR-5; CD85k; LILRB4), ILT-4(LIR-2; LILRB2), ILT-5(LIR-3; LILRB3; 마우스 PIR-B); LAIR-1, PECAM-1(CD31), PILR-α(FDF03), SIRL-1 및 SIRP-α를 포함한다. 본 개시내용의 방법에 따라 억제될 수 있는 억제 면역 수용체의 추가의 예는 시알산-결합 Ig-유사 렉틴(Siglec) 수용체, 예를 들어 Siglec 7, Siglec 9, 및/또는 기타를 포함한다. 본 개시내용의 방법에 따라 억제될 수 있는 억제 면역 수용체의 추가의 예는 비제한적인 예로서 CLEC4A (DCIR), Ly49Q 및 MICL을 포함하는 C형 렉틴을 포함한다. 억제 면역 수용체에 관한 상세설명은 예를 들어 문헌[Steevels et al. (2011) *Eur. J. Immunol.* 41(3):575-587]에서 발견될 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역 세포에 존재하는 세포 표면 분자는 억제 면역 수용체의 리간드이다. 소정의 양태에서, 면역 세포에 존재하는 세포 표면 분자는 면역 관문 분자이다. 제1 모이어티가 특이적으로 결합할 수 있는 면역 관문 분자의 비제한적인 예는 PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, TIGIT 및 B7 패밀리의 구성원을 포함한다.

[0022] 상기 요약된 것처럼, 본 개시내용의 이작용성 분자는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 모이어티는 세포외 분자에 특이적으로 결합한다. "세포외 분자"란 가용성 분자의 부근의 임의의 세포의 세포막에 외부인 가용성 분자를 의미한다. 세포외 분자는 엔도솜/리소좀 경로를 통한 표적화된 분해에 원해지는 임의의 세포외 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포외 분자는 세포 표면 수용체에 대한 리간드이다. 관심 세포 표면 수용체 리간드는 성장 인자(예를 들어, 표피 성장 인자(EGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 등), 사이토카인(예를 들어, 인터류킨, 인터페론, 종양 괴사 인자(TNF), 형질전환 성장 인자 β(TGF-β)와 이러한 사이토카인의 임의의 특정 하위유형을 포함), 호르몬 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 소정의 양태에서, 제1 모이어티는 아포지질단백질 E4(ApoE4)에 특이적으로 결합한다.

[0023] 일부 실시형태에서, 제1 모이어티는 세포외 분자에 특이적으로 결합하고, 여기서 세포외 분자는 항체, 예를 들어 세포 표면 분자 또는 상이한 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 자가항체이다. 자가항체의 비제한적인 예는 류마티스성 인자(RF: rheumatoid factor), 항핵 항체(ANA: antinuclear antibody), 항중성구 세포질 항체(ANCA: Antineutrophil Cytoplasmic Antibody), 항-이중 가닥 DNA(항-dsDNA: Anti-Double Stranded DNA), 항중심절 항체(ACA: Anticentromere Antibody), 항히스톤 항체, 사이클릭 시트룰린화 펩타이드 항체(CCP: Cyclic Citrullinated Peptide Antibody), 추출 핵 항원 항체(예를 들어, 항-SS-A(Ro) 및 항-SS-B(La), 항-RNP, 항-Jo-1, 항-Sm, Scl-70), 카디오리핀 항체, 베타-2 당단백질 1 항체, 항인지질 항체(APA: Antiphospholipid Antibody), 루푸스 항응고제(LA: Lupus anticoagulant), 당뇨병 관련 자가항체, 항-조직 트랜스글루타미나아제(항-tTG: Anti-Tissue Transglutaminase), 항-글리아딘 항체(AGA: Anti-Gliadin Antibody), 내재성 인자 항체, 벽 세포 항체, 갑상선 자가항체(예를 들어, 항-TPO, TSH 수용체 항체), 평활근 항체(SMA: Smooth Muscle Antibody), 항미토콘드리아 항체(AMA: Antimitochondrial Antibody), 간 신장 마이크로솜 1형 항체(항-LKM-1: Liver Kidney Microsome Type 1 Antibody), 항-사구체 기저막(GBM: Anti-Glomerular Basement Membrane), 아세틸콜린 수용체(AChR: Acetylcholine Receptor) 항체 등을 포함한다.

[0024] 일부 실시형태에서, 제1 모이어티는 세포외 분자에 특이적으로 결합하고, 여기서 세포외 분자는 질병에서 축적하는 분비된 단백질(예를 들어, 알파-시누클레인), 콜레스테롤 운반체(예를 들어, ApoB), 감염성 질병 독소(예를 들어, AB 독소, ESAT-6), 감염성 입자(예를 들어, 전체 바이러스, 전체 박테리아 등), 응고 인자(예를 들어, IX 인자), 세포외 분자에 결합하는 임의의 FDA 승인된 항체의 표적(예를 들어, TNF알파), 임의의 케모카인 또는 사이토카인(예를 들어, 패혈증 또는 만성 염증의 매개자, 예컨대 IL-1), 단백질성 호르몬(예를 들어, 인슐린, ACTH 등), 기분 장애의 단백질성 매개자, 에너지 항상성의 단백질성 매개자(예를 들어, 렙틴, 그렐린 등), 혈류에 존재하는 단백질성 알레르겐 또는 이러한 알레르겐에 대한 항체(예를 들어, 땅콩 알레르기에 대한), 단백질성 독소(예를 들어, 뱀독 히알루로니다제 등) 등이다.

[0025] 소정의 실시형태에서, 제1 모이어티는 세포 표면 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하고, 여기서 세포 표면 또는 세포외 분자는 돌연변이된 단백질이다. 일부 실시형태에서, 이작용성 분자는 돌연변이된 단백질을 리소좀으로 실어날라서, 주요 조직접합성 복합체(MHC: major histocompatibility complex)(예를 들어, MHC I 또는 MHC II)에 이의 로딩을 촉진하고, 이에 의해 면역계에 의해 돌연변이된 단백질의 인식을 촉진한다. 이 맥락에서, 이작용성 분자는 돌연변이된 단백질 및 원치 않는 단백질(예를 들어, KIT)에 특이적인 항체를 생성하는 데 사용된다.

[0026] "특이적으로 결합한다"란 제1 모이어티 및 제2 모이어티가 예를 들어 약 10^{5} M^{-1} 이상의 친화도 또는 K_a(즉, 1/M의 단위로 특정 결합 상호작용의 평형 결합 상수)로 이의 각각의 표적에 결합한다는 것을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 제1 모이어티 및 제2 모이어티는 약 10^{6} M^{-1}, 10^{7} M^{-1}, 10^{8} M^{-1}, 10^{9} M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1}, 10^{12} M^{-1} 또는 10^{13} M^{-1} 이상의 K_a로 이들의 각각의 표적에 결합한다. "고친화도" 결합은 적어도 10^{7} M^{-1}, 적어도 10^{8} M^{-1}, 적어도 10^{9} M^{-1}, 적어도 10^{10} M^{-1}, 적어도 10^{11} M^{-1}, 적어도 10^{12} M^{-1}, 적어도 10^{13} M^{-1}, 또는 이것 초과의 K_a로의 결합을 지칭한다. 대안적으로, 친화도는 M의 단위(예를 들어, 10^{-5} M 내지 10^{-13} M, 또는 이것 미만)로 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_D)로 정의될 수 있다. 소정의 양태에서, 특이적 결합은 제1 모이어티 및 제2 모이어티가 약 10^{-5} M 이하, 약 10^{-6} M 이하, 약 10^{-7} M 이하, 약 10^{-8} M 이하 또는 약 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 10^{-12} M, 또는 이것 미만의 K_D로 이의 각각의 표적에 결합한다는 것을 의미한다. 제1 모이어티 및 제2 모이어티의 이들의 각각의 표적에 대한 결합 친화도는 종래의 기법을 사용하여, 예를 들어 경쟁적 ELISA(효소 결합 면역흡착 검정), 평형 투석에 의해; 표면 플라즈몬 공명(SPR: surface plasmon resonance) 기술을 사용하여(예를 들어, 제조업자에 의해 개략된 일반 절차를 사용하여 BIAcore 2000 기기); 방사면역검정법; 등에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0027] 제1 모이어티는 엔도솜/리소좀 경로를 통해 분해를 위해 표적화되는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 결합할 수 있는 임의의 형태의 모이어티일 수 있다. 소정의 양태에서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드, 리간드(예를 들어, 세포 표면 수용체에 대한 리간드, 여기서 세포 표면 수용체는 분해를 위해 표적화됨), 압타머, 나노입자 및 소분자로부터 선택된다. 제2 모이어티는 리소좀 표적화 분자에 결합할 수 있는 임의의 형태의 모이어티일 수 있다. 소정의 양태에서, 제2 모이어티는 폴리펩타이드, 리간드 (예를 들어, 리소좀 표적화 분자에 대한 리간

드), 압타머, 나노입자 및 소분자로부터 선택된다.

[0028] 일부 실시형태에서, 이작용성 분자의 모이어티가 폴리펩타이드일 때, 모이어티는 항체이다. 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은, 임의의 아이소타입의 항체 또는 면역글로불린(예를 들어, IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgE, IgD, IgA, IgM 등), 전체 항체(예를 들어, 결국 중쇄 폴리펩타이드와 경쇄 폴리펩타이드의 2개의 이합체로 이루어진 사합체로 이루어진 항체); 단쇄 항체; 비제한적인 예로서 Fv, 단쇄 Fv(scFv), Fab, $F(ab')_2$, Fab', $(scFv')_2$, 디아바디 및 나노바디를 포함하는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자(제1 모이어티의 경우) 또는 리소좀 표적화 분자(제2 모이어티의 경우)에 대한 특이적 결합을 보유하는 항체의 단편(예를 들어, 전체 항체 또는 단쇄 항체의 단편); 키메라 항체; 단일클론 항체; 전체 인간 항체; 인간화 항체(예를 들어, 인간화 전체 항체, 인간화 항체 단편 등); 및 항체 및 비항체 단백질의 항원 결합 부분 또는 이의 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 항체는 생체내 영상화제 등으로 검출 가능하게 표지될 수 있다. 항체는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등과 같은 다른 모이어티에 추가로 접합될 수 있다. 항체 Fc 영역(또는 이의 단편)에 대한 융합, PEG에 대한 접합 등은 대상체에 대한 투여 시 예를 들어 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0029] "소분자"란 분자량이 1000 원자 질량 단위(amu: atomic mass unit) 이하인 화합물을 의미한다. 일부 실시형태에서, 소분자는 750 amu 이하, 500 amu 이하, 400 amu 이하, 300 amu 이하 또는 200 amu 이하이다. 소정의 양태에서, 소분자는 중합체에 존재하는 것과 같은 반복 분자 단위로 제조되지 않는다.

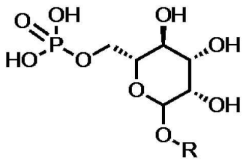
[0030] 상기 요약된 바와 같이, 제2 모이어티는 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합한다. 본원에 사용된 바대로, "리소좀 표적화 분자"는 이작용성 분자의 제2 모이어티에 의한 결합 시 이작용성 분자 및 세포 내에 제1 모이어티에 의해 결합된 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 리소좀에 실어나르는 세포 표면 분자이다. 이작용성 분자 및 세포 표면 분자 또는 세포외 분자는 리소좀에 전달되고 내재화될 시에 리소좀 효소, 예를 들어 산 가수분해효소에 의해 분해된다. 이런 방식으로, 이작용성 분자는 분해를 위해 제1 모이어티에 의해 결합된 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 표적화하고, 표적화는 조사 분야 및 임상 분야를 포함하여 다양한 시험관내 분야 및 생체내 분야에 사용된다.

[0031] 제2 모이어티는 임의의 적합한 리소좀 표적화 분자에 결합할 수 있다. 리소좀 표적화 분자의 비제한적인 예는 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR), 소르틸린, 엽산 수용체, ASPGR, IFITM3, 엔도솜/리소좀 경로에서의 분자(예를 들어, LIMP-1, LIMP-2) 등을 포함한다.

[0032] 일부 실시형태에서, 제2 모이어티가 결합한 리소좀 표적화 분자는 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR)이다. M6PR은 신체의 조직에 걸쳐 존재하고, 골지 구획 및 세포외 공간으로부터 리소좀으로의 만노스-6-포스페이트(M6P) 태그화된 카고, 예컨대 산 가수분해효소의 수송을 담당한다. M6PR에 관한 상세내용은 예를 들어 문헌[Gary-Bobo et al. (2007) *Curr. Med. Chem.* 14:2945-2953]; 문헌[Das et al. (2016) *ACS Macro Lett.* 5:809-813]; 및 다른 곳에서 발견될 수 있다. 제2 모이어티가 결합할 수 있는 M6PR의 예는 UniProtKB - P20645로 제공되는 양이온 의존적 인간 M6PR 및 UniProtKB - P11717로 제공되는 양이온 독립적 M6PR(인슐린양 성장 인자 2 수용체(IGF2R)라고도 칭함)을 포함한다. 양이온 독립적 만노스 6-포스페이트 수용체는 세포 표면에서 만노스 6-포스페이트(M6P) 보유 단백질, IGF-II, 레티노산, 플라스미노겐 등과 같은 리간드에 결합하는 다작용성 단백질이다. 이것의 주요 기능은 M6P-효소에 결합하고 이를 리소좀에 수송하는 것이지만, 이것은 다양한 세포외 M6P-당단백질, 예를 들어 잠재 TGFβ 전구체, 유로키나제형 플라스미노겐 활성자 수용체, 그랜자임 B, 성장 인자, 헤르페스 바이러스 등의 활성을 또한 조절할 수 있다.

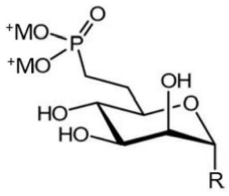
[0033] 소정의 양태에서, 리소좀 표적화 분자가 M6PR일 때, 제2 모이어티는 M6PR에 특이적으로 결합하는 항체이다. 항-M6PR 항체가 이용 가능하고, MOB-1772z 재조합 항-인간 M6PR 항체(Creative Biolabs), EPR6599, 2G11, MEM-238, EPR6599 및 EPR7691 항-M6PR 항체(Abcam) 등을 포함한다.

[0034] 일부 실시형태에서, 리소좀 표적화 분자가 M6PR일 때, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함한다. 소정의 양태에서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6Ps)를 포함하고, 여기서 M6P는 하기 구조를 갖는다:



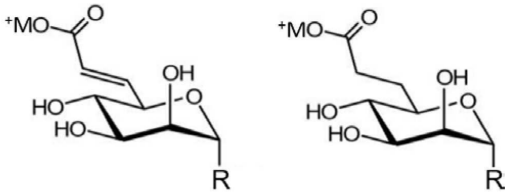
[0035]

[0036] 대안적으로 또는 부가적으로, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체를 포함한다. "M6P 유사체"란 M6P가 아니지만 M6PR의 M6P 인식 부위에 결합하는 분자를 의미한다. 포스포네이트, 카복실레이트, 설페이트, 설포네이트 또는 말로네이트기를 갖는 몇몇 M6P 유사체는 인간 혈청에서 M6P 자체보다 더 높은 친화도 및 더 강한 안정성을 나타낸다. 일부 구조적 특징은 M6PR에 대한 M6P의 결합에 중요한 것으로 나타났다. 예를 들어, 피라노스 고리의 2번 위치에서의 하이드록실기는 축을 이루어 M6PR에 대한 강한 결합이 관찰된다. 음전하와 피라노스 고리 사이의 거리는 또한 M6PR에 의한 M6P 인식에서 역할을 한다. 적합한 유사체가 일반적으로 M6PR에 효과적으로 결합하도록 M6P에 등배전자여야 하고; 단일 음전하가 M6PR에 대한 결합을 허용하기에 충분하지만, 인 원자가 인식을 보장하는 데 필요하지 않고; (M6P의 말로네이트 및 포스포네이트 등배전자 유사체에서처럼) 2개의 음전하의 존재가 M6PR에 대한 결합에 유리하다고 나타났다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 M6PR 리간드가 하나 이상의 M6PR 유사체를 포함할 때, 하나 이상의 M6PR 유사체는 하나 이상의 포스포네이트 M6P 유사체(M6Pn), 말로네이트 M6P 유사체, 카복실레이트 M6P 유사체, 설포네이트 M6P 유사체, 아크릴레이트 M6P 유사체, 및/또는 기타를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 M6PR 유사체는 하기 구조(여기서, M^+는 임의의 상대양이온(countercation) 또는 수소 원자임)를 갖는 하나 이상의 포스포네이트 M6P 유사체(M6Pn)를 포함한다:



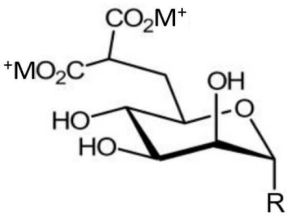
[0037]

[0038] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 M6PR 유사체는 하기 구조(여기서, M^+는 임의의 상대양이온 또는 수소 원자임) 중 하나를 갖는 하나 이상의 카복실레이트 M6P 유사체를 포함한다:



[0039]

[0040] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 M6PR 유사체는 하기 구조(여기서, M^+는 임의의 상대양이온 또는 수소 원자임)를 갖는 하나 이상의 말로네이트 M6P 유사체를 포함한다:



[0041]

[0042] M6PR에 의한 M6P 및 M6P 유사체 인식, 및 본 개시내용의 이작용성 분자에 사용될 수 있는 M6P에 관한 상세내용은 예를 들어 문헌[Gary-Bobo et al. (2007) *Curr. Med. Chem.* 14:2945-2953]; 및 문헌[Jeanjean et al. (2008) *Bioorg Med Chem Lett.* 18(23): 6240-3]에서 발견될 수 있고, 이들의 개시내용은 모든 목적을 위해 그 전문이 인용되어 포함된다.

[0043] 소정의 양태에서, 제2 모이어티가 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함할 때, 제2 모이어티는 1개 내지 1000개의 M6PR 리간드, 예컨대 1개 내지 750개, 1개 내지 500개, 1개 내지 250개, 1개 내지 100개, 1개 내지 75개, 1개

내지 50개, 1개 내지 40개, 1개 내지 30개, 1개 내지 20개, 1개 내지 10개(예를 들어, 1개 내지 6개), 또는 1개 내지 5개의 M6PR 리간드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 모이어티가 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함할 때, 제2 모이어티는 10개 내지 50개, 15개 내지 45개, 20개 내지 40개, 또는 25개 내지 35개의 M6PR 리간드를 포함한다. 소정의 양태에서, 제2 모이어티가 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함할 때, 제2 모이어티는 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 75개 이상, 100개 이상, 250개 이상, 500개 이상, 750개 이상, 또는 1000개 이상의 M6PR 리간드를 포함한다.

[0044] 일부 실시형태에서, 제2 모이어티가 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함할 때, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드를 나타내는(예를 들어, 이것으로 작용기화된) 중합체 스캐폴드를 포함한다. 이러한 이작용성 분자 및 이의 용도의 하나의 예가 도 1에 개략적으로 예시되어 있다. 이 예에서, 이작용성 분자는 제1 모이어티로서 항체를 포함한다. 항체는 (왼쪽에 도시된 바와 같은) 표적 세포외 분자 또는 (오른쪽에 도시된 바와 같은) 표적 세포 표면 분자 중 어느 하나에 결합할 수 있다. 항체는 M6P 리간드(이들의 각각은 도 1에서 "6P"로 지칭됨)를 나타내는 중합체 스캐폴드에 접합된다. M6PR은 세포 표면 M6PR에 의한 표시된 M6P 리간드의 결합 시 분해를 위해 이작용성 분자(및 결합된 표적 분자)를 리소좀에 실어나른다.

[0045] 제2 모이어티가 하나 이상의 M6PR 리간드를 나타내는 중합체 스캐폴드를 포함할 때, 중합체 스캐폴드는 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함하는 글리코폴리머일 수 있다. 예로서, 글리코폴리머는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 아미노산(예를 들어, 천연 아미노산 및/또는 비천연 아미노산)을 포함하는 당단백질일 수 있다. 글리코폴리머가 당단백질일 때, 당단백질은 N-카복시언하이드라이드 (NCA) 유래 당단백질일 수 있다. NCA 단량체의 개환 중합(ROP)은 넓은 범위의 유용한 물성을 보유하는 합성 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드 하이브리드에 잘 연구된 경로이다. 일부 실시형태에서, 중합은 금속 촉매화된다. α-아미노산-N-카복시언하이드라이드의 대규모 합성을 위한 적합한 접근법은 예를 들어 문헌[Semple et al. (2016) *Synthetic Communications* 47(1):53-61]에 기재되어 있다.

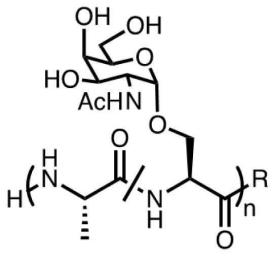
[0046] 만노스-6-포스페이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 예시적인 접근법이 도 2에 도식적으로 예시된다. 만노스-6-포스포네이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 예시적인 접근법이 도 3에 도식적으로 예시된다. 만노스-6-카복실레이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 예시적인 접근법이 도 4에 도식적으로 예시된다. 만노스-6-아크릴레이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 예시적인 접근법이 도 5에 도식적으로 예시된다. 글루코스-6-포스포네이트 N-카복시언하이드라이드를 합성하기 위한 예시적인 접근법이 도 6에 도식적으로 예시된다. 만노스-6-포스포네이트 이소티오시아네이트를 합성하기 위한 예시적인 접근법이 도 7에 도식적으로 예시된다.

[0047] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 이작용성 분자는 간 세포, 예를 들어 간세포(간세포 암종(HCC) 세포를 포함함)의 표면에 발현된 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함한다. 제2 모이어티가 결합할 수 있는 간 세포의 표면에 발현된 리소좀 표적화 분자의 비제한적인 예는 혈액으로부터의 당접합체의 제거를 매개하는 간 수용체인 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)이다. 수용체는 유전자 *ASGR1* 및 *ASGR2*에 의해 암호화된 2개의 단백질, 아시알로당단백질 수용체 1 및 2(ASGR1(UniProtKB - P07306 - 인간) 및 ASGR2(UniProtKB - P07307 - 인간))를 포함한다. ASGPR은 갈락토스 잔기 및 갈락토사민 잔기를 노출시키도록 시알산이 제거된 당단백질인 아시알로당단백질에 결합한다. 간 세포 상에 위치한 수용체는 순환으로부터 표적 당단백질을 제거한다. ASGPR은 간세포, 몇몇 인간 암종 세포주 및 간암의 표면 상에서 고도로 발현된다.

[0048] 리소좀 표적화 분자가 ASGPR일 때, 적합한 제2 모이어티는 항-ASGPR 항체, ASGPR 리간드 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에 따르면, 이러한 제2 모이어티는 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함한다. 적합한 ASGPR 리간드는 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc), 하나 이상의 갈락토스, 하나 이상의 글루코스, 및 임의의 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 소정의 실시형태에서, 이러한 제2 모이어티는 1개 내지 1000개의 ASGPR 리간드, 예컨대 1개 내지 750개, 1개 내지 500개, 1개 내지 250개, 1개 내지 100개, 1개 내지 75개, 1개 내지 50개, 1개 내지 40개, 1개 내지 30개, 1개 내지 20개, 1개 내지 10개(예를 들어, 1개 내지 6개), 또는 1개 내지 5개의 ASGPR 리간드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 모이어티가 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함할 때, 제2 모이어티는 10개 내지 50개, 15개 내지 45개, 20개 내지 40개, 또는 25개 내지 35개의 ASGPR 리간드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제2 모이어티가 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함할 때, 제2 모이어티는 3개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 75개 이상, 100개 이상, 250개 이상, 500개 이상, 750개 이상, 또는 1000개 이상의 ASGPR 리간드를 포함한다.

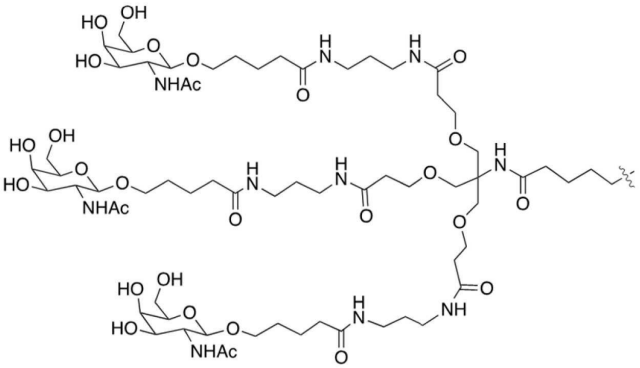
[0049] 일부 실시형태에 따르면, 리소좀 표적화 분자가 ASGPR이고, 제2 모이어티가 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함할

때, 제2 모이어티는 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함하는 스캐폴드를 포함한다. 하나의 비제한적인 예에서, 제2 모이어티는 GalNAc를 포함하는 중합체를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 제2 모이어티는 폴리(GalNAc-코-Ala)를 포함하고, 이의 구조는 하기 및 도 20에 제공된다.



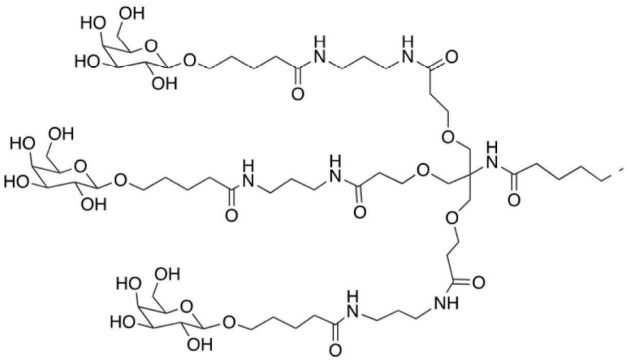
[0050]

[0051] 소정의 실시형태에서, 리소좀 표적화 분자가 ASGPR일 때, 제2 모이어티는 1개(일가), 2개(이가), 3개(삼가) 또는 4개 또는 이것 초과의 ASGPR 리간드, 예를 들어 GalNAc, 갈락토스 및 글루코스로부터 독립적으로 선택된 ASGPR 리간드를 포함하는 덴드리머 스캐폴드를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에 따르면, 제2 모이어티는 1가, 2가 또는 3가 GalNAc 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함한다. 사용될 수 있는 3가 GalNAc 함유 덴드리머 스캐폴드의 비제한적인 예는 (본원에서 트리-GalNAc 덴드리머로 지칭되는) 하기이다:



[0052]

[0053] 일부 실시형태에 따르면, 제2 모이어티는 1가, 2가 또는 3가 갈락토스 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함한다. 사용될 수 있는 3가 갈락토스 함유 덴드리머 스캐폴드의 비제한적인 예는 (본원에서 트리-Gal 덴드리머로 지칭되는) 하기이다:



[0054]

[0055] 일부 실시형태에 따르면, 제2 모이어티가 간 세포의 표면에서 발현된 리소좀 표적화 분자, 예를 들어 ASGPR에 특이적으로 결합할 때, 제1 모이어티는 간세포(간세포 암종(HCC) 세포를 포함함)에서 발현된 세포 표면 분자에 특이적으로 결합한다. 이러한 세포 표면 분자의 비제한적인 예는 성장 인자 수용체를 포함한다. 관심 성장 인자 수용체는 표피 성장 인자 수용체(EGFR), C-Met, 인슐린양 성장 인자 1 수용체(IGF1R), 섬유아세포 성장 인자 수용체 4(FGFR4), HER2 및 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0056] 소정의 실시형태에서, 이작용성 분자는 간세포 암종(HCC) 세포의 표면에서(예를 들어, HCC를 치료하기 위해 HCC를 갖는 개체에 대한 투여 시 생체내) 성장 인자를 분해하는 데 사용되고, 여기서 이작용성 분자는 EGFR, C-Met, IGF1R, FGFR4 또는 HER2에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티를 포함하고, 제2 모이어티는 ASGPR에 특이적으로 결합한다(예를 들어, 제2 모이어티는 ASGPR 리간드, 예를 들어 GalNAc, 갈락토스, 및/또는 글루코스를 포

함하는 스캐폴드(예를 들어, 중합체 스캐폴드)를 포함할 수 있다).

[0057] 일부 실시형태에 따르면, 이작용성 분자는 (예를 들어, 간의 섬유증을 갖는 개체에 대한 투여 시 생체내) 섬유증 간 세포에서 발현된 세포 표면 분자(예를 들어, 성장 인자)를 분해하는 데 사용되고, 여기서 이작용성 분자는 섬유증(예를 들어, PDGFR)을 촉진하는 세포 표면 또는 세포외 단백질에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티를 포함하고, 제2 모이어티는 ASGPR에 특이적으로 결합한다(예를 들어, 제2 모이어티는 하나 이상의 ASGPR 리간드, 예를 들어 GalNAc, 갈락토스 및/또는 글루코스를 포함하는 스캐폴드(예를 들어, 중합체 스캐폴드)를 포함할 수 있다).

[0058] 소정의 실시형태에서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시킨다. 일부 실시형태에 따르면, 이작용성 분자는 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시킨다. 이 맥락에서 "분해를 향상시킨다"란 세포 표면 분자 또는 세포외 분자가 이작용성 분자의 존재 하에 분해되고, 동일한 조건 하에 제1 모이어티 단독의 존재 하에, 또는 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 단독의 존재 하에 분해되지 않거나; 세포 표면 분자 또는 세포외 분자가 동일한 조건 하에 세포 표면 분자 또는 세포외 분자가 제1 모이어티 단독의 존재 하에, 또는 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 단독의 존재 하에 분해되는 것보다 높은 정도로 이작용성 분자의 존재 하에 분해됨을 의미한다. 세포 표면 분자 또는 세포외 분자가 동일한 조건 하에 제1 모이어티 단독의 존재 하에, 또는 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 단독의 존재 하에 분해되는 것보다 높은 정도로 세포 표면 분자 또는 세포외 분자가 이작용성 분자의 존재 하에 분해할 때, 분해는 이작용성 분자의 존재 하에 1.2배 이상, 1.4배 이상, 1.6배 이상, 1.8배 이상, 2배 이상, 2.5배 이상, 3배 이상, 3.5배 이상, 4배 이상, 4.5배 이상, 5배 이상, 5.5배 이상, 6배 이상, 6.5배 이상, 7배 이상, 7.5배 이상, 8배 이상, 8.5배 이상, 9배 이상, 9.5배 이상, 또는 10배 이상일 수 있다.

[0059] 본 개시내용의 이작용성 분자가 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자의 분해를 향상시키는 비제한적인 예는 하기 실험 부문의 실시예 4에 제공된다. 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자의 분해를 향상시키지 않는 이작용성 분자의 예는 실시예 5에 제공된다.

[0060] 당업자는 관심 이작용성 분자가 제1 모이어티 단독의 존재 하의, 또는 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시키는지를 용이하게 결정할 수 있다. 이러한 결정을 용이하게 하기 위한 적합한 접근법의 비제한적인 예는 하기 실험 부문에 제공된다.

[0061] 본 개시내용의 이작용성 분자는 임의의 적합한 형식일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드이고, 제2 모이어티는 폴리펩타이드이고, 이작용성 분자는 제2 모이어티에 융합된 제1 모이어티를 포함하는 융합 단백질이다. 제1 모이어티는 제2 모이어티에 직접 융합될 수 있다. 다른 양태에서, 제1 모이어티는 제2 모이어티에 직접 융합될 수 있고, 예를 들어 여기서 스페이서 도메인은 제1 모이어티와 제2 모이어티 사이에 배치된다. 이작용성 분자가 융합 단백질일 때 이작용성 분자를 암호화하는 핵산이 본 개시내용에 의해 제공된다. 이러한 핵산을 포함하는 발현 벡터는 본 개시내용의 임의의 핵산 및/또는 발현 벡터를 포함하는 세포(예를 들어, 숙주 세포)처럼 또한 제공된다. 예를 들어, 적합한 세포 형질주입 프로토콜 및 형질주입 시약을 사용하여 본 개시내용의 임의의 핵산 및/또는 발현 벡터를 세포로 도입하는 단계를 포함하는 이러한 세포를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 이작용성 분자가 융합 단백질일 때 이작용성 분자를 제조하는 방법이 본 개시내용에 의해 또한 제공된다. 이러한 방법은 이작용성 분자가 세포에서 발현되는 조건 하에 본 개시내용의 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0062] 본 개시내용의 이작용성 분자에 대한 다른 적합한 형식은 접합체를 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 이작용성 분자는 제2 모이어티에 접합된 제1 모이어티를 포함한다. 소정의 양태에서, 제1 모이어티는 항체이고, 제2 모이어티는 M6PR에 특이적으로 결합한다. 예로서, 제1 모이어티는 항체일 수 있고, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드, 예를 들어 하나 이상의 M6P 및/또는 M6P 유사체를 포함하는/나타내는 중합체 스캐폴드를 포함할 수 있고, 여기서 중합체 스캐폴드는 항체에 접합된다. 일부 이러한 실시형태에서, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 당단백질이다. 이러한 접합체를 제조하는 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 제1 모이어티를 제2 모이어티에 접합하는 단계를 포함한다. 제1 모이어티가 항체이고 제2 모이어티가 본원에 기재된 바와 같은 글리코폴리머인 이러한 방법의 비제한적인 예는 도 12에 도식적으로 예시되어 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 제1 모이어티를 제2 모이어티에 부위

특이적으로 접합하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 제1 모이어티가 폴리펩타이드(예를 들어, 항체)를 포함할 때, 접합하는 단계는 제2 모이어티를 제1 모이어티의 미리 선택된 아미노산에 부위 특이적으로 접합하는 단계를 포함한다. 소정의 양태에서, 미리 선택된 아미노산은 제1 모이어티의 N 말단 또는 C 말단에 있다. 다른 양태에서, 미리 선택된 아미노산은 제1 모이어티의 N 말단과 C 말단 사이인 제1 모이어티의 내부에 있다. 일부 실시형태에서, 미리 선택된 아미노산은 비천연 아미노산이다. 접합을 수월하게 하기 위해 제1 모이어티 및/또는 제2 모이어티에 제공될 수 있는 비천연 아미노산의 비제한적인 예는 아지드, 알킨, 알켄, 아미노-옥시, 하이드라진, 알데하이드(예를 들어, 포밀글리신, 예를 들어 Catalent Pharma Solutions로부터의 SMARTag™ technology), 니트론, 니트릴 옥사이드, 사이클로프로펜, 노르보르넨, 이소-시아나이드, 아릴 할라이드 및 붕산 작용기로부터 선택된 작용기를 갖는 것을 포함한다. 관심 작용기를 제공하기 위해 혼입되고 선택될 수 있는 비천연 아미노산이 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Maza et al. (2015) Bioconjug. Chem. 26(9):1884-9]; 문헌[Patterson et al. (2014) *ACS Chem. Biol.* 9:592-605]; 문헌[Adumeau et al. (2016) *Mol. Imaging Biol.* (2):153-65]; 및 다른 곳에 기재되어 있다.

[0063] 일부 실시형태에서, 제1 모이어티를 제2 모이어티에 접합시키는 단계는 제2 모이어티를 제1 모이어티 상의 글리칸에 접합시키는 것을 포함하고, 또는 그 반대로 같다. 이러한 방법은 제2 모이어티가 부착될 수 있는 작용기를 제공하도록 제1 모이어티 상의 하나 이상의 글리칸을 변형시키는 단계를 포함할 수 있다. 하나의 비제한적인 예에서, 제1 모이어티(예를 들어, 항체) 상의 N-글리칸은 알데하이드 기에 페리오데이트 산화를 통해 변형될 수 있고, 이것은 이후 아미노옥시 M6Pn과 같이 제2 모이어티로 작용기화될 수 있다.

[0064] 이작용성 분자가 접합체일 때, 하나 이상의 링커는 제1 모이어티의 제2 모이어티에 대한 접합을 수월하게 하도록 사용될 수 있다. 이러한 링커의 비제한적인 예는 에스테르 링커, 아미드 링커, 말레이미드 또는 말레이미드계 링커; 발린-시트룰린 링커; 하이드라존 링커; N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)부티레이트(SPDB) 링커; 숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC) 링커; 비닐술폰계 링커; 비제한적인 예로서 테트라에틸렌 글리콜과 같은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하는 링커; 프로판산을 포함하는 링커; 카프롤레산을 포함하는 링커 및 임의의 이들의 조합을 포함한다. 소정의 양태에서, 링커는 화학적으로 불안정한 링커, 예컨대 중성 pH(혈류 pH 7.3-7.5)에서 안정하지만 표적 세포(예를 들어, 암 세포)의 약산성인 엔도솜(pH 5.0 내지 6.5) 및 리소좀(pH 4.5 내지 5.0)으로의 내재화 시 가수분해를 겪는 산 절단 가능한 링커이다. 화학적으로 불안정한 링커는 하이드라존계 링커, 옥심계 링커, 카보네이트계 링커, 에스테르계 링커 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 소정의 실시형태에 따르면, 링커는 효소 불안정 링커, 예컨대 혈류에서 안정하지만 예를 들어 표적 세포(예를 들어, 암 세포)의 리소좀에서 리소좀 프로테아제(예컨대, 카텝신 또는 플라스민)에 의해 표적 세포로의 내재화 시 효소 절단을 겪는 효소 불안정 링커이다. 효소 불안정 링커는 펩타이드 결합을 포함하는 링커, 예를 들어 디펩타이드계 링커, 예컨대 발린-시트룰린 링커, 예컨대 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-*p*-아미노벤질(MC-vc-PAB) 링커, 발릴-알라닐-파라-아미노벤질옥시(Val-Ala-PAB) 링커 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 화학적으로 불안정한 링커, 효소 불안정 링커 및 절단 불가능한 링커가 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Ducry & Stump (2010) *Bioconjugate Chem.* 21:5-13]에 자세히 기재되어 있다.

[0065] 링커를 통해 제1 모이어티 및 제2 모이어티를 접합하기 위해 많은 전략이 이용 가능하다. 예를 들어, 제1 모이어티는 링커를 제1 모이어티에 공유결합으로 부착시켜 유도체화될 수 있고, 여기서 링커는 제2 모이어티 상의 "화학 손잡이(chemical handle)"와 반응할 수 있는 작용기를 갖는다. 또한 예로서, 제2 모이어티는 링커를 제2 모이어티에 공유결합으로 부착시켜 유도체화될 수 있으며, 여기서 링커는 제1 모이어티 상의 "화학 손잡이"와 반응할 수 있는 작용기를 갖는다. 링커 상의 관능기는 다양할 수 있고, 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 상의 화학 손잡이와의 적합성에 기초하여 선택될 수 있다. 일 실시형태에 따르면, 화학 손잡이는 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 내로의 화학 손잡이를 갖는 비천연 아미노산의 혼입에 의해 제공된다. 일부 실시형태에서, 제1 모이어티 및 제2 모이어티의 접합은 알킨-아지드 고리화첨가에 의한다.

[0066] 본 개시내용의 이작용성 분자에 대한 다른 적합한 형식은 이중특이적 항체를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용의 이작용성 분자는 제1 모이어티(예를 들어, 제1 Fab 아암)가 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하고, 제2 모이어티(예를 들어, 제2 Fab 아암)가 리소좀 표적화 분자(예를 들어, M6PR)에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체일 수 있다. 이러한 이중특이적 항체의 도식적 예시는 도 19에 제공된다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 엔도솜의 낮은 pH에서 표적으로부터 분리된다. 이러한 전략은 주어진 이중특이적 항체가 수용체와 순환하게 허용하고, 카고 및 표적을 항체의 분해 없이 리소좀에 계속해서 전달한다. 이중특이적 항체를 제조하기 위한 접근법이 공지되어 있다. 예를 들어, 이작용성 분자가 이중특이적 항체일 때, 이중특이적 항체는 "구멍-내-손잡이"(KIH: knobs-into-hole) 접근법을 이용하여 제조될 수 있다. KIH 기술은 이종이합체화를

촉진하기 위해 각각의 중쇄에서 "손잡이" 또는 "구멍" 중 어느 하나를 생성하기 위해 CH3 도메인을 조작하는 것을 수반한다. KIH 설계 및 제조 전략은 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Xu et al. (2015) *MAbs* 7(1):231-42]; 문헌[Carter et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 248(1-2):7-15]; 문헌[Ridgway et al. (1996) *Protein Eng.* 9(7):617-2]; 및 문헌[Merchant et al. (1998) *Nat. Biotechnol.* 16(7):677-81]에 기재된 것들을 포함한다.

[0067] 조성물

[0068] 상기 요약된 바와 같이, 본 개시내용은 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 간단함의 목적을 위해 본원에 중언부언되지 않고 포함된 상기 이작용성 분자 부문에 기재된 임의의 이작용성 분자를 포함하여 본 개시내용의 임의의 이작용성 분자를 포함할 수 있다.

[0069] 소정의 양태에서, 상기 조성물은 액체 매질에 존재하는 본 개시내용의 이작용성 분자를 포함한다. 액체 매질은 수성 액체 매질, 예컨대 물, 완충 용액 등일 수 있다. 하나 이상의 첨가제, 예컨대 염(예를 들어, NaCl, $MgCl_2$, KCl, $MgSO_4$), 완충제(Tris 완충제, N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄설폰산)(HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산(MES), 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산 나트륨염(MES), 3-(N-모르폴리노)프로판설폰산(MOPS), N-트리스[하이드록시메틸]메틸-3-아미노프로판설폰산(TAPS) 등), 프로테아제 억제제, 글리세롤 등은 이러한 조성물에 존재할 수 있다.

[0070] 약제학적 조성물이 또한 제공된다. 약제학적 조성물은 본 개시내용의 임의의 이작용성 분자 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 약제학적 조성물은 일반적으로 이작용성 분자의 치료학적 유효량을 포함한다. "치료학적 유효량"은 원하는 결과를 생성하는 데 충분한 투여량, 예를 들어 이작용성 분자의 제1 모이어티가 특이적으로 결합하는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자와 연관된 세포 증식성 장애(예를 들어, 암) 등을 갖는 개체에서 세포 증식의 감소와 같은 유리한 또는 원하는 치료학적(예방학적 포함) 결과를 이끌어내는 데 충분한 양을 의미한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.

[0071] 본 개시내용의 이작용성 분자는 치료학적 투여를 위해 다양한 제형에 혼입될 수 있다. 보다 구체적으로, 이작용성 분자는 적절한 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 희석제와의 조합에 의해 약제학적 조성물로 제형화될 수 있고, 고체, 반고체, 액체 또는 기체 형태, 예컨대 정제, 캡슐, 산제, 과립제, 연고, 용액, 주사, 흡입제 및 에어로졸로 제제로 제형화될 수 있다.

[0072] 개체에 대한 투여에 적합한(예를 들어, 인간 투여에 적합한) 본 개시내용의 이작용성 분자의 제형은 일반적으로 멸균이고, 선택된 투여 경로에 따라 개체에 대한 투여에 금지된 검출 가능한 발열원 또는 다른 오염물이 게다가 없을 수 있다.

[0073] 약제학적 투여 형태에서, 이작용성 분자는 단독으로 또는 다른 약제학적 활성 화합물과의 적절한 회합뿐만 아니라, 조합으로 투여될 수 있다. 하기 방법 및 부형제는 단지 예시이며, 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0074] 경구 제제의 경우, 이작용성 분자는 단독으로, 또는 정제, 산제, 과립제 또는 캡슐을 제조하는 데 적절한 첨가제, 예를 들어 통상적인 첨가제, 예컨대 락토스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분; 결합제, 예컨대 결정질 셀룰로스, 셀룰로스 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 붕해제, 예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 또는 나트륨 카복시메틸셀룰로스; 활택제, 예컨대 탈크 또는 스테아르산마그네슘; 및 원하는 경우 희석제, 완충제, 습윤제, 보존제 및 착향료와 조합으로 사용될 수 있다.

[0075] 이작용성 분자는, 원하는 경우 통상적인 첨가제, 예컨대 가용화제, 등장제, 현탁제, 유화제, 안정화제 및 보존제와 함께, 수성 용매 또는 비수성 용매, 예컨대 식물성 오일 또는 다른 유사한 오일, 합성 지방족 산 글리세라이드, 고급 지방족 산의 에스테르 또는 프로필렌 글리콜 중에 용해되거나 현탁되거나 유화되어 주사용 제제로 제형화될 수 있다.

[0076] 약제학적 조성물은 액체 형태, 동결건조된 형태, 또는 동결건조된 형태로부터 재구성된 액체 형태일 수 있고, 여기서 동결건조된 제제는 투여 전 멸균 용액으로 재구성되어야 한다. 동결건조된 조성물을 재구성하기 위한 표준 절차는 일정 부피의 순수한 물(통상적으로 동결건조 동안 제거된 부피와 동일함)을 다시 첨가하는 것이지만; 항균제를 포함하는 용액이 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0077] 이작용성 분자의 수성 제형은 pH 완충 용액 중에, 예를 들어 약 4.0 내지 약 8.0, 예컨대 약 4.5 내지 약 7.5, 예를 들어 약 5.0 내지 약 7.0의 범위의 pH에서 제조될 수 있다. 이러한 범위 내에 pH에 적합한 완충제의 예는 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제, 시트레이트 완충제, 숙시네이트 완충제, 아세테이트 완충제 및 다른 유기산 완충제를 포함한다. 완충제 농도는, 예를 들어 완충제 및 제형의 원하는 등장성에 따라, 약 1 mM 내지 약

100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM일 수 있다.

[0078] 사용 방법

[0079] 상기 요약된 것처럼, 본 개시내용의 이작용성 분자를 사용하는 방법이 또한 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 간단함의 목적을 위해 본원에 중언부언되지 않고 포함된 상기 이작용성 분자 부문에 기재된 임의의 이작용성 분자를 사용하는 것을 포함한다.

[0080] 소정의 양태에서, 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 리소좀 표적화 분자가 분해를 위해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 리소좀에 실어나르는 조건 하에 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 본 개시내용의 이작용성 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 다양한 분야에 사용된다. 소정의 양태에서, 상기 방법은 시험관내(예를 들어, 관, 세포 배양 플레이트 또는 웰 등에서) 수행되고, 예를 들어 시험 분야 및/또는 조사 분야에 사용된다. 다른 양태에서, 상기 방법은 생체내(예를 들어, 이작용성 분자가 투여된 개체에서) 수행되고, 예를 들어 임상/치료 분야에 사용된다.

[0081] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 임의의 이작용성 분자 또는 임의의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 다양한 개체가 해당 방법에 따라 치료 가능하다. 일반적으로, 이러한 대상은 "포유동물" 또는 "포유류"이고, 여기서 이러한 용어는 육식동물(예를 들어, 개 및 고양이), 설치류(예를 들어, 마우스, 기니어 피그 및 래트) 및 영장류(예를 들어, 인간, 침팬지 및 원숭이) 목을 포함하는 포유류 강 내에 있는 유기체를 기재하는 데 광범위하게 사용된다. 일부 실시형태에서, 개체는 사람이다.

[0082] 일부 실시형태에서, 이작용성 분자(또는 이를 포함하는 약제학적 조성물)의 유효량은 단독으로(예를 들어, 단일 요법으로) 또는 하나 이상의 부가적인 치료제와 조합으로(예를 들어, 병용 요법으로) 하나 이상의 용량으로 투여될 때 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물의 부재 하의 개체에서의 증상과 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 이것 초과로 개체의 의학 병태(예를 들어, 암, 신경퇴행성 장애 등)의 증상을 감소시키기에 효과적인 양이다.

[0083] 소정의 양태에서, 개체는 뇌에서의 아밀로이드-β 침착(예를 들어, 알츠하이머병) 또는 뇌에서의 타우 단백질 침착(예를 들어, 타우병증)을 특징으로 하는 신경퇴행성 장애를 갖거나 갖는 것으로 의심되고, apoE4의 표적화된 분해가 개체의 신경퇴행성 장애를 치료하도록 이작용성 분자의 제1 모이어티는 apoE4(예를 들어, APOE4 유전자의 ε4 대립유전자로부터 발현된 apoE4)에 특이적으로 결합한다.

[0084] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 임의의 이작용성 분자 또는 임의의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 암을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 이러한 방법에 따르면, 이작용성 분자의 제1 모이어티는 적어도 개체의 암에 기여하는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하고, 이작용성 분자를 사용한 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 표적화된 분해는 개체의 암을 치료한다. 소정의 양태에서, 제1 모이어티는 암 세포 상의 세포 표면 분자, 암 세포 상의 세포 표면 분자에 대한 리간드, 면역 세포 상의 세포 표면 분자, 면역 세포 상의 세포 표면 분자에 대한 리간드, 억제 면역 수용체 및 억제 면역 수용체의 리간드로부터 선택되는 분자에 특이적으로 결합한다.

[0085] 소정의 실시형태에서, 개체는 고형 종양, 반고형 종양, 원발성 종양, 전이성 종양 등의 존재를 특징으로 하는 암을 갖는다. 일부 실시형태에서, 개체는 유방암, 흑색종, 폐암, 결장직장암, 전립선암, 신경교종, 방광암, 자궁내막암, 신장암, 백혈병(예를 들어, 급성 골수성 백혈병(AML: acute myeloid leukemia)) 간암 (예를 들어, 간세포 암종(HCC), 예컨대 원발성 HCC 또는 재발성 HCC), 비호지킨 림프종, 췌장암, 갑상선암으로부터 선택된 암, 임의의 이들의 조합, 및 임의의 이들의 하위유형을 갖는다.

[0086] 일부 실시형태에 따르면, 개체는 특정 간 질환(비제한적인 예로서 간세포 암종(HCC)을 포함함)을 갖고, 상기 방법은 질환을 치료하기 위한 것이다. 예를 들어, 소정의 실시형태에 따르면, 개체는 HCC를 갖고, 제1 모이어티는 개체의 HCC 세포 상의 세포 표면 분자에 결합하고, 제2 모이어티는 ASGPR에 결합한다. 소정의 실시형태에서, 제1 모이어티는 개체의 HCC 세포 상의 종양 촉진 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에 따르면, 종양 촉진 단백질은 HCC 세포 상의 성장 인자이다. 이러한 성장 인자의 비제한적인 예는 EGFR, C-Met, IGF1R 및 FGFR4를 포함한다. 이러한 이작용성 분자는 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같은 ASGPR에 결합하는 임의의 제2 모이어티를 포함할 수 있다.

[0087] 소정의 실시형태에서, 개체는 간의 섬유증을 갖고, 상기 방법은 간 섬유증을 치료하기 위한 것이다. 예를 들어,

일부 실시형태에 따르면, 개체는 간 섬유증을 갖고, 제1 모이어티는 개체의 섬유증 간 세포 상의 세포 표면 분자에 결합하고, 제2 모이어티는 ASGPR에 결합한다. 소정의 실시형태에서, 제1 모이어티는 개체의 섬유증 간 세포 상의 섬유증 촉진 단백질에 결합한다. 일부 실시형태에 따르면, 섬유증 촉진 단백질은 섬유증 간 세포 상의 성장 인자이다. 이러한 성장 인자의 비제한적인 예는 PDGFR이다. 이러한 이작용성 분자는 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같은 ASGPR에 결합하는 임의의 제2 모이어티를 포함할 수 있다.

[0088] 본 개시내용의 이작용성 분자를 사용하는 임의의 방법에서, 소정의 실시형태에서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시킨다. 유사하게, 본 개시내용의 이작용성 분자를 사용하는 임의의 방법에서, 일부 실시형태에 따르면, 이작용성 분자는 제1 모이어티 또는 제2 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시킨다. 이러한 분해 증대에 관한 상세내용은 간단함의 목적을 위해 본원에 중언부언되지 않고 포함된 상기 이작용성 분자 부문에 제공된다.

[0089] "치료한다", "치료하는" 또는 "치료"는 적어도 개체의 의학 병태(예를 들어, 세포 증식성 장애, 예를 들어 암)와 관련된 증상의 개선을 의미하고, 여기서 개선은 넓은 의미에서 치료하고자 하는 의학 병태와 관련된 매개변수, 예를 들어 증상의 규모를 적어도 감소시키는 것을 지칭한다. 이와 같이, 치료는 또한 개체가 더이상 의학 병태 또는 적어도 의학 병태를 특징으로 하는 증상으로 고통받지 않도록 의학 병태 또는 적어도 이와 관련된 증상이 완전히 억제되는, 예를 들어 발생이 예방되는 또는 중단되는, 예를 들어 종결되는 상황을 포함한다.

[0090] 소정의 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물을 ADCC를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 항체 의존적 세포 독성(ADCC)을 향상시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 이작용성 분자의 제1 모이어티는 억제 면역 수용체 또는 억제 면역 수용체의 리간드에 특이적으로 결합한다. 소정의 양태에서, 이작용성 분자의 제1 모이어티는 PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, TIGIT 또는 B7 패밀리의 구성원과 같은 면역 관문 분자에 특이적으로 결합한다.

[0091] 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은, 생체내 방법 및 생체외 방법뿐만 아니라, 전신 투여 경로 및 국소 투여 경로를 포함하는, 약물 전달에 적합한 임의의 이용 가능한 방법 및 경로를 사용하여 개체에게 투여될 수 있다. 종래의 및 약제학적으로 허용되는 투여 경로는 비강내, 근육내, 기관내, 피하, 진피내, 국부 도포, 안구, 정맥내, 동맥내, 비강, 경구, 및 다른 장관 및 비경구 투여 경로를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 비경구 투여에 의한다. 투여 경로는 이작용성 분자 및/또는 원하는 효과에 따라 원하는 경우 조합되거나 조정될 수 있다. 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 실시형태에서, 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은 예를 들어 전신 전달(예를 들어, 정맥내 주입)을 위한 또는 국소 부위에의 주사에 의해 투여된다.

[0092] 키트

[0093] 상기 요약된 바와 같이, 본 개시내용은 또한 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 해당 키트는 본 개시내용의 임의의 이작용성 분자(간단함의 목적을 위해 본원에 중언부언되지 않고 포함된 상기 이작용성 분자 부문에 기재된 임의의 이작용성 분자를 포함함), 및 제1 모이어티가 특이적으로 결합하는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위해 이작용성 분자의 사용에 대한 지침을 포함한다. 소정의 양태에서, 지침은 시험관내, 예를 들어 조사 목적 및/또는 시험 목적을 위해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 것이다. 다른 양태에서, 지침은 생체내 분야, 예를 들어 임상/치료 분야에 대해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 것이다. 예를 들어, 본 개시내용의 임의의 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물, 및 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 지침을 포함하는 키트가 제공된다. 이러한 키트는 단위 투여량, 예를 들어 앰플 또는 다중 투여량 형식으로 존재하는 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물의 분량을 포함할 수 있다. 이와 같이, 소정의 실시형태에서, 키트는 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물의 1 이상(예를 들어, 2 이상)의 단위 투여량(예를 들어, 앰플)을 포함할 수 있다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단위 투여량"은 인간 및 동물 대상체에 대한 통합 투여량으로 적합한 물리적으로 구별되는 단위를 지칭하고, 각각의 단위는 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양으로 계산된 조성물의 선결정된 분량을 함유한다. 단위 투여량의 양은 개체에서 사용된 특정 이작용성 분자, 달성되는 효과 및 이작용성 분자와 연관된 약력학과 같은 다양한 인자에 따라 달라진다. 또 다른 실시형태에서, 키트는 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물의 단일의 다중 투여량을 포함할 수 있다.

[0095] 다른 양태에서, 본 개시내용의 임의의 글리코폴리머(간단함의 목적을 위해 본원에 중언부언되지 않고 포함된 상

기 이작용성 분자 부문에 기재된 임의의 글리코폴리머를 포함함), 및 글리코폴리머를 관심 분자에 접합하기 위한 지침을 포함하는 키트가 제공된다. 이러한 키트는 글리코폴리머를 관심 분자에 접합하기 위한 시약을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 관심 분자는 폴리펩타이드이다. 이러한 폴리펩타이드의 비제한적인 예는 항체를 포함한다. 소정의 양태에서, 관심 분자는 간단함의 목적을 위해 본원에 중언부언되지 않고 포함된 상기 이작용성 분자 부문에 기재된 임의의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 포함하여 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합한다.

[0096] 키트의 구성요소가 별도의 용기에 존재할 수 있거나, 다수의 구성요소가 단일의 용기에 존재할 수 있다.

[0097] 키트에 포함된 지침은 적합한 기록 매체에 기록될 수 있다. 예를 들어, 지침은 종이 또는 플라스틱 등과 같은 기재에 인쇄될 수 있다. 이와 같이, 지침은 키트에 패키지 삽입물로서 존재할 수 있거나, 키트 또는 이의 구성요소의 용기의 표지(즉, 포장 또는 속포장과 결합되어) 등에 존재할 수 있다. 다른 실시형태에서, 지침은 적합한 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체, 예를 들어 휴대용 플래시 드라이브, DVD, CD-ROM, 디스켓 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 실제 지침은 키트에 존재하지 않고, 원격 소스로부터, 예를 들어 인터넷을 통해 지침을 얻기 위한 수단이 제공된다. 이러한 실시형태의 예는 지침을 볼 수 있고/있거나 지침을 다운로드할 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 지침에서와 같이, 지침을 얻기 위한 수단이 적합한 기재에 기록된다.

[0098] 글리코폴리머, 단량체 및 이의 제조 방법

[0099] 본 개시내용은 또한 글리코폴리머를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 글리코폴리머는 중합체 스캐폴드 및 중합체 스캐폴드에 부착된 하나 이상의 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR) 리간드를 포함한다. 글리코폴리머, 중합체 스캐폴드, 및/또는 M6PR 리간드는 간단함의 목적을 위해 본원에 중언부언되지 않고 포함된 상기 이작용성 분자 부문에 기재된 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, 글리코폴리머는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 당단백질일 수 있다. 당단백질은 N-카복시언하이드라이드 (NCA) 유래 당단백질일 수 있다. 소정의 양태에서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 M6P 유사체, 예컨대 하나 이상의 만노스-6-포스포네이트(M6Pn)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합체 스캐폴드는 1개 내지 50개의 M6PR 리간드, 예컨대 1개 내지 40개, 1개 내지 30개, 1개 내지 20개, 1개 내지 10개(예를 들어, 1개 내지 6개), 또는 1개 내지 5개의 M6PR 리간드를 포함한다. 소정의 양태에서, 중합체 스캐폴드는 10개 내지 50개, 15개 내지 45개, 20개 내지 40개, 또는 25개 내지 35개의 M6PR 리간드를 포함한다. 소정의 양태에서, 중합체 스캐폴드는 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 또는 40개 이상의 M6PR 리간드를 포함한다.

[0100] 본 개시내용의 글리코폴리머를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 일부 실시형태에서, 글리코폴리머의 제조는 중합을 포함한다. 중합은 NCA 중합에 의할 수 있고, 이의 예는 도 8에 도식적으로 예시된다.

[0101] 소정의 양태에서, 글리코폴리머를 제조하는 방법은 하나 이상의 M6PR 리간드를 중합체 스캐폴드에 부착하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 상기 방법은 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 단량체로부터 중합체 스캐폴드를 합성하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 스캐폴드는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 단량체로부터 중합될 수 있고, 합성하는 단계는 고상 합성에 의한다. 예시적인 고상 합성 반응식은 도 9에 제공된다.

[0102] 관련 양태에서, 본 개시내용은 단량체를 제공한다. 단량체는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR) 리간드로 작용기화된다. 소정의 양태에서, 단량체는 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 단량체는 비천연 아미노산이다. 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 M6P 유사체, 예컨대 만노스-6-포스포네이트(M6Pn)를 포함할 수 있다.

[0103] 첨부된 청구범위에 불구하고, 본 개시내용은 또한 하기 실시형태에 의해 정의된다:

[0104] 1. 이작용성 분자로서,

[0105] 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는 제1 모이어티; 및

[0106] 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는, 이작용성 분자.

[0107] 2. 실시형태 1에 있어서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의

분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시키는, 이작용성 분자.

[0108] 3. 실시형태 1 또는 실시형태 2에 있어서, 제1 모이어티는 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

[0109] 4. 실시형태 3에 있어서, 세포 표면 분자는 세포 표면 수용체인, 이작용성 분자.

[0110] 5. 실시형태 4에 있어서, 세포 표면 수용체는 성장 인자 수용체인, 이작용성 분자.

[0111] 6. 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 세포 표면 분자는 암 세포에 존재하는, 이작용성 분자.

[0112] 7. 실시형태 6에 있어서, 세포 표면 분자는 종양 연관된 항원 또는 종양 특이적 항원인, 이작용성 분자.

[0113] 8. 실시형태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 세포 표면 분자는 면역 세포에 존재하는, 이작용성 분자.

[0114] 9. 실시형태 8에 있어서, 면역 세포는 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 중성구, 수지상 세포, T 세포, B 세포, 비만 세포, 호염기구 및 호산구로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

[0115] 10. 실시형태 8에 있어서, 세포 표면 분자는 억제 면역 수용체인, 이작용성 분자.

[0116] 11. 실시형태 10에 있어서, 세포 표면 분자는 억제 면역 수용체의 리간드인, 이작용성 분자.

[0117] 12. 실시형태 8에 있어서, 세포 표면 분자는 면역 관문 분자인, 이작용성 분자.

[0118] 13. 실시형태 12에 있어서, 면역 관문 분자는 PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, TIGIT 및 B7 패밀리의 구성원으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

[0119] 14. 실시형태 1에 있어서, 제1 모이어티는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

[0120] 15. 실시형태 14에 있어서, 세포외 분자는 세포 표면 수용체에 대한 리간드인, 이작용성 분자.

[0121] 16. 실시형태 15에 있어서, 세포외 분자는 성장 인자인, 이작용성 분자.

[0122] 17. 실시형태 15에 있어서, 세포외 분자는 사이토카인 또는 케모카인인, 이작용성 분자.

[0123] 18. 실시형태 14에 있어서, 세포외 분자는 항체인, 이작용성 분자.

[0124] 19. 실시형태 18에 있어서, 항체는 자가항체인, 이작용성 분자.

[0125] 20. 실시형태 18 또는 실시형태 19에 있어서, 항체는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

[0126] 21. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드, 리간드, 압타머, 나노입자 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

[0127] 22. 실시형태 21에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드인, 이작용성 분자.

[0128] 23. 실시형태 22에 있어서, 제1 모이어티는 항체인, 이작용성 분자.

[0129] 24. 실시형태 23에 있어서, 항체는 IgG, 단쇄 Fv (scFv), Fab, $(Fab)_2$, $(scFv')_2$ 또는 나노바디인, 이작용성 분자.

[0130] 25. 실시형태 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 폴리펩타이드, 리간드, 압타머, 나노입자 및 소분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

[0131] 26. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR)인, 이작용성 분자.

[0132] 27. 실시형태 26에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0133] 28. 실시형태 27에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함하는, 이작용성 분자.

[0134] 29. 실시형태 27 또는 실시형태 28에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체를 포함하는, 이작용성 분자.

[0135] 30. 실시형태 29에 있어서, 하나 이상의 M6P 유사체는 하나 이상의 만노스-6-포스포네이트(M6Pn)를 포함하는,

이작용성 분자.

[0136] 31. 실시형태 27 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 1개 내지 500개의 M6PR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0137] 32. 실시형태 27 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 M6PR 리간드를 나타내는 중합체 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0138] 33. 실시형태 32에 있어서, 중합체 스캐폴드는 하나 이상의 M6PR 리간드를 포함하는 글리코폴리머인, 이작용성 분자.

[0139] 34. 실시형태 33에 있어서, 글리코폴리머는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 당단백질인, 이작용성 분자.

[0140] 35. 실시형태 34에 있어서, 당단백질은 N-카복시언하이드라이드(NCA) 유래 당단백질인, 이작용성 분자.

[0141] 36. 실시형태 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 간 세포의 표면에서 발현되는, 이작용성 분자.

[0142] 37. 실시형태 36에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 간세포의 표면에서 발현되는, 이작용성 분자.

[0143] 38. 실시형태 36 또는 실시형태 37에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 간세포 암종(HCC) 세포, 섬유증 간 세포 또는 둘 다의 표면에서 발현되는, 이작용성 분자.

[0144] 39. 실시형태 36 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 리소좀 표적화 분자는 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)인, 이작용성 분자.

[0145] 40. 실시형태 39에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0146] 41. 실시형태 40에 있어서, 하나 이상의 ASGPR 리간드는 하나 이상의 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함하는, 이작용성 분자.

[0147] 42. 실시형태 40 또는 실시형태 41에 있어서, 하나 이상의 ASGPR 리간드는 하나 이상의 갈락토스를 포함하는, 이작용성 분자.

[0148] 43. 실시형태 40 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 ASGPR 리간드는 하나 이상의 글루코스를 포함하는, 이작용성 분자.

[0149] 44. 실시형태 40 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 1개 내지 500개의 ASGPR 리간드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0150] 45. 실시형태 40 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 하나 이상의 ASGPR 리간드를 포함하는 중합체를 포함하는, 이작용성 분자.

[0151] 46. 실시형태 45에 있어서, 제2 모이어티는 제2 모이어티는 폴리(GalNAc-코-Ala)를 포함하는, 이작용성 분자.

[0152] 47. 실시형태 41에 있어서, 제2 모이어티는 1가, 2가 또는 3가 GalNAc 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0153] 48. 실시형태 47에 있어서, 제2 모이어티는 3가 GalNAc 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0154] 49. 실시형태 42에 있어서, 제2 모이어티는 1가, 2가 또는 3가 갈락토스 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0155] 50. 실시형태 49에 있어서, 제2 모이어티는 3가 갈락토스 함유 덴드리머 스캐폴드를 포함하는, 이작용성 분자.

[0156] 51. 실시형태 36 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 제1 모이어티는 간세포에 발현된 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는, 이작용성 분자.

[0157] 52. 실시형태 51에 있어서, 세포 표면 분자는 성장 인자 수용체인, 이작용성 분자.

[0158] 53. 실시형태 52에 있어서, 성장 인자 수용체는 표피 성장 인자 수용체(EGFR), C-Met, 인슐린양 성장 인자 1 수용체(IGF1R), 섬유아세포 성장 인자 수용체 4(FGFR4) 및 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 이작용성 분자.

[0159] 54. 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드이고, 제2 모이어티는 폴리펩타이드이고, 이작용성 분자는 제2 모이어티에 융합된 제1 모이어티를 포함하는 융합 단백질인, 이작용성 분자.

[0160] 55. 실시형태 54에 있어서, 제1 모이어티는 제2 모이어티에 직접 융합된, 이작용성 분자.

[0161] 56. 실시형태 54에 있어서, 제1 모이어티와 제2 모이어티 사이에 스페이서 도메인을 포함하는, 이작용성 분자.

[0162] 57. 실시형태 1 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 이작용성 분자는

[0163] 세포 표면 분자 또는 세포외 분자; 및

[0164] 리소좀 표적화 분자에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체인, 이작용성 분자.

[0165] 58. 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 이작용성 분자는 제2 모이어티에 접합된 제1 모이어티를 포함하는 접합체인, 이작용성 분자.

[0166] 59. 실시형태 58에 있어서, 제1 모이어티는 항체인, 이작용성 분자.

[0167] 60. 실시형태 58 또는 실시형태 59에 있어서, 실시형태 27 내지 35 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 제2 모이어티를 포함하는, 이작용성 분자.

[0168] 61. 실시형태 58 또는 실시형태 59에 있어서, 실시형태 40 내지 50 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 제2 모이어티를 포함하는, 이작용성 분자.

[0169] 62. 실시형태 54 내지 57 중 어느 하나의 이작용성 분자를 암호화하는 핵산.

[0170] 63. 실시형태 62의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

[0171] 64. 실시형태 62의 핵산 또는 실시형태 63의 발현 벡터를 포함하는 세포.

[0172] 65. 실시형태 62의 핵산 또는 실시형태 63의 발현 벡터를 세포로 도입하는 단계를 포함하는, 실시형태 64의 세포를 제조하는 방법.

[0173] 66. 제1 모이어티를 제2 모이어티에 접합하는 단계를 포함하는, 실시형태 58 또는 실시형태 59의 이작용성 분자를 제조하는 방법.

[0174] 67. 실시형태 66에 있어서, 접합하는 단계는 제1 모이어티를 제2 모이어티에 부위 특이적으로 접합하는 단계를 포함하는, 방법.

[0175] 68. 실시형태 67에 있어서, 제1 모이어티는 폴리펩타이드를 포함하고, 접합하는 단계는 제2 모이어티를 제1 모이어티의 미리 선택된 아미노산에 부위 특이적으로 접합하는 단계를 포함하는, 방법.

[0176] 69. 실시형태 68에 있어서, 미리 결정된 아미노산은 제1 모이어티의 N 말단 또는 C 말단에 있는, 방법.

[0177] 70. 실시형태 68에 있어서, 미리 결정된 아미노산은 제1 모이어티의 내부에 있는, 방법.

[0178] 71. 실시형태 68 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 미리 결정된 아미노산은 비천연 아미노산인, 방법.

[0179] 72. 실시형태 66 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 제1 모이어티는 항체인, 방법.

[0180] 73. 실시형태 66 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 실시형태 27 내지 35 중 어느 하나에 정의된 바와 같은, 방법.

[0181] 74. 실시형태 66 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 실시형태 40 내지 50 중 어느 하나에 정의된 바와 같은, 방법.

[0182] 75. 실시형태 66 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 접합하는 단계는 알킨-아지드 고리화첨가에 의한, 방법.

[0183] 76. 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하는 방법으로서,

[0184] 리소좀 표적화 분자가 분해를 위해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 리소좀에 실어나르는 조건 하에 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 실시형태 1 내지 61 중 어느 하나의 이작용성 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0185] 77. 실시형태 76에 있어서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자

의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시키는, 방법.

[0186] 78. 실시형태 76 또는 실시형태 77에 있어서, 상기 방법은 시험관내 수행되는, 방법.

[0187] 79. 실시형태 76 또는 실시형태 77에 있어서, 상기 방법은 생체외 수행되는, 방법.

[0188] 80. 약제학적 조성물로서,

[0189] 실시형태 1 내지 61 중 어느 하나의 이작용성 분자; 및

[0190] 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

[0191] 81. 실시형태 80에 있어서, 상기 조성물은 비경구 투여를 위해 제형화된, 방법.

[0192] 82. 실시형태 80 또는 실시형태 81의 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0193] 83. 실시형태 80 또는 실시형태 81의 약제학적 조성물의 유효량을 암을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

[0194] 84. 실시형태 83에 있어서, 제1 모이어티는 암 세포 상의 세포 표면 분자, 암 세포 상의 세포 표면 분자에 대한 리간드, 면역 세포 상의 세포 표면 분자, 면역 세포 상의 세포 표면 분자에 대한 리간드, 억제 면역 수용체 및 억제 면역 수용체의 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자에 특이적으로 결합하는, 방법.

[0195] 85. 실시형태 83 또는 실시형태 84에 있어서, 개체는 간세포 암종(HCC)을 갖고, 제1 모이어티는 개체의 HCC 세포 상의 세포 표면 분자에 결합하고, 제2 모이어티는 ASGPR에 결합하는, 방법.

[0196] 86. 실시형태 85에 있어서, 제1 모이어티는 개체의 HCC 세포 상의 성장 인자에 결합하는, 방법.

[0197] 87. 실시형태 90에 있어서, 제1 모이어티는 EGFR, C-Met, IGF1R 및 FGFR4로 이루어진 군으로부터 선택되는 성장 인자에 결합하는, 방법.

[0198] 88. 실시형태 85 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 제2 모이어티는 실시형태 36 내지 실시형태 50 중 어느 하나에 정의된 바와 같은, 방법.

[0199] 89. 실시형태 80 또는 실시형태 81의 약제학적 조성물을 ADCC를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 항체 의존적 세포 독성(ADCC)을 향상시키는 방법.

[0200] 90. 실시형태 80 또는 실시형태 81의 약제학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암의 면역원성을 향상시키는 방법.

[0201] 91. 실시형태 89 또는 실시형태 90에 있어서, 제1 모이어티는 억제 면역 수용체 및 억제 면역 수용체의 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는 분자에 특이적으로 결합하는, 방법.

[0202] 92. 실시형태 82 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 투여하는 단계는 비경구 투여에 의한, 방법.

[0203] 93. 실시형태 82 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 이작용성 분자는 제1 모이어티 단독의 존재 하의 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해에 비해 세포 표면 분자 또는 세포외 분자의 분해를 향상시키는, 방법.

[0204] 94. 키트로서,

[0205] 실시형태 1 내지 61 중 어느 하나의 이작용성 분자; 및

[0206] 제1 모이어티가 특이적으로 결합하는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 지침을 포함하는, 키트.

[0207] 95. 실시형태 94에 있어서, 지침은 시험관내 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 것인, 키트.

[0208] 96. 실시형태 94에 있어서, 지침은 생체내 세포 표면 분자 또는 세포외 분자를 분해하기 위한 것인, 키트.

[0209] 97. 키트로서,

[0210] 실시형태 1 내지 61 중 어느 하나의 이작용성 분자 또는 실시형태 80 또는 실시형태 81의 약제학적 조성물; 및

[0211] 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 지침을 포함하는, 키트.

[0212] 98. 실시형태 97에 있어서, 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은 1개 이상의 단위 투여량으로 존재하는, 키트.

[0213] 99. 실시형태 97에 있어서, 이작용성 분자 또는 약제학적 조성물은 2개 이상의 단위 투여량으로 존재하는, 키트.

[0214] 100. 글리코폴리머로서,

[0215] 중합체 스캐폴드; 및

[0216] 중합체 스캐폴드에 부착된 하나 이상의 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR) 리간드를 포함하는, 글리코폴리머.

[0217] 101. 실시형태 100에 있어서, 글리코폴리머는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 당단백질인, 글리코폴리머.

[0218] 102. 실시형태 101에 있어서, 당단백질은 N-카복시언하이드라이드(NCA) 유래 당단백질인, 글리코폴리머.

[0219] 103. 실시형태 100 내지 102 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함하는, 글리코폴리머.

[0220] 104. 실시형태 100 내지 103 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유사체를 포함하는, 글리코폴리머.

[0221] 105. 실시형태 104에 있어서, 하나 이상의 M6P 유사체는 하나 이상의 만노스-6-포스포네이트(M6Pn)를 포함하는, 글리코폴리머.

[0222] 106. 실시형태 100 내지 105 중 어느 하나에 있어서, 중합체 스캐폴드는 1개 내지 500개의 M6PR 리간드를 포함하는, 글리코폴리머.

[0223] 107. 실시형태 100 내지 106 중 어느 하나의 글리코폴리머를 제조하는 방법으로서,

[0224] 하나 이상의 M6PR 리간드를 중합체 스캐폴드에 부착하는 단계; 또는

[0225] 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 단량체로부터 중합체 스캐폴드를 합성하는 단계를 포함하는, 방법.

[0226] 108. 실시형태 107에 있어서, 스캐폴드는 하나 이상의 M6PR 리간드로 작용기화된 하나 이상의 단량체로부터 중합되고, 합성하는 단계는 고상 합성에 의한, 방법.

[0227] 109. 실시형태 108에 있어서, 글리코폴리머는 당단백질 중합체이고, 합성하는 단계는 고상 펩타이드 합성에 의한, 방법.

[0228] 110. 키트로서,

[0229] 실시형태 100 내지 106 중 어느 하나의 글리코폴리머; 및

[0230] 글리코폴리머를 관심 분자에 접합하기 위한 지침을 포함하는, 키트.

[0231] 111. 실시형태 110에 있어서, 글리코폴리머를 관심 분자에 접합하기 위한 시약을 추가로 포함하는, 키트.

[0232] 112. 실시형태 110 또는 실시형태 111에 있어서, 관심 분자는 폴리펩타이드인, 키트.

[0233] 113. 실시형태 112에 있어서, 폴리펩타이드는 항체인, 키트.

[0234] 114. 실시형태 110 내지 113 중 어느 하나에 있어서, 관심 분자는 세포 표면 분자 또는 세포외 분자에 특이적으로 결합하는, 키트.

[0235] 115. 하나 이상의 만노스-6-포스페이트 수용체(M6PR) 리간드로 작용기화된 단량체.

[0236] 116. 실시형태 115에 있어서, 단량체는 아미노산인, 단량체.

[0237] 117. 실시형태 115에 있어서, 단량체는 비천연 아미노산인, 단량체.

[0238] 118. 실시형태 115 내지 117 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함하는, 단량체.

[0239] 119. 실시형태 115 내지 실시형태 118 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 M6PR 리간드는 하나 이상의 M6P 유

사체를 포함하는, 단량체.

[0240] 120. 실시형태 119에 있어서, 하나 이상의 M6P 유사체는 하나 이상의 만노스-6-포스포네이트(M6Pn)를 포함하는, 단량체.

[0241] 하기 실시예는 제한의 방식이 아니라 예시의 방식으로 제공된다.

[0242] 실험

[0243] 실시예 1 - 만노스-6-포스페이트 중합체는 카고를 리소좀에 실어나른다

[0244] 이작용성 분자가 분해를 위해 세포외 공간으로부터 리소좀으로의 NeutrAvidin-647(NA647 - 비오틴이 강하게 결합하는 단백질)의 이동을 매개할 수 있는지를 결정하기 위해 비오틴 캡(본원에 사용된 바와 같은 "제1 모이어티" - 도 10에 삼각형으로 도시됨) 및 M6Pn 중합체(본원에 사용된 바와 같은 "제2 모이어티")를 포함하는 이작용성 분자(도 10 참조)가 이 실시예에서 시험되었다. 도 10은 단백질 및 리소좀 염색 염료 둘 다의 동시국재화가 관찰되므로 이작용성 분자가 리소좀으로의 NeutrAvidin-647의 이동을 실제로 매개할 수 있다는 것을 입증하는 형광 영상화 결과(하부)를 제공한다.

[0245] 다음에, 다양한 세포주를 상기 기재된 바의 방식으로 시험하였다. 몇몇 세포주가 M6Pn 중합체 의존적 방식으로 NA647의 흡수를 나타낸다는 것을 입증하는 데이터가 도 11에 도시되어 있다. 이 결과의 관점에서, M6PR(예를 들어, CIM6PR)을 보유하는 임의의 세포주가 이 방법에 의해 세포 표면 및 세포외 분자의 리소좀으로의 실어나르기를 허용할 것이고, 본 연구에서 시험된 세포주로 제한되지 않는 것으로 기대된다.

[0246] 실시예 2 - M6Pn-접합된 항체는 표적을 리소좀에 실어나른다

[0247] 제1 모이어티가 관심 특정 표적에 결합하는 항체이고, 제2 모이어티가 M6Pn 함유 당단백질인 이작용성 분자를 이 실시예에서 시험하였다.

[0248] 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 이의 결합 파트너를 리소좀으로 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 도식적 예시(상부) 및 형광 영상화 데이터(하부)가 도 13에 제공된다. 이 실시예에서, 마우스 IgG-488을 단백질 및 리소좀 염색 염료 둘 다의 동시국재화(병합)로 폴리(M6Pn) 태그를 보유하는 항-마우스 IgG 항체와 항온처리하였다.

[0249] 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 이의 결합 파트너를 세포내 구획으로 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 도식적 예시(상부) 및 추가의 데이터(하부)가 도 14에 제공된다. 이 실시예에서, 재조합 인간 apoE4를 마우스 유래 항-인간 apoE4 항체, 항-마우스 IgG 항체 또는 폴리(M6Pn) 태그를 보유하는 항-마우스 항체와 항온처리하였다. M6Pn 함유 이차 항체로 유의미하게 더 많은 흡수가 관찰된다.

[0250] 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 분해를 위해 이의 결합 파트너를 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 추가의 데이터가 도 15에 제공된다. 이 실시예에서, 세포를 M6Pn 태그를 보유하는 세툭시맙과 항온처리하여 EGFR 분해를 평가하였다. 총 EGFR의 소실은 세툭시맙 또는 모의 중합체(GalNAc)를 보유하는 세툭시맙과 비교하여 시험된 모든 세포주에 관찰된다. EGF는 EGFR 분해에 대한 양성 대조군이다. 레인 1: 대조군. 레인 2: EGF (100 ng/mL, 1시간, + 대조군). 레인 3: 세툭시맙. 레인 4: 세툭시맙-GalNAc 접합체. 레인 5: 세툭시맙-M6P 접합체(긴). 레인 6: 세툭시맙-M6P 접합체(짧은). 대조군의 퍼센트는 농도계측에 의해 결정되었다.

[0251] 폴리(M6Pn) 표지된 항체 단편이 분해를 위해 이의 결합 파트너를 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 데이터가 도 16에 제공된다. 이 실시예에서, 세포를 M6Pn 태그를 보유하는 세툭시맙 유래 Fab 부분과 항온처리하여 EGFR 분해를 평가하였다. 총 EGFR의 소실은 세툭시맙 Fab 단독 또는 모의 중합체(GalNAc)를 보유하는 세툭시맙 Fab와 비교하여 관찰된다.

[0252] 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 분해를 위해 이의 결합 파트너를 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 추가의 데이터가 도 17에 제공된다. 이 실시예에서, 세포를 CD71에 대한 일차 마우스 유래 항체, 항-마우스 IgG 항체 또는 폴리(M6Pn) 태그를 보유하는 항-마우스 항체와 항온처리하여 CD71(트랜스페린 수용체)의 분해를 평가하였다. M6P 태그를 함유하는 시스템은 유의미하게 분해를 더 생성시킨다.

[0253] 폴리(M6Pn) 표지된 항체가 분해를 위해 이의 결합 파트너를 실어나를 수 있다는 것을 입증하는 추가의 데이터가 도 18에 제공된다. 이 실시예에서, 세포를 항-PDL1 항체 또는 M6P 태그를 보유하는 항-PDL1 항체와 항온처리하여 PDL1 분해를 평가하였다. 분해는 오직 M6P 표지된 항-PDL1 항체로 관찰된다.

[0254] 실시예 3 - ASGPR 리간드는 카고를 간세포에서의 리소좀에 실어나른다

[0255] 몇몇 현재의 치료는 오프 표적 효과를 겪는다. 간암 및 간 섬유증과 같은 간 관련 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있는 간에서의 단백질의 표적화된 분해가 이 실시예에 기재된다. 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)라 불리는 소거제 수용체는 간 세포(간세포)에서 배타적으로 또는 거의 배타적으로 발현된다. 도 20(왼쪽)에 도식적으로 예시된 것처럼, ASGPR은 항시적으로 혈장 막과 엔도솜 사이에 재순환한다. ASGPR은 세포외 당단백질을 리소좀에서 분해를 위해 세포 내에 가져온다. 이러한 막 또는 세포외 단백질에 결합하는 제1 모이어티 및 ASGPR 리간드를 포함하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자를 사용하여 간세포 상의 세포외 단백질 또는 막 단백질을 분해하기 위한 이 수용체의 이용이 본원에 입증된다.

[0256] ASGPR 관련된 실시예에서 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)의 중합체, 특히 도 20(하부 왼쪽)에 도시된 바와 같은 폴리(GalNAc-코-Ala) 중합체를 포함하는 제2 모이어티에 접합된 분해되는 표적 분자에 결합하는 항체를 포함하는 이작용성 분자를 시험하였다.

[0257] ASGPR 리간드를 포함하는 이작용성 분자가 간세포에서 카고를 리소좀에 실어나를 수 있는지를 평가하기 위해, 도 21에 도식적으로 예시된 검정이 이용되었다. 이작용성 분자가 간세포의 세포내 구획으로 세포외 형광 표지된 마우스 IgG(IgG-AF647)를 실어나를 수 있는지를 결정하기 위해 폴리(GalNAc-코-Ala) 중합체에 접합된 항-마우스 IgG 항체를 포함하는 이작용성 분자를 시험하였다. 이 실시예에서 M6PR 리간드에 접합된 항-마우스 IgG 항체를 포함하는 이작용성 분자를 또한 시험하였다. HEPG2 세포(간세포 암종 세포주)를 1시간 동안 50 nM의 IgG-AF647 및 25 nM의 항-마우스 접합체와 항온처리하였다. 세포 흡수는 유세포분석법에 의해 분석되었다. 막대 그래프에 의해 도시된 것처럼, 세포 형광의 대략 8배 증가는 GalNAc 함유 접합체를 사용하여 관찰되었지만, M6Pn 함유 접합체는 배경에 비해 2배 증가를 유도하였다. 데이터는 ASGPR의 발현 수준이 M6PR의 발현 수준보다 높은 간세포에서, GalNAc 함유 접합체가 세포 흡수를 촉발하는 데 더 효과적이라는 것을 입증한다.

[0258] HUH7 세포(다른 간세포 암종 세포주)에서가 아니라 도 21에 기재된 검정으로부터의 결과가 도 22에 도시되어 있다. HUH7 세포에서의 IgG-AF647의 효과적인 흡수가 관찰되었다. 또한, 세포가 M6PR 또는 ASGPR 억제제(각각 단량체성 M6P(mM6P) 및 단량체성 GalNAc(mGalNAc))와 항온처리되는 대조군이 포함되었다. 세포가 억제제와 항온처리될 때 흡수가 감소하였고, 이는 GalNAc 또는 M6Pn 함유 접합체에 의한 흡수가 실제로 각각 ASGPR 또는 M6PR에 의해 매개된다는 것을 나타낸다.

[0259] 실시예 4 - 세툭시맙-ASGPR 리간드 접합체를 사용한 간세포에서의 EGFR의 효과적인 분해

[0260] 표피 성장 인자 수용체(EGFR)는 간세포 암종(HCC)에서 증식 및 혈관신생을 유도하는 것으로 공지되어 있다. HCC 환자의 68%는 이들의 HCC 세포 상에 EGFR을 발현한다. 이식은 현재 HCC를 갖는 환자에 대한 최고의 치료 옵션으로 있고, 양질의 사망한 공여자 장기의 공급은 제한된다. 수용체 티로신 키나제(RTK) 억제제 또는 항체가 대개 치료에 사용되지만, HCC 세포는 수용체 티로신 키나제(EGFR, HER2, HER3, c-Met, IGF1R)의 이종이합체화로 인해 이 치료에 내성을 발생시키고, 이는 RTK 혼선을 통해 종양형성 신호전달을 회복하도록 동일한 하류 효과기의 인산화로 이어진다. EGFR 차단 항체인 세툭시맙은 HCC 환자에서 II상 임상 실험에 실패하였다.

[0261] 이 실시예에서 ASGPR 리간드(폴리(GalNAc-코-Ala))에 접합된 항-EGFR 항체(이 실시예에서 세툭시맙)를 포함하는 이작용성 분자가 도 23(상부)에 도식적으로 예시된 것처럼 HCC 세포에서 EGFR의 흡수 및 분해를 유도할 수 있는지를 평가하였다. 세툭시맙-M6PR 리간드 접합체를 또한 시험하였다.

[0262] 제1 실험에 HEP3B 세포를 사용하였다. 세포를 10 nM의 세툭시맙 접합체와 48시간 동안 항온처리하고, 이후 웨스턴 블롯 분석을 위해 용해시켰다. (도 23, 하부에 도시된) 웨스턴 블롯은 1) 비치료, 2) EGF(EGFR의 공지된 하향조절자), 3) 세툭시맙, 4) 세툭시맙-GalNAc 접합체 및 5) 세툭시맙-M6Pn 접합체의 5개의 레인을 갖는다. 도시된 것처럼, 세툭시맙-GalNAc 접합체는 세툭시맙-M6Pn 접합체와 비교하여 효과적인 EGRFR 분해 및 더 높은 EGFR 분해를 나타냈다. 로딩 대조군으로서 빈쿨린을 사용하였다.

[0263] 제2 실험에 HEPG2 세포를 사용하였다. 결과가 도 24에 도시되어 있다. HEPG2 세포에서의 EGFR의 효과적인 분해가 관찰되었다. 여기서, 분해 효율은 가능하게는 HEP3B 세포 및 HEPG2 세포주에서 EGFR의 상대 수준으로 인해 세툭시맙-GalNAc와 세툭시맙-M6Pn 접합체 사이에 유사했다. (공공 데이터베이스로부터 입수 가능한) 2개의 세포주에서 EGFR 및 수용체의 상대 mRNA 수준이 오른쪽에 도시된다. EGFR 수준이 HEP3B 세포와 비교하여 HEPG2 세포에서 비교적 낮으므로, 데이터는 덜 효과적인 분해자(세툭시맙-M6Pn 접합체)에 의해서도 막 EGFR의 대부분이 분해되고, 웨스턴 블롯에서 보이는 잔류 EGFR이 내부 EGFR일 수 있다는 것을 제시한다. ASGPR 수준이 또한 모니터링되었는데 ASGPR의 수준이 상이한 치료에 걸쳐 일정하게 있다는 것을 보여준다.

[0264] 다음에, HEP3B 세포에서 시간에 따른 EGFR 분해를 평가하도록 시간 경과 연구를 수행하였다. 결과가 도 25에 도시되어 있다. 도시된 것처럼, 12시간에, 세툭시맙-GalNAc 접합체는 EGFR 수준을 50% 미만으로 감소시킨다. 분해는 48시간에 증가한다. 세툭시맙-M6Pn 접합체는 시험된 임의의 시점에 EGFR 수준을 50% 아래로 감소시키지 않았다.

[0265] 잔류 EGFR이 막 EGFR 또는 세포내 EGFR인지를 평가하기 위해 면역형광 실험을 수행하였다. 결과가 도 26에 도시되어 있다. HEP3B 및 세툭시맙에서의 세포의 윤곽은 막에서의 EGFR 국재화를 나타낸다. HEP3B가 세툭시맙-M6Pn 접합체로 치료될 때, EGFR의 일부는 내부로 국재화되지만, 일부는 막에 남는다. HEP3B가 세툭시맙-GalNAc 접합체로 치료될 때, EGFR은 막에서 거의 관찰되지 않고, 어마어마한 EGFR이 세포 내에 있다. 따라서, 세툭시맙-GalNAc 접합체는 대부분의 막 결합된 EGFR을 분해하였고, 웨스턴 블롯에서 보이는 잔류(대략 30%의) EGFR은 세포내 EGFR인 것으로 보인다.

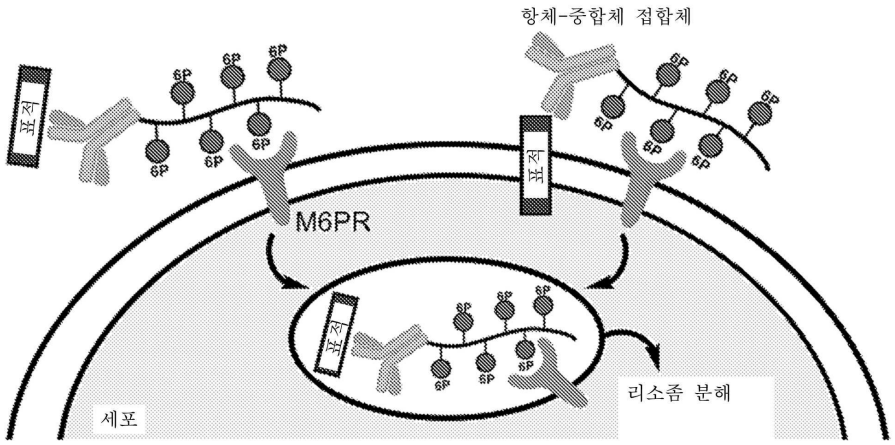
[0266] 실시예 5 - 트라스투주맙 단독 및 트라스투주맙 접합체를 통한 HER2 분해

[0267] 이 실시예에서 도 20에 도시된 트라스투주맙 단독 또는 GalNAc 함유 중합체("트라스투주맙-GalNAc")에 접합된 트라스투주맙의 존재 하의 HUH7 세포 및 HEPG2 세포에서의 HER2의 분해의 정도를 보여주는 웨스턴 블롯 데이터를 평가하였다. HUH7 세포 및 HEPG2 세포를 10 nM의 트라스투주맙 또는 트라스투주맙-GalNAc 접합체와 48시간 동안 항온처리하고, 이후 웨스턴 블롯 분석을 위해 용해시켰다. 도 27에서의 웨스턴 블롯은 각각의 세포주에 대해 1) 비치료, 2) 트라스투주맙, 3) 트라스투주맙-GalNAc에 대한 3개의 레인을 갖는다. 도 27에서의 막대 그래프는 각각의 세포주에서의 대조군에 대한 HER2의 평균 퍼센트를 보여준다. 도시된 것처럼, 세포주 중 어느 하나에서의 트라스투주맙 단독 또는 GalNAc 함유 중합체에 접합된 트라스투주맙의 존재 하의 HER2 분해에서 통계 차이가 없었다. 이와 같이, 트라스투주맙-GalNAc 접합체는 트라스투주맙 단독의 존재 하의 HER2의 분해에 비해 HER2의 분해를 향상시키지 않았다.

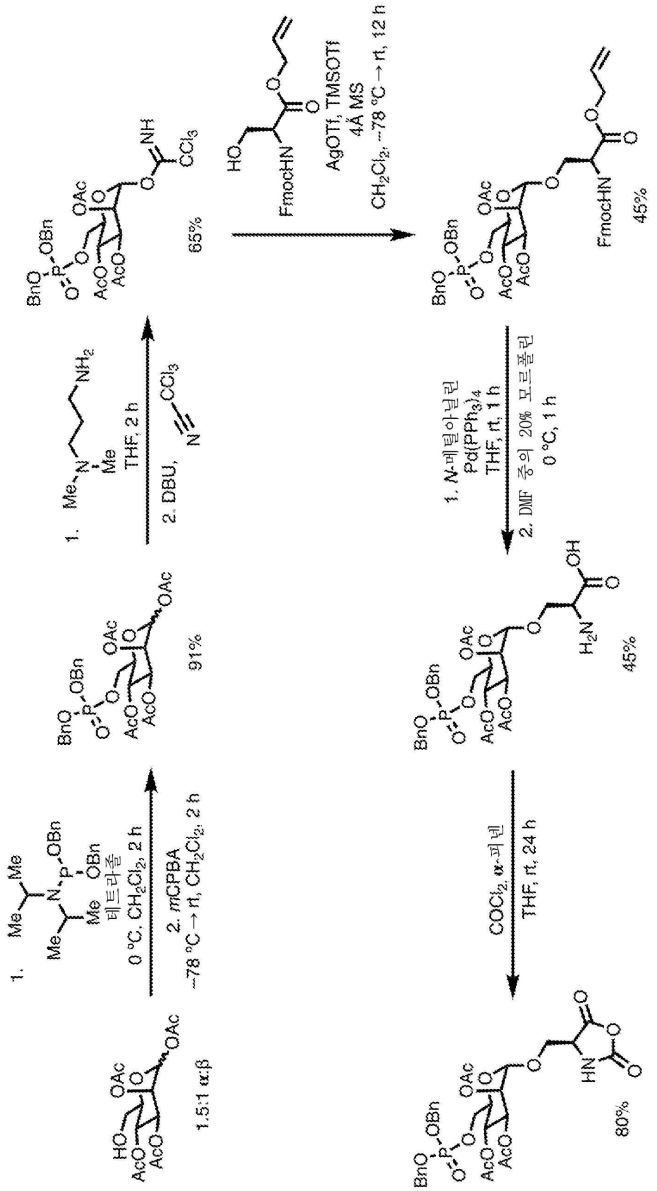
[0268] 따라서, 상술한 내용은 단지 본 개시내용의 원리를 예시하는 것이다. 당업자는, 본원에 명시적으로 기재되거나 제시되지는 않았지만, 본 발명의 원리를 구현하고, 이의 사상 및 범위에 포함되는 다양한 배열을 고안할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 나아가, 본원에 인용된 모든 실시예 및 조건부 언어는, 주로 독자가 본 발명의 원리, 및 본 발명자가 해당 분야를 발전시키는 데 기여한 개념의 이해를 돕기 위한 것이며, 이러한 구체적으로 인용된 예 및 조건에 한정되지 않는 것으로서 해석되어야 한다. 나아가, 본 발명의 원리, 양태 및 실시형태뿐만 아니라, 이의 구체적인 예를 인용한 본원의 모든 설명은 이의 구조적 등가물 및 기능적 등가물 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 이러한 등가물은, 현재 공지된 등가물 및 미래에 개발될 등가물, 즉 구조에 관계없이 동일한 기능을 수행하는 임의의 개발된 요소 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본 발명의 범위는 본원에 도시되고 기재된 예시적인 실시형태에 한정되는 것이 아닌 것으로 의도된다.

도면

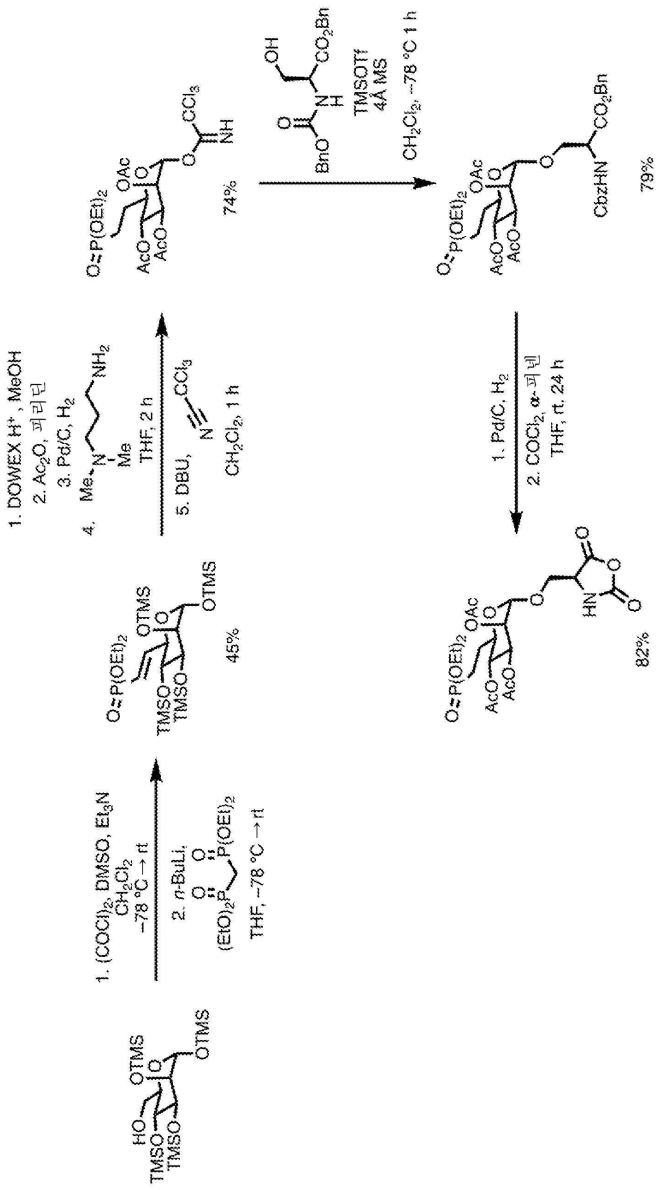
도면1



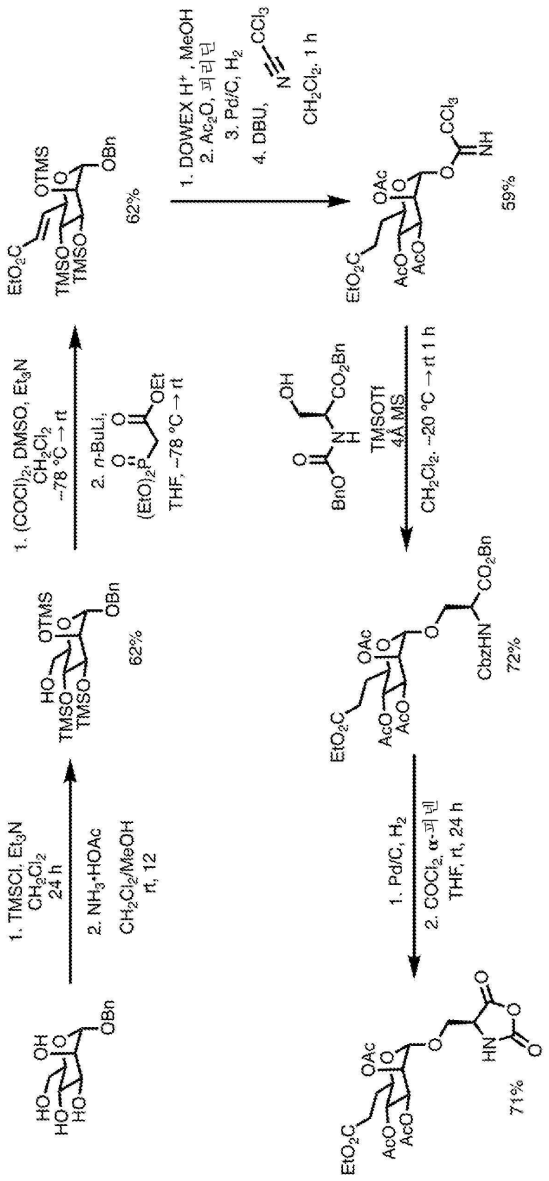
도면2



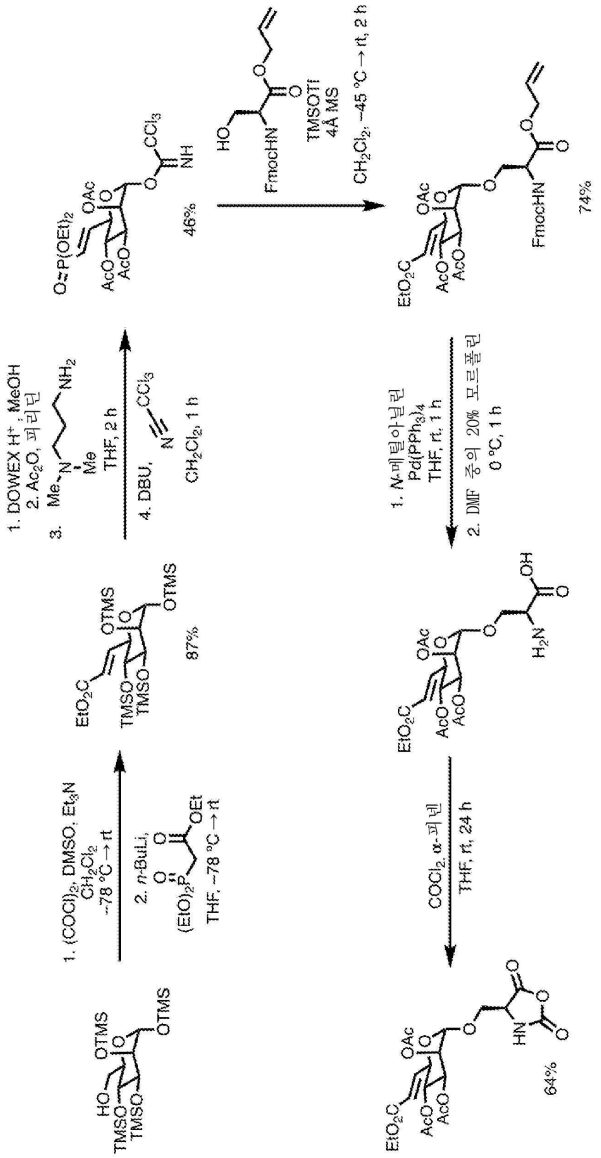
도면3


1. DOWEX H+, MeOH
2. Ac2O, 피리딘
3. Pd/C, H2
4.
5. DBU,
THF, 2 h
CH2Cl2, 1 h
74%
TMSOTf
4Å MS
CH2Cl2, –78 °C 1 h
79%
1. Pd/C, H2
2. COCl2, α-피넨
THF, rt, 24 h
82%
1. (COCl)2, DMSO, Et3N
CH2Cl2
–78 °C → rt
2. n-BuLi,
THF, –78 °C → rt
45%

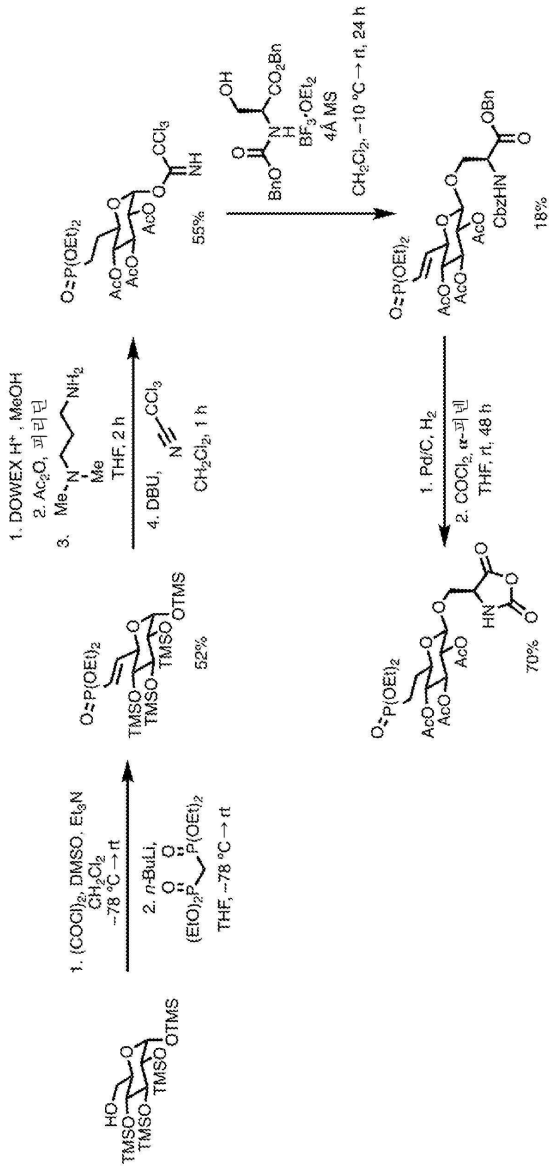
도면4



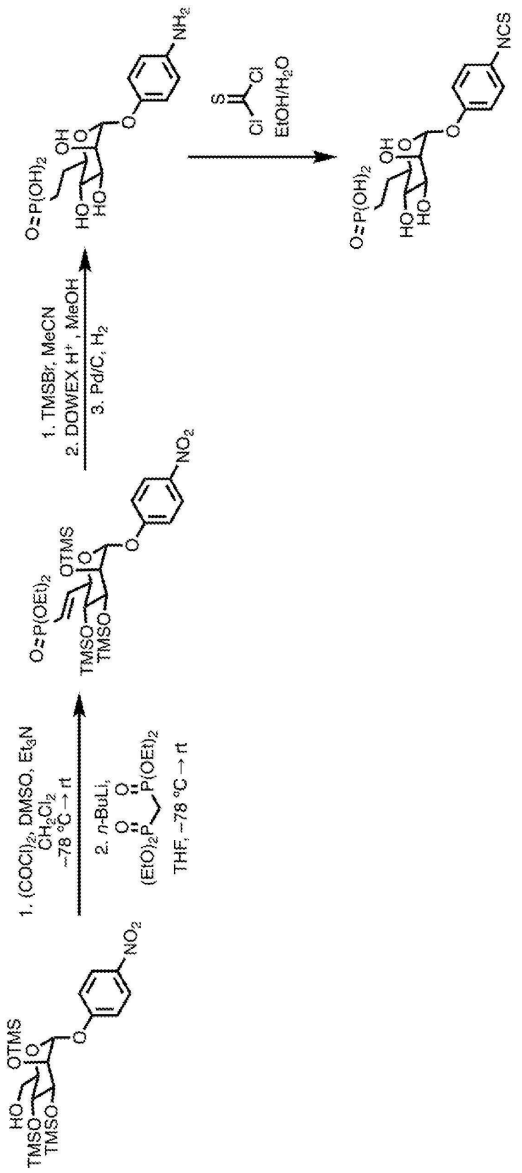
도면5



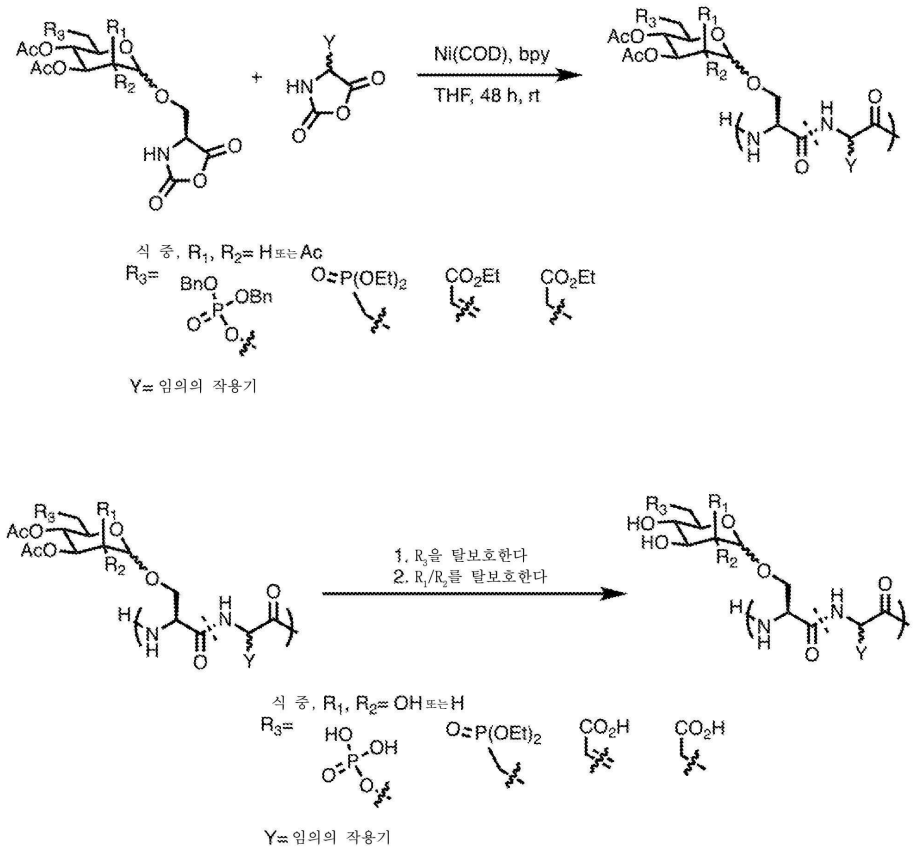
도면6



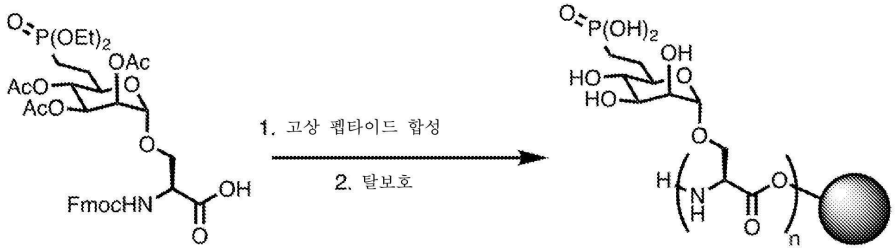
도면7


1. (COCl)2, DMSO, Et3N
CH2Cl2
−78 °C → rt
2. n-BuLi,
(EtO)2P
P(OEt)2
THF, −78 °C → rt
1. TMSBr, MeCN
2. DOWEX H+, MeOH
3. Pd/C, H2
EtOH/H2O
OTMS
TMSO
HO
O=P(OEt)2
O=P(OH)2
NO2
NH2
NCS

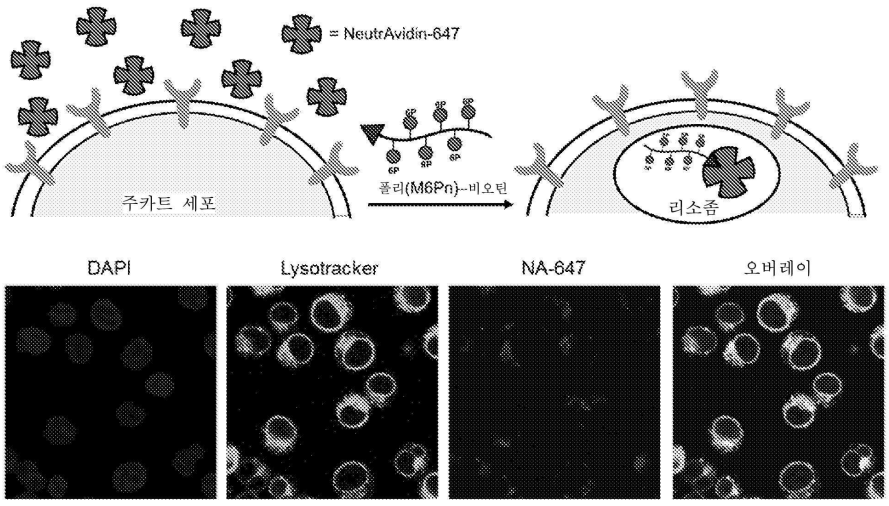
도면8


Ni(COD), bpy
THF, 48 h, rt
식 중, R1, R2= H 또는 Ac
R3=
BnO
OBn
O=P(OEt)2
CO2Et
CO2Et
Y= 임의의 작용기
1. R3을 탈보호한다
2. R1/R2를 탈보호한다
식 중, R1, R2= OH 또는 H
R3=
HO
OH
O=P(OEt)2
CO2H
CO2H
Y= 임의의 작용기

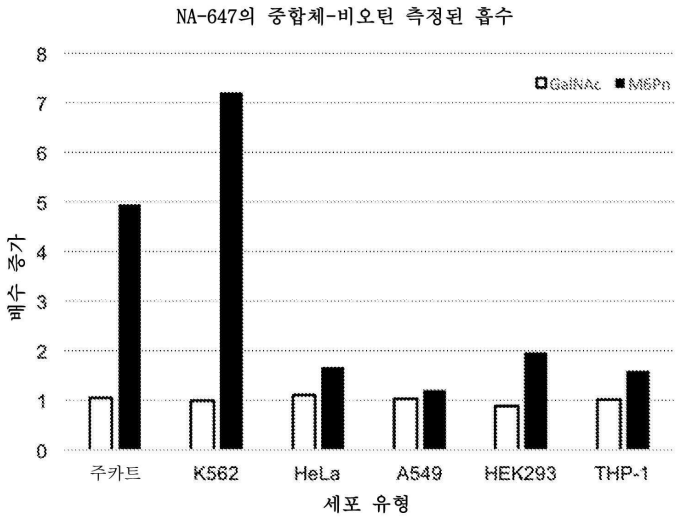
도면9


O=P(OEt)2
OAc
AcO
AcO
FmocHN
OH
1. 고상 펩타이드 합성
2. 탈보호
O=P(OH)2
OH
HO
HO
n

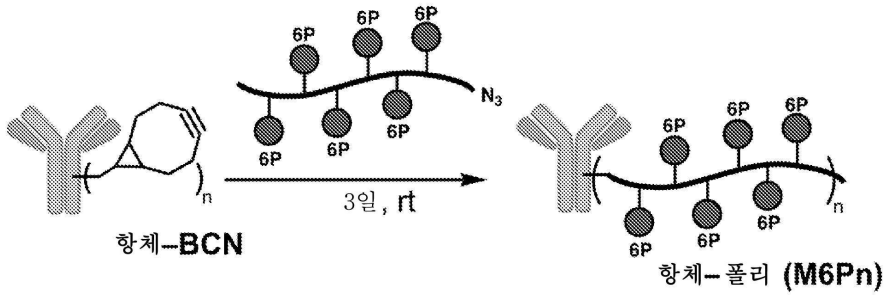
도면10

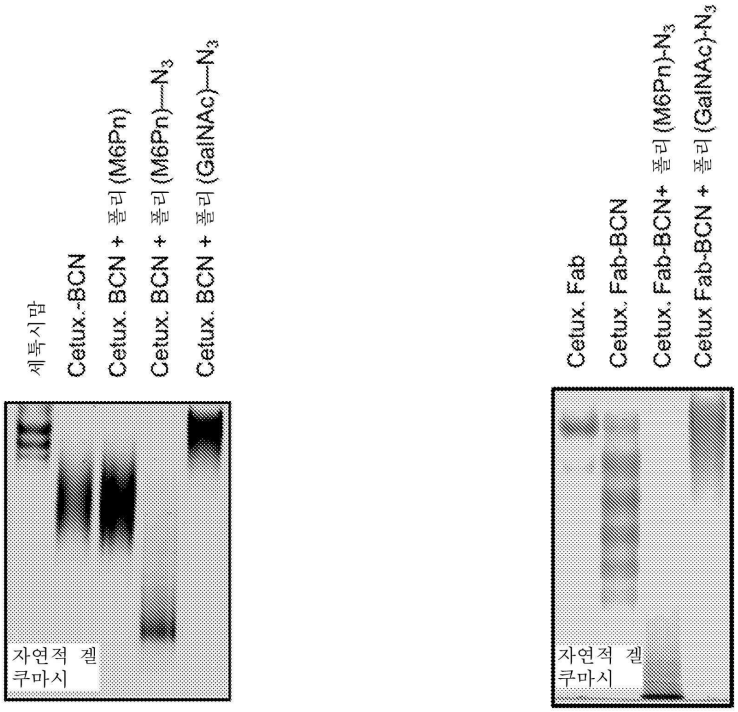

= NeutrAvidin-647
주카트 세포
폴리(M6Pn)-비오틴
리소좀
DAPI
Lysotracker
NA-647
오버레이

도면11

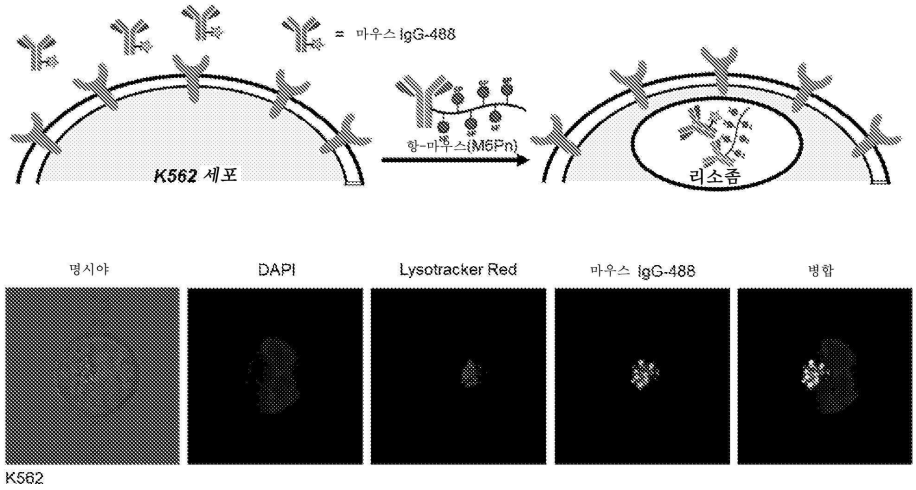

NA-647의 중합체-비오틴 측정된 흡수
GalNAc
M6Pn
배수 증가
0
1
2
3
4
5
6
7
8
주카트
K562
HeLa
A549
HEK293
THP-1
세포 유형

도면12

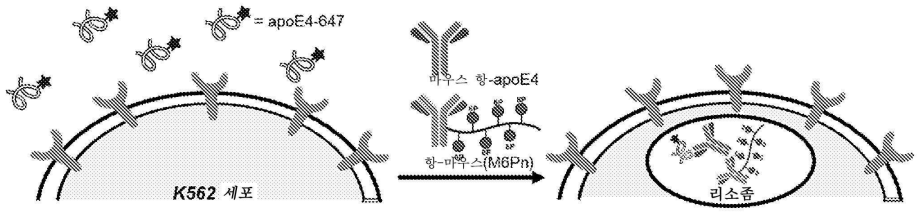

6P
N3
n
3일, rt
항체-BCN
항체-폴리 (M6Pn)

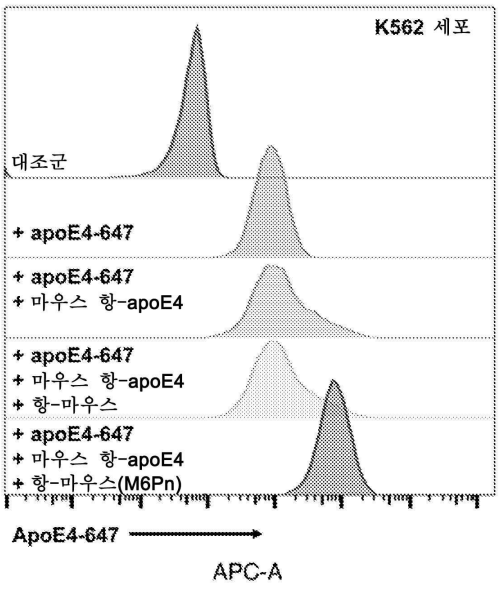

세툭시맙
Cetux.-BCN
Cetux. BCN + 폴리 (M6Pn)
Cetux. BCN + 폴리 (M6Pn)—N3
Cetux. BCN + 폴리 (GalNAc)—N3
자연적 겔
쿠마시
Cetux. Fab
Cetux. Fab-BCN
Cetux. Fab-BCN+ 폴리 (M6Pn)-N3
Cetux Fab-BCN + 폴리 (GalNAc)-N3
자연적 겔
쿠마시

도면13

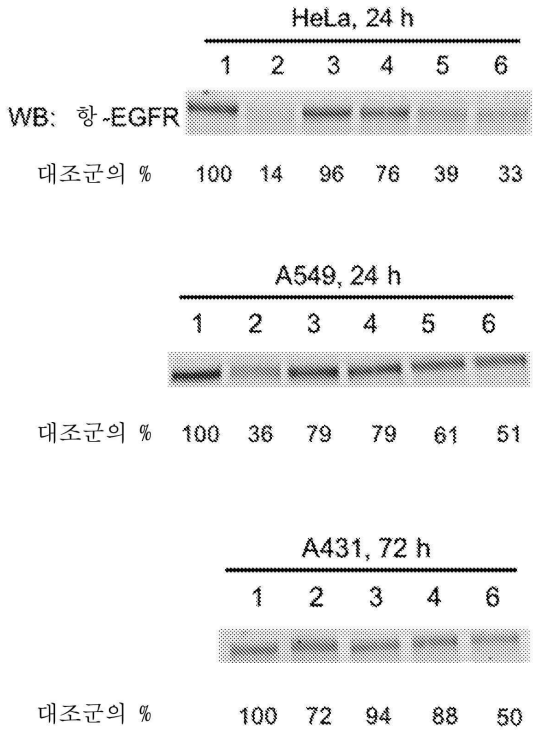

= 마우스 IgG-488
항-마우스(M6Pn)
K562 세포
리소좀
명시야
DAPI
Lysotracker Red
마우스 IgG-488
병합
K562

도면14

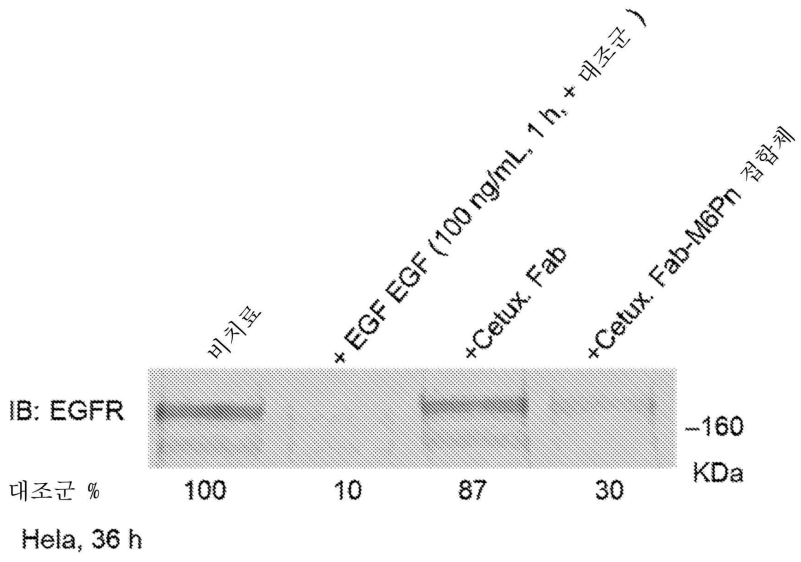

= apoE4-647
마우스 항-apoE4
항-마우스(M6Pn)
K562 세포
리소좀


K562 세포
대조군
+ apoE4-647
+ apoE4-647
+ 마우스 항-apoE4
+ apoE4-647
+ 마우스 항-apoE4
+ 항-마우스
+ apoE4-647
+ 마우스 항-apoE4
+ 항-마우스(M6Pn)
ApoE4-647
APC-A

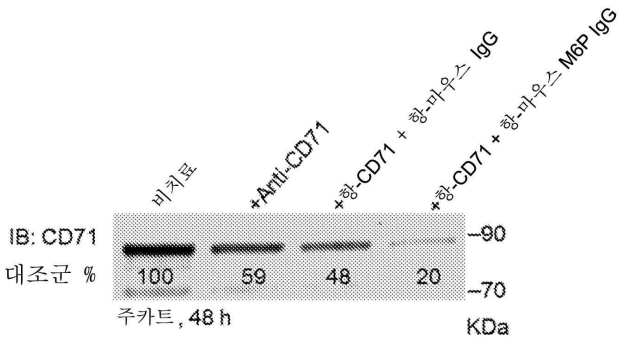
도면15


HeLa, 24 h
1 2 3 4 5 6
WB: 항-EGFR
대조군의 % 100 14 96 76 39 33
A549, 24 h
1 2 3 4 5 6
대조군의 % 100 36 79 79 61 51
A431, 72 h
1 2 3 4 6
대조군의 % 100 72 94 88 50

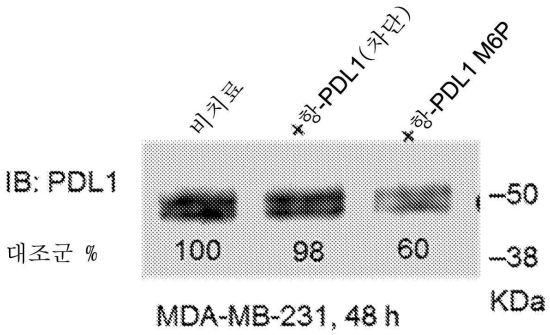
도면16


비처료
+ EGF EGF (100 ng/mL, 1 h, + 대조군)
+Cetux. Fab
+Cetux. Fab-M6Pn 접합체
IB: EGFR
~160
KDa
대조군 % 100 10 87 30
Hela, 36 h

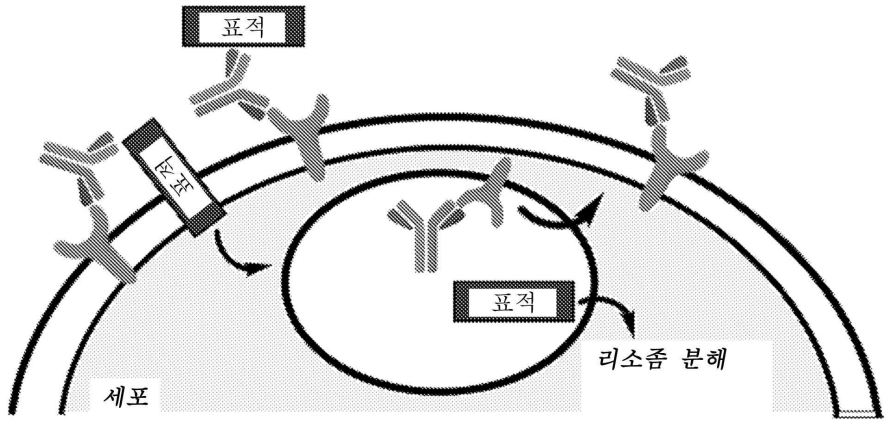
도면17



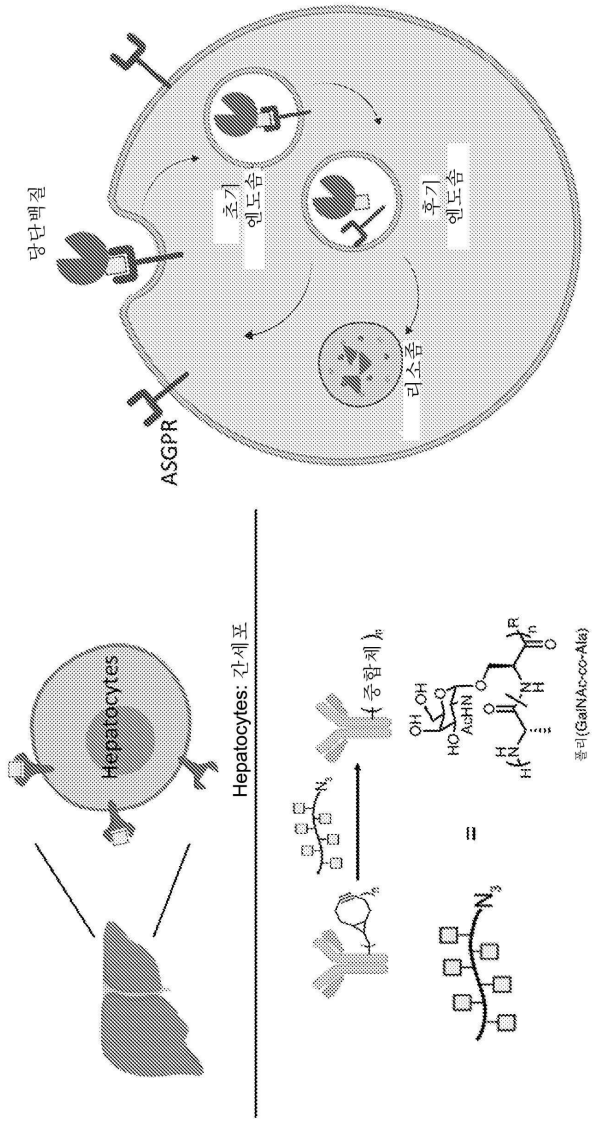
도면18



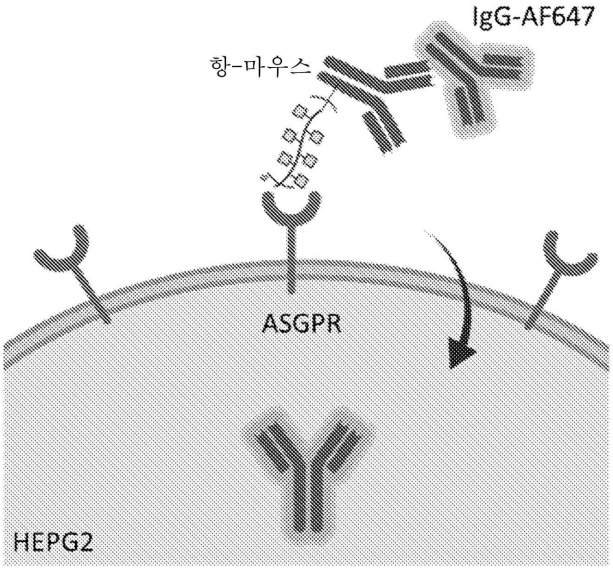
도면19

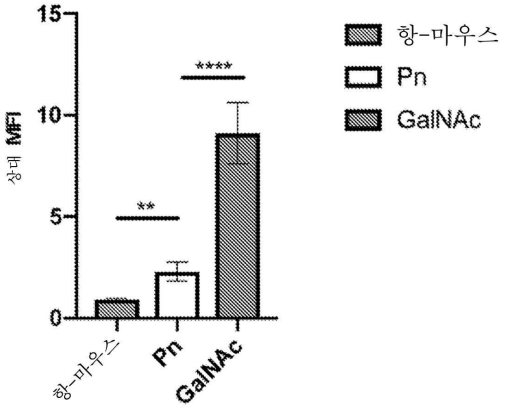


도면20

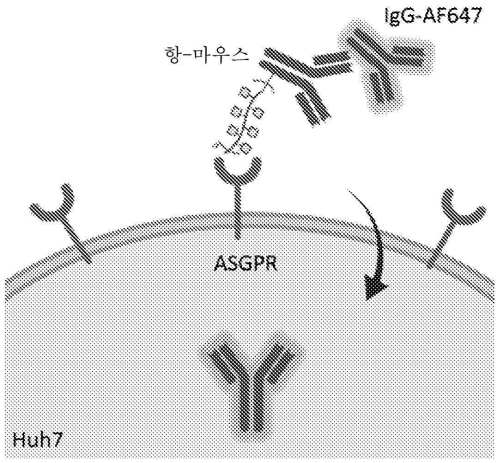

당단백질
초기 엔도솜
후기 엔도솜
리소좀
ASGPR
Hepatocytes
Hepatocytes: 간세포
n-중합체
콜리(GalNAc-co-Ala)

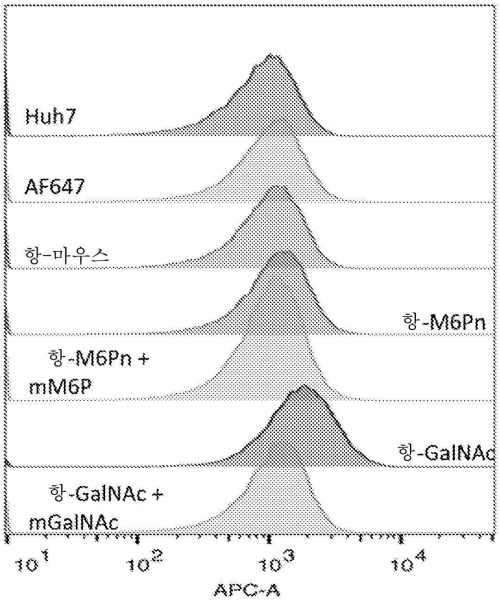
도면21


IgG-AF647
항-마우스
ASGPR
HEPG2

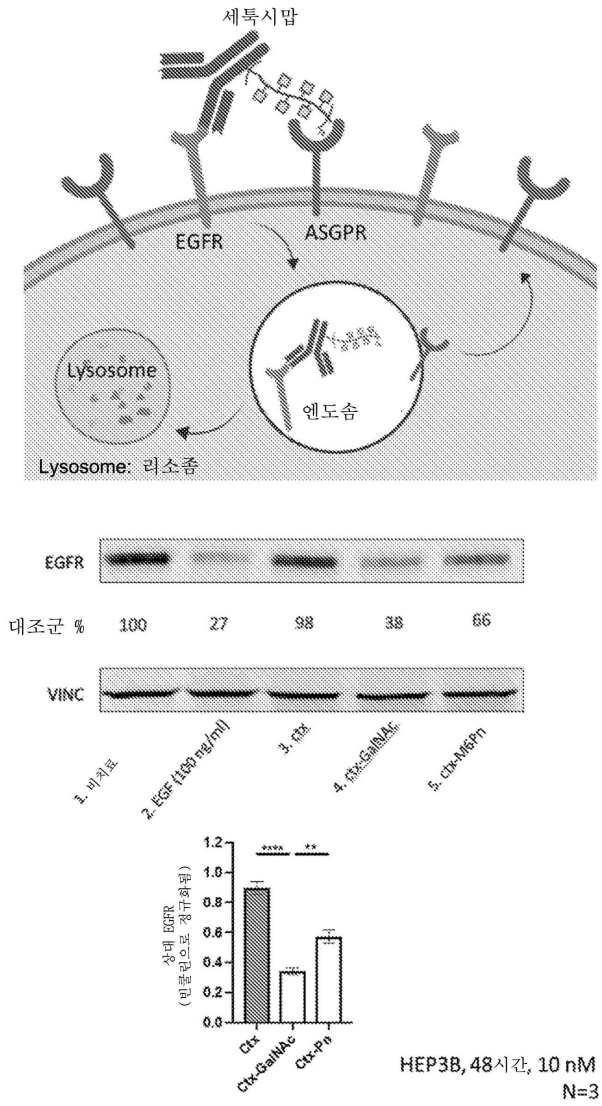

15
10
5
0
상대 MFI
**
****
항-마우스
Pn
GalNAc
항-마우스
Pn
GalNAc

도면22

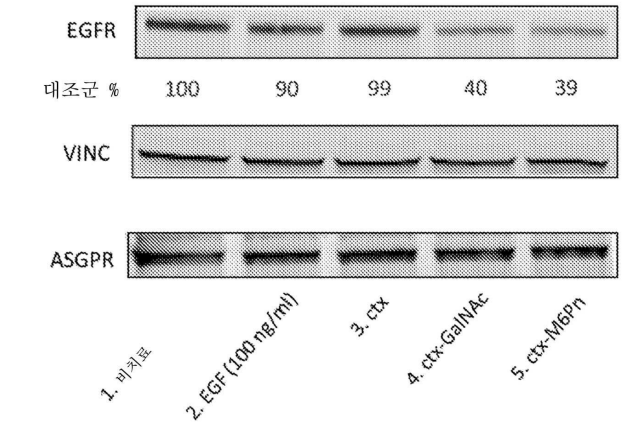

IgG-AF647
항-마우스
ASGPR
Huh7


Huh7
AF647
항-마우스
항-M6Pn
항-M6Pn +
mM6P
항-GalNAc
항-GalNAc +
mGalNAc
10^1
10^2
10^3
10^4
APC-A

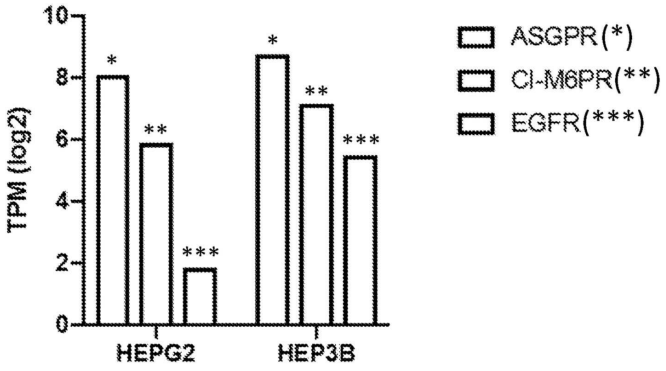
도면23


세툭시맙
EGFR
ASGPR
Lysosome
엔도솜
Lysosome: 리소좀
EGFR
대조군 %
100
27
98
38
66
VINC
1. 비처료
2. EGF (150 ng/ml)
3. Ctx
4. Ctx-GalNAc
5. Ctx-M6Pn
상대 EGFR
(빈클린으로 정규화됨)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
****
**
Ctx
Ctx-GalNAc
Ctx-Pn
HEP3B, 48시간, 10 nM
N=3

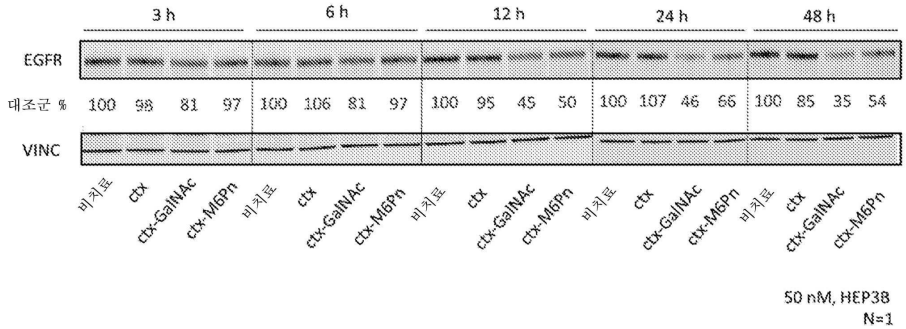
도면24



HEPG2, 48시간, 50 nM
N=1

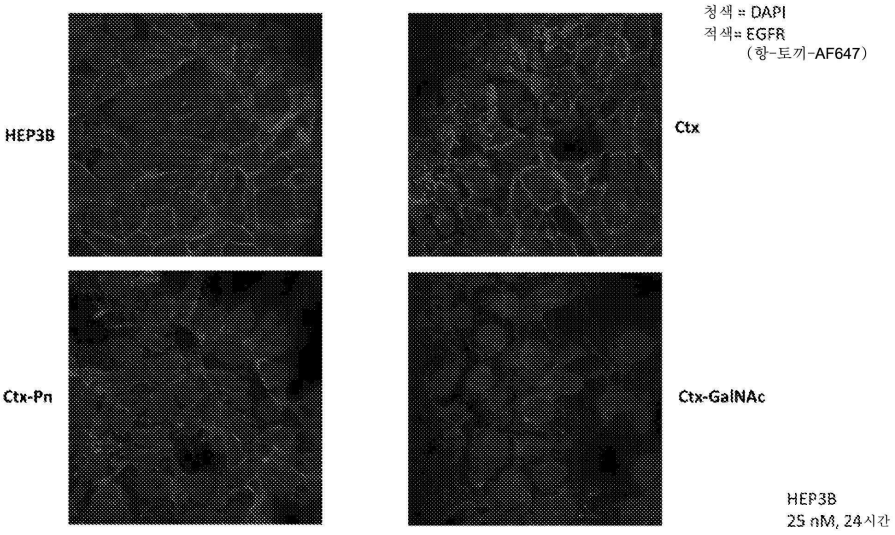


도면25

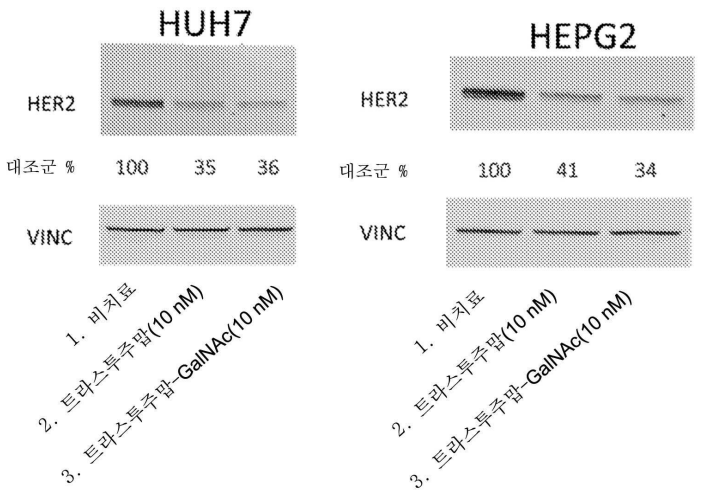


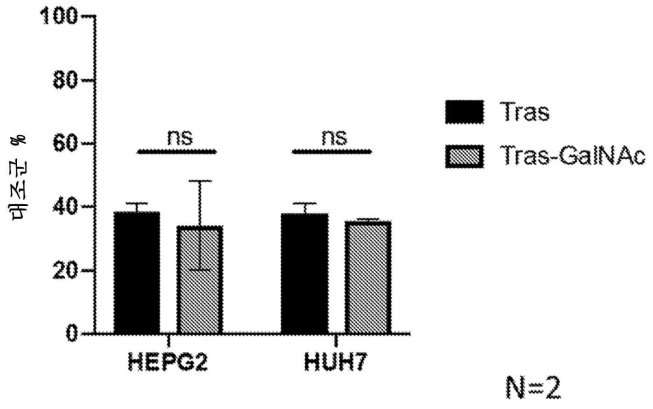
50 nM, HEP3B
N=1

도면26


청색 = DAPI
적색= EGFR
(항-토끼-AF647)
HEP3B
Ctx
Ctx-Pn
Ctx-GalNAc
HEP3B
25 nM, 24시간

도면27


HUH7
HER2
대조군 %
100
35
36
VINC
1. 비치료
2. 트라스투주맙(10 nM)
3. 트라스투주맙-GalNAc(10 nM)
HEPG2
HER2
대조군 %
100
41
34
VINC
1. 비치료
2. 트라스투주맙(10 nM)
3. 트라스투주맙-GalNAc(10 nM)


100
80
60
40
20
0
대조군 %
ns
ns
Tras
Tras-GalNAc
HEPG2
HUH7
N=2