



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0104653
(43) 공개일자 2023년07월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7018353
- (22) 출원일자(국제) 2021년11월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년05월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/080688
- (87) 국제공개번호 WO 2022/096604
국제공개일자 2022년05월12일
- (30) 우선권주장
20205794.9 2020년11월04일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
하이델베르크 파마 리서치 게엠베하
독일 라텐부르크 68526 그레고르-멘델-스트라제 22
- (72) 발명자
쿨케, 미카엘
독일 68526 라텐부르크 그레고르-멘델-스트라제 22 하이델베르크 파마 리서치 게엠베하 내
헤클러, 토르스텐
독일 68526 라텐부르크 그레고르-멘델-스트라제 22 하이델베르크 파마 리서치 게엠베하 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이윤기

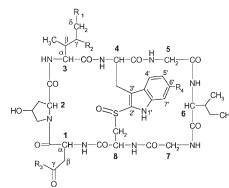
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 암 요법에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제 및 항체-아마톡신 접합체의 조합물을 포함하는 조성물

(57) 요약

본 출원은 (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및 (b) 적어도 1종의 접합체를 포함하며, 여기서 상기 접합체는 (i) 표적 결합 모이어티, (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및 (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커를 포함하는 것인, 조성물에 관한 것이다. 본 출원은 추가로 암을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 상기 조성물, 및 상기 조성물 및 추가의 부형제를 포함하는 제약 제제, 뿐만 아니라 상기 조성물의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α-아라닌	OH	OH	NH ₂	OH
β-아라닌	OH	OH	OH	OH
γ-아라닌	H	OH	NH ₂	OH
ε-아라닌	H	OH	OH	OH
아라닌	OH	OH	OH	H
아라닌아미드	OH	OH	NH ₂	H
아라놀린	H	H	NH ₂	OH
아라놀린산	H	H	OH	OH
γ-아라닌	H	OH	OH	H
γ-아라닌아미드	H	OH	NH ₂	H

(52) CPC특허분류

A61K 47/6831 (2017.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
A61K 47/6867 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
C07K 2317/21 (2013.01)

(72) 발명자

팔, 안드레아스

독일 68526 라덴부르크 그레고르-멘델-스트라쎄 22
하이델베르크 파마 리서치 게엠베하 내

필러, 크리스토프

독일 68526 라덴부르크 그레고르-멘델-스트라쎄 22
하이델베르크 파마 리서치 게엠베하 내

베르너-지몬, 수잔네

독일 68526 라덴부르크 그레고르-멘델-스트라쎄 22
하이델베르크 파마 리서치 게엠베하 내

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 조성물:

- (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및
- (b) 적어도 1종의 접합체, 여기서 상기 접합체는 하기를 포함함:
 - (i) 표적 결합 모이어티,
 - (ii) 적어도 1종의 아파톡신, 및
 - (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아파톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제 및/또는 상기 접합체의 표적 결합 모이어티가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물:

- (i) 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체,
- (ii) 그의 항원-결합 단편, 바람직하게는 가변 도메인 (Fv), Fab 단편 또는 F(ab)₂ 단편,
- (iii) 그의 항원-결합 유도체, 바람직하게는 단일-쇄 Fv (scFv), 및
- (iv) 항체-유사 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 그의 항원-결합 유도체가 각각 무린, 키메라, 인간 화 또는 인간 항체, 또는 그의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 유도체인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제가 PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, BTLA, CD96 및 CD160으로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 체크포인트 수용체에, 또는 PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, 갈렉틴-3, LSECtin, CD112, 세아캅-1, Gal-9, PtdSer, HMGB1, HVEM, CD155로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 체크포인트 수용체의 리간드에 결합하는 것인 조성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제가 니볼루맙, 피달리주맙, 펌브롤리주맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙, 세미플리맙 및 이필리무맙, 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 그의 항원-결합 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체이고, 바람직하게는 항체가 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 니볼루맙, 또는 이필리무맙 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 그의 항원-결합 유도체인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 2종 이상의 면역 체크포인트 억제제의 조합을 포함하고, 바람직하게는 2종의 면역 체크포인트 억제제의 조합을 포함하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체의 표적 결합 모이어티가 PSMA, CD19, CD37, CD269, 시알릴 루이스^a, HER-2/neu, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM)를 포함하는 군으로부터 선택된 암 세포의 세포 표면 상

의 표적 분자에 결합하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체의 표적 결합 모이어티가 D265C, D265A, A118C, L234A 및/또는 L235A (EU 넘버링 시스템에 따름)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 갖는 항체인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항체가 D265C 돌연변이를 보유하는 Fc 영역을 포함하고, 존재하는 경우에 상기 링커가, 또는 상기 아마톡신이 상기 항체의 D265C 잔기를 통해, 바람직하게는 티오에테르 - 연결을 통해 상기 항체에 연결되는 것인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체의 아마톡신이 α -아마니틴, β -아마니틴, γ -아마니틴, ϵ -아마니틴, 아마닌, 아마닌아미드, 아마놀린, 아마놀린산, 또는 그의 염 또는 유사체로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 11

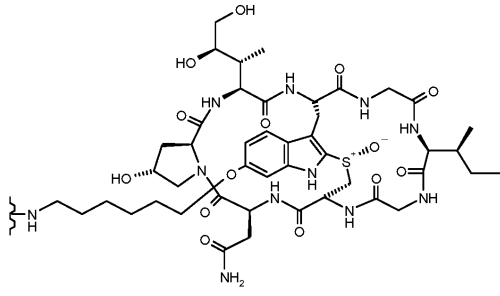
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 존재하는 경우에 상기 접합체의 링커가, 안정한 또는 절단가능한 링커이고, 상기 절단가능한 링커가 효소적으로 절단가능한 링커, 바람직하게는 프로테아제-절단가능한 링커, 및 화학적으로 절단가능한 링커, 바람직하게는 디설피드 가교를 포함하는 링커로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 12

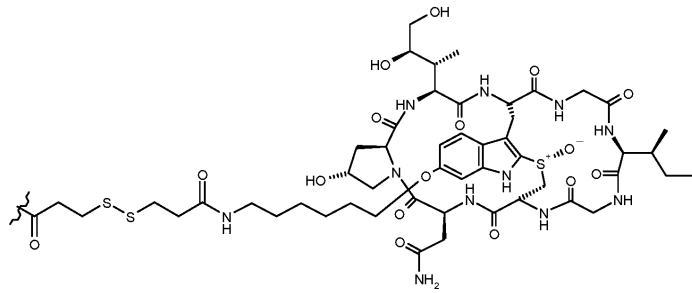
제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 존재하는 경우에 상기 접합체의 링커가, 또는 상기 표적 결합 모이어티가 (i) 아마톡신 아미노산 1의 γ C-원자, 또는 (ii) 아마톡신 아미노산 3의 δ C-원자, 또는 (iii) 아마톡신 아미노산 4의 6'-C-원자를 통해 상기 아마톡신에 연결되는 것인 조성물.

청구항 13

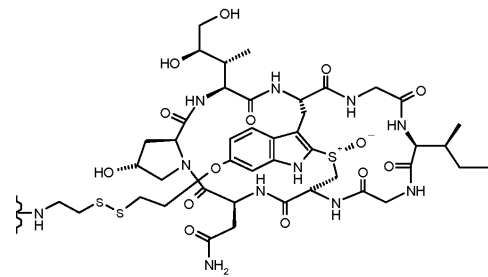
제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체가 링커-아마톡신 모이어티로서 각각 하기 화학식 I 내지 XII의 화합물 중 임의의 것을 포함하는 것인 조성물:



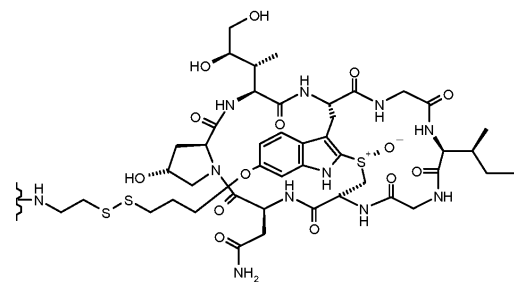
(I)



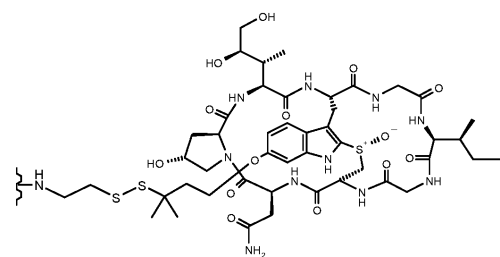
(II)



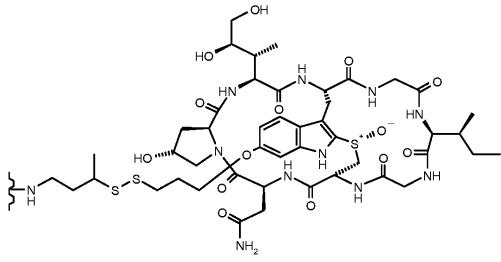
(III)



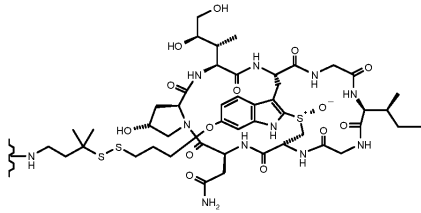
(IV)



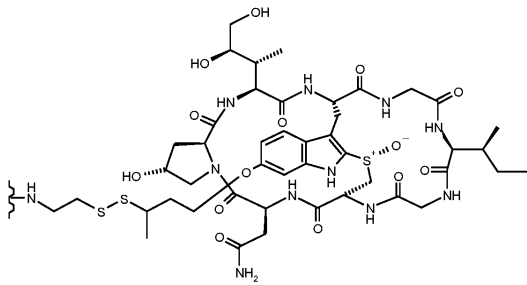
(V)



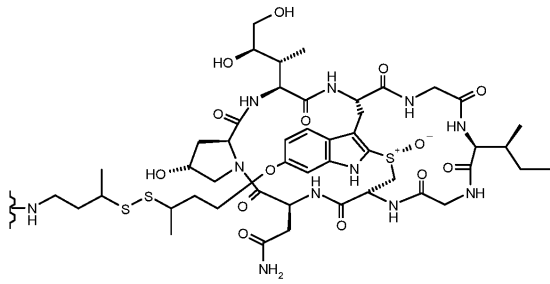
(VI)



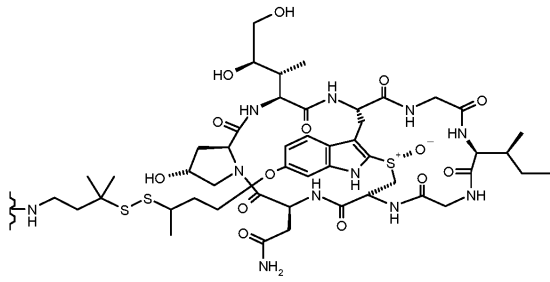
(VII)



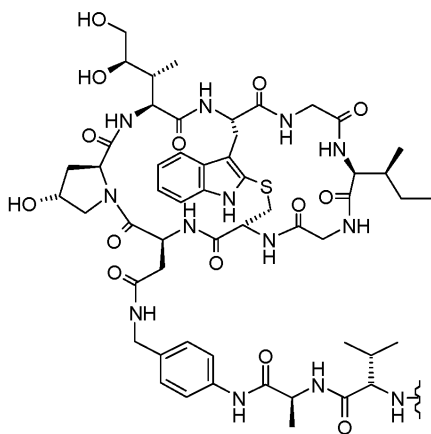
(VIII)



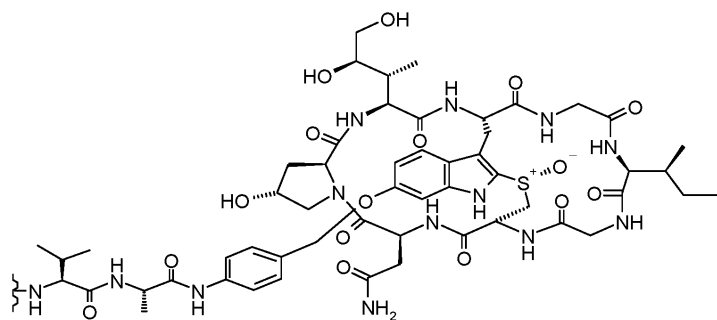
(IX)



(X)



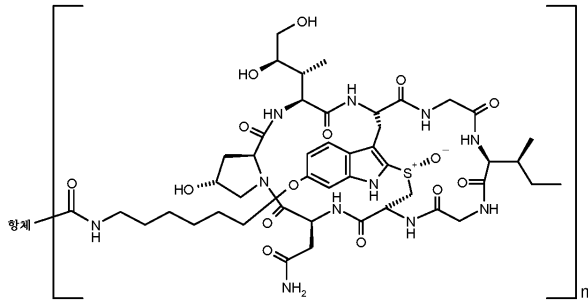
(XI)



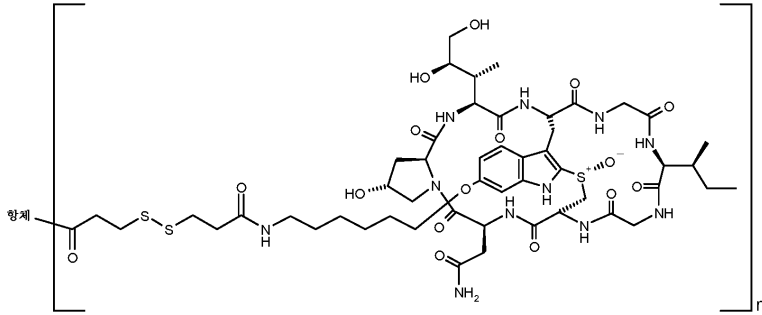
(XII)

청구항 14

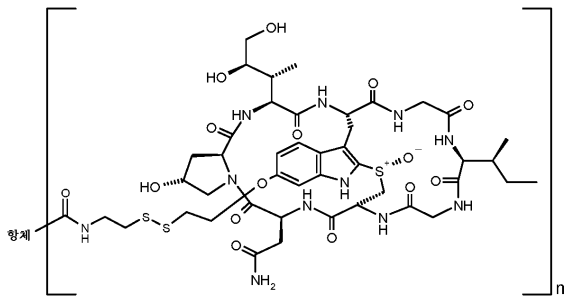
제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체가 하기 화학식 XIII 내지 XXII 중 어느 하나에 따른 화합물인 조성물:



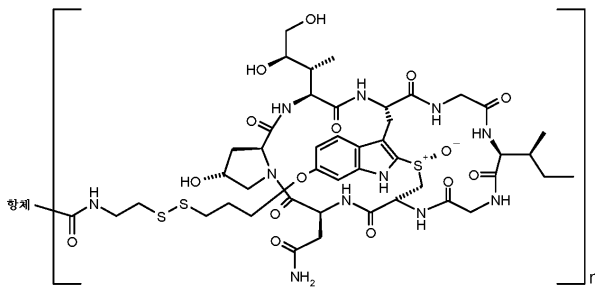
(XIII)



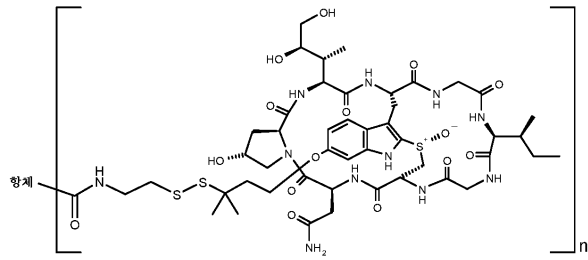
(XIV)



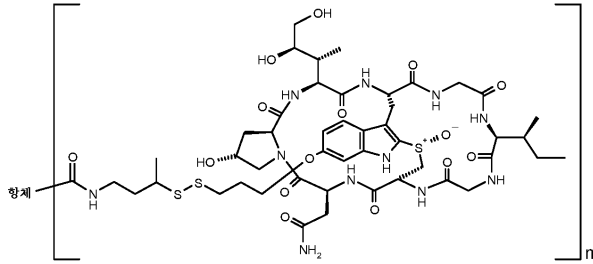
(XV)



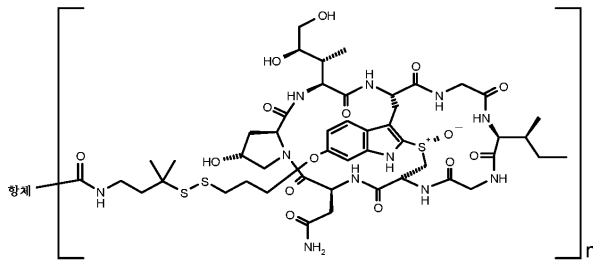
(XVI)



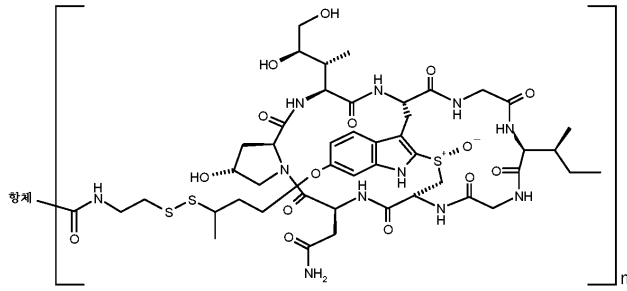
(XVII)



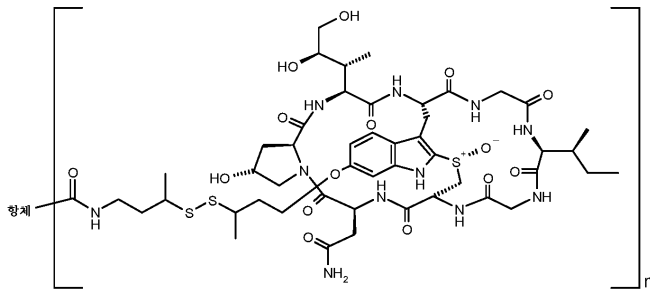
(XVIII)



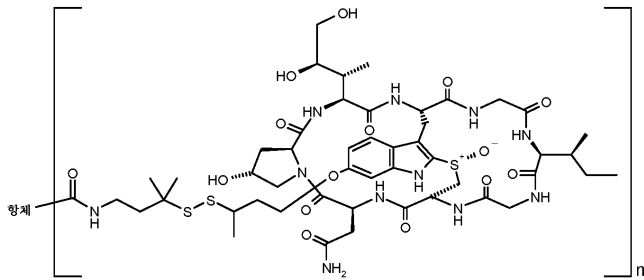
(XIX)



(XX)



(XXI)

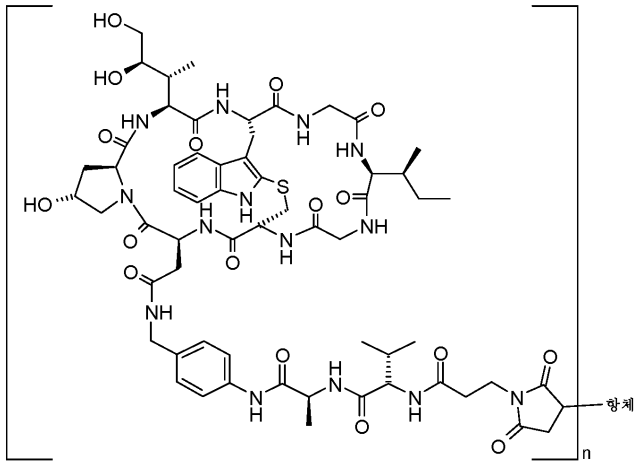


(XXII)

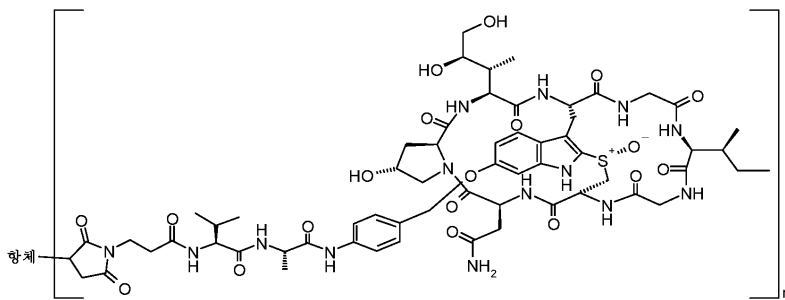
여기서 상기 아파톡신 링커 모이어티는 상기 항체의 자연 발생 리신 잔기의 ϵ -아미노 기에 커플링되고, 여기서 n 은 바람직하게는 1 내지 8임.

청구항 15

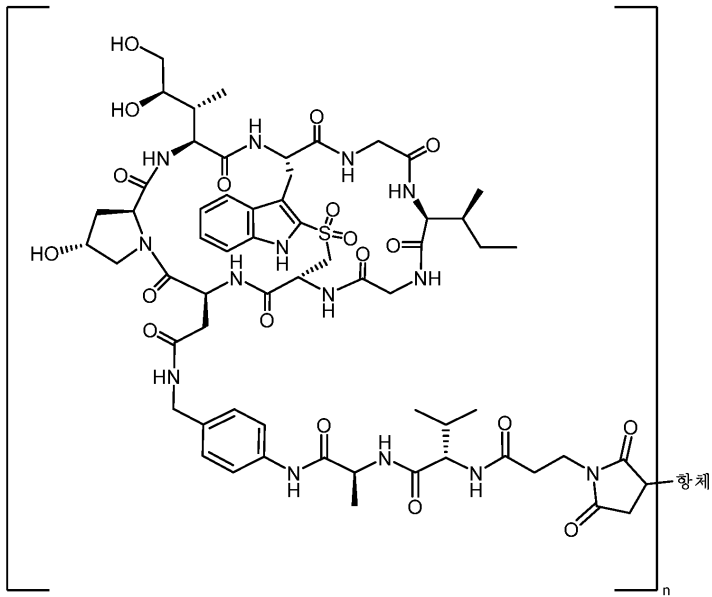
제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체가 하기 화학식 XXIII, XXIV, XVIIIb, XVb, XVIb, XVIIb, XVIIIb, XIXb, XXb, XXIb 중 어느 하나에 따른 화합물인 조성물:



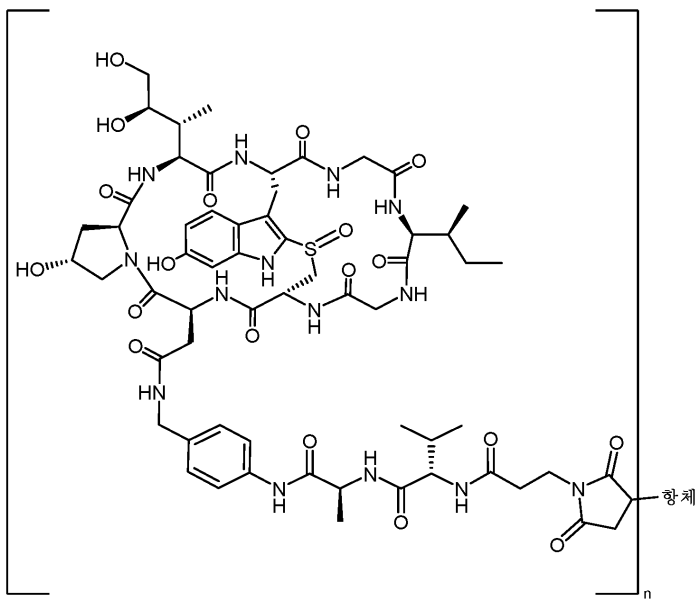
(XXIII)



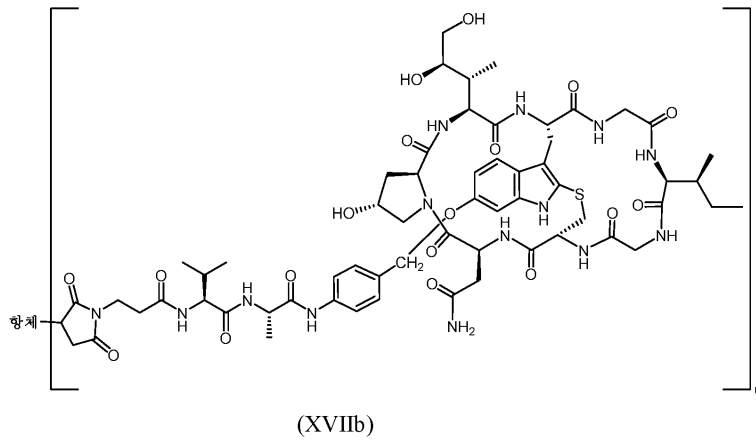
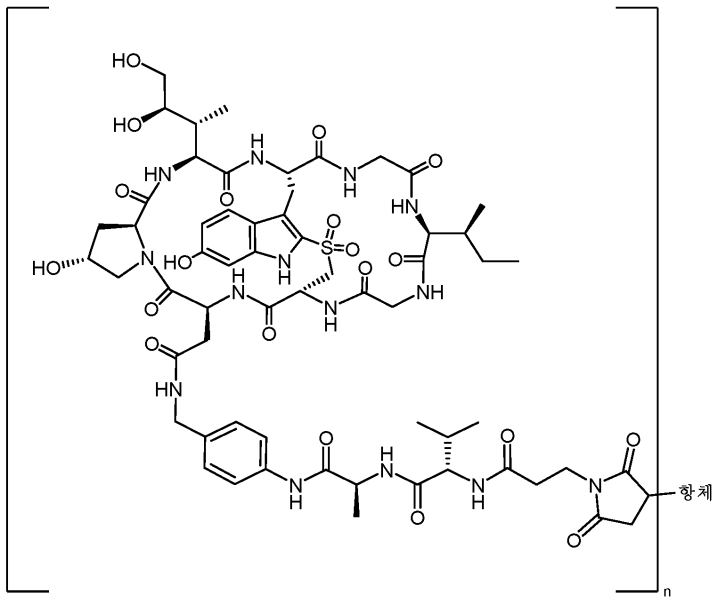
(XXIV)

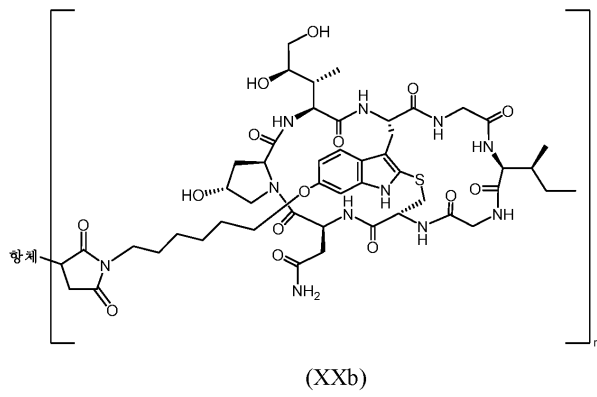
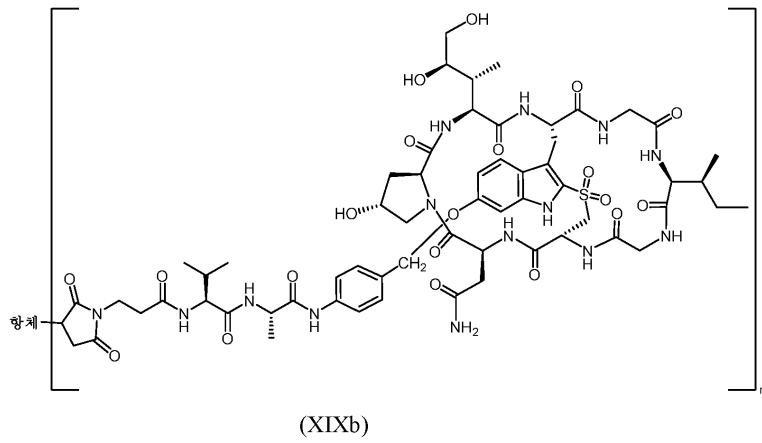
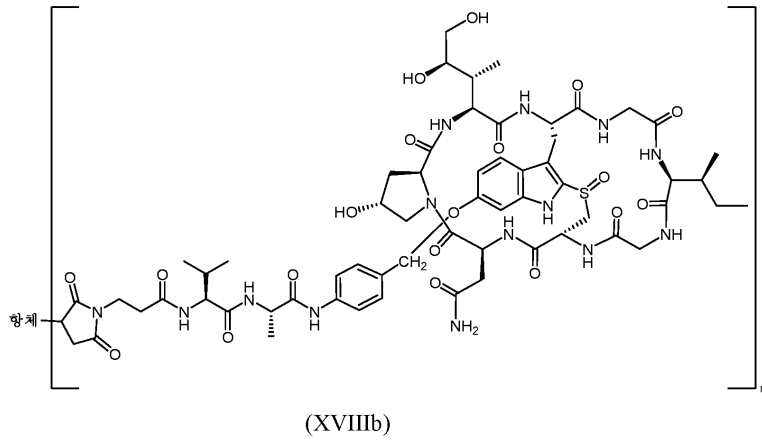


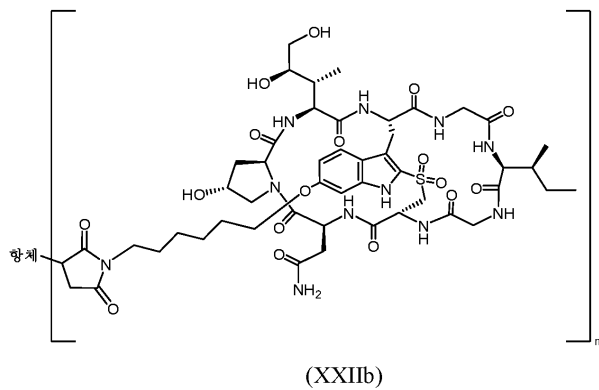
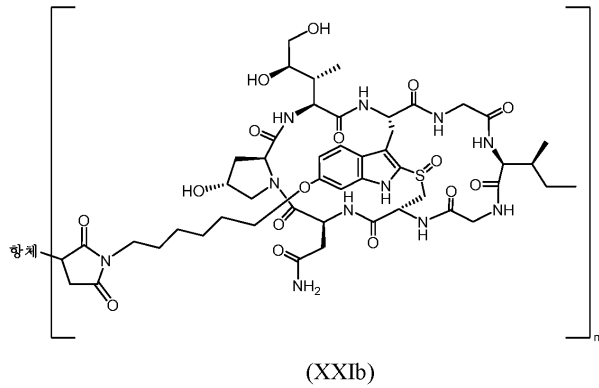
(XIIIb)



(XVb)







여기서 상기 아마톡신 링커 모이어티는 항체의 시스테인 잔기의 티올기에 커플링되고, n은 바람직하게는 1 내지 10, 바람직하게는 1, 2, 3 내지 4, 바람직하게는 1, 2 내지 5, 바람직하게는 4 내지 7, 바람직하게는 8 내지 10임.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하고, 1종 이상의 제약상 허용되는 완충제, 계면활성제, 희석제, 담체, 부형제, 충전제, 결합제, 운할제, 활택제, 붕해제, 흡착제 및/또는 보존제를 추가로 포함하는 제약 제제.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 흑색종, 편평 및 비-편평 비소세포 폐암, 전이성 소세포 폐암, 신세포 암종, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 두경부 편평 세포 암종, 메르켈 세포 암종, 간세포성 암종, 위 및 위식도 암종, 전이성 결장직장암, 원발성 종격 B 세포 림프종, 재발성 또는 전이성 자궁경부암, 및 전이성 피부 편평 세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물 또는 제약 제제.

청구항 18

암의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에게 (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및 (b) 적어도 1종의 접합체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 접합체는 (i) 표적 결합 모이어티, (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및 (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커를 포함하는 것인, 상기 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 19

암의 치료를 위한, (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및 (b) 적어도 1종의 접합체를 포함하는 조성물이며, 여기서 상기 접합체는 (i) 표적 결합 모이어티, (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및 (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커를 포함하는 것인 조성물의 용도.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 출원은 암 면역요법 분야에 관한 것이다. 특히, 본 출원은 (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및 (b) 적어도 1종의 접합체를 포함하며, 여기서 상기 접합체는 (i) 표적 결합 모이어티, (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및 (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커를 포함하는 것인, 조성물에 관한 것이다. 본 출원은 추가로 암을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 상기 조성물, 및 상기 조성물 및 추가의 부형제를 포함하는 제약 제제, 뿐만 아니라 상기 조성물의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 면역계의 조절은 선천성 및 적응성 면역계의 조절 세포, 예컨대 조절 T 세포 (Treg), 골수-유래 억제 세포 (MDSC) 및 M2-유형 대식세포; 조절 시토카인, 예컨대 IL-10 및 TGF-β; 및 T 세포 활성화를 제어하는 면역 체크포인트를 포함한 다양한 메커니즘에 의해 매개된다. 이러한 세포 및 분자는 암 및 만성 감염성 질환의 발생 동안 면역 전복의 메커니즘으로서 이용될 수 있다. 그러나, 다른 한편으로는, 지금까지 개발된 가장 성공적인 암 치료 전략 중 하나는 면역요법에 기초하였다. 이러한 치료 접근법은 화학요법 약물 또는 암 세포를 직접적으로 파괴하는 다른 치료 양식과 비교하여 더 적은 오프-타겟 결과를 가지면서, 종양의 상이한 진행 단계에 대한 속주 또는 환자의 면역 반응을 증진시키는 것을 목표로 한다 (Singh et al., 2020).

[0003] 면역 체크포인트는 상기 세포의 면역 반응성을 조정하는 T 림프구의 세포 막 상의 수용체이다. T 세포의 세포 막 상에서 발현되고, 가용성 또는 세포-결합된 리간드인 각각의 리간드와 상호작용하는 항염증 (억제) 및 염증 유발 (활성화) 면역 체크포인트가 존재한다. 종양 세포는 종종 항종양 면역 반응을 억제하는 각각의 리간드를 통해 항염증 면역 체크포인트 경로를 활성화시켜, 면역-감시를 피하고 종양 성장을 진행시킨다. 면역 체크포인트 억제제 (ICI)는 항염증성 면역 체크포인트 또는 그의 리간드에 결합하고, 면역계를 재활성화시켜 종양을 방지하는 그의 능력을 재확립함으로써 이러한 종양 억제 전략을 방해할 수 있는 작용제, 특히 모노클로날 항체이다. ICI는 다양한 종양 유형에서 임상적으로 효과적인 것으로 나타났다 (Dyck and Mills, 2017; Darwin et al., 2018).

[0004] 약물 개발을 위해 가장 널리 연구되고 사용된 ICI 표적 중 2가지는 PD-1/PD-L1-PD-L2 및 CTLA4/CD80-CD86 수용체-리간드 신호전달 경로였다. 두 경로 모두는 T-세포 활성화, 증식 및 생존의 억제를 유발한다. CTLA-4 수용체는 T 세포에서 우세하게 발현되는 반면, PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포, 및 특정 골수 세포에서 발현된다. 또한, CTLA-4는 T-세포 활성화의 프라이밍 단계에서 작용하고, 초기 T-세포 활성화를 제한하는 반면, PD-1은 이펙터 단계 동안, 주로 T 세포가 PD-1 리간드와 마주치는 말초 조직에서 나중에 작용한다 (Dyck and Mills, 2017).

[0005] 2개의 신호가 T-세포 활성화에 요구된다: 제1 신호로서 주요 조직적합성 복합체 (MHC)에 의해 제시된 펩티드 항원의 인식, 및 제2 신호로서 항원-제시 세포 (APC)에 의해 발현된 CD80 또는 CD86에의 결합 후 CD28을 통한 공동자극 (도 2). T-세포 반응의 억제에서 역할을 하는 것으로 확인된 제1 억제 수용체 중 하나인 CTLA-4는 CD28 과 구조적으로 유사하고, CD28보다 더 높은 친화도로 CD80 및 CD86에 결합한다. CTLA-4 발현은 CD28-매개 공동자극 (제2) 신호를 감소시킴으로써 T-세포 활성화를 방해하여, T 세포 무반응을 유발하고; 무반응 T 세포는 제한된 이펙터 기능을 갖는 것으로 시사되었다 (Dyck and Mills, 2017). CTLA-4 발현 및 기능은 본질적으로 T-세포 활성화와 연관되고; CTLA-4는 T 세포 수용체 (TCR) 결속 후에 즉시 상향조절된다 (신호 1). CTLA-4를 생체 내 차단하는 것은 CTLA-4가 CD80/86에 결합하는 것을 억제하고, Treg 세포를 억제하고 이펙터 T-세포 기능을 증진시킴으로써 항종양 면역을 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (Wei et al., 2018).

[0006] 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1) 분자는 면역 티로신-기반 억제 모티프 (ITIM) 및 면역 수용체 억제 티로신-기반 스위치 모티프 (ITSM) 내에 잠재적 인산화 부위를 갖는 세포내 도메인, 소수성 막횡단 영역, 및 세포 외 IgV 도메인으로 이루어진다 (Li et al., 2016). 활성화된 스위치 모티프 (ITSM)는 활성 T 세포에 대한 PD-1의 억제 효과를 위해 요구되고; PD-1 리간드 결합은 티로신 포스파타제 SHP-2의 ITSM 모티프로의 동원을 유도하여 TCR 하류 신호전달을 방해한다. 또한, PD-1 리간드 결합은 T-세포 증식, 시토카인 분비 및 대사에 중요한 신호전달 분자, 예컨대 PIP-3 키나제 및 Ras를 방해하고, 또한 T 이펙터 세포에서 대사 변경을 유도하고 Treg 세포의 유도를 촉진한다. PD-1 리간드 결합은 또한 T-세포 소진으로 이어질 수 있다.

[0007] PD-1은 T 세포, Treg, 소진된 T 세포, B 세포, 활성화된 단핵구, 수지상 세포 (DC), 자연 킬러 (NK) 세포, 자연 킬러 T (NKT) 세포, 상피 세포, 및 종양 세포 상에서 검출되었다 (Li et al., 2016). T 세포 상의 PD-1 발현

은 항원 자극에 의해 유도된다. PD-1은 주로 말초에서 T 세포에 대한 그의 억제 효과를 발휘한다. PD-1의 2개의 리간드인 PD-L1 (CD274) 및 PD-L2 (CD273)가 확인되었다. 암에서, 종양 세포 및 골수 세포는 PD-1 결합을 통해 T-세포 억제를 매개하는 주요 세포 유형인 것으로 생각된다 (Li et al., 2016; Dyck and Mills, 2017).

- [0008] CTLA-4 및 PD-1 이외에도, 최근의 연구는 림프구 활성화 유전자-3 (LAG-3), T 세포 이뮤노글로불린 및 뮤신도메인 함유-3 (TIM-3), T 세포 이뮤노글로불린 및 ITIM 도메인 (TIGIT), T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제인자 (VISTA), CD96, 및 BTLA (CD272)와 같은 추가의 면역 체크포인트 표적을 확인하였다 (Qin et al., 2019).
- [0009] LAG-3은 통상적으로 활성화된 CD4-양성 및 CD8-양성 T 세포, Treg, 자연 킬러 (NK) 세포의 하위집단, B 세포, 및 형질세포양 수지상 세포 (pDC) 상에서 발현된다. 연구는 LAG-3 신호전달이 T 헬퍼 1 (Th1) 세포 활성화, 증식 및 시토카인 분비에서 음성 조절 역할을 한다는 것을 나타냈다. 종양발생 및 암 진행 동안, 종양 세포는 면역 감시로부터 벗어나기 위해 이 경로를 이용한다. MHC-II, 갈렉틴-3, LSECtin, a-시뉴클레인, 및 피브리노겐-유사 단백질 1 (FGL1)은 LAG-3과 상호작용하는 것으로 기재되었다.
- [0010] A형 간염 바이러스 세포 수용체 2 (HAVCR2)로도 불리는 TIM-3은 N-말단 Ig 가변 영역 (IgV)-유사 도메인, O-연결된 글리코실화를 위한 부위를 함유하는 막-근위 뮤신-유사 도메인 (글리코실화 뮤신 도메인), 단일 막형단 영역 및 C-말단 세포질 꼬리를 갖는 Ig 슈퍼-패밀리에 속한다. TIM-3의 발현은 T 세포에 제한되지 않고, 이는 B 세포, Treg, NK 세포, DC, 단핵구 및 대식세포를 포함한 상이한 유형의 면역 세포 상에서 발현되는 것으로 공지되어 있다. 갈렉틴-9, 고-이동성 그룹 단백질 B1 (HMGB1), 암배아성 항원 세포 부착 분자 1 (세아캄(Ceacam)-1), 및 포스포티딜 세린 (PtdSer)을 포함한 4종의 별개의 리간드가 TIM-3의 IgV 도메인에 결합하는 것으로 보고되었으며, 여기서 갈렉틴-9 및 HMGB1은 가용성 리간드인 반면, 세아캄-1 및 PtdSer은 표면 리간드에 속한다. TIM-3과 갈렉틴-9의 결합은 Th1 세포에서 세포내 칼슘 유동을 촉발하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 기재되었고; 갈렉틴-9는 또한 결장암에서 TIM-3- 및 CD8-양성 T 세포의 아포토시스를 유도하였다. HMGB1과 TIM-3 사이의 상호작용은 주로 선천성 면역 반응에 영향을 미친다.
- [0011] TIGIT 단백질은 세포의 IgV 영역, 막형단 도메인, 및 ITIM 및 이뮤노글로불린 꼬리 티로신 (ITT)-유사 인산화 모티프를 보유하는 세포질 꼬리를 포함한다. TIGIT의 발현은 주로 T 세포 하위세트 (Treg 및 기억 T 세포 포함) 및 NK 세포 상에서 림프구에 엄격하게 제한되는 것으로 입증되었다. TIGIT는 2개의 리간드, 즉 CD155 (PVR 또는 Nec1-5) 및 CD112 (넥틴-2, PRR2 또는 PVRL2로도 알려짐)에 상이한 친화도로 결합한다. TIGIT는 리간드에 대해 CD266 (DNAM-1)과 같은 다른 대응물과 경쟁함으로써 그의 면역억제 효과를 발휘한다. CD266은 양성 공동-자극 신호를 전달하는 반면, TIGIT는 억제 신호를 T 세포 내로 전달한다 (Qin et al., 2019).
- [0012] 거의 4,000종의 활성 면역-종양학-관련 치료제가 현재 세계적 약물 개발 파이프라인에 있고, PD-1/PD-L1 차단 단독을 탐구하는 전 세계적 수의 임상 시험은 이미 2,250건에 도달하였다. 미국에서 2011년에 이필리무맙 (항-CTLA-4)이 전이성 흑색종의 치료에 대해 승인된 이래로, ICI가 승인된 적응증의 수는 20가지를 훨씬 초과하여 증가하였다 (Taams and de Gruijl, 2020). 미국 식품 의약품국 (FDA)은 지금까지 유망한 치료 결과를 나타내는 2가지 부류의 ICI를 승인하였다: CTLA-4 및 PD-1 (CD279) 및 그의 리간드인 PD-L1 (CD274, B7-H1) 및 PD-L2 (CD273, B7-DC), 다른 것은 현재 임상 시험 중임 (Singh et al., 2020).
- [0013] 면역 체크포인트 억제제로서 규제 기관에 의해 승인된 치료 모노클로날 항체는 CTLA-4에 대해 지시된 이필리무맙; PD-1에 대해 지시된 니볼루맙 및 펌브롤리주맙; 및 PD-L1에 대해 지시된 아테졸리주맙, 아벨루맙, 두르발루맙 및 세미플리맙을 포함한다 (Singh et al., 2020).
- [0014] 면역 체크포인트 차단 요법이 규제 기관에 의해 승인된 종양 유형은 흑색종, 편평 및 비-편평 비소세포 폐암, 전이성 소세포 폐암, 신세포 암종, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 두경부 편평 세포 암종, 메르켈 세포 암종, 간세포성 암종, 위 및 위식도 암종, 전이성 결장직장암, 원발성 종격 B 세포 림프종, 재발성 또는 전이성 자궁경부암, 및 전이성 피부 편평 세포 암종을 포함한다 (Wei et al., 2018; Singh et al., 2020).
- [0015] CTLA-4- 또는 PD-1-차단 항체를 사용한 단독요법에 추가로, 예를 들어 이필리무맙 및 니볼루맙을 포함하는 조합 요법이 사용되었다. 또한, ICI는 전형적으로 암 항원의 공급원 및 수지상 세포와 같은 선천성 면역 세포를 활성화시키는 아주반트로 이루어진 암 백신과 조합되어 사용되어 왔고; 암 백신은 IFN- γ 또는 용해 과립의 분비를 통해 종양 세포를 사멸시키는 종양-특이적 T 세포를 생성하는 것을 목표로 한다. ICI는 또한 방사선요법과 조합되어 및 히스톤 데아세틸라제 억제제와 조합되어 사용되어 왔으며, 이는 일부 암 유형에서 직접적인 종양 세포독성을 유도하고 종양 면역원성을 개선시킬 수 있다.
- [0016] ICI는 지난 10년에 걸쳐 암 요법에서 가장 중요한 개발 중 하나로 간주되어 왔다. 그러나, 특히 개별 ICI를 사

용한 단독요법 접근법에서, 상당한 부분의 환자는 반응하지 않았다 (Dyck and Mills, 2017). 또한, 이러한 접근법과 연관된 새로운 스펙트럼의 면역-관련 유해 사건 (irAE)의 출현이 또한 주목되었으며 (Martins et al., 2019), 이는 이러한 부류의 치료제의 높은 암 세포 특이성 및 선택성에 대한 필요를 시사한다.

[0017] 항암제의 임상 성공을 위한 주요 측면 중 하나는 면역원성 세포 사멸 (ICD)을 유도하는 그의 능력, 즉, 예를 들어 아포토시스에 의한 비-면역원성 암 세포 사멸과 비교하여, 특히 암 세포로부터 유래된 사멸-세포 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 세포 사멸 양식인 것으로 밝혀졌다. ICD는 세포 표면의 조성에서의 변화 뿐만 아니라 가용성 매개자의 방출을 수반하고; 이들 신호는 수지상 세포에 의해 발현된 일련의 수용체 상에서 작동하며, 따라서 T 세포에 대한 중앙 항원의 그의 제시를 자극한다 (Kroemer et al., 2013). 이러한 세포 사멸 양식은 원래 항암 화학요법과 관련하여 관찰되고 연구되었다.

[0018] ICD는 사멸 중인 세포의 형질 막의 조성 및 미세환경의 조성에서의 변경의 조합을 특징으로 하는 것으로 밝혀졌다 (도 3). 이들 변경은 사멸전(premortem) 스트레스 및 후속 세포 봉해로부터 발생한다. ICD는 필수적으로, 내형질 세망 (ER) 스트레스 및 스트레스에 대한 적응 반응으로서의 자가포식인 2가지 유형의 스트레스가 선행된다. 예를 들어, 화학요법으로 인한 ER 스트레스의 결과로서, 칼레티쿨린 (CRT) (그의 최대 분획이 ER 내강에 정상적으로 분비됨), 열 쇼크 단백질 및 다른 ER 단백질이 형질 막의 외부 표면에서 노출된다. 자가포식의 결과로서 및 이에 따라, 아데노신 트리포스페이트 (ATP)가 사멸 중인 세포로부터 분비된다. 세포 사멸-연관 세포 봉해의 결과로서, 비-히스톤 염색질 단백질 고-이동성 그룹 박스 1 (HMGB1)이 미세환경으로 방출된다.

[0019] 세포 표면에서 CRT 및 다른 ER 단백질의 노출, ATP의 분비, 및 HMGB1의 방출은 비-면역원성 세포 사멸과 대조적으로 ICD의 특징이다. CRT, ATP 및 HMGB1은 각각 CD91 (저밀도 지단백질 수용체-관련 단백질 1, LRP1), P2RX7 (퓨린성 수용체) 및 TLR4 (톨-유사 수용체 4) 수용체와 상호작용하며, 이들은 수지상 세포에 의해 발현되고, 사멸 중인 세포의 포식, IL-1 β 와 같은 시토카인의 생산, 및 중앙 항원의 제시를 촉진한다. 따라서, 환자의 사멸 중인 암 세포는 DC 동원, T 림프구의 증가된 수 및 활성화, 뿐만 아니라 중앙 내의 조절 T 세포 (Treg)에 비해 세포독성 CD8-양성 T 림프구 (CTL)의 증가된 비를 특징으로 하는 중앙-특이적 면역 반응을 자극하는 백신으로서 작동하고, 이는 차례로 잔류 암 세포를 제어할 수 있다 (Kroemer et al., 2013).

[0020] 다른 화학요법제는 ICD를 유도하는 그의 능력에 있어서 동등하지 않다. 생체내 암 세포에 대한 24종의 다른 세포독성 화학요법제를 시험하는 연구에서, 모든 작용제는 아포토시스를 유도하였음에도 불구하고, 이들 중 단지 4종 (3종의 안트라시클린 및 옥살리플라틴)만이 보호적 항암 면역 반응을 도출하는 것으로 관찰되었다 (Obeid et al., 2007).

[0021] 따라서, ICI의 면역 체크포인트 억제 효과와 높은 암 세포 특이성 및 선택성 뿐만 아니라 ICD를 유도하는 높은 능력을 조합한 치료제 또는 조성물을 개발할 필요가 있다.

[0022] 아마톡신은 아마니타 팔로이데스 버섯에서 발견되는 8개의 아미노산으로 구성된 시클릭 펩티드이다 (도 1 참조). 아마톡신은 포유동물 세포의 DNA-의존성 RNA 폴리머라제 II를 특이적으로 억제하고, 이에 의해 또한 영향을 받은 세포의 전사 및 단백질 생합성을 억제한다. 세포에서의 전사의 억제는 성장 및 증식의 정지를 유발한다. 공유 결합되지는 않았지만, 아마니틴과 RNA-폴리머라제 II 사이의 복합체는 매우 단단하다 (KD = 3 nM). 효소로부터의 아마니틴의 해리는 매우 느린 과정이고, 따라서 영향을 받은 세포의 회복을 가능하지 않게 만든다. 전사의 억제가 충분히 길게 지속되는 경우에, 세포는 프로그램화된 세포 사멸 (아포토시스)을 겪을 것이다.

[0023] 아마톡신을 포함하는 항체 약물 접합체 (ADC) (항체-표적화된 아마톡신 접합체) 및 중앙 항원-특이적 항체, 항체 단편 또는 유도체 또는 항체-유사 단백질이 기재되어 있다 (WO2010/115629A2, WO2016/142049A1, WO2017/149077A1).

[0024] 본 출원에 제시된 바와 같이, 본 발명자들은 예상외로 표적 결합 모이어티로서 중앙 항원-특이적 항체를 포함하는 아마톡신-기반 ADC가 면역원성 세포 사멸을 유도한다는 것을 발견하였다. 놀랍게도, 본 발명자들은 생체내에서 그의 중앙-세포 사멸 활성화에 관하여 아마톡신-기반 ADC 및 면역 체크포인트 억제제의 상승작용적 효과를 추가로 관찰하였다. 이들 결과는 예상치 못한 것이었는데, 이는 아마톡신 단독도 아마톡신-기반 ADC도 이전에 이러한 유익한 효과를 갖는 것으로 밝혀지지 않았기 때문이다.

발명의 내용

[0025] 발명의 개요

- [0026] 따라서, 선행 기술에 비추어 볼 때, 본 발명의 하나의 목적은 하기를 포함하는 제약 조성물을 제공하는 것이다:
- [0027] (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및
- [0028] (b) 적어도 1종의 접합체, 여기서 상기 접합체는 하기를 포함함:
- [0029] (i) 표적 결합 모이어티,
- [0030] (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및
- [0031] (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커.
- [0032] 본 발명의 하나의 추가의 목적은 암 또는 만성 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 조성물을 제공하는 것이며, 상기 조성물은 하기를 포함한다:
- [0033] (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및
- [0034] (b) 적어도 1종의 접합체, 여기서 상기 접합체는 하기를 포함함:
- [0035] (i) 표적 결합 모이어티,
- [0036] (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및
- [0037] (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커.
- [0038] 본 발명의 하나의 추가의 목적은 (사용하기 위한) 상기 조성물을 포함하고, 1종 이상의 제약상 허용되는 완충제, 계면활성제, 희석제, 담체, 부형제, 충전제, 결합제, 윤활제, 활택제, 봉해제, 흡착제 및/또는 보존제를 추가로 포함하는 제약 제제를 제공하는 것이었다.
- [0039] 상기 및 추가의 목적은 본 발명의 독립 청구항에 따른 방법 및 수단에 의해 충족된다. 종속 청구항은 구체적인 실시양태에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명 및 그의 특색의 일반적 이점은 하기에 상세히 논의될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1. 다양한 아마톡신의 구조식. 볼드체 (1 내지 8)의 숫자는 아마톡신을 형성하는 8개 아미노산의 표준 넘버링을 지정한다. 아미노산 1, 3, 및 4 내의 원자의 표준 명칭이 또한 제시된다 (각각 그리스 문자 α 내지 γ , 그리스 문자 α 내지 δ , 및 1' 내지 7'의 숫자).
- 도 2. 면역원성 세포 사멸의 주요 개념. 사멸전 내형질 세망 스트레스 및 자가포식의 결과로서, ICD 유도제에 반응하는 암 세포는 아포토시스전 단계에서 그의 형질 막의 외엽 상에 CRT를 노출시키고, 아포토시스 동안 ATP를 분비한다. 또한, ICD를 겪고있는 세포는 그의 막이 2차 괴사 동안 투과화됨에 따라 핵 단백질 HMGB1을 방출한다. CRT, ATP, 및 HMGB1은 각각 수용체 CD91, P2RX7, 및 TLR4에 결합한다. 이는 중앙 층 내로의 DC의 동원(ATP에 의해 자극됨), DC에 의한 중앙 항원의 포식(CRT에 의해 자극됨), 및 T 세포에의 최적 항원 제시(HMGB1에 의해 자극됨)를 용이하게 한다. 전체적으로, 이들 과정은 $\gamma \delta T$ 세포 및 CTL 둘 다를 수반하는 강력한 IL-1 β - 및 IL-17-의존성, IFN- γ -매개 면역 반응을 발생시킨다. ATP, 아데노신 트리포스페이트; CRT, 칼레티쿨린; CTL, 세포독성 CD8+ T 림프구; DC, 수지상 세포; HMGB1, 고-이동성 그룹 박스 1; IFN, 인터페론; IL, 인터류킨; TLR, 톨-유사 수용체 (Kroemer et al. 2013).
- 도 3. 면역 체크포인트 억제의 주요 개념. T 세포 수용체에 대한 펩티드 항원의 MHC 제시는 T 세포 활성화를 위한 제1 신호를 제공한다 (1). 항원-제시 세포 상의 CD80과 T 세포 상의 CD28 사이의 상호작용을 통해, T 세포는 제2 공동자극 활성화 신호를 받는다 (2). CTLA-4는 CD80에의 결합에 대해 CD28과 경쟁하고, 억제 신호를 T 세포에 전달한다 (3). T 세포 상의 PD-1 수용체는 PD-L1에 결합하여, 억제 신호를 T 세포에 전달한다 (4). 중앙 세포는 T 세포가 악성 세포를 제거하는 것을 방지하기 위해 이들 메카니즘의 사용을 이용한다. 이러한 상호작용이 발생하는 것을 방지하는 억제제 (CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1 억제제)를 사용함으로써, T 세포는 중앙 세포를 확인한 후에 활성화로 남아있고, 이를 숙주로부터 제거할 수 있다. CD, 분화 클러스터; CTLA-4, 세포독성 T 림프구 연관 항원-4; MHC, 주요 조직적합성 복합체; PD-1, 프로그램화된 세포 사멸 단백질-1; PD 리간드-1; TCR, T-세포 수용체 (문헌 [Sambi et al. 2019]로부터의 도면).
- 도 4. 항체-표적화된 아마톡신 접합체 (ATAC)에 의해 유도된 면역원성 세포 사멸. Her2-양성 세포주 BT474 및

CD79b-양성 세포주 BJAB를 각각 상이한 화합물에 노출시켰다. 면역원성 세포 사멸 (ICD) 마커 칼레티쿨린 (CRT), 아데노신 트리-포스페이트 (ATP), 및 고-이동성 그룹 박스 1 단백질 (HMGB1)을 결정하였다. 아미니틴-접합된 ADC는 ICD 마커의 분비를 표적-의존성 방식으로 유도한다. (A, B, C) Her2-양성 세포주 BT474, 및 (D, E, F) CD79b-양성 세포주 BJAB를 각각 화합물 없음 (제1 막대), 100 nM 메이탄신 (제2 막대), 100 nM 아미니틴 (제3 막대), 50 nM 항-Her2-아미니틴 접합체 (제4 막대) 및 50 nM 항-CD79b-아미니틴 접합체 (제5 막대)에 노출시키고; (A), (D) CRT-노출 (양성) 세포; (B), (E) ATP 분비; 및 (C), (F) HMGB1 방출을 평가하였다.

도 5. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 존재 하에서의 아벨루맘 및 항-CD19-아마톡신 접합체의 상승작용적 작용. 라지(Raji) 이종이식편 마우스 모델 시스템에서 생체내 항-PD-L1 항체 아벨루맘 (20 mg/kg, i.v., 제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일), 또는 항-CD19-아마톡신 접합체 (ATAC, 각각 0.1 및 0.3 mg/kg; 단일 용량 i.v. 제0일), 또는 아벨루맘 (20 mg/kg) 및 ATAC (각각 0.1 및 0.3 mg/kg)의 조합물을 사용한 항종양 연구의 결과. 종양 세포 접종 후 다양한 시점에서 종양 부피를 평가하였다.

도 6. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 부재 또는 존재 하에서의 아벨루맘 및 항-CD19-아마톡신 접합체의 상승작용적 작용. 라지 이종이식편 마우스 모델 시스템에서 각각 PBMC의 부재 하에 (군 01 - 04) 및 PBMC의 존재 하에 (군 05 - 08) 항-PD-L1 항체 아벨루맘 (20 mg/kg, i.v., 제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일), 또는 항-CD19-아마톡신 접합체 (ATAC, 0.3 mg/kg; 단일 용량 i.v. 제0일), 또는 아벨루맘 (20 mg/kg) 및 ATAC (0.3 mg/kg)의 조합물을 사용한 항종양 연구의 결과. 종양 세포 접종 후 다양한 시점에서 종양 부피를 평가하였다.

도 7. 상이한 세포주에서의 항-HER2 ATAC의 세포독성 효력의 개관. 링커-포함 아마톡신 XIXa, XVIIIa, XIIIa, XIIa, XXIa, XXIa에 접합된 항-HER2-LALA-D265C 항체 (각각의 항-HER2-LALA-D265C 항체에 커플링된 상응하는 접합된 아마톡신은 XIXb, XVIIIb, XIIIb, XIIb, XXIb, XXIb로 지정되고, 여기서 항-HER2 항체는 상기 화학식의 항체에 상응함).

도 8. s.c. JIMT-1 이종이식편 모델에서의 항-Her2 ATAC의 효능. Jimt-1 이종이식편 모델의 경우, 암컷 NMRI 누드 마우스에 마우스당 5×10^6 개의 Jimt-1 유방암 세포 (Mol Cancer Ther. 2004 Dec;3(12):1585-92)를 우측 측복부에 피하로 접종하였다. $\sim 120 \text{ mm}^3$ 의 평균 종양 부피에서, 동물을 제0일에 각각의 실험군에 할당하였다. 동일한 날에, 동물에게 지시된 바와 같이 단일 정맥내 용량의 아미니틴 기반 항-Her2 항체 약물 접합체 (ADC)를 제공하였다. 종양 부피 및 체중을 1주에 2회 결정하였다.

도 9. 라지 이종이식편 마우스 모델 시스템에서의 생체내 펌프롤리주맘 및 항-CD19-아마톡신 접합체 처리의 상승작용적 작용. 항-PD-1 항체 펌프롤리주맘 (20 mg/kg, i.v., 제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일), 또는 항-CD19-아마톡신 접합체 (항-CD19 ATAC, 0.1 mg/kg 또는 0.3 mg/kg; 단일 용량 i.v. 제0일), 또는 펌프롤리주맘 (20 mg/kg) 및 항-CD19 ATAC (0.1 mg/kg 또는 0.3 mg/kg)의 조합물을 사용한 항종양 연구의 결과. 종양 세포 접종 후 다양한 시점에서 종양 부피를 평가하였다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 10. 라지 이종이식편 마우스 모델에서 항-CTLA4 처리 및 항-CD19-아마톡신 접합체의 조합 처리의 상승작용적 효과를 도시하는 마우스의 생존 플롯. 항-CD19 ATAC를 제0일에 0.1 mg/kg 또는 0.3 mg/kg 단일 용량의 용량으로 투여하고, 이필리무맘을 제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 및 제10일에 4 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 조합 처리는 제0일에 0.1 mg/kg 또는 0.3 mg/kg (둘 다 단일 용량)의 용량의 항-CD19 ATAC, 및 제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일에 4 mg/kg의 용량의 이필리무맘을 사용하여 수행하였다. 실험 세부사항은 실시예 6에 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

발명의 상세한 설명

[0043]

본 발명을 상세히 기재하기 전에, 본 발명은 기재된 장치의 특정한 구성요소 부분 또는 기재된 방법의 공정 단계로 제한되지 않으며, 이는 이러한 장치 및 방법이 달라질 수 있기 때문임을 이해하여야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 목적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 단수 및/또는 복수 지시대상을 포함한다는 것을 유의해야 한다. 또한, 수치에 의해 한정되는 파라미터 범위가 주어지는 경우에, 범위는 이들 한계 값을 포함하는 것으로 간주된다는 것이 이해되어야 한다. 본원에서 값의 범위에 대한 언급은 단지 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 약칭 방법으로서 기능하도록 의

도된다. 본원에 달리 나타내지 않는 한, 각각의 개별 값은 본원에 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다. 본 명세서의 어떠한 용어도 본 발명의 실시예에 필수적인 임의의 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

- [0044] 단어 "실질적으로"는 "완전히"를 배제하지 않고, 예를 들어 Y가 "실질적으로 없는" 조성물은 Y가 완전히 없을 수 있다. 필요한 경우, 단어 "실질적으로"는 본 발명의 정의에서 생략될 수 있다.
- [0045] 본 명세서 및 하기 청구범위 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 용어 "포함하다" 및 변형어, 예컨대 "포함한다" 및 "포함하는"은 언급된 구성원, 정수 또는 단계의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 언급되지 않은 구성원, 정수 또는 단계의 배제를 의미하지는 않는 것으로 이해될 것이다. 용어 "이루어진다"는 용어 "포함하다"의 특정한 실시양태이며, 여기서 임의의 다른 언급되지 않은 구성원, 정수 또는 단계는 배제된다. 본 발명의 문맥에서, 용어 "포함하다"는 용어 "이루어진다"를 포괄한다. 따라서, 용어 "포함하는"은 "포함한" 뿐만 아니라 "이루어진"을 포괄하며, 예를 들어 X를 "포함하는" 조성물은 X로 독점적으로 이루어질 수 있거나, 또는 추가의 것, 예를 들어 X + Y를 포함할 수 있다.
- [0046] 추가로, 본원에 개시된 실시양태는 서로 관련되지 않을 개별 실시양태로서 이해되도록 의도되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 한 실시양태와 함께 논의된 특색은 또한 본원에 제시된 다른 실시양태와 관련하여서도 개시되도록 의도된다. 한 경우에, 특정 특색이 한 실시양태와 함께 개시되지 않으나 또 다른 실시양태와 함께 개시되는 경우, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 특색이 상기 다른 실시양태와 함께 개시되는 것을 의미하지는 않는다는 것을 반드시 의미하지는 않음을 이해할 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 특색을 또한 다른 실시양태에 대해 개시하는 것이 본 출원의 요지이지만, 단지 명확성을 위해 및 명세서를 관리가능한 부피로 유지하기 위해 이는 수행되지 않았음을 이해할 것이다.
- [0047] 또한, 본원에 언급된 선행 기술 문헌의 내용은 참조로 포함된다. 이는, 특히 표준 또는 상용 방법을 개시하는 선행 기술 문헌을 지칭한다. 이러한 경우에, 참조로 포함하는 것은 주로 충분한 구현가능 개시내용을 제공하고 장황한 반복을 피하는 목적을 갖는다.
- [0048] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 하기를 포함하는 제약 조성물이 제공된다:
- [0049] (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및
- [0050] (b) 적어도 1종의 접합체, 여기서 상기 접합체는 하기를 포함함:
- [0051] (i) 표적 결합 모이어티,
- [0052] (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및
- [0053] (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커.
- [0054] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 조성물이 제공되며, 상기 조성물은 하기를 포함한다:
- [0055] (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및
- [0056] (b) 적어도 1종의 접합체, 여기서 상기 접합체는 하기를 포함함:
- [0057] (i) 표적 결합 모이어티,
- [0058] (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및
- [0059] (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커.
- [0060] 본 발명의 제3 측면에 따르면, 만성 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 조성물이 제공되며, 상기 조성물은 하기를 포함한다:
- [0061] (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및
- [0062] (b) 적어도 1종의 접합체, 여기서 상기 접합체는 하기를 포함함:
- [0063] (i) 표적 결합 모이어티,
- [0064] (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및
- [0065] (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커.

- [0066] 면역 체크포인트 수용체로도 불리는 면역 체크포인트는 T-세포 활성화를 제어하고, 따라서 지나친 염증 및 자가 면역 질환을 예방하지만, 또한 항종양 면역 반응을 억제한다.
- [0067] 본 발명의 문맥에서, 용어 "면역 체크포인트 억제제" 또는 간단히 "체크포인트 억제제" 또는 "ICI"는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)의 표면 상에서 발견되는 면역 체크포인트 수용체 단백질 또는 분자의 수준을 직접적으로 또는 간접적으로 감소시키거나 그의 기능을 억제하는 임의의 작용제 또는 화합물, 또는 가용성 화합물로서 또는 면역 세포-억제 세포의 표면 상에서 상기 면역 체크포인트 수용체 단백질 또는 분자에 결합하는 리간드의 수준을 직접적으로 또는 간접적으로 감소시키거나 그의 기능을 억제하는 임의의 작용제 또는 화합물을 지칭한다. 이러한 억제 세포는, 예를 들어 암 세포, 조절 T 세포, 관용원성 항원 제시 세포, 골수-유래 억제 세포, 종양-연관 대식세포, 또는 암-연관 섬유모세포일 수 있다. 상기 리간드는 전형적으로 면역 세포 상의 면역 체크포인트 수용체 단백질 또는 분자에 결합할 수 있다. 면역 체크포인트 수용체 단백질-리간드 쌍의 비제한적 예는 PD-1, PD-L1이다. PD-1은 T-세포 상에서 발견되는 면역 체크포인트 수용체 단백질이다. 암 세포에 의해 과다-발현될 수 있는 PD-L1은 PD-1에 결합하고, 암 세포가 숙주 면역계 공격을 회피하는 것을 돕는다. 따라서, 면역 체크포인트 억제제는 T 세포 상의 PD-1을 차단함으로써 (즉, PD-1 억제제로서 작용함) 또는 암 세포 상의 PD-L1을 차단함으로써 (즉, PD-L1 억제제로서 작용함) PD-1/PD-L1 상호작용을 방지함으로써, 항종양 T-세포 활성을 유지 또는 회복시키거나 또는 억제 암 세포 활성을 차단한다.
- [0068] 따라서, 면역 체크포인트 억제제는 면역 억제 수용체, 예컨대 PD-1의 길항제이며, 이는 이 경우에 PD-1/PD-L1 경로에서 PD-1 또는 PD-L1을 억제한다. PD-1 또는 PD-L1 억제제의 예는, 비제한적으로, 인간 PD-1 기능을 길항 또는 차단하는 인간화 또는 인간 항체 예컨대 웹브롤리주맙, 피딜리주맙, 세미플리맙, JTX-4014, 스파르탈리주맙, 신틸리맙 (IBI308), 도스타를리맙 (TSR-042, WBP-285), INCMGA00012 (MGA012), AMP-224, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, BCD-100, AGEN-2034, 토리팔리맙 (TAB001, JS001), 또는 AMP-514 (MEDI0680), 뿐만 아니라 완전 인간 항체 예컨대 PD-1 차단 니볼루맙 또는 차단 PD-L1 예컨대 아벨루맙, 두르발루맙, 코시벨리맙 (CK-301), WBP-3155 (CS1001) 및 아테졸리주맙 또는 재조합 항-PD-L1 프로바디 CX-072를 포함한다.
- [0069] 예를 들어 문헌 [Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369(2):134-44]에 개시된 웹브롤리주맙 (이전에 램브롤리주맙으로도 공지됨; 상표명 키트루다(Keytruda); MK-3475로도 공지됨)은 PD-1에 결합하는 인간화 IgG4 모노클로날 항체이고; 이는 Fc-매개 세포독성을 방지하도록 설계된 C228P에서의 돌연변이를 함유한다. 웹브롤리주맙은 예를 들어 US 8,354,509 및 WO2009/114335에 개시되어 있다. 이는 절제불가능한 또는 전이성 흑색종을 앓고 있는 환자 및 전이성 NSCLC를 갖는 환자의 치료에 대해 FDA에 의해 승인되었다.
- [0070] 니볼루맙 (CAS 등록 번호: 946414-94-4; BMS-936558 또는 MDX1106b)은 검출가능한 항체-의존성 세포 독성 (ADCC)이 결여된, PD-1을 특이적으로 차단하는 완전 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 니볼루맙은 예를 들어 US 8,008,449 및 WO2006/121168에 개시되어 있다. 이는 절제불가능한 또는 전이성 흑색종, 전이성 NSCLC 및 진행성 신세포 암종을 앓고 있는 환자의 치료를 위해 FDA에 의해 승인되었다.
- [0071] 피딜리주맙 (CT-011; 큐어 테크(Cure Tech))은 PD-1에 결합하는 인간화 IgG1k 모노클로날 항체이다. 피딜리주맙은 예를 들어 WO2009/101611에 개시되어 있다.
- [0072] PD1-1 내지 PD1-5는 WO2018/220169에 개시된 바와 같은 항-PD-1 항체를 지칭한다.
- [0073] 이필리무맙 (CAS 등록 번호: 477202-00-9, 이는 10D1, 또는 MDX010, MDX-101로도 지칭될 수 있음)은 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA4)에 결합하는 인간 IgG1 항체이다. CTLA-4는 항원 제시 세포 상의 B7에의 결합에 대해 자극성 CD28과 경쟁하는 억제 분자이다. CTLA-4 및 CD28은 둘 다 T-세포의 표면 상에 제시된다. 이필리무맙은 종양에 대한 T-세포 매개 면역 반응의 억제를 방지하는, CTLA-4에 결합하는 인간 IgG1이다. 이필리무맙은 예를 들어 WO 01/14424에 항체 "10D1"로서 개시되어 있다.
- [0074] 본원에 사용된 바와 같은 INN은 또한, 미국에서 42 USC § 262 서브섹션 (k) 하에 인가된 바이오시밀러 항체 및 다른 관할권에서의 등가의 규정을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에 개시된 바와 같은 상응하는 기원 항체의 모든 바이오시밀러 항체를 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0075] 면역 체크포인트 수용체 또는 분자는, 예를 들어 PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, OX40, GITR, ICOS, CD276 (B7-H3), B7-H4 (VTCN1), IDO, KIR, CD122, CD137, CD94/NKG2A, CD80, CD86, 갈렉틴-3, LSECtin, CD112, 세아캄-1, Gal-9, PtdSer, HMGB1, HVEM, CD155 및 BTLA (CD272)를 비제한적으로 포함한다.
- [0076] 본 발명에 따른 면역 체크포인트 억제제는 예를 들어 소분자 (유기) 화합물 또는 대분자, 예컨대 펩티드 또는

핵산일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 소분자 면역 체크포인트 억제제는 W015033301 A1에 개시된 바와 같은 CA-170 (그의 전구체 AUNP-12 포함); 또는 예를 들어 BMS-8 (CAS 번호 1675201-90-7)을 포함한다. 본 발명의 적어도 한 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 그의 항원 결합 유도체이다. 바람직한 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 그의 항원 결합 유도체이다.

[0077] 본 발명의 문맥에서 용어 "아마톡신"은 아마니타(*Amanita*) 속으로부터 단리되고 문헌 [Wieland, T. and Faulstich H. (Wieland T, Faulstich H., CRC Crit Rev Biochem. 5 (1978) 185-260)]에 기재된 바와 같은 8개의 아미노산으로 구성된 모든 시클릭 펩티드, 추가로 그의 모든 화학적 유도체; 추가로 그의 모든 반합성 유사체; 추가로 천연 화합물의 마스터 구조에 따른 빌딩 블록으로부터 구축된 그의 모든 합성 유사체 (시클릭, 8개의 아미노산), 추가로 히드록실화 아미노산 대신에 비-히드록실화 아미노산을 함유하는 모든 합성 또는 반합성 유사체, 추가로 술폭시드 모이어티가 술포, 티오에테르에 의해, 또는 황과 상이한 원자, 예를 들어 아마니틴의 카르바나로그(carbanalog)에서와 같은 탄소 원자에 의해 대체된 모든 합성 또는 반합성 유사체를 포함한다.

[0078] 본원에 사용된 화합물의 "유도체"는 화합물과 유사한 화학 구조를 갖지만, 화합물에 존재하지 않는 적어도 1개의 화학적 기를 함유하고/거나 화합물에 존재하는 적어도 1개의 화학적 기가 결핍된 종을 지칭한다. 유도체가 비교되는 화합물은 "모" 화합물로 공지되어 있다. 전형적으로, "유도체"는 1개 이상의 화학 반응 단계에서 모 화합물로부터 생성될 수 있다.

[0079] 본원에 사용된 화합물의 "유사체"는 화합물과 구조적으로 관련되지만 동일하지는 않으며, 화합물의 적어도 하나의 활성을 나타낸다. 유사체가 비교되는 화합물은 "모" 화합물로 공지되어 있다. 상기 언급된 활성은, 비제한적으로, 또 다른 화합물에 대한 결합 활성; 억제 활성, 예를 들어 효소 억제 활성; 독성 효과; 활성화 활성, 예를 들어 효소-활성화 활성을 포함한다. 유사체가 이러한 활성을 모 화합물과 동일한 정도로 나타낼 필요는 없다. 화합물이 모 화합물의 활성의 적어도 1% (보다 바람직하게는 적어도 5%, 보다 바람직하게는 적어도 10%, 보다 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%)의 정도로 관련 활성을 나타내는 경우에, 화합물은 본 출원의 문맥 내에서 유사체로서 간주된다. 따라서, 본원에 사용된 "아마톡신의 유사체"는 α -아마니틴, β -아마니틴, γ -아마니틴, ϵ -아마니틴, 아마닌, 아마닌아미드, 아마놀린 및 아마놀린산 중 어느 하나와 구조적으로 관련되고, α -아마니틴, β -아마니틴, γ -아마니틴, ϵ -아마니틴, 아마닌, 아마닌아미드, 아마놀린 및 아마놀린산 중 적어도 하나와 비교하여 포유동물 RNA 폴리머라제 II에 대해 적어도 1% (보다 바람직하게는 적어도 5%, 보다 바람직하게는 적어도 10%, 보다 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%)의 억제 활성을 나타내는 화합물을 지칭한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 "아마톡신의 유사체"는 심지어 α -아마니틴, β -아마니틴, γ -아마니틴, ϵ -아마니틴, 아마닌, 아마닌아미드, 아마놀린 또는 아마놀린산 중 어느 하나보다 포유동물 RNA 폴리머라제 II에 대해 더 큰 억제 활성을 나타낼 수 있다. 억제 활성은 50% 억제가 발생하는 농도 (IC_{50} 값)를 결정함으로써 측정될 수 있다. 포유동물 RNA 폴리머라제 II에 대한 억제 활성은 세포 증식에 대한 억제 활성을 측정함으로써 간접적으로 결정될 수 있다.

[0080] "반합성 유사체"는 천연 공급원 (예를 들어 식물 물질, 박테리아 배양물, 진균 배양물 또는 세포 배양물)으로부터의 화합물을 출발 물질로서 사용하여 화학적 합성에 의해 수득된 유사체를 지칭한다. 전형적으로, 본 발명의 "반합성 유사체"는 아마니타세아에(*Amanitaceae*) 과의 버섯으로부터 단리된 화합물로부터 출발하여 합성되었다. 대조적으로, "합성 유사체"는 작은 (전형적으로 석유화학) 빌딩 블록으로부터 소위 전체 합성에 의해 합성된 유사체를 지칭한다. 통상적으로, 이러한 전체 합성은 생물학적 과정의 도움 없이 수행된다.

[0081] 본 발명의 일부 실시양태에 따르면, 상기 접합체의 아마톡신은 α -아마니틴, β -아마니틴, γ -아마니틴, ϵ -아마니틴, 아마닌, 아마닌아미드, 아마놀린, 아마놀린산, 및 그의 유사체, 유도체 및 염으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0082] 기능적으로, 아마톡신은 포유동물 RNA 폴리머라제 II를 억제하는 펩티드 또는 펩시펩티드로서 정의된다. 바람직한 아마톡신은 하기 정의된 바와 같은 링커 분자 또는 표적-결합 모이어티와 반응할 수 있는 관능기 (예를 들어 카르복실 기, 아미노 기, 히드록시 기, 티올 또는 티올-포획 기)를 갖는 것이다.

[0083] 본 발명의 문맥에서, 용어 "아마니틴"은 특히 위치 1의 아스파르트산 또는 아스파라긴 잔기, 위치 2의 프롤린 잔기, 특히 히드록시프롤린 잔기, 위치 3의 이소류신, 히드록시이소류신 또는 디히드록시이소류신, 위치 4의 트립토판 또는 히드록시트립토판 잔기, 위치 5 및 7의 글리신 잔기, 위치 6의 이소류신 잔기, 및 위치 8의 시스테인 잔기, 특히 술폭시드 또는 술포 유도체로 산화된 시스테인의 유도체 (아마니틴의 넘버링 및 대표적인 예에

대해, 도 1 참조)를 기재로 하는 비시클릭 구조를 지칭하고, 추가로 그의 모든 화학적 유도체; 추가로 그의 모든 반합성 유사체; 추가로 천연 화합물의 마스터 구조에 따른 빌딩 블록으로부터 구축된 그의 모든 합성 유사체 (시클릭, 8개 아미노산), 추가로 히드록실화 아미노산 대신에 비-히드록실화 아미노산을 함유하는 모든 합성 또는 반합성 유사체, 추가로 모든 합성 또는 반합성 유사체를 포함하며, 여기서 각각의 경우에 임의의 이러한 유도체 또는 유사체는 포유동물 RNA 폴리머라제 II를 억제함으로써 기능적으로 활성이다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "표적-결합 모이어티"는 표적 분자 또는 표적 에피토포에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자 또는 분자의 일부를 지칭한다. 본 출원의 맥락에서 바람직한 표적-결합 모이어티는 (i) 항체 또는 그의 항원-결합 단편; (ii) 항체-유사 단백질; 및 (iii) 핵산 압타머이다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 "표적-결합 모이어티"는 전형적으로 40,000 Da (40 kDa)이상의 분자량을 갖는다.

[0085] 본 출원의 맥락에서 "링커"는 예를 들어 표적 결합 모이어티와 아마톡신 사이의 입체 간섭을 완화시키기 위해 2개의 성분 사이의 거리를 증가시키는 분자를 지칭하며, 이는 그렇지 않으면 RNA 폴리머라제 II와 상호작용하는 아마톡신의 능력을 감소시킬 수 있다. 링커는 표적 결합 모이어티에 의해 표적화되는 세포에서 특이적으로 아마톡신의 방출을 용이하게 할 수 있기 때문에 또 다른 목적을 제공할 수 있다. 링커 및 바람직하게는 한 측면 상의 링커와 아마톡신 사이의 결합 및 다른 측면 상의 링커와 표적 결합 모이어티 또는 항체 사이의 결합은 세포 외부의 생리학적 조건, 예를 들어 혈액 하에 안정한 반면, 세포 내부에서, 특히 표적 세포, 예를 들어 암 세포 내부에서 절단될 수 있는 것이 바람직하다. 이러한 선택적 안정성을 제공하기 위해, 링커는 바람직하게는 pH-감수성 또는 프로테아제 감수성인 관능기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 링커를 표적 결합 모이어티에 연결하는 결합은 선택적 안정성을 제공할 수 있다. 바람직하게는 링커는 적어도 1개, 바람직하게는 1-30개 원자 길이 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 원자)의 길이를 가지며, 여기서 링커의 한 측면은 아마톡신과 반응하고, 다른 측면은 표적-결합 모이어티와 반응한다. 본 발명의 문맥에서, 링커는 바람직하게는 임의로 치환된, C₁₋₃₀-알킬, C₁₋₃₀-헤테로알킬, C₂₋₃₀-알케닐, C₂₋₃₀-헤테로알케닐, C₂₋₃₀-알키닐, C₂₋₃₀-헤테로알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 아르알킬, 또는 헤테로아르알킬 기이다. 링커는 1개 이상의 구조적 요소, 예컨대 아미드, 에스테르, 에테르, 티오에테르, 디설피드, 탄화수소 모이어티 등을 함유할 수 있다. 링커는 또한 이들 구조적 요소 중 2개 이상의 조합을 함유할 수 있다. 이들 구조적 요소 중 각각의 하나는 링커에 1회 초과, 예를 들어 2회, 3회, 4회, 5회 또는 6회 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 디설피드 결합을 포함할 수 있다. 링커는 단일 단계에서 또는 2개 이상의 후속 단계에서 아마톡신 및 표적 결합 모이어티에 부착되어야 하는 것으로 이해된다. 이를 위해, 링커는 바람직하게는 근위 및 원위 말단에, 2개의 기를 보유할 것이며, 이는 (i) 기, 바람직하게는 아마톡신 또는 표적 결합-펩티드 상의 활성화된 기에 공유 결합을 형성할 수 있거나 또는 (ii) 아마톡신 상의 기와 공유 결합을 형성하도록 활성화되거나 또는 활성화될 수 있다. 따라서, 링커가 존재하는 경우에, 화학적 기, 예를 들어 에스테르, 에테르, 우레탄, 펩티드 결합 등은 링커의 원위 및 근위 말단에 있는 것이 바람직하며, 이는 이러한 커플링 반응의 결과이다. "링커"의 존재는 임의적이고, 즉 독소는 표적-결합 모이어티 독소 접합체의 일부 실시양태에서 표적-결합 모이어티의 잔기에 직접 연결될 수 있다.

[0086] 제1, 제2 및 제3 측면의 상기 조성물의 바람직한 실시양태에서, 상기 면역 체크포인트 억제제 및/또는 상기 접합체의 표적 결합 모이어티는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0087] (i) 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체,

[0088] (ii) 그의 항원-결합 단편, 바람직하게는 가변 도메인 (Fv), Fab 단편 또는 F(ab)₂ 단편,

[0089] (iii) 그의 항원-결합 유도체, 바람직하게는 단일-쇄 Fv (scFv), 및

[0090] (iv) 항체-유사 단백질.

[0091] 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 그의 항원-결합 유도체는 각각 무린, 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 또는 그의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 유도체일 수 있다.

[0092] 본원에 사용된 용어 "항체"는 이뮤노글로불린 유전자 또는 이뮤노글로불린 유전자의 단편 또는 그로부터 유래된 cDNA에 의해 코딩되는 1개 이상의 폴리펩티드 쇄로 이루어진 단백질을 지칭할 것이다. 상기 이뮤노글로불린 유전자는 경쇄 카파, 람다 및 중쇄 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤 불변 영역 유전자 뿐만 아니라 임의의 많은 상이한 가변 영역 유전자를 포함한다.

[0093] 기본 이뮤노글로불린 (항체) 구조 단위는 통상적으로 2개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 쇄, 경쇄 (L, 약 25 kDa의

분자량을 가짐) 및 중쇄 (H, 약 50-70 kDa의 분자량을 가짐)로 구성된 사량체이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (VH 또는 V_H 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역 (CH 또는 C_H 로 약칭됨)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (VL 또는 V_L 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역 (CL 또는 C_L 로 약칭됨)을 함유한다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역 사이에 배치된 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 불리는 초가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL 영역은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 형성한다.

[0094] CDR은 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 결합에 가장 중요하다. 항원의 결합에 필요한 3차원 구조가 유지되는 한, FR은 다른 서열로 대체될 수 있다. 구축물의 구조적 변화는 대부분 항원에 대한 충분한 결합의 상실로 이어진다.

[0095] 용어 (모노클로날) 항체의 "항원 결합 부분"은 CD20 항원에 그의 천연 형태로 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 1개 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 부분의 예는 Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편, F(ab')₂ 단편, 힌지 영역에서 디설피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편, 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, 및 VH 도메인 및 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)으로 이루어진 dAb 단편을 포함한다.

[0096] 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 항체 단편 또는 항체 유도체는 모노클로날 항체일 수 있다. 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 이소형의 것일 수 있다.

[0097] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체" ("mAb")는 단일 특이성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체는 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래되거나 또는 이를 기초로 하거나 또는 완전 합성 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체를 제조하는 방법은 결합 특이성에 관련되지 않는다. 바람직하게는, 이러한 항체는 IgG, IgD, IgE, IgA 및/또는 IgM, 또는 그의 단편 또는 유도체로 이루어진 균으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 이러한 항체는 IgG 유형 항체 또는 그의 단편 또는 유도체이다.

[0098] 본원에 사용된 용어 "단편"은 표적 결합 능력을 보유하는 이러한 항체의 단편, 예를 들어 CDR (상보성 결정 영역), 초가변 영역, 가변 도메인 (Fv), IgG 중쇄 (VH, CH1, 힌지, CH2 및 CH3 영역으로 이루어짐), IgG 경쇄 (VL 및 CL 영역으로 이루어짐), 및/또는 Fab 및/또는 F(ab)₂를 지칭할 것이다.

[0099] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 유도체" 또는 "유도체"는 공통 항체 개념과 구조적으로 상이하지만 여전히 일부 구조적 관계를 갖는 단백질 구축물, 예를 들어 펩티드 스캐폴드 및 그것이 유래된 원래 항체의 CDR 중 적어도 1개로 구성된 단백질을 지칭할 것이다. 예는 예를 들어 scFv, Fab 및/또는 F(ab)₂, 뿐만 아니라 이중-, 삼중- 또는 보다 고도의 특이적 항체 구축물을 포함한다. 모든 이들 항목은 하기에 설명된다.

[0100] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 항체 유도체는 디아바디, 낙타류 항체, 도메인 항체, scFv로 이루어진 2개의 쇠를 갖는 2가 동종이량체, IgA (J 쇠 및 분비 성분에 의해 연결된 2개의 IgG 구조), 상어 항체, 신세계 영장류 프레임워크 플러스 비-신세계 영장류 CDR로 이루어진 항체, CH3+VL+VH를 포함하는 이량체화된 구축물, CDR을 포함하는 다른 스캐폴드 단백질 포맷, 및 항체 접합체 (예를 들어, 약물, 독소, 시토키인, 압타머, 핵산, 예컨대 테스옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA), 치료 폴리펩티드, 방사성동위원소 또는 표지에 연결된 항체, 또는 그의 단편 또는 유도체)이다. 상기 스캐폴드 단백질 포맷은, 예를 들어 항체-유사 단백질, 예컨대 안키린 및 아필린 단백질 등을 포함할 수 있다.

[0101] 본원에 사용된 용어 "항체-유사 단백질"은 표적 분자에 특이적으로 결합하도록 (예를 들어 Ig 루프의 돌연변이 유발에 의해) 조작된 단백질을 지칭한다. 전형적으로, 이러한 항체-유사 단백질은 양쪽 말단에서 단백질 스캐폴드에 부착된 적어도 하나의 가변 펩티드 루프를 포함한다. 이러한 이중 구조적 제약은 항체-유사 단백질의 결합 친화도를 항체와 대등한 수준으로 크게 증가시킨다. 가변 펩티드 루프의 길이는 전형적으로 10 내지 20개의 아미노산으로 이루어진다. 스캐폴드 단백질은 우수한 용해도 특성을 갖는 임의의 단백질일 수 있다. 바람직하게는, 스캐폴드 단백질은 작은 구상 단백질이다. 항체-유사 단백질은 비제한적으로 아피바디, 안티칼린, 및 설계된 안키린 반복 단백질을 포함한다 (Binz et al., 2005). 항체-유사 단백질은, 예를 들어 대형 파지 디

스플레이 라이브러리로부터 패닝함으로써 돌연변이체의 대형 라이브러리로부터 유래될 수 있고, 정규 항체와 유사하게 단리될 수 있다. 또한, 항체-유사 결합 단백질은 구형 단백질 내의 표면-노출 잔기의 조합 돌연변이유발에 의해 획득될 수 있다.

- [0102] 본원에 사용된 용어 "Fab"는 항원 결합 영역을 포함하는 IgG 단편에 관한 것이며, 상기 단편은 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄로부터의 1개의 불변 및 1개의 가변 도메인으로 구성된다.
- [0103] 본원에 사용된 용어 "F(ab)₂"는 디설피드 결합에 의해 서로 연결된 2개의 Fab 단편으로 이루어진 IgG 단편에 관한 것이다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "scFv"는 통상적으로 세린 (S) 및/또는 글리신 (G) 잔기를 포함하는 짧은 링커와 함께 연결된, 이뮤노글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 융합체인 단일-쇄 가변 단편에 관한 것이다. 이 키메라 분자는 불변 영역의 제거 및 링커 펩티드의 도입에도 불구하고, 원래 이뮤노글로불린의 특이성을 보유한다.
- [0105] 변형된 항체 포맷은 예를 들어 이중- 또는 삼중특이적 항체 구축물, 항체-기반 융합 단백질, 면역접합체 등이다.
- [0106] IgG, scFv, Fab 및/또는 F(ab)₂는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 항체 포맷이다. 관련 구현 가능 기술은 각각의 교과서로부터 이용가능하다.
- [0107] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 그의 항원-결합 유도체는 각각 무린, 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 또는 그의 항원-결합 단편 또는 항원-결합 유도체이다.
- [0108] 마우스로부터 유래된 모노클로날 항체 (mAb)는 항체를 도출할 수 있는 또 다른 종으로부터의 단백질을 함유한다는 사실로 인해 원치않는 면역학적 부작용을 유발할 수 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해, 항체 인간화 및 성숙 방법은 비-인간 모 항체의 특이성 및 친화도를 이상적으로 여전히 보유하면서 인간에게 적용될 때 최소 면역원성을 갖는 항체 분자를 생성하도록 설계되었다 (검토를 위해 문헌 [Almagro and Fransson 2008] 참조). 이들 방법을 이용하여, 예를 들어 마우스 mAb의 프레임워크 영역을 상응하는 인간 프레임워크 영역으로 대체한다 (소위 CDR 그래프팅). WO200907861은 재조합 DNA 기술에 의해 비-인간 항체의 CDR 영역을 인간 불변 영역에 연결시킴으로써 인간화 형태의 마우스 항체를 생성하는 것을 개시한다. 의료 연구 협의회(Medical Research Council)에 의한 US6548640은 CDR 그래프팅 기술을 기재하고, 셀테크(Celltech)에 의한 US5859205는 인간화 항체의 생산을 기재한다.
- [0109] 본원에 사용된 용어 "인간화 항체"는 항체의 불변 영역 및/또는 프레임워크 영역의 적어도 일부, 및 임의로 CDR 영역의 일부가 인간 이뮤노글로불린 서열로부터 유래되거나 그에 대해 조정된 것인 항체, 그의 단편 또는 유도체에 관한 것이다.
- [0110] 본원에 개시된 항체, 그의 항체 단편 또는 항체 유도체는 적절한 리간드 친화도를 유지하는, 특히 바람직한 VH- 및 VL-기반 항원-결합 영역의 인간화 서열을 포함할 수 있다. 상기 인간화 서열을 획득하기 위한 아미노산 서열 변형은 원래 항체의 CDR 영역 및/또는 프레임워크 영역 및/또는 항체 불변 영역 서열에서 발생할 수 있다.
- [0111] 상기 항체, 또는 그의 항체 단편 또는 항체 유도체는 글리코실화될 수 있다. 글리칸은 중쇄의 아스파라긴 297에서 N-연결된 올리고사카라이드 쇄일 수 있다.
- [0112] 본 발명의 항체 또는 단편 또는 유도체는 숙주 세포를 본 발명에 따른 항체에 대한 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질감염시킴으로써 생산될 수 있다. 발현 벡터 또는 재조합 플라스미드는 코딩 항체 서열을 예를 들어 CMV 프로모터와 같은 프로모터 및 인핸서 서열을 포함한 적절한 조절 유전자 요소의 제어 하에 놓음으로써 생산된다. 중쇄 및 경쇄 서열은 공동-형질감염된 개별 발현 벡터로부터, 또는 이중 발현 벡터로부터 발현될 수 있다. 상기 형질감염은 일시적 형질감염 또는 안정적인 형질감염일 수 있다. 형질감염된 세포를 후속적으로 배양하여 형질감염된 항체 구축물을 생산한다. 안정적인 형질감염이 수행되면, 적절하게 회합된 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체를 분비하는 안정한 클론이 적절한 검정, 예컨대 예를 들어 ELISA로 스크리닝함으로써 선택되고, 서브클로닝되고, 향후 생산을 위해 증식된다.
- [0113] 본 발명에 따른 조성물의 일부 실시양태에서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, BTLA (CD272), OX40 (CD134), B7-H4 (VTCN1), CD96, CD278 (ICOS), CD94/NKG2A 및 CD160으로 이루어진 군으로부터 선택된 면역 체크포인트 수용체에, 또는 PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, 갈락틴-3, LSECtin, CD112, 세아캄-1, Gal-9, PtdSer, HMGB1, HVEM, CD155, OX40L, CD275 (ICOSLG)로 이루어진 군으로부터 선택된

면역 체크포인트 수용체의 리간드에 결합한다.

- [0114] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, 세미플리맙, JTX-4014, 스파르탈리주맙, 신틸리맙 (IBI308), 도스타를리맙 (TSR-042, WBP-285), INCMGA00012 (MGA012), AMP-224, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, BCD-100, AGEN-2034, 토리팔리맙 (TAB001, JS001), 또는 AMP-514 MEDI0680 니볼루맙, 아벨루맙, 두르발루맙, 코시벨리맙 (CK-301), WBP-3155 (CS1001), 아테졸리주맙 또는 CX-072, 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 그의 항원-결합 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체인 면역 체크포인트 억제제를 포함한다. 바람직하게는, 항체는 아벨루맙, 니볼루맙, 이필리무맙, 펌브롤리주맙 또는 그의 항원-결합 단편 또는 그의 항원-결합 유도체 중 하나이다.
- [0115] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 조성물은 2종 이상의 면역 체크포인트 억제제, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 2, 3, 4, 5, 6종의 면역 체크포인트 억제제의 조합을 포함하고, 바람직하게는 조성물은 2종의 면역 체크포인트 억제제의 조합을 포함한다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 조성물은 상이한 면역 체크포인트를 표적화하는 2종 이상의 면역 체크포인트 억제제, 예를 들어 CTLA-4 및 PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L1 및 TIGIT, PD-1/PD-L1 및 OX40, PD-1/PD-L1 및 VISTA, CTLA4 및 TIGIT, CTLA4 및 OX40을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0116] 따라서, 본 발명에 따른 조성물은 예를 들어 면역 체크포인트 억제제의 하기 조합 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0117] CTLA4 - PD-1/PD-L1:
- [0118] 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 이필리무맙
- [0119] PD-1/PD-L1 및 TIGIT:
- [0120] 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 티라골루맙; 또는 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 BMS986207;
- [0121] PD-1/PD-L1 및 OX40:
- [0122] 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 BMS986178
- [0123] PD-1/PD-L1 및 VISTA:
- [0124] 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 CI-8993
- [0125] PD-1/PD-L1 및 OX40:
- [0126] 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 MEDI0562, 또는 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 PF04518600
- [0127] TIM-3 및 PD-1/PD-L1:
- [0128] 니볼루맙, 아벨루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 두르발루맙, 아테졸리주맙 중 하나와 조합된 MBG453
- [0129] CTLA4 및 TIGIT:
- [0130] 티라골루맙 또는 BMS986207 중 하나와 조합된 이필리무맙.
- [0131] CTLA4 및 OX40:
- [0132] MEDI0562 또는 PF04518600 중 하나와 조합된 이필리무맙.
- [0133] 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 표적 결합 모이어티를 포함하며, 여기서 상기 접합체의 상기 표적 결합 모이어티는 암 세포의 세포 표면 상의 표적 분자에 결합하고, 여기서 표적 분자는 PSMA, CD19, CD37, CD269, 시알릴 루이스^a, HER-2/neu, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM) 중 하나이다. 상기 개시된 바와 같은 표적

분자 PSMA, CD19, CD37, CD269, 시알릴 루이스^a, HER-2/neu, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM)는 하기 단백질 또는 세포 표면 항원을 지칭한다: 본원에 사용된 "PSMA"는 또한 글루타메이트 카르복시펩티다제 II (GCPII), N-아세틸-L-아스파르틸-L-글루타메이트 펩티다제 I (NAALADase I) 또는 N-아세틸-아스파르틸글루타메이트 (NAAG) 펩티다제로 공지된 전립선 특이적 막 항원을 지칭하고, 인간 폴레이트 히드롤라제 (FOLH1) 유전자에 의해 코딩되는 효소이다. PSMA는 상이한 생리학적 역할을 하는 막-결합 세포 표면 펩티다제이고, 다양한 조직, 예컨대 전립선, 신장, 소장, 중추 및 말초 신경계에서 발현된다. 이는 교모세포종, 유방암 및 방광암을 포함한 수많은 고형 종양 악성종양의 악성 전립선 상피 세포 및 혈관 내피 세포에 의해 고도로 발현된다.

[0134] 상기 개시된 "CD19"는 CD19 분자 (분화 클러스터 19)로도 공지된 B-림프구 항원 CD19, B-림프구 표면 항원 B4, T-세포 표면 항원 Leu-12 및 인간에서 유전자 CD19에 의해 코딩되는 막횡단 단백질인 CVID3을 지칭한다. CD19는 B 림프구 발생, 림프종 진단을 위한 바이오마커이고, 백혈병 면역요법을 위한 표적으로서 이용될 수 있다.

[0135] 상기 개시된 용어 "CD37"은 인간에서 CD37 유전자에 의해 코딩되고 "테트라스파닌" 슈퍼패밀리 또는 막횡단 4 슈퍼패밀리의 구성원인 단백질을 지칭한다. 테트라스파닌은 세포 성장, 생존, 부착, 세포-세포 소통, 및 트래킹, 엑소솜을 통한 세포간 소통, 종양발생, 전이, 및 면역 반응의 조절을 포함한 광범위한 생물학적 과정에 관여하는, 신호전달 전달의 "분자 촉진제"로서 간주되는 4개의 보존된 막횡단 도메인의 존재를 특징으로 한다. 테트라스파닌 구성원은 또한 세포 운동성, 발생 및 분화, 활성화, 증식, 이동 및 종양 침습을 포함한 광범위한 세포 과정에서 기능적 역할을 갖는 것으로 기재되었다 (Hemler 2001; Xu-Monette et al. 2016). 증가된 CD37 발현은 B 세포 악성종양에서 발견되었다 (Zou et al. 2018). B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL) 및 B-세포 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL)을 포함한 대부분의 B-세포 악성종양은 CD37을 발현한다.

[0136] 상기 개시된 바와 같은 표적 분자 CD269는, 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 17 (TNFRSF17)도 공지된 B-세포 성숙 항원 (BCMA 또는 BCM)을 지칭하며, 이는 인간에서 TNFRSF17 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. CD269는 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종에 연루된다.

[0137] 상기 개시된 바와 같은 시알릴 루이스^a (CD15로도 지칭됨)는 시알산, 푸코스 및 N-아세틸락토사민으로 구성된 테트라사카라이드를 지칭한다. 시알릴 루이스^a는 호지킨병을 갖는 환자에서 뿐만 아니라 일부 B-세포 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 및 대부분의 급성 비림프구성 백혈병에서 발현되는, 호중구 상에서 발견되는 식세포작용 및 화학주성을 매개한다. 시알릴 루이스^a는 거의 모든 리드-스텐버그(Reed-Sternberg) 세포 상에 존재하고, 호지킨 림프종을 진단하는 생검에서 상기 세포의 존재를 확인하기 위해 면역조직화학에서 사용될 수 있다.

[0138] 상기 개시된 바와 같은 HER-2/neu는 CD340 (분화 클러스터 340)으로 또한 공지된 수용체 티로신-단백질 키나제 erbB-2를 지칭하고, 원종양유전자 Neu, Erbb2 (설치류), 또는 ERBB2 (인간)는 인간에서 ERBB2 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. ERBB는 조류 계통으로부터 단리된 유전자인 적혈모구성 종양유전자 B로부터 축약된다. 이는 또한 빈번하게 HER2 (인간 표피 성장 인자 수용체 2로부터) 또는 HER2/neu로 불린다. HER2는 인간 표피 성장 인자 수용체 (HER/EGFR/ERBB) 패밀리의 구성원이다. 수용체의 이량체화는 수용체의 세포질 도메인 내의 티로신 잔기의 자가인산화를 유발하고, 세포 증식 및 종양발생으로 이어지는 다양한 신호전달 경로를 개시한다. HER2의 증폭 또는 과다발현은 대략 유방암의 15-30% 및 위/위식도암의 10-30%에서 발생하고, 예후 및 예측 바이오마커로서 작용한다.

[0139] 상기 개시된 바와 같은 EpCAM은 상피에서 Ca²⁺-비의존성 동형 세포-세포 부착을 매개하는 막횡단 당단백질인 "상피 세포 부착 분자"를 지칭한다. EpCAM은 30-40 kD의 분자량을 갖는 글리코실화 유형 I 막 단백질이고, 인간에서 EPCAM 유전자에 의해 코딩된다. EpCAM 분자의 서열은 3개의 잠재적 N-연결된 글리코실화 부위의 존재를 예측한다. 이는 314개 아미노산으로 구성된다. EpCAM은 표피 성장 인자 (EGF)- 및 티로글로불린 반복부-유사 도메인을 갖는 세포외 도메인 (242개 아미노산), 단일 막횡단 도메인 (23개 아미노산), 및 짧은 세포내 도메인 (26개 아미노산)으로 이루어진다. EpCAM은 세포 신호전달, 이동, 증식 및 분화에 관여한다. 또한, EpCAM은 c-myc, e-fabp 및 시클린 A & E를 상향조절하는 그의 능력을 통해 종양원성 잠재력을 갖는다. EpCAM은 또한 EpCAM, 17-1A, HEA125, MK-1, GA733-2, EGP-2, EGP34, KSA, TROP-1, ESA 또는 KS1/4로 지칭될 수 있다. EpCAM은 상피 및 상피-유래 신생물에서 독점적으로 발현되고, 다양한 암에 대한 진단 마커로서 사용될 수 있다.

[0140] 본 출원의 문맥에서, 용어 "표적 분자" 및 "표적 에피토프" 각각은 표적-결합 모이머티에 의해 특이적으로 결합되는 항원 및 항원의 에피토프를 각각 지칭한다. 특히 표적 분자는 종양-연관 항원, 특히 비-종양 세포의 표면

과 비교하여 증가된 농도로 및/또는 상이한 입체 배위로 1종 이상의 중양 세포 유형의 표면 상에 존재하는 항원 또는 에피토프이다. 특히, 상기 항원 또는 에피토프는 1개 이상의 중양 세포 유형의 표면 상에 존재하지만, 비-중양 세포의 표면 상에는 존재하지 않는다. 특정한 실시양태에서, 표적-결합 모이어티는 PSMA, CD19, CD37, CD269, 시알릴 루이스^a, HER-2/neu, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM)로부터 선택된 항원의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 다른 실시양태에서, 상기 항원 또는 에피토프는 자가면역 질환에 관여하는 세포 상에서 우선적으로 발현된다. 특정 실시양태에서, 표적-결합 모이어티는 IL-6 수용체 (IL-6R)의 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0141] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 조성물은 표적 결합 모이어티를 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 접합체의 상기 표적 결합 모이어티는 D265C, D265A, A118C, L234A 또는 L235A (EU 넘버링 시스템에 따름)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 갖는 항체이다. "카바트에서와 같은 EU 인텍스" 또는 "EU 넘버링 시스템"은 인간 IgG1 EU 항체의 넘버링을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85] 참조, 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0142] 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 접합체의 표적-결합 모이어티를 나타내는 항체는 D265C 돌연변이를 보유하는 Fc 영역을 포함하고, 존재하는 경우에 상기 링커는, 또는 상기 아마톡신은 상기 항체의 D265C 잔기 중 1 또는 2개를 통해, 바람직하게는 디설피드 연결을 통해 상기 항체에 연결된다.

[0143] 본 발명의 일부 실시양태에 따르면, 상기 접합체의 표적-결합 모이어티를 나타내는 상기 항체는 EU 넘버링 시스템에 따른 중쇄 118Cys, 중쇄 239Cys 또는 중쇄 265Cys, 바람직하게는 EU 넘버링 시스템에 따른 중쇄 265Cys를 포함하도록 유전자 조작되었고, 여기서 존재하는 경우에 상기 링커는, 또는 상기 아마톡신은 각각 상기 중쇄 118Cys 또는 상기 중쇄 239Cys 또는 중쇄 265Cys 잔기를 통해 상기 항체에 연결된다.

[0144] 바람직한 실시양태에 따르면, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 상기 접합체의 표적-결합 모이어티를 나타내는 항체는 L234 돌연변이, L235 돌연변이 및 D265 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0145] 보다 바람직한 실시양태에 따르면, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 상기 접합체의 표적-결합 모이어티를 나타내는 항체는 L234A, L235A 및 D265C 돌연변이 (EU 넘버링 시스템에 따름)를 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0146] 본원에 사용된 용어 "유전자 조작된" 또는 "유전자 조작"은 유전자 기술적 방법, 예컨대 예를 들어 문헌 [Biochem. J. (1986) 237, 1-7, 또는 J Biol Chem. 2015 Jan 30; 290(5): 2577-2592]에 기재된 바와 같은 부위-지정 돌연변이유발에 의한, 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 치환, 삽입, 결실 또는 복귀, 또는 그의 임의의 조합의 의미에서의 주어진 또는 천연 폴리펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열 또는 그의 일부의 변형에 관한 것이다.

[0147] 본원에 사용된 용어 "아미노산 치환"은 단백질의 아미노산 서열의 변형에 관한 것이며, 여기서 1개 이상의 아미노산이 동일한 수의 상이한 아미노산으로 대체되어, 원래 단백질과 상이한 아미노산 서열을 함유하는 단백질을 생산한다. 보존적 아미노산 치환은 유사한 크기, 전하, 극성 및/또는 입체형태로 인해 단백질의 구조 및 기능에 유의하게 영향을 미치지 않는 치환에 관한 것으로 이해된다. 이러한 의미에서 보존적 아미노산의 군은, 예를 들어 비-극성 아미노산 Gly, Ala, Val, Ile 및 Leu; 방향족 아미노산 Phe, Trp 및 Tyr; 양으로 하전된 아미노산 Lys, Arg 및 His; 및 음으로 하전된 아미노산 Asp 및 Glu를 나타낸다. 예시적인 아미노산 치환은 하기 표 1에 제시된다.

원래 잔기	치환의 예
Ala (A)	Val, Leu, Ile, Gly
Arg (R)	His, Lys
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, His
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Tyr, Trp, Met
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

[0148]

[0149]

본 발명의 일부 실시양태에 따르면, 존재하는 경우에 상기 링커는, 또는 상기 아미노산은 상기 항체의 임의의 천연 Cys 잔기를 통해, 바람직하게는 디설피드 연결을 통해 상기 항체에 연결된다.

[0150]

또한, 본 발명에 따른 접합체는 10×10^{-9} M, 9×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M보다 우수한, 바람직하게는 10×10^{-10} M, 9×10^{-10} M, 8×10^{-10} M, 7×10^{-10} M, 6×10^{-10} M, 5×10^{-10} M, 4×10^{-10} M, 3×10^{-10} M, 2×10^{-10} M보다 우수한, 보다 바람직하게는 10×10^{-11} M, 9×10^{-11} M, 8×10^{-11} M, 7×10^{-11} M, 6×10^{-11} M, 5×10^{-11} M, 4×10^{-11} M, 3×10^{-11} M, 2×10^{-11} M, 또는 1×10^{-11} M보다 우수한 IC_{50} 의 세포독성 활성을 가질 수 있다.

[0151]

본 발명의 일부 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같은 접합체는 (i) 6'-데옥시 위치를 갖는 아미노산 4 및 (ii) 5'-데옥시 위치를 갖는 아미노산 8을 포함하는 아미노산을 포함한다.

[0152]

본 발명의 일부 실시양태에서, 존재하는 경우에 상기 접합체의 링커는, 또는 상기 표적 결합 모이어티는 (i) 아미노산 아미노산 1의 γ C-원자, 또는 (ii) 아미노산 아미노산 3의 δ C-원자, 또는 (iii) 아미노산 아미노산 4의 6'-C-원자를 통해 상기 아미노산에 연결된다.

[0153]

본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 기재된 바와 같은 조성물 중 상기 접합체는 링커를 포함한다.

[0154]

상기 링커는 안정한 (비-절단가능한) 또는 절단가능한 링커일 수 있다. 절단가능한 링커는 효소적으로 절단가능한 링커, 바람직하게는 프로테아제-절단가능한 링커, 및 화학적으로 절단가능한 링커, 바람직하게는 디설피드

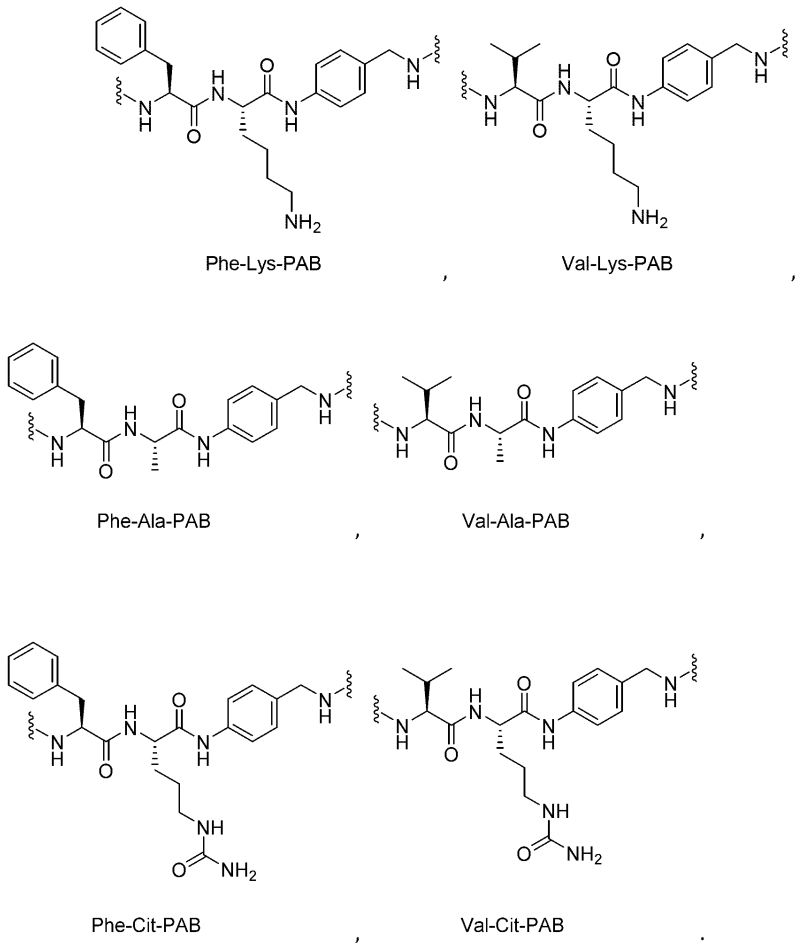
가교를 포함하는 링커로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0155] "절단가능한 링커"는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는 것으로 이해된다. 본원에 사용된 용어 "절단 부위"는 특정한 조건 하에 정의된 위치에서의 특이적 절단에 감수성인 모이어티를 지칭할 것이다. 상기 조건은, 예를 들어 특정 신체 또는 세포 구획에서의 특정 효소 또는 환원성 환경이다.

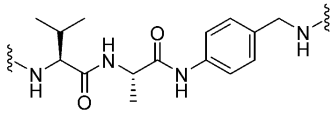
[0156] "비-절단가능한 링커"는 예를 들어 카텝신 B에 의한 효소적 절단의 대상이 아닌 것으로 이해되고, 표적 세포 내부에서 본 발명의 접합체의 항체 모이어티의 분해 (예를 들어, 리소솜 분해) 동안 본 발명의 접합체로부터 방출된다.

[0157] 본 발명의 일부 실시양태에 따르면, 절단 부위는 2개 이상의 아미노산을 포함하는 효소적으로 절단가능한 모이어티이다. 바람직하게는, 상기 효소적으로 절단가능한 모이어티는 발린-알라닌 (Val-Ala), 발린-시트룰린 (Val-Cit), 발린-리신 (Val-Lys), 발린-아르기닌 (Val-Arg) 디펩티드, 페닐알라닌-리신-글리신-프롤린-류신-글리신 (Phe Lys Gly Pro Leu Gly) 또는 알라닌-알라닌-프롤린-발린 (Ala Ala Pro Val) 펩티드, 또는 β-글루쿠로니드 또는 β-갈락토시드를 포함한다. 효소적으로 절단가능한 모이어티는 또한 링커로 지칭될 수 있다.

[0158] 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 효소적으로 절단가능한 모이어티는 Phe-Lys, Val-Lys, Phe-Ala, Val-Ala, Phe-Cit 및 Val-Cit로부터 선택된 디펩티드를 포함하고, 특히 여기서 절단가능한 링커는 디펩티드와 아마톡신 사이에 p-아미노벤질 (PAB) 스페이서를 추가로 포함한다:



[0159] 따라서, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명의 접합체는 상기 개시된 바와 같은 디펩티드-PAB 모이어티 Phe-Lys-PAB, Val-Lys-PAB, Phe-Ala-PAB, Val-Ala-PAB, Phe-Cit-PAB, 또는 Val-Cit-PAB 중 어느 하나를 포함하는 효소적으로 절단가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 접합체의 절단가능한 모이어티는 디펩티드-PAB 모이어티 Val-Ala-PAB를 포함하며:



Val-Ala-PAB

[0161]

[0162]

[0163]

[0164]

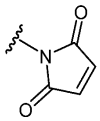
[0165]

[0166]

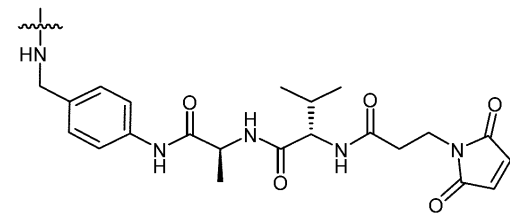
여기서 PAB 모이어티는 아마톡신에 연결된다.

일부 실시양태에 따르면, 상기 개시된 바와 같은 본 발명의 절단가능한 모이어티 또는 링커는 브로모 아세트아미드, 아이오도 아세트아미드, 메틸술폰닐벤조티아졸, 4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일아미노 기 메틸-술폰닐 페닐테트라졸 또는 메틸술폰닐 페닐옥사디아졸, 피리딘-2-티올, 5-니트로피리딘-2-티올, 메탄티오술폰네이트 또는 말레이미드로부터 선택된 티올 반응성 기를 포함한다.

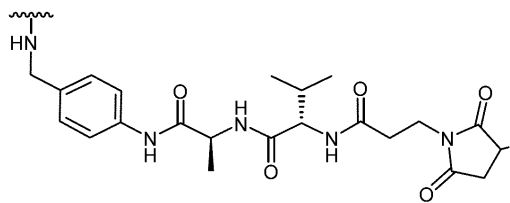
바람직한 실시양태에 따르면, 티올 반응성 기는 하기 도시된 바와 같은 말레이미드 (말레이미딜 모이어티)이다:



특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 링커는 본원에 개시된 바와 같은 항체에 대한 (i) 커플링 전, 또는 (ii) 커플링 후의 구조를 포함한다:



(i)



(ii)

[0167]

[0168]

[0169]

[0170]

[0171]

[0172]

일부 실시양태에 따르면, 상기 절단 부위는 시스테인 프로테아제, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 트레오닌 프로테아제 및 아스파르트산 프로테아제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 프로테아제에 의해 절단가능할 수 있다.

티올 프로테아제로도 공지된 시스테인 프로테아제는 촉매 트리어드(triad) 또는 디어드(dyad)에서 친핵성 시스테인 티올을 수반하는 공통적인 촉매 메커니즘을 공유하는 프로테아제이다.

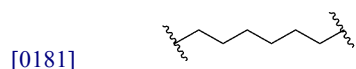
메탈로프로테아제는 촉매 메커니즘이 금속을 포함하는 프로테아제이다. 대부분의 메탈로프로테아제는 아연을 필요로 하지만, 일부는 코발트를 사용한다. 금속 이온은 3개의 리간드를 통해 단백질에 배위된다. 금속 이온을 배위하는 리간드는 히스티딘, 글루타메이트, 아스파르테이트, 리신 및 아르기닌에 따라 달라질 수 있다. 제 4 배위 위치는 불안정한 물 분자에 의해 차지된다.

세린 프로테아제는 단백질 내의 펩티드 결합을 절단하는 효소이고; 세린은 효소의 활성 부위에서 친핵성 아미노산으로서 작용한다. 세린 프로테아제는 그의 구조에 기초하여 2개의 광범위한 카테고리에 속한다: 키모트립신-유사 (트립신-유사) 또는 서브틸리신-유사.

트레오닌 프로테아제는 활성 부위 내에 트레오닌 (Thr) 잔기를 보유하는 단백질분해 효소의 패밀리이다. 이러

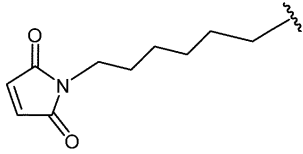
한 부류의 효소의 원형 구성원은 프로테아솜의 촉매 서브유닛이지만, 아실트랜스퍼라제는 수렴적으로 동일한 활성 부위 기하구조 및 메카니즘을 진화시켰다.

- [0173] 아스파르트산 프로테아제는 그의 펩티드 기질의 촉매작용을 위해 1개 이상의 아스파르테이트 잔기에 결합된 활성화된 물 분자를 사용하는 촉매 유형의 프로테아제 효소이다. 일반적으로, 이들은 활성 부위에 2종의 고도로 보존된 아스파르테이트를 갖고, 산성 pH에서 최적으로 활성이다. 거의 모든 공지된 아스파르틸 프로테아제는 펩스타틴에 의해 억제된다.
- [0174] 본 발명의 일부 실시양태에서, 절단가능한 부위는 카텝신 A 또는 B, 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP), 엘라스타제, β -글루쿠로니다제 및 β -갈락토시다제, 바람직하게는 카텝신 B로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 작용제에 의해 절단가능하다.
- [0175] 본 발명의 일부 실시양태에서, 절단 부위는 디설피드 결합이고, 특이적 절단은 환원 환경, 예를 들어 세포내 환원 환경, 예컨대 예를 들어 산성 pH 조건에 의해 수행된다.
- [0176] 일부 실시양태에 따르면, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명의 접합체는 비-절단가능한 링커를 포함한다. 본 발명에 따라 사용하기에 적합한 비-절단가능한 링커는 예를 들어 결합, $-(C=O)-$, C_1-C_6 알킬렌, C_1-C_6 헤테로알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌, C_2-C_6 헤테로알케닐렌, C_2-C_6 알키닐렌, C_2-C_6 헤테로알키닐렌, C_3-C_6 시클로알킬렌, 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 헤테로아릴렌, 및 그의 조합으로부터 선택된 1개 이상의 기를 포함할 수 있고, 이들 각각은 임의로 치환될 수 있고/거나 1개 이상의 탄소 원자 대신에 1개 이상의 헤테로원자 (예를 들어, S, N, 또는 O)를 포함할 수 있다. 이러한 기의 비제한적 예는 $(CH_2)_p$, $(C=O)(CH_2)_p$, 및 폴리에틸렌글리콜 (PEG; $(CH_2CH_2O)_p$), 단위를 포함하며, 여기서 p는 각 경우에 독립적으로 선택된 1-6의 정수이다.
- [0177] 일부 실시양태에서, 본 발명의 비-절단가능한 링커는 결합, $-(C=O)-$, $-C(O)NH-$ 기, $-OC(O)NH-$ 기, C_1-C_6 알킬렌, C_1-C_6 헤테로알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌, C_2-C_6 헤테로알케닐렌, C_2-C_6 알키닐렌, C_2-C_6 헤테로알키닐렌, C_3-C_6 시클로알킬렌, 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 헤테로아릴렌, $-(CH_2CH_2O)_p-$ 기 (여기서 p는 1-6의 정수이고, 여기서 각각의 C_1-C_6 알킬렌, C_1-C_6 헤테로알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌, C_2-C_6 헤테로알케닐렌, C_2-C_6 알키닐렌, C_2-C_6 헤테로알키닐렌, C_3-C_6 시클로알킬렌, 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 또는 헤테로아릴렌은 각 경우에 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 알크아릴, 알킬 헤테로아릴, 아미노, 암모늄, 아실, 아실옥시, 아실아미노, 아미노카르보닐, 알콕시카르보닐, 우레이도, 카르바메이트, 아릴, 헤테로아릴, 술피닐, 술포닐, 히드록실, 알콕시, 술폰닐, 할로젠, 카르복시, 트리할로메틸, 시아노, 히드록시, 메르캅토, 및 니트로로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개의 치환기로 임의로 치환될 수 있음) 중 1개 이상을 포함한다.
- [0178] 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 비-절단가능한 링커의 각각의 C_1-C_6 알킬렌, C_1-C_6 헤테로알킬렌, C_2-C_6 알케닐렌, C_2-C_6 헤테로알케닐렌, C_2-C_6 알키닐렌, C_2-C_6 헤테로알키닐렌, C_3-C_6 시클로알킬렌, 헤테로시클로알킬렌, 아릴렌, 또는 헤테로아릴렌은 O, S 및 N으로부터 선택된 1개 이상의 헤테로원자가 임의로 개재될 수 있고, 예를 들어 각 경우에 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 알크아릴, 알킬 헤테로아릴, 아미노, 암모늄, 아실, 아실옥시, 아실아미노, 아미노카르보닐, 알콕시카르보닐, 우레이도, 카르바메이트, 아릴, 헤테로아릴, 술피닐, 술포닐, 히드록실, 알콕시, 술폰닐, 할로젠, 카르복시, 트리할로메틸, 시아노, 히드록시, 메르캅토, 및 니트로로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개의 치환기로 임의로 치환될 수 있다. 본원에 사용된 화학적 기의 정의는 국제 순수 응용 화학 연합 (IUPAC) 버전 2.3.3에 의해 공개된 문헌 ["Compendium of Chemical Terminology" ("Gold Book"), goldbook.iupac.org, ISBN: 0-9678550-9-8] (이의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 제공된 바와 같은 의미를 가질 것이고, 그에 제공된 바와 같이 정의될 것이다.
- [0179] 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 접합체의 비-절단가능한 링커는 $-(CH_2)_n-$ 단위를 포함하며, 여기서 n은 2-12의 정수, 예를 들어 2-6이고, 예를 들어 n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이다.
- [0180] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 접합체의 비-절단가능한 링커는 $-(CH_2)_6-$ 를 포함하며, 여기서 n은 6이고, 링커는 하기 화학식에 의해 나타내어진다:



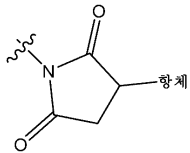
[0182] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명의 비-절단가능한 링커는 티올-반응성 기를 추가로 포함한다. 상기 개시된 바와 같은 상기 비-절단가능한 링커의 티올-반응성 기는 예를 들어 브로모 아세트아미드, 아이오도 아세트아미드, 메틸술폰닐벤조티아졸, 4,6-디클로로-1,3,5-트리아진-2-일아미노 기 메틸-술폰닐 페닐테트라졸 또는 메틸술폰닐 페닐옥사디아졸, 피리딘-2-티올, 5-니트로피리딘-2-티올, 메탄티오술폰네이트, 또는 말레이미드로부터 선택될 수 있다.

[0183] 바람직한 실시양태에 따르면, 티올 반응성 기는 상기 개시된 바와 같은 말레이미드 (말레이미딜 모이어티)이다. 예를 들어, 상기 말레이미드를 포함하는 비-절단가능한 링커는 예를 들어 하기 구조를 가질 수 있고, 여기서 링커 말단의 과상선은 아마톡신에 대한 부착 지점을 나타낸다:



[0184]

[0185] 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 표적 결합 모이어티 상의 반응성 술폰히드릴에의 접합 후에, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커의 말레이미딜 모이어티는 하기 구조를 포함하며:

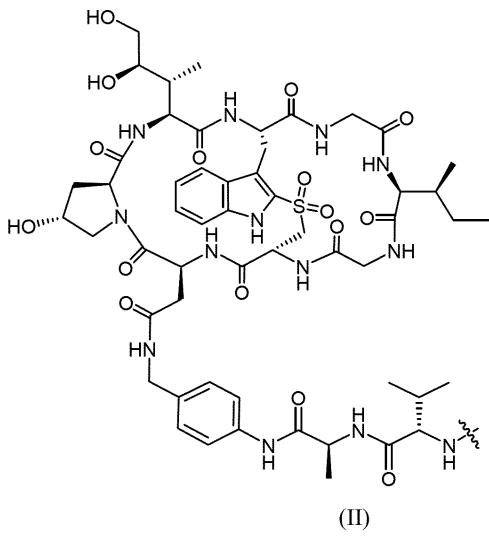
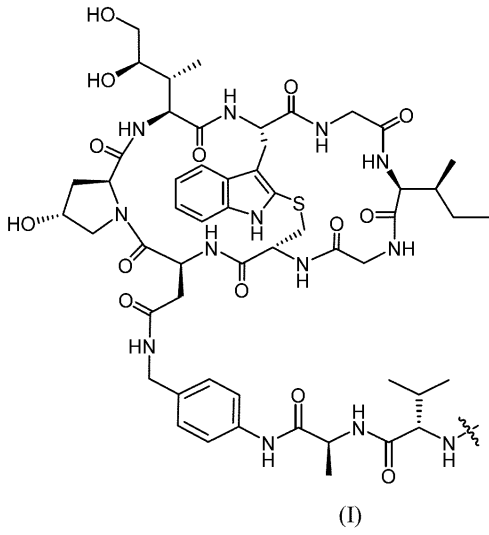


[0186]

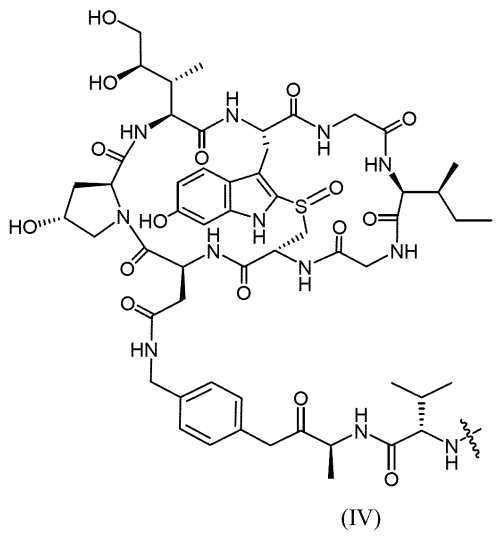
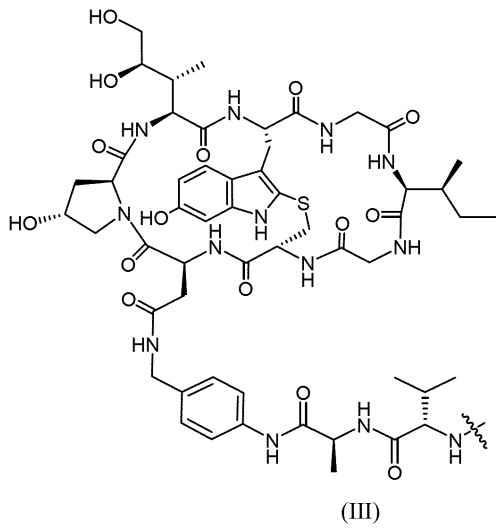
[0187] 여기서 과상선은 본원에 개시된 바와 같은 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커의 부착 부위를 나타낸다.

[0188] 바람직한 실시양태에 따르면, 티올-반응성 기를 추가로 포함하는 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커를 포함하는 본 발명의 접합체는 접합체의 항체 내의 자연 발생 술폰히드릴 모이어티에 커플링될 수 있거나, 또는 티올-반응성 기를 포함하는 본 발명의 접합체의 상기 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커는 예를 들어 문헌 [Nat Biotechnol. 2008 Aug;26(8):925-32]에 기재된 바와 같은 유전자 조작에 의해 항체 내로 도입된 술폰히드릴 모이어티에 커플링될 수 있다. 바람직하게는, 티올-반응성 기를 포함하는 본원에 개시된 바와 같은 절단가능한 또는 비-절단가능한 링커는 유전자 조작에 의해 본 발명의 접합체의 항체의 Fc 영역 내로 도입된 술폰히드릴 모이어티에 커플링된다. 술폰히드릴 모이어티가 도입될 수 있는 상기 항체의 Fc 영역 내의 바람직한 위치는 D265, 또는 A118 (EU 넘버링에 따름), 보다 바람직하게는 D265를 포함한다.

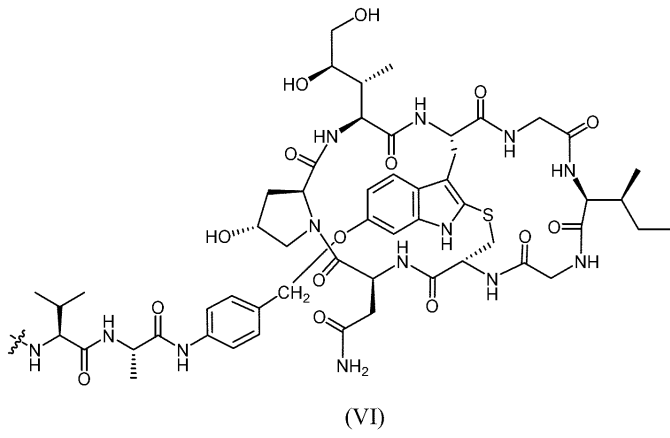
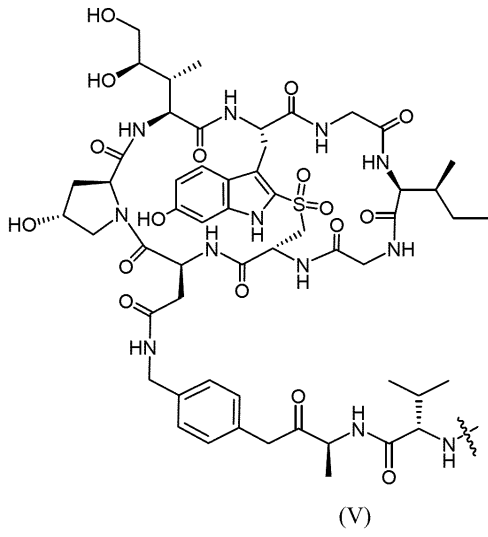
[0189] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물 중 접합체는 링커-아마톡신 모이어티로서 하기 화학식 I 내지 XI 각각의 화합물 중 임의의 것을 포함한다.



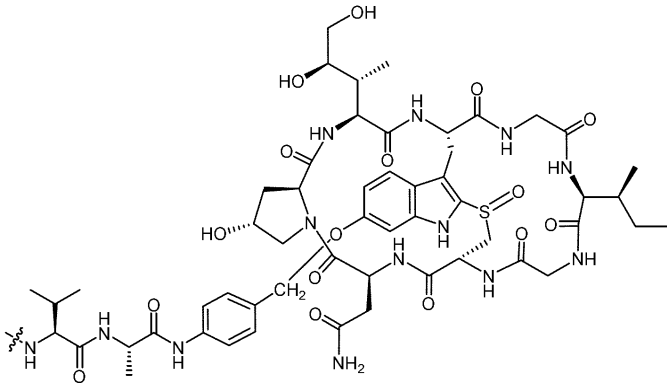
[0190]



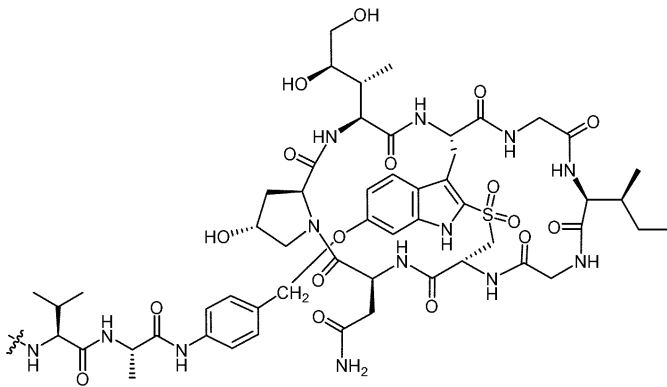
[0191]



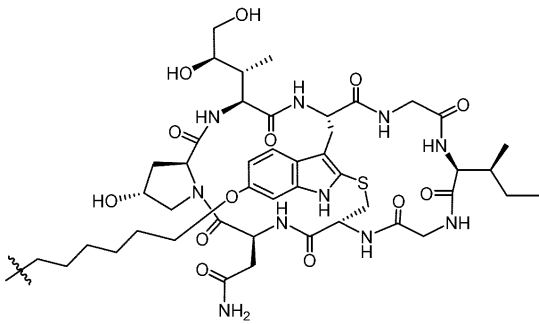
[0192]



(VII)

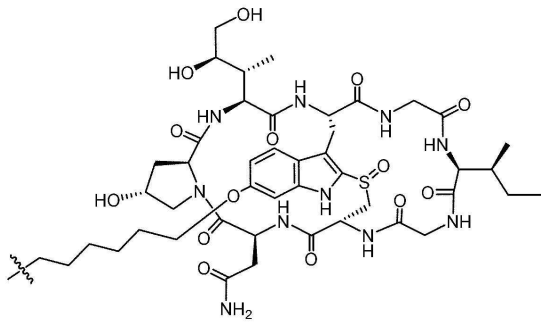


(VIII)

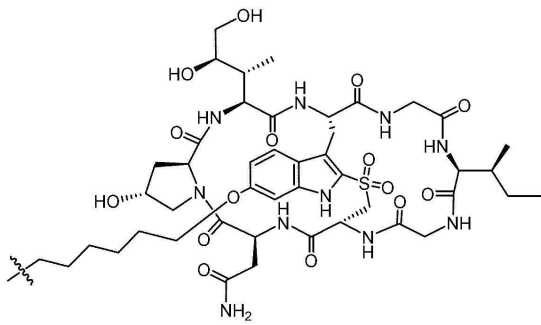


(IX)

[0193]



(X)

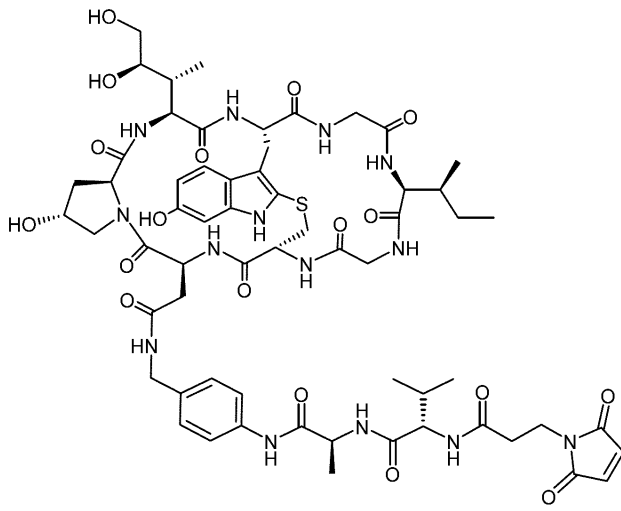


(XI)

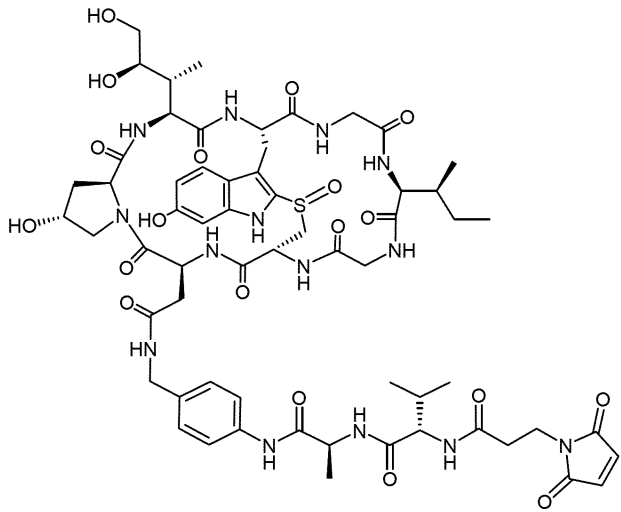
[0194]

[0195]

한 실시양태에 따르면, 본 발명의 접합체는 바람직하게는 항체의 티올 기를 반응성 캡으로서 말레이미드 모이어티를 함유하는 화학식 XIIa 내지 XXIIa 중 어느 하나에 따른 화합물과 반응시킴으로써 합성된다. 본원에 사용된 용어 "반응성 캡"은 예를 들어 항체의 티올 기와 반응하여 화학식 XIIa 내지 XXIIa의 화합물을 항체에 공유 연결하는 화학적 모이어티를 지칭한다.

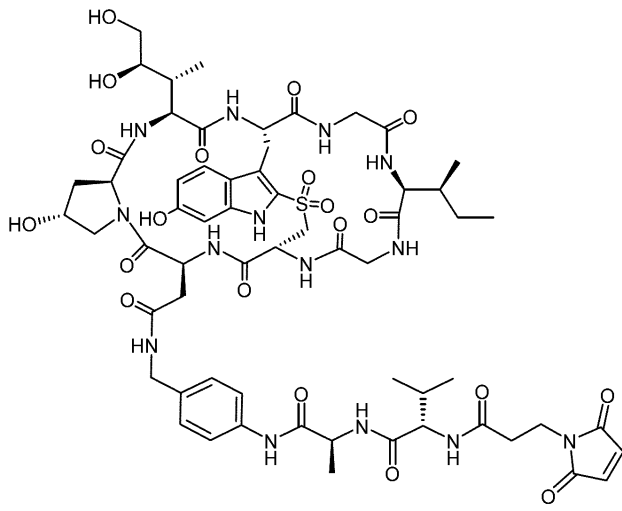


(XIVa)

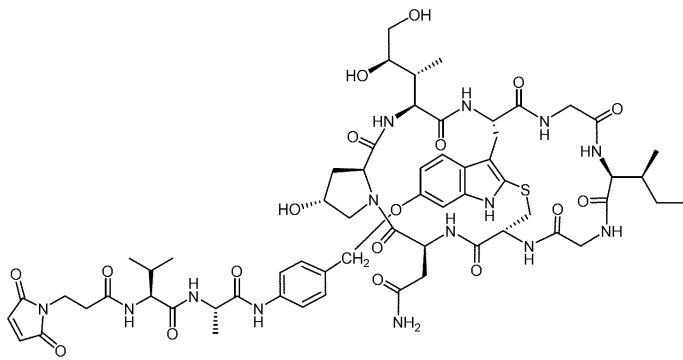


(XVa)

[0197]

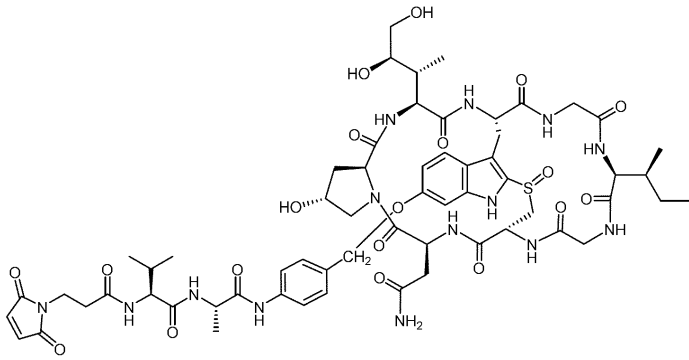


(XVIa)

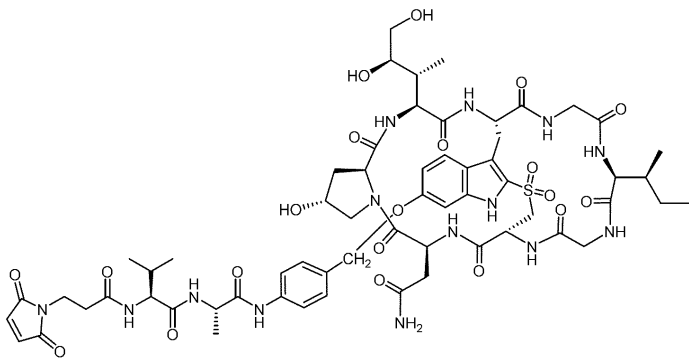


(XVIIa)

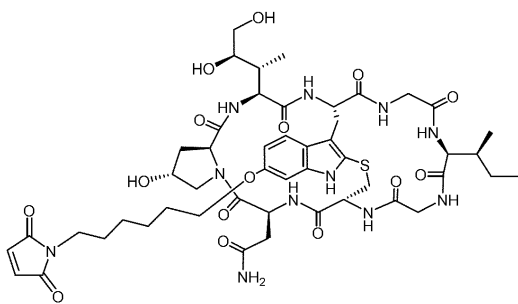
[0198]



(XVIIIa)

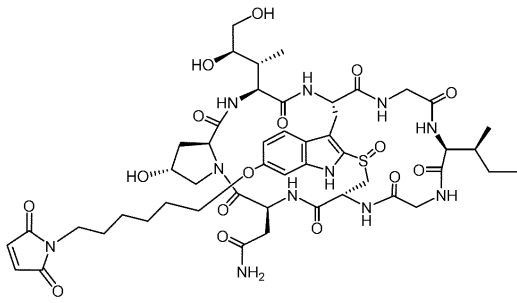


(XIVa)

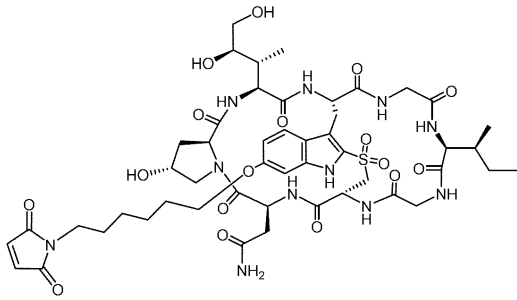


(XXa)

[0199]



(XXIa)



(XXIIa)

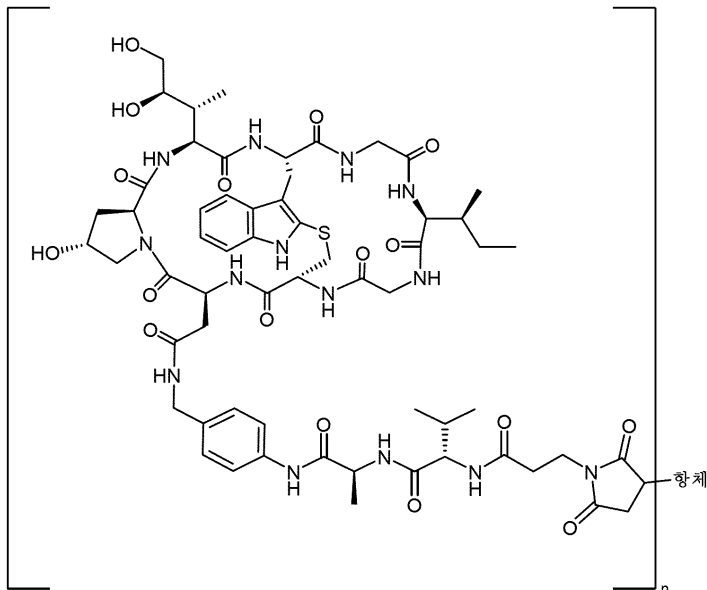
[0200]

[0201]

일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 화학식 XIIa - XXIIa에 따른 화합물은 항체-약물 접합체 (ADC), 보다 구체적으로 항체-표적화된 아마톡신 접합체를 생성하거나 제조하는 데 사용된다. 본원에 개시된 바와 같은 본 발명의 ADC는 또한 "ATAC"로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 화합물 XIIa 내지 XXIIa는 ATAC를 형성하기에 적합한 조건 하에 표적 결합 모이어티, 예컨대 예를 들어 항체, 예를 들어 인간 IgG1 항체와 반응한다. 화학식 XIIa - XXIIa에 따른 본 발명의 화합물은 예를 들어 PSMA, CD19, CD37, CD269, 시알릴 루이스^a, HER-2/neu, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM)에 대해 지시된 표적 결합 모이어티, 예컨대 예를 들어 항체와 반응하여 상응하는 ATAC를 생성할 수 있다. 표적 결합 모이어티 또는 항체에 대한 본 발명의 화합물 XIIa - XXIIa의 커플링은 예를 들어 WO 2018/115466 A1에 개시된 바와 같이 수행되어 본 발명의 화합물 XIIb - XXIIb 중 하나를 포함하는 ATAC를 생성할 수 있다.

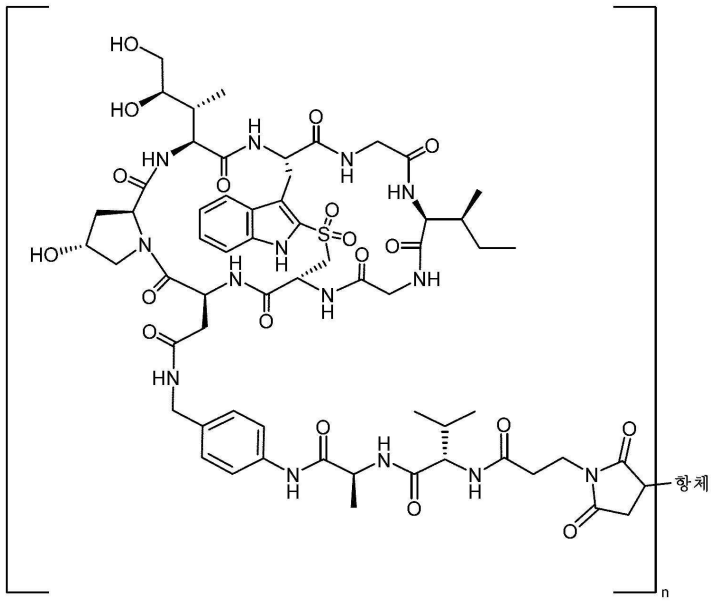
[0202]

본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 상기 접합체는 하기 개시된 바와 같은 화학식 XIIb 내지 XXIIb 중 어느 하나에 따른 화합물이다:

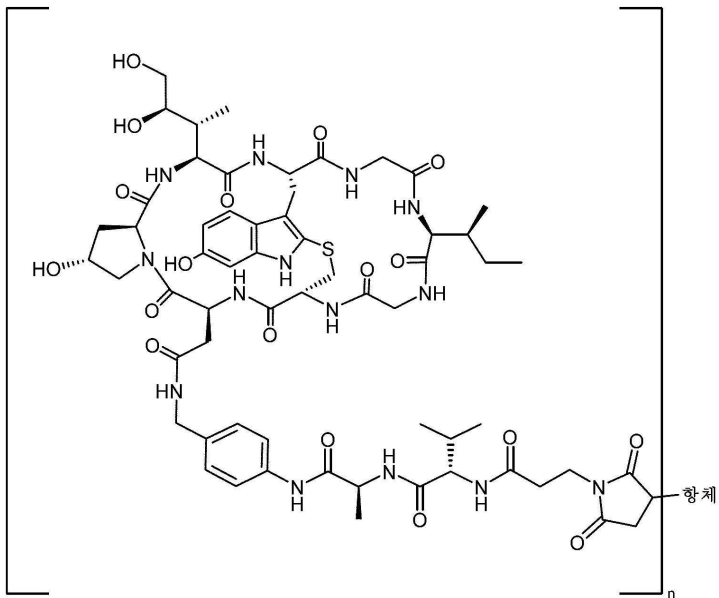


(XIIb)

[0203]

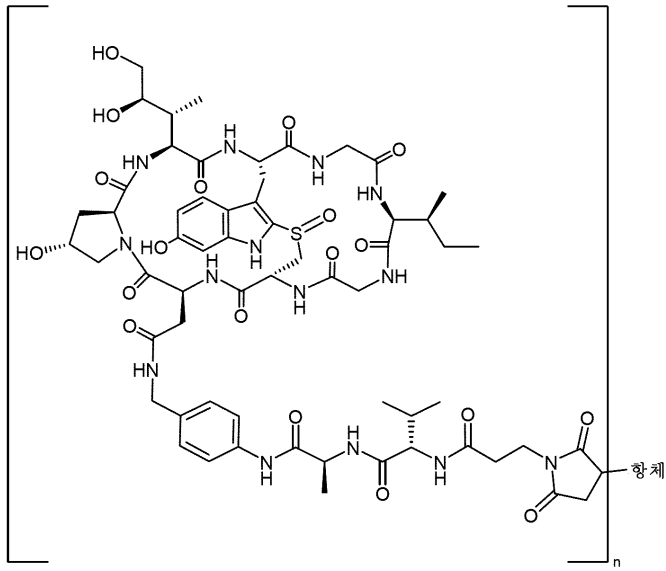


(XIIIb)

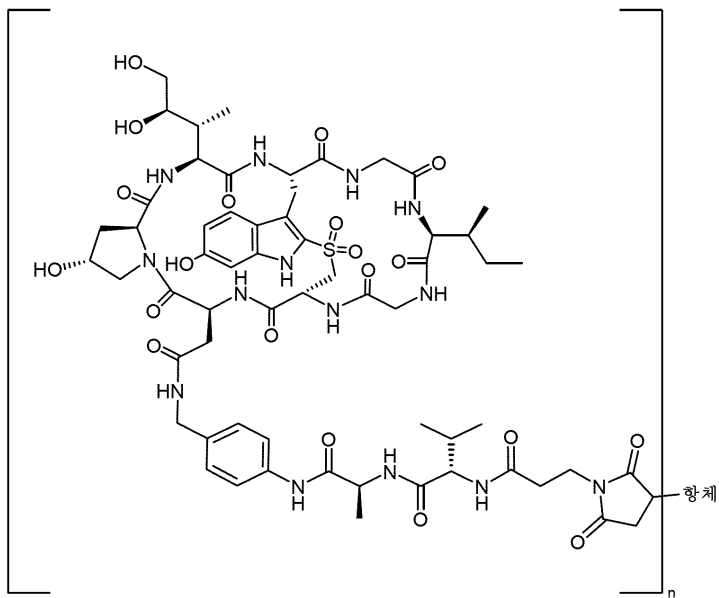


(XIVb)

[0204]

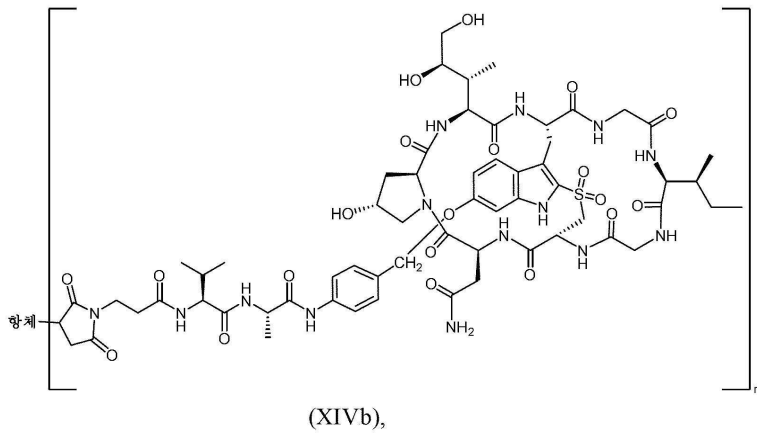
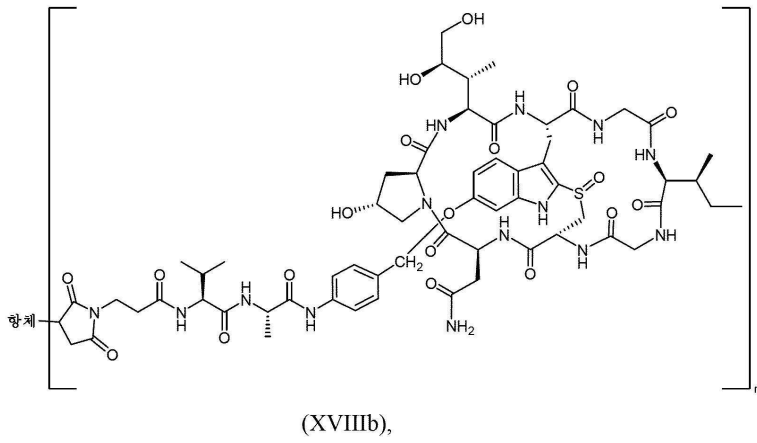
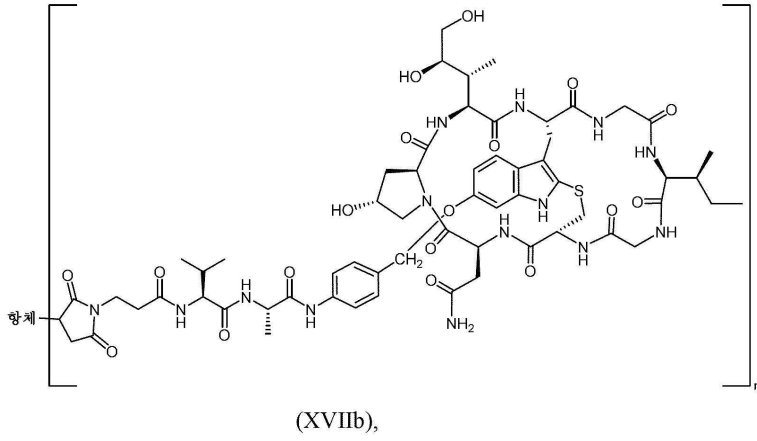


(XVb)

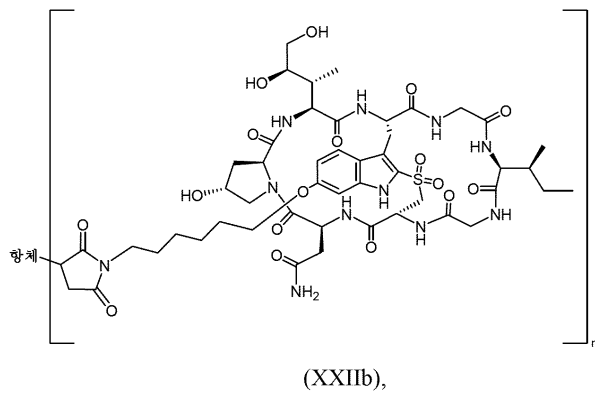
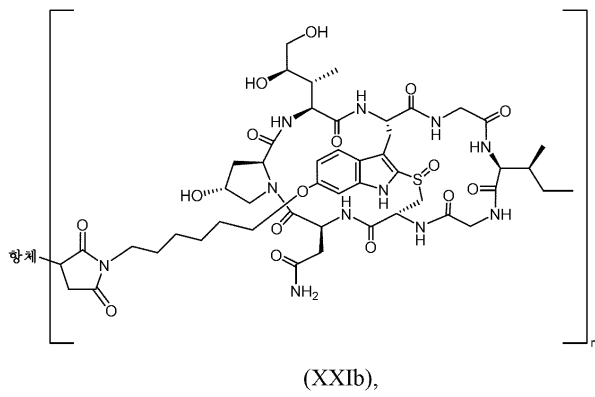
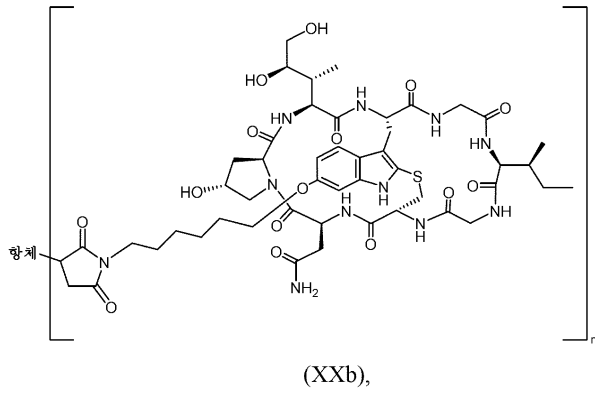


(XVIb)

[0205]



[0206]



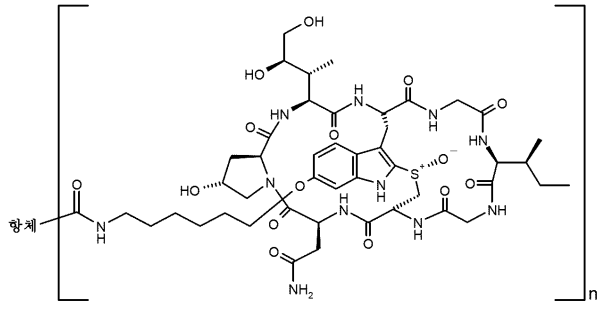
[0207]

[0208]

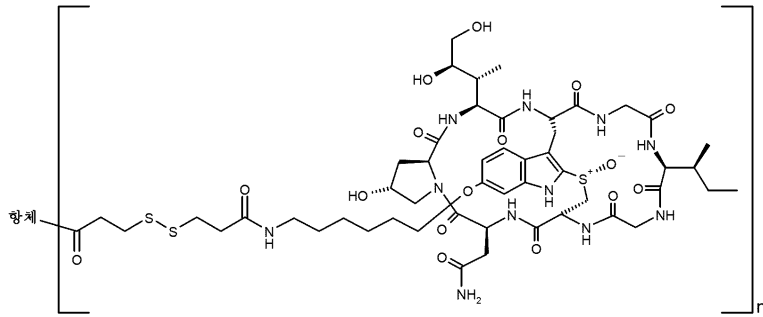
여기서 n은 바람직하게는 1 내지 10, 바람직하게는 1, 2, 3 내지 4, 바람직하게는 1, 2 내지 5, 바람직하게는 4 내지 7, 바람직하게는 8 내지 10임.

[0209]

또한, 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 접합체는 화학식 XIII 내지 XXII 중 어느 하나에 따른 화합물이다:

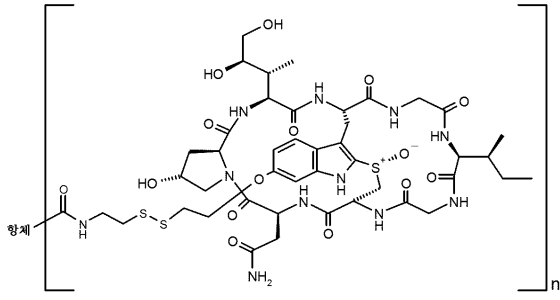


(XIII)

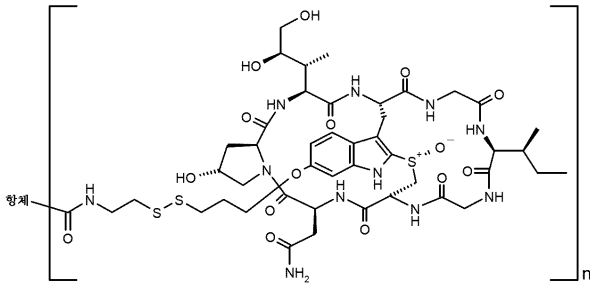


(XIV)

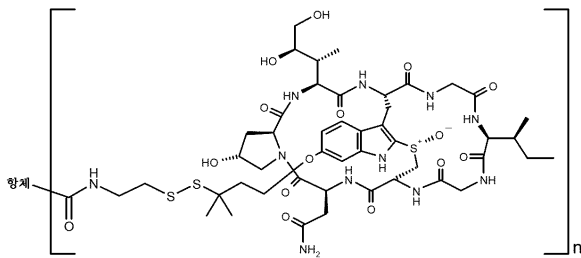
[0210]



(XV)

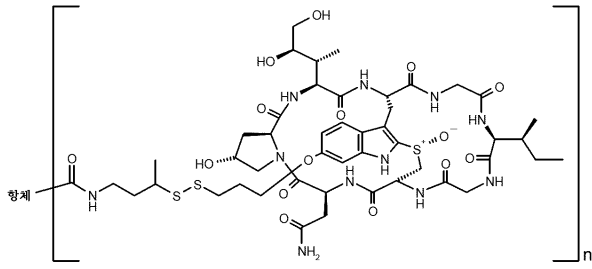


(XVI)

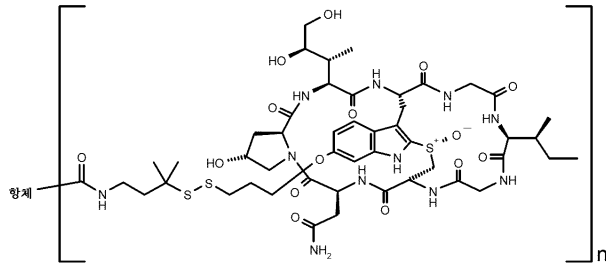


(XVII)

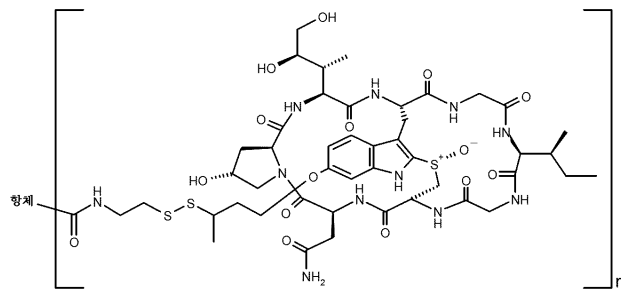
[0211]



(XVIII)

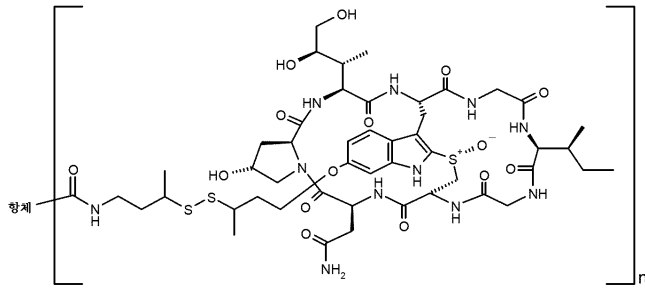


(XIX)

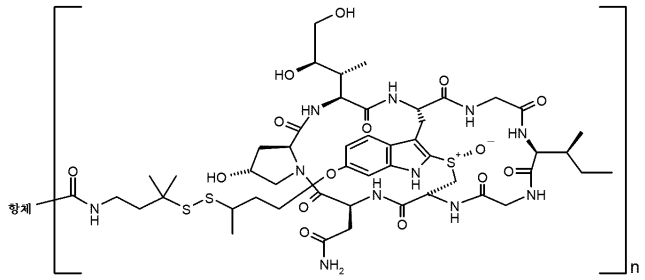


(XX)

[0212]



(XXI)



(XXII)

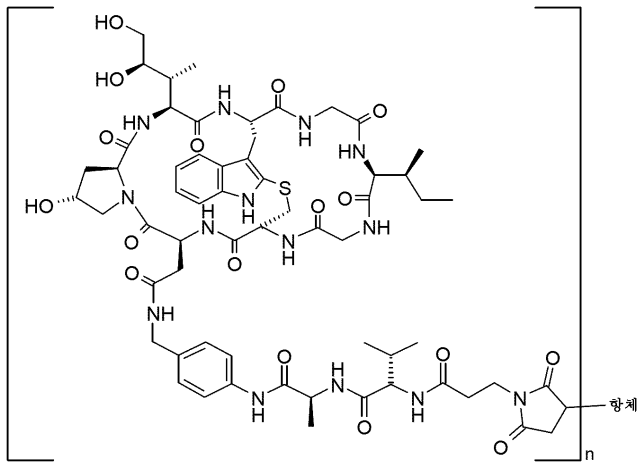
[0213]

[0214]

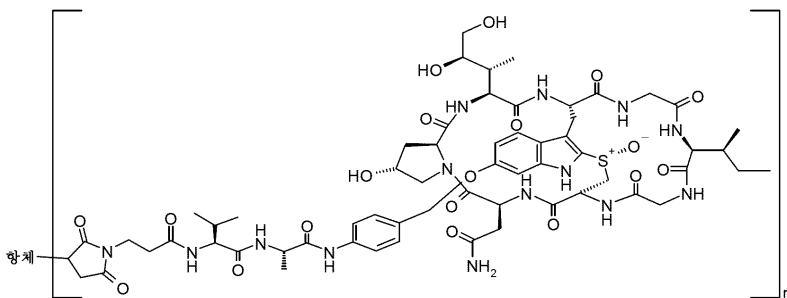
여기서 아마톡신 링커 모이어티는 상기 항체의 자연 발생 리신 잔기의 ε-아미노기에 커플링되고, n은 바람직하게는 1 내지 8, 바람직하게는 1, 2, 3 내지 4, 바람직하게는 2 내지 5, 바람직하게는 5 내지 7임.

[0215]

또한, 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 접합체는 화학식 XXIII, XXIV, XIIIb, XIIb, XXb 및 XVIb 중 어느 하나에 따른 화합물이다:

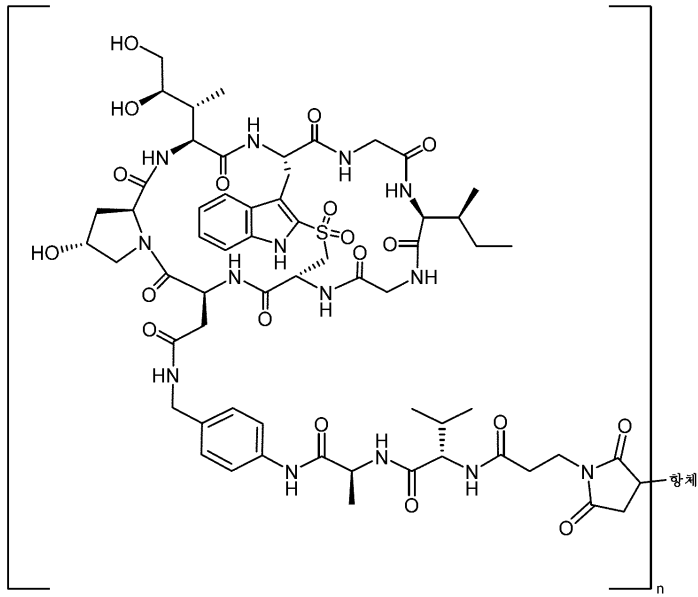


(XXIII)

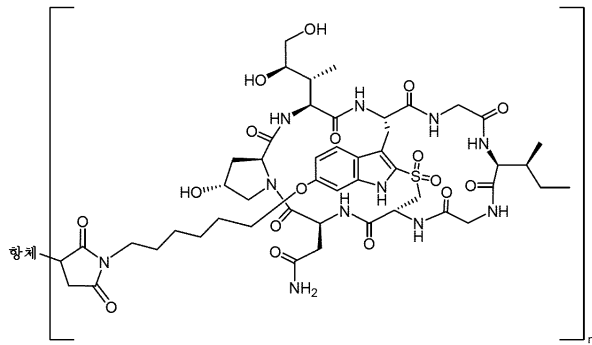


(XXIV)

[0216]

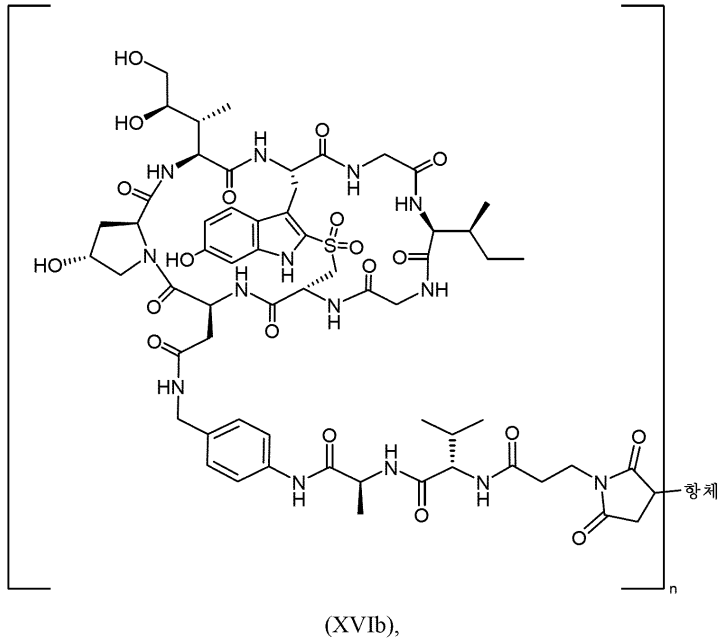
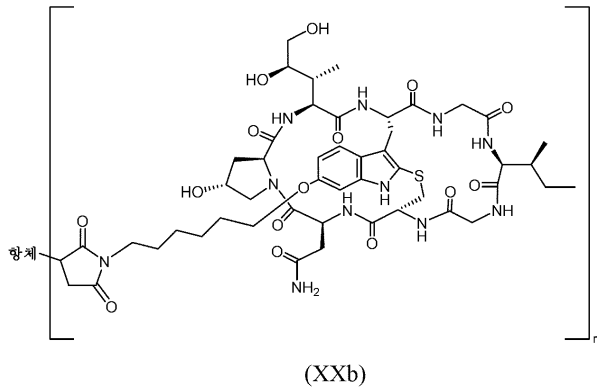


(XIIIb)



(XXIIb)

[0217]



[0218]

[0219]

여기서 아마톡신 링커 모이어티는 항체의 시스테인 잔기의 티올 기에 커플링되고, n은 바람직하게는 1 내지 10, 또는 예를 들어 n은 2, 4 내지 6, 보다 바람직하게는 n은 1, 2, 4 또는 8임.

[0220]

본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리무맙 중 적어도 1종, 및 HER2에 대해 지시된 항체 (α HER2-LALA-D265C) 및 화학식 XXIb, XXIIb, XIIb, XIIIb, XVIIIb 또는 XIXb에 따른 아마톡신을 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 개시된 바와 같은 각각의 아마톡신 구조에 나타낸 바와 같은 항체는 본원에 개시된 바와 같은 α HER2-LALA-D265C이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 하나를 포함한다.

	항체	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	α HER2-LALA-D265C	XXIb, XXIb, XIIb, XIIIb, XVIIIb, 또는 XIXb	아벨루맙
2	α HER2-LALA-D265C	XXIb, XXIb, XIIb, XIIIb, XVIIIb, 또는 XIXb	니볼루맙
3	α HER2-LALA-D265C	XXIb, XXIb, XIIb, XIIIb, XVIIIb, 또는 XIXb	렘브롤리주맙
4	α HER2-LALA-D265C	XXIb, XXIb, XIIb, XIIIb, XVIIIb, 또는 XIXb	이필리무맙
5	α HER2-LALA-D265C	XXIb, XXIb, XIIb, XIIIb, XVIIIb, 또는 XIXb	두르발루맙
6	α HER2-LALA-D265C	XXIb, XXIb, XIIb, XIIIb, XVIIIb, 또는 XIXb	아벨루맙 + 이필리무맙

[0221]

[0222]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 1종의 아마톡신에 커플링된 상기 개시된 바와 같은 항체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0223]

본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리무맙 중 적어도 1종, 및 CD19에 대해 지시된 항체 (chiBCE19-D265C) 및 화학식 XXI, XXII, XXb, XXIb, XXIV, XIIb 또는 XVIb에 따른 아마톡신을 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 개시된 바와 같은 각각의 아마톡신 구조에 나타난 바와 같은 항체는 CD19 (chiBCE19-D265C)이다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 하나를 포함한다.

	항체	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	α CD19 (chiBCE19-D265C)	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙
2	α CD19 (chiBCE19-D265C)	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	니블루맙
3	α CD19 (chiBCE19-D265C)	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	웹브롤리주맙
4	α CD19 (chiBCE19-D265C)	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	이필리무맙
5	α CD19 (chiBCE19-D265C)	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	두르발루맙
6	α CD19 (chiBCE19-D265C)	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙 + 이필리무맙

[0224]

[0225]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 1종의 아마톡신에 커플링된 상기 개시된 바와 같은 항체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0226]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니블루맙, 웹브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리무맙 중 적어도 1종, 및 PSMA에 대해 지시된 항체 및 화학식 XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb 또는 XVIb에 따른 아마톡신을 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 개시된 바와 같은 각각의 아마톡신 구조에 나타낸 바와 같은 항체는 항-PSMA 항체이다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 하나를 포함한다.

	항체	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	α PSMA	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙
2	α PSMA	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	니볼루맙
3	α PSMA	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	렘브롤리주맙
4	α PSMA	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	이필리무맙
5	α PSMA	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	두르발루맙
6	α PSMA	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙 + 이필리무맙

[0227]

[0228]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 1종의 아마톡신에 커플링된 상기 개시된 바와 같은 항체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0229]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 개시된 바와 같은 본 발명의 접합체의 항-PSMA 항체는 WO 2020/025564에 개시된 바와 같은 항-PSMA 항체이다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 본 발명의 접합체의 항체는 3-F11-var1, 3-F11-var2, 3-F11-var3, 3-F11-var4, 3-F11-var5, 3-F11-var6, 3-F11-var7, 3-F11-var8, 3-F11-var9, 3-F11-var10, 3-F11-var11, 3-F11-var12, 3-F11-var13, 3-F11-var14, 3-F11-var15 또는 3-F11-var16 중 하나이고, 바람직하게는 본 발명의 접합체의 항체는 WO 2020/025564에 개시된 바와 같은 3-F11-var1, 3-F11-var13 또는 3-F11-var16 중 하나이다.

[0230]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 상기 개시된 바와 같은 항-PSMA 항체는 그의 Fc 영역에 L234A, L235A 및 D265C (EU 명명법에 따른 넘버링), 바람직하게는 L234A, L235A 및 D265C로부터 선택된 적어도 1개의 돌연변이를 포함한다.

[0231]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리무맙 중 적어도 1종, 및 CD37에 대해 지시된 항체 및 화학식 XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb 또는 XVIb에 따른 아마톡신을 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 개시된 바와 같은 각각의 아마톡신 구조에 나타난 바와 같은 항체는 항-CD37 항체이다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 하나를 포함한다.

	항체	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	α CD37	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙
2	α CD37	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	니볼루맙
3	α CD37	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	렘브롤리주맙
4	α CD37	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	이필리무맙
5	α CD37	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	두르발루맙
6	α CD37	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙 + 이필리무맙

[0232]

[0233]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 1종의 아마톡신에 커플링된 상기 개시된 바와 같은 항체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0234]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 상기 개시된 바와 같은 항-CD37 항체는 그의 Fc 영역에 L234A, L235A 및 D265C (EU 명명법에 따른 넘버링), 바람직하게는 L234A, L235A 및 D265C로부터 선택된 적어도 1개의 돌연변이를 포함한다.

[0235]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리무맙 중 적어도 1종, 및 CD269에 대해 지시된 항체 및 화학식 XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb 또는 XVIb에 따른 아마톡신을 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 개시된 바와 같은 각각의 아마톡신 구조에 나타낸 바와 같은 항체는 항-CD269 항체이다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 하나를 포함한다.

	항체	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	α CD269	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙
2	α CD269	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	니볼루맙
3	α CD269	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	렘브롤리주맙
4	α CD269	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	이필리루맙
5	α CD269	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	두르발루맙
5	α CD269	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙 + 이필리루맙

[0236]

[0237]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 1종의 아마톡신에 커플링된 상기 개시된 바와 같은 항체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0238]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 개시된 바와 같은 본 발명의 접합체의 항-CD269 항체는 WO 2018/115466에 개시된 바와 같은 인간화 항체 J22.9-ISY이며, 여기서 접합체는 화학식 I에 따른 아마톡신 링커-모이티어를 포함하거나, 또는 여기서 접합체는 본원에 개시된 바와 같은 화학식 XIIb에 의해 나타내어진다.

[0239]

일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 상기 개시된 바와 같은 항-CD269 항체는 예를 들어 그의 Fc 영역에 L234A, L235A 및 D265C (EU 명명법에 따른 넘버링)로부터 선택된 적어도 1개의 돌연변이를 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체의 Fc 영역은 돌연변이 L234A, L235A 및 D265C를 포함한다.

[0240]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리루맙 중 적어도 1종, 및 시알릴 루이스^a에 대해 지시된 항체 및 화학식 XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb 또는 XVIb에 따른 아마톡신을 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 개시된 바와 같은 각각의 아마톡신 구조에 나타낸 바와 같은 항체는 항- α 시알릴 루이스^a 항체이다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 하나를 포함한다.

	항체	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	α 시알릴 루이스 ^a	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙
2	α 시알릴 루이스 ^a	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	니볼루맙
3	α 시알릴 루이스 ^a	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	렘브롤리주맙
4	α 시알릴 루이스 ^a	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	이필리무맙
5	α 시알릴 루이스 ^a	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	두르발루맙
6	α 시알릴 루이스 ^a	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙 + 이필리무맙

[0241]

[0242]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 1종의 아마톡신에 커플링된 상기 개시된 바와 같은 항체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0243]

일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 상기 개시된 바와 같은 항-시알릴 루이스^a 항체는 그의 Fc 영역에 L234A, L235A 및 D265C (EU 명명법에 따른 넘버링), 바람직하게는 L234A, L235A 및 D265C로부터 선택된 적어도 1개의 돌연변이를 포함한다.

[0244]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리무맙 중 적어도 1종, 및 EpCAM에 대해 지시된 항체 및 화학식 XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb 또는 XVIb에 따른 아마톡신을 포함하는 접합체를 포함하며, 여기서 상기 개시된 바와 같은 각각의 아마톡신 구조에 나타낸 바와 같은 항체는 항-EpCAM 항체이다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 하나를 포함한다.

	항체	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	α EpCAM	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙
2	α EpCAM	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	니볼루맙
3	α EpCAM	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	렘브롤리주맙
4	α EpCAM	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	이필리무맙
5	α EpCAM	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	두르발루맙
6	α EpCAM	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙 + 이필리무맙

[0245]

[0246]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 1종의 아마톡신에 커플링된 상기 개시된 바와 같은 항체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0247]

일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 상기 개시된 바와 같은 항-EpCAM 항체는 그의 Fc 영역에 L234A, L235A 및 D265C (EU 명명법에 따른 넘버링), 바람직하게는 L234A, L235A 및 D265C로부터 선택된 적어도 1개의 돌연변이를 포함한다.

[0248]

특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 개시된 바와 같은 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 접합체는 화학식 XIIb, XIVb, XVIIb, XXb 또는 XVIIb를 포함하거나 또는 이에 따른다. 따라서, 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 상기 조성물은 면역 체크포인트 억제제 아벨루맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 두르발루맙 또는 이필리무맙 중 적어도 1종 및 화학식 XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb 또는 XVIb에 따른 접합체를 포함한다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조성물은 하기 중 적어도 하나를 포함한다.

	접합체	면역 체크포인트 억제제
1	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙
2	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	니볼루맙
3	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	렘브롤리주맙
4	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	이필리무맙
5	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	두르발루맙
6	XXIII, XXII, XXb, XXIIb, XXIV, XIIIb, 또는 XVIb	아벨루맙 + 이필리무맙

[0249]

[0250]

따라서, 본 발명의 조성물은 상기 개시된 바와 같은 적어도 접합체 및 상기 개시된 바와 같은 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제를 포함한다.

[0251]

한 실시양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물의 제조에 사용하기 위한 화학식 XIIb, XIIIb, XIVb, XVb, XVIb, XVIIb, XVIIIb, XIXb, XXb, XXIb, XXIIb에 따른 접합체에 관한 것이다.

[0252]

한 실시양태에 따르면, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 조성물의 제조에 사용하기 위한 아벨루맙, 니볼루맙, 렘브롤리주맙, 이필리무맙 또는 두르발루맙의 군으로부터 선택된 면역 체크포인트 억제제에 관한 것이다.

[0253]

본 발명의 제4 측면에 따르면, 기재된 바와 같은 (사용하기 위한) 조성물을 포함하고, 1종 이상의 제약상 허용되는 완충제, 계면활성제, 희석제, 담체, 부형제, 충전제, 결합제, 율활제, 활택제, 봉해제, 흡착제 및/또는 보존제를 추가로 포함하는 제약 제제가 제공된다.

[0254]

수성 형태에서는, 상기 제약 제제는 즉시 투여 가능할 수 있는 반면, 동결건조 형태에서는 상기 제제는 투여 전에, 예를 들어 보존제, 예컨대 예를 들어 벤질 알콜, 항산화제, 예컨대 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C, 레티닐 팔미테이트, 및 셀레늄, 아미노산 시스테인 및 메티오닌, 시트르산 및 시트르산나트륨, 합성 보존제, 예컨대 파라벤 메틸 파라벤 및 프로필 파라벤을 포함할 수 있거나 또는 포함하지 않을 수 있는 주사용수의 첨가에 의해 액체 형태로 전달될 수 있다.

[0255]

상기 제약 제제는, 예를 들어 아미노산, 당 폴리올, 디사카라이드 및/또는 폴리사카라이드일 수 있는 1종 이상의 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제약 제제는 1종 이상의 계면활성제, 1종 이상의 등장화제, 및/또는 1종 이상의 금속 이온 킬레이트화제, 및/또는 1종 이상의 보존제를 추가로 포함할 수 있다.

[0256]

본원에 기재된 바와 같은 제약 제제는 적어도 정맥내, 근육내 또는 피하 투여에 적합할 수 있다. 대안적으로, 본 발명에 따른 상기 접합체는 특정 기간에 걸쳐 생물학적 활성제의 지속 방출을 가능하게 하는 데포 제제로 제공될 수 있다.

[0257]

본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명의 이전 측면에 따른 상기 제제를 포함하는 1차 포장, 예컨대 사전충전된 시린지 또는 펜, 바이알 또는 주입 백이 제공된다.

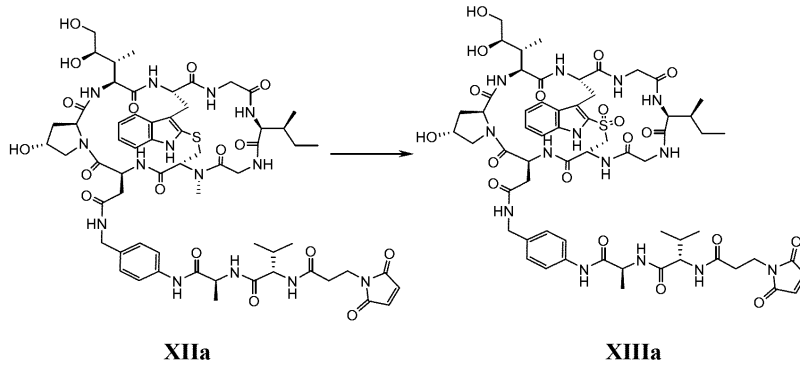
- [0258] 사전충전된 시린지 또는 펜은 동결건조 형태 (이는 이어서 투여 전에, 예를 들어 주사용수로 가용화되어야 함) 또는 수성 형태의 제제를 함유할 수 있다. 상기 시린지 또는 펜은 종종 단일 사용을 위한 일회용 물품이고, 0.1 내지 20 ml의 부피를 가질 수 있다. 그러나, 시린지 또는 펜은 또한 다중-사용 또는 다중-용량 시린지 또는 펜일 수 있다.
- [0259] 상기 바이알은 또한 동결건조 형태 또는 수성 형태의 제제를 함유할 수 있고, 단일 또는 다중 사용 장치로서 기능할 수 있다. 다중 사용 장치로서, 상기 바이알은 보다 큰 부피를 가질 수 있다. 상기 주입 백은 통상적으로 수성 형태의 제제를 함유하고, 20 내지 5000 ml의 부피를 가질 수 있다.
- [0260] 본 발명의 일부 실시양태에서, 암의 치료에 사용하기 위한 조성물 또는 기재된 바와 같은 제약 제제는 흑색종, 편평 및 비-편평 비소세포 폐암, 전이성 소세포 폐암, 신세포 암종, 호지킨 림프종, B 림프구-연관 악성종양, 요로상피 암종, 두경부 편평 세포 암종, 메르켈 세포 암종, 간세포성 암종, 위 및 위식도 암종, 전이성 결장직장암, 다발성 골수종, 원발성 중격 B 세포 림프종, 재발성 또는 전이성 자궁경부암, 및 전이성 피부 편평 세포암종, 전립선암, 삼중-음성 유방암 (TNBC)을 포함한 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암에 관한 것이다.
- [0261] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 B 림프구-연관 악성종양의 치료에 사용하기 위한, 특히 비-호지킨 림프종, 여포성 림프종, 미만성 대 B 세포 비-호지킨 림프종, 및 만성 림프구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 상기 조성물 또는 제약 제제에 관한 것이다.
- [0262] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 제약 조성물에 사용하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 면역 체크포인트 억제제에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 조성물 또는 제약 제제에 사용하기 위한 아벨루맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 이필리무맙, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4, PD1-5, 피딜리주맙, 세미플리맙, JTX-4014, 스파르탈리주맙, 신틸리맙 (IBI308), 도스타를리맙, 토리팔리맙, 두르발루맙, 또는 아테졸리주맙에 관한 것이다.
- [0263] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 본 발명에 따른 조성물 또는 제약 제제에서의 아벨루맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 이필리무맙 또는 두르발루맙의 용도에 관한 것이다.
- [0264] 본 발명은 추가로 암의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에게 (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및 (b) 적어도 1종의 접합체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 접합체는 (i) 표적 결합 모이어티, (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및 (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커를 포함하는 것인, 상기 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0265] 한 실시양태에 따르면, 상기 개시된 바와 같은 암의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서의 암의 치료 방법은 흑색종, 편평 및 비-편평 비소세포 폐암, 전이성 소세포 폐암, 신세포 암종, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 두경부 편평 세포 암종, 메르켈 세포 암종, 간세포성 암종, 위 및 위식도 암종, 전이성 결장직장암, 원발성 중격 B 세포 림프종, 재발성 또는 전이성 자궁경부암, 및 전이성 피부 편평 세포 암종의 치료를 위해 상기 개시된 바와 같은 조성물 또는 제약 제제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0266] 일부 실시양태에서, 상기 개시된 바와 같은 암을 치료하는 방법은 면역 체크포인트 억제제 및 본원에 개시된 바와 같은 조성물의 접합체를 순차적으로 또는 동시에 투여하는 것을 포함한다. 면역 체크포인트 억제제 및 본 발명의 접합체의 순차적 투여의 경우에, 체크포인트 억제제가 먼저 투여되고, 이어서 접합체가 투여될 수 있고, 대안적으로, 본 발명의 접합체가 예를 들어 먼저 투여되고, 이어서 면역 체크포인트 억제제가 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 면역 체크포인트 억제제 및 접합체는 상기 개시된 바와 같이 순차적으로 또는 동시에 정맥내로 (i.v.) 투여된다. 본원에 사용된 용어 "동시 투여"는 동일한 날에, 예를 들어 서로 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 12시간, 18시간, 20시간 또는 23시간 이내에 면역 체크포인트 억제제 및 본 발명의 접합체를 투여하는 것을 지칭한다.
- [0267] 본 발명은 추가로 암의 치료를 위한, (a) 적어도 1종의 면역 체크포인트 억제제 및 (b) 적어도 1종의 접합체를 포함하는 조성물이며, 여기서 상기 접합체는 (i) 표적 결합 모이어티, (ii) 적어도 1종의 아마톡신, 및 (iii) 임의로 상기 표적 결합 모이어티를 상기 적어도 1종의 아마톡신과 연결하는 적어도 1개의 링커를 포함하는 것인 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0268] 실시예
- [0269] 본 발명이 도면 및 상기 설명에서 상세히 예시되고 기재되었지만, 이러한 예시 및 설명은 제한적인 것이 아니라 예시적 또는 대표적인 것으로 간주되어야 하며; 본 발명은 개시된 실시양태로 제한되지 않는다. 개시된 실시양

태에 대한 다른 변형은 도면, 개시내용 및 첨부된 청구범위의 연구로부터 청구된 발명을 실시하는 데 있어서 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되고 실시될 수 있다. 청구범위에서, 단어 "포함하는"은 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않고, 단수형은 복수를 배제하지 않는다. 특정 조치가 상호 상이한 종속 청구항에서 언급된다는 단순한 사실은 이들 조치의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것을 나타내지 않는다. 청구범위 내의 임의의 참조 부호는 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0270] 본원에 개시된 모든 아미노산 서열은 N-말단에서 C-말단으로 제시되고; 본원에 개시된 모든 핵산 서열은 5'→3'로 제시된다.

[0271] 실시예 1: 링커 독소의 합성

[0272] 링커 독소 XIIIa의 합성



[0273]

[0274] 5.15 mg (3.92 μmol) 티오에테르 XIIa (WO 2018/115466에 기재된 바와 같음)를 1000 μl 아세트산 중에 용해시켰다. 주위 온도에서 아세트산 중 m-CPBA (메타-클로로퍼벤조산, 69.5%, 알드리치)의 용액 2078.99 μl를 첨가하였다 (원액: 5000 μl 아세트산 중 5.15 mg m-CPBA). 주위 온도에서 3시간 15분 동안 교반한 후, 용액을 15 ml 병냉 MTBE 내로 적하하였다. 전체 혼합물을 -18°C에서 추가로 1시간 동안 저장하고, 침전물을 원심분리에 의해 단리하였다. 고체 잔류물을 15 ml 병냉 MTBE로 세척하고, 건조시켰다. 조 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 순수한 생성물 3.12 mg (59%)을 수득하였다. 생성물을 아세토니트릴/물 (1/1)로부터 백색 무정형 고체로 동결-건조시켰다.

[0275] HPLC 정제:

[0276] 정제용 HPLC를 페노메덱스 루나-C18(2), 10 μm 칼럼 (250 x 21.2 mm) (유량 30 ml/분, λ=290 nm)과 물, 0.05%TFA (용매 A) 및 순수한 아세토니트릴 (용매 B)을 사용하여 하기 구배로 수행하였다:

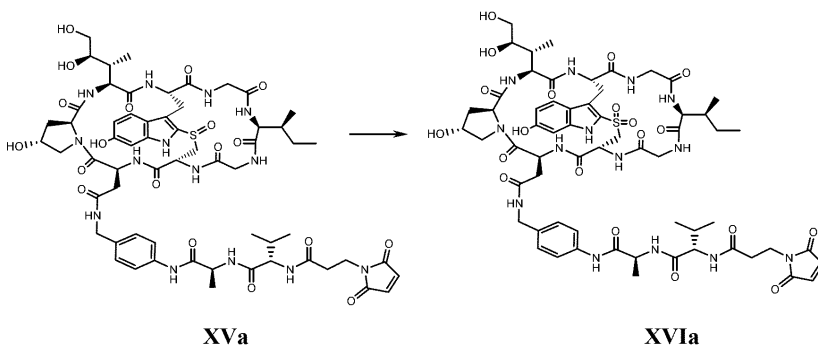
[0277] 0.0분→ 95%A; 14.8분→ 50%A; 15.0분→ 0%A; 18.0분→ 0%A; 18.5분→ 95%A, 22.0분→ 95%A.

[0278] MS (ESI+) [MH]⁺ 실측치: 1346.7 계산치: 1346.47 (C₆₁H₈₁N₁₄O₁₉S)

[0279] [M+Na]⁺ 실측치: 1368.5 계산치: 1368.45 (C₆₁H₈₀N₁₄NaO₁₉S)

[0280] 링커 독소 XVIa의 합성

[0281] 변형법 a)



[0282]

[0283] 10.09 mg (7.50 μmol) 술폭시드 XVa (WO 2016/142049에 기재된 바와 같음)를 2000 μl 아세트산 중에 용해시켰다. 주위 온도에서 아세트산 중 m-CPBA (메타-클로로퍼벤조산, 69.5%, 알드리치)의 용액 1784.28 μl 를 첨가하였다 (원액: 5000 μl 아세트산 중 5.18 mg m-CPBA). 주위 온도에서 3.5시간 동안 교반한 후, 용액을 30 ml 빙냉 MTBE 내로 적하하였다. 전체 혼합물을 -18°C 에서 추가로 45분 동안 저장하고, 침전물을 원심분리에 의해 분리하였다. 고체 잔류물을 30 ml 빙냉 MTBE로 세척하고, 건조시켰다. 조 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 순수한 생성물 5.82 mg (57%)을 수득하였다. 생성물을 아세토니트릴/물 (1/1)로부터 백색 무정형 고체로 동결-건조시켰다.

[0284] HPLC 정제:

[0285] 정제용 HPLC를 페노메덱스 루나-C18(2), 10 μm 칼럼 (250 x 21.2 mm) (유량 30 ml/분, $\lambda=305\text{ nm}$)과 물, 0.05%TFA (용매 A) 및 순수한 아세토니트릴 (용매 B)을 사용하여 하기 구배로 수행하였다:

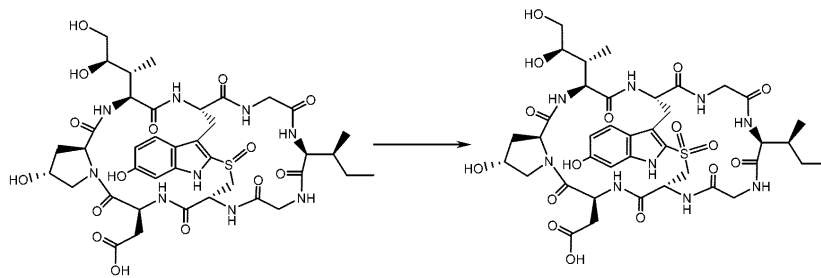
[0286] 0.0분 → 95%A; 14.8분 → 50%A; 15.0분 → 0%A; 18.0분 → 0%A; 18.5분 → 95%A, 22.0분 → 95%A.

[0287] MS (ESI+) [MH]⁺ 실측치: 1362.4 계산치: 1362.47 (C₆₁H₈₁N₁₄O₂₀S)

[0288] [M+Na]⁺ 실측치: 1384.6 계산치: 1384.45 (C₆₁H₈₀N₁₄NaO₂₀S)

[0289] 변형법 b)

[0290] 단계 1:



β -아마니틴

[0291]

[0292] 20.25 mg (22.01 μmol) β -아마니틴을 4000 μl 아세트산 중에 용해시켰다. 주위 온도에서, 아세트산 중 m-CPBA (메타-클로로퍼벤조산, 69.5%, 알드리치)의 용액 5634.38 μl 를 첨가하였다 (원액: 10 ml 아세트산 중 10.67 mg m-CPBA). 주위 온도에서 3.5시간 동안 교반한 후, 용액을 60 ml 빙냉 MTBE 내로 적하하였다. 전체 혼합물을 -18°C 에서 추가로 30분 동안 저장하고, 침전물을 원심분리에 의해 분리하였다. 고체 잔류물을 60 ml 빙냉 MTBE로 세척하고, 건조시켰다. 조 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 순수한 생성물 10.46 mg (51%)을 수득하였다. 생성물을 아세토니트릴/물 (1/1)로부터 백색 무정형 고체로 동결-건조시켰다.

[0293] HPLC 정제:

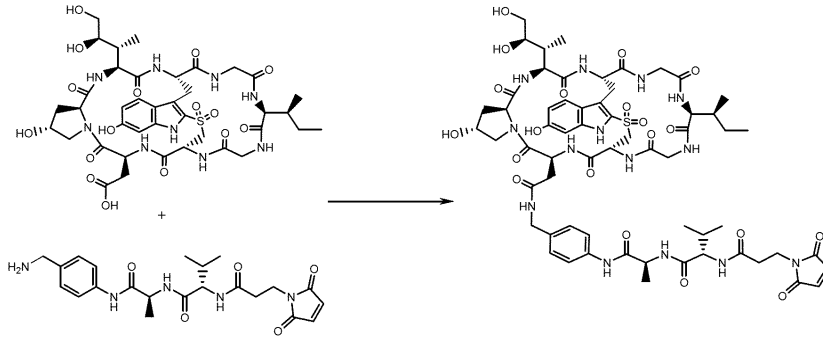
[0294] 정제용 HPLC를 페노메덱스 루나-C18(2), 10 μm 칼럼 (250 x 21.2 mm) (유량 30 ml/분, $\lambda=305\text{ nm}$)과 물, 0.05%TFA (용매 A) 및 순수한 아세토니트릴 (용매 B)을 사용하여 하기 구배로 수행하였다:

[0295] 0.0분 → 97%A; 1.0분 → 90%A; 23.0분 → 86%A; 23.1분 → 0%A; 27.0분 → 0%A, 27.5분 → 97%A; 30.0분 → 97%A.

[0296] MS (ESI+) [MH]⁺ 실측치: 936.9; 계산치: 936.98 (C₃₉H₅₄N₉O₁₆S)

[0297] [M+Na]⁺ 실측치: 958.9; 계산치: 958.96 (C₃₉H₅₃N₉NaO₁₆S)

[0298] 단계 2:



XVIa

[0299]

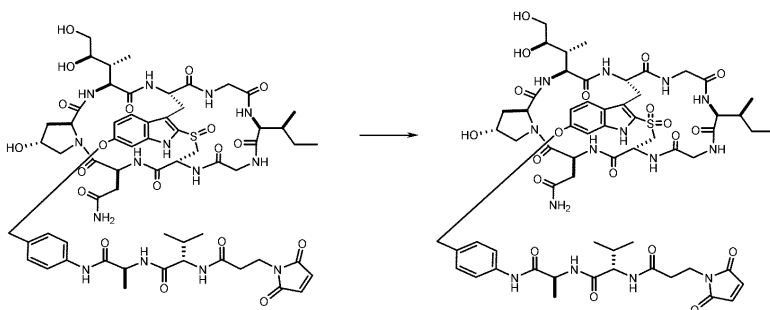
[0300] 단계 1 생성물 7.99 mg (8.54 μmol)을 665 μl 건조 DMF 중에 용해시켰다. 주위 온도에서 건조 DMF 중 TBTU의 용액 127.98 μl 를 첨가하였다. 그 후, 건조 DMF 중 DIPEA 128.04 μl 의 용액을 첨가하였다 (원액: 1500 μl 건조 DMF 중 52.25 μl DIPEA). 생성된 용액을 아르곤 하에 주위 온도에서 1분 동안 교반하였다. 이어서, 128.05 μl 의 BMP-Val-Ala-PAB-NH₂ (WO 2018115466)의 용액을 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하였다. 조 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 순수한 생성물 7.34 mg (63%)을 수득하였다.

[0301] HPLC 정제:

[0302] 정제용 HPLC를 페노메덱스 루나-C18(2), 10 μm 칼럼 (250 x 21.2 mm) (유량 15 ml/분, $\lambda=305$ nm) 95% 물, 5% 메탄올, 0.05% TFA (용매 A) 및 95% 메탄올, 5% 물, 0.05% TFA (용매 B)를 사용하여 하기 구배로 수행하였다:

[0303] 0.0분 → 100%A; 5.0분 → 50%A; 10.0분 → 30%A; 20.0분 → 20%A; 45.0분 → 0%A, 50.0분 → 100%A; 55.0분 → 100%A.

[0304] 링커 독소 XIXa의 합성



XVIIIa

XIXa

[0305]

[0306] 5.07 mg (3.77 μmol) 술폭시드 XVIIIa (WO 2016/142049에 기재된 바와 같음)를 1000 μl 아세트산 중에 용해시켰다. 주위 온도에서 아세트산 중 m-CPBA (메타-클로로퍼벤조산, 69.5%, 알드리치)의 용액 1043.57 μl 를 첨가하였다 (원액: 5000 μl 아세트산 중 4.93 mg m-CPBA). 주위 온도에서 3시간 15분 동안 교반한 후, 용액을 15 ml 빙냉 MTBE 내로 적하하였다. 전체 혼합물을 -18°C에서 추가로 1시간 동안 저장하고, 침전물을 원심분리에 의해 단리하였다. 고체 잔류물을 15 ml 빙냉 MTBE로 세척하고, 건조시켰다. 조 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 순수한 생성물 2.44 mg (48%)을 수득하였다. 생성물을 아세토니트릴/물 (1/1)로부터 백색 무정형 고체로 동결-건조시켰다.

[0307] HPLC 정제:

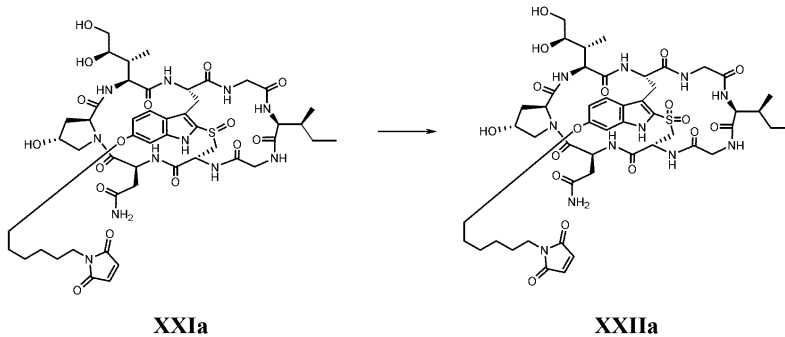
[0308] 정제용 HPLC를 페노메덱스 루나-C18(2), 10 μm 칼럼 (250 x 21.2 mm) (유량 30 ml/분, $\lambda=305$ nm)과 물, 0.05%TFA (용매 A) 및 순수한 아세토니트릴 (용매 B)을 사용하여 하기 구배로 수행하였다:

[0309] 0.0분 → 95%A; 14.8분 → 50%A; 15.0분 → 0%A; 18.0분 → 0%A; 18.5분 → 95%A, 22.0분 → 95%A.

[0310] MS (ESI+) [MH]⁺ 실측치: 1362.4; 계산치: 1362.47 (C₆₁H₈₁N₁₄O₂₀S)

[0311] [M+Na]⁺ 실측치: 1384.6; 계산치: 1384.45 (C₆₁H₈₀N₁₄NaO₂₀S)

[0312] 링커 독소 XXIIa의 합성



[0313]

[0314] 5.13 mg (4.67 μmol) 술폭시드 XXIa (WO 2016142049)를 1000 μl 아세트산 중에 용해시켰다. 주위 온도에서 아세트산 중 m-CPBA (메타-클로로퍼벤조산, 69.5%, 알드리치)의 용액 1291.27 μl를 첨가하였다 (원액: 5000 μl 아세트산 중 4.94 mg m-CPBA). 주위 온도에서 3.5시간 동안 교반한 후, 용액을 15 ml 빙냉 MTBE 내로 적하하였다. 전체 혼합물을 얼음 상에서 추가로 30분 동안 저장하고, 침전물을 원심분리에 의해 분리하였다. 고체 잔류물을 15 ml 빙냉 MTBE로 세척하고, 건조시켰다. 조 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 순수한 생성물 3.6 mg (69%)을 수득하였다. 생성물을 아세토니트릴/물 (1/1)로부터 백색 무정형 고체로 동결-건조시켰다.

[0315] HPLC 정제:

[0316] 정제용 HPLC를 페노메덱스 루나-C18(2), 10 μm 칼럼 (250 x 21.2 mm) (유량 30 ml/분, λ=305 nm)과 물, 0.05%TFA (용매 A) 및 순수한 아세토니트릴 (용매 B)을 사용하여 하기 구배로 수행하였다:

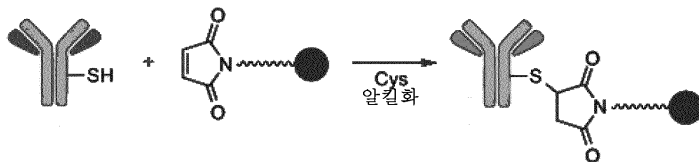
[0317] 0.0분→ 95%A; 14.8분→ 50%A; 15.0분→ 0%A; 18.0분→ 0%A; 18.5분→ 95%A, 22.0분→ 95%A.

[0318] MS (ESI+) [MH]⁺ 실측치: 1115.4 계산치: 1115.22 (C₄₉H₆₈N₁₁O₁₇S)

[0319] [M+Na]⁺ 실측치: 1137.2 계산치: 1137.20 (C₄₉H₆₇N₁₁NaO₁₇S)

[0320] 실시예 2: 항체-표적화된 아마톡신 접합체

[0321] 항체를 소위 티오마b(Thiomab) 기술에 의해 아마톡신 링커 접합체에 접합시켰다. 이러한 접근법에서, 접합은 하기 반응식에 제시된 바와 같이 독소 링커 구조물의 말레이미드 잔기를 항체 내의 시스테인 잔기의 유리 SH 기에 접합시킴으로써 일어난다.



[0322]

[0323] 이러한 접합 방법의 원리는 문헌 [Junutula et al. (2008)]에 개시되어 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0324] 본 실험에 사용된 항체는 이러한 유리 SH 기를 갖는 시스테인 잔기를 제공하기 위해 둘 다의 Fc 도메인에 D265C 치환을 포함한다. 각각의 기술은 WO 2016/142049 A1에 개시되어 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로 포함되고, 이는 2의 고정된 약물 대 항체 비 ("DAR") 및 부위 특이적 접합을 갖는 균질 생성물을 생성한다.

[0325] 실시예 3: 항체-표적화된 아마톡신 접합체에 의한 면역원성 세포 사멸의 유도

[0326] 실시예 3.1: ICD 마커 측정을 위한 세포의 처리

- [0327] Her2-양성 세포주 BT474는 인간 유방암 세포주이다. CD79b-양성 세포주 BJAB는 인간 버킷 림프종-유래 B 세포주이다.
- [0328] 각각 Her2-양성 세포주 BT474 및 CD79b-양성 세포주 BJAB의 세포를 100 μ L의 배지 내에 웰당 8×10^4 개 세포로 플레이팅하였다. 편평 바닥 또는 U-바닥 플레이트를 각각 BT474 또는 BJAB 세포에 사용하였다. 다음날, 배지를 교체하였다. 이 단계는 복제 웰 사이의 가변성을 감소시킴으로써 ATP 검정 재현성을 유의하게 개선시켰다. 이어서, 세포를 배지 단독, 메이탄신 (100 nM), 아마니틴 (100 nM), 항-HER2-아마니틴 접합체 (50 nM 항체), 또는 항-CD79b-아마니틴 접합체 (50 nM 항체)로 16-72시간 동안 처리하였다.
- [0329] 실시예 3.2: 칼레티쿨린 측정
- [0330] 세포를 처리 24, 48 및 72시간 후에 검정하였다. 부착성 BT474 세포를 고도로 정제된 재조합 세포-해리 효소 (TrypLE, 써모-피셔)의 용액으로 37°C에서 2분 동안 리프팅하였다. BT474 및 BJAB 세포 둘 다를 PBS/2% FBS로 세척한 다음, 0.5% 파라포름알데히드 중에서 5분 동안 고정시켰다. 차가운 PBS/2% FBS로 2회 세척한 후, 세포를 Fc 수용체-매개 비-특이적 결합을 차단하는 Fc 수용체 결합 억제제 (Fc 블록, 이바이오사이언스)와 함께 5분 동안 인큐베이션하고, 이어서 항-칼레티쿨린-FITC (암캠(Abcam)) 또는 이소형 대조군-FITC (암캠)와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS/2% FBS로 2회 세척하였다. 아이오딘화프로피듐 (PI)을 첨가하고, 샘플을 FACS 디바(Diva) 소프트웨어를 사용하여 FACS칸토(FACSCanto) 기기 (백톤-디킨슨(Becton-Dickinson)) 상에서 유동 세포측정법에 의해 분석하였다.
- [0331] 실시예 3.3: 세포의 ATP 측정
- [0332] 처리 16, 40, 및 64시간 후에, 배양 배지를 반응 튜브 (에펜도르프(Eppendorf))로 옮기고, 부드럽게 원심분리하였다. 세포의 ATP 농도를 엔리텐(ENLITEN) ATP 검정 (프로메가(Promega))를 사용하여 결정하였다. 화학발광을 스펙트라맥스(SpectraMax) ME 화학발광 판독기 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices)) 상에서 측정하였다.
- [0333] 실시예 3.4: 세포의 HMGB1 측정
- [0334] 처리 24, 48 및 72시간 후에 배양 배지를 수집하였다. 분석물을 pH 9에서 1 μ g/mL 항-HMGB1 항체 (클론 1D5, 시그마(Sigma))로 코팅된 닌크 맥시소르프(Nunc Maxisorp) 96-웰 플레이트 상에 포획하고, 플레이트를 카세인 완충제 (써모피셔)로 차단하였다. 실험 샘플과 동일한 일수 동안 37°C/5% CO₂에서 인큐베이션된 배양 배지에 첨가된 재조합 인간 HMGB1 단백질 (알앤디 시스템즈(R&D Systems))를 사용하여 표준 곡선을 생성하였다. 이 단계는 새로운 배양 배지에서 관찰된 배경 신호를 정규화하는 효과를 가졌다. 실험 샘플로부터의 배지를 새로운 튜브로 옮기고, 부드럽게 원심분리하여 파편을 펠릿화한 다음, 표준 곡선을 따라 제조된 플레이트에 첨가하였다. 1시간 후, 플레이트를 PBS/0.1% 트윈-20으로 세척하고, 항-HMGB1 폴리클로날 항체 (ab18256, 암캠)를 1시간 동안 PBS 중 1 μ g/mL로 첨가하였다. 플레이트를 세척하고, 항-토기 퍼옥시다제-접합된 2차 항체 (잭슨 이뮤노리서치(Jackson Immunoresearch))를 PBS 중 1:3000 희석으로 적용하였다. 30분 후, 플레이트를 PBS/0.1% 트윈-20으로 세척하고, 결합된 2차 항체를 울트라 TMB (써모 피셔(Thermo Fisher))를 사용하여 검출하고; 신호를 몰레큘라 디바이시스 스펙트라 맥스 M5 플레이트 판독기 상에서 판독하였다. 샘플 취급과 관련하여, 실험 샘플은 HMGB1 신호가 분해되기 때문에 후속 분석을 위해 동결시킬 수 없었다. 그러나, 샘플은 다음 날 분석을 위해 4°C에서 유지될 수 있었다.
- [0335] 각각 BT474 및 BJAB 세포로부터의 ICD 마커 측정의 결과는 도 4에 제시된다.
- [0336] 미접합 메이탄신과 대조적으로, 미접합 아마니틴은 배지만으로 처리된 대조군 세포와 비교하여, 2개의 세포주 중 어느 하나에 의한 칼레티쿨린 (CRT)의 세포 표면 노출, ATP 분비, 또는 HMGB1 방출을 유도하지 않았다. 이러한 발견은 미접합 아마니틴의 불량한 세포 흡수와 일치한다. 그러나, 아마니틴-접합된 항체-약물 접합체 (ADC)는 각각 상기 ICD 마커의 노출 및 분비를 표적-의존성 방식으로 유도하였다.
- [0337] Her2-양성 BT474 세포에서 (도 4A - C), 항-HER2-아마니틴 접합체는 CRT의 세포 표면 노출 (도 4A), ATP 분비 (도 4B), 및 HMGB1 방출 (도 4C)을 유도하였지만, 항-CD79b-아마니틴 접합체는 이를 유도하지 않았다. 대조적으로, CD79b-양성 BJAB 세포에서 (도 4D - F), 항-CD79b-아마니틴 접합체는 CRT의 세포 표면 노출 (도 4D), ATP 분비 (도 4E), 및 HMGB1 방출 (도 4F)을 유도하였지만, 항-HER2-아마니틴 접합체는 이를 유도하지 않았다.
- [0338] 따라서, 상기 세포주에서 CRT의 ATAC-유도된 노출, ATP의 분비, 및 HMGB1의 방출은 ATAC의 표적-결합 모이어티의 특이성에 의존성이었다.

[0339] 실시예 4: 생체내 ATAC 및 면역 체크포인트 억제제의 상승작용적 세포독성 작용

[0340] ICI 및 ATAC를 포함하는 조합물의 세포독성 활성은 생체내 종양 마우스 모델의 사용에 의해 평가되었다. 연구는 각각 12마리의 동물을 갖는 6개의 실험군으로 이루어졌다. CD19-양성 라지 세포 (인간 버킷 림프종, DSMZ)를 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC, 저먼 레드 크로스(German Red Cross))와 예비혼합하고, 연구 제0일에 피하로 접종하였다. PBS, 각각 0.1 mg/kg 체중의 용량 및 0.3 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 단독 (단일 용량 i.v.), 20 mg/kg 체중의 용량의 PD-L1-특이적 항체 아벨루맵 단독 (제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일에 i.v.), 또는 각각 0.1 mg/kg 체중의 용량 및 0.3 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb (단일 용량 i.v.) 및 20 mg/kg 체중의 용량의 PD-L1-특이적 항체 아벨루맵 (제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일에 i.v.)의 조합물로의 처리를 세포 접종 후 제0일에 시작하였다. 종양 부피를 캘리퍼 측정에 의해 1주에 2회 측정하고, 체중을 병행하여 결정하였다. 종양 부피가 >1600 mm³일 때 또는 윤리적 이유로 인해 마우스가 희생될 필요가 있을 때 (독일 동물 복지 법률에 따름) 동물을 희생시키고 부검을 수행하였다.

[0341] 연구 결과는 도 5에 제시된다. 대조군 (PBS)과 비교하여, 0.1 mg/kg 체중의 용량에서 PD-L1-특이적 항체 아벨루맵 단독 또는 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 단독에 의해 달성된 종양 부피의 감소는 대등하였다. 그러나, 0.1 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 및 PD-L1-특이적 항체 아벨루맵의 조합물에서 발견된 종양 부피의 감소는 둘 다의 개별 작용제 단독에 의해 달성된 감소의 합보다 유의하게 더 높았다. ATAC가 0.3 mg/kg 체중의 보다 높은 농도로 사용된 경우에도 동일하게 관찰되었으며, 이는 생체내에서의 그의 종양-세포 사멸 활성에 관한 ATAC 및 면역 체크포인트 억제제의 상승작용적 효과를 나타낸다.

[0342] 표 1: 종양 세포 접종 후 제31일의 평균 종양 부피. TV: 종양 부피; SEM: 평균의 표준 오차

	평균 TV [mm ³]	SEM
PBS 10mL/kg	493.6	106.1
아벨루맵 20mg/kg	353.1	76.3
ATAC 0.1 mg/kg	349.9	87.7
ATAC 0.1 mg/kg + 아벨루맵 20mg/kg	165.5	26.9
ATAC 0.3 mg/kg	176.0	87.5
ATAC 0.3 mg/kg + 아벨루맵 20mg/kg	27.4	22.1

[0343]

[0344] 실시예 4: PBMC의 존재에 따른 생체내 ATAC 및 면역 체크포인트 억제제의 상승작용적 세포독성 작용의 의존성

[0345] ICI 및 ATAC를 포함하는 조합물의 세포독성 활성은 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 부재 및 존재 하에 생체내 종양 마우스 모델의 사용에 의해 추가로 평가되었다. 연구는 각각 12마리의 동물을 갖는 8개의 실험군으로 이루어졌다. 4개의 군에 대해, CD19-양성 라지 세포 (인간 버킷 림프종, DSMZ)를 인간 PBMC (저먼 레드 크로스)와 예비혼합하고, 제0일에 피하로 접종하였다. 나머지 4개의 군에 라지 세포만을 피하로 접종하였다. PBS, 0.3 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 단독, 또는 20 mg/kg 체중의 용량의 PD-L1-특이적 항체 아벨루맵 (바벤시오(Bavencio)®) 단독, 또는 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 및 PD-L1-특이적 항체 아벨루맵의 조합물로의 처리를 세포 접종 후 제0일에 시작하였고 (세부사항에 대해서는 표 2 참조), 이에 의해 아벨루맵 및 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb를 순차적으로 i.v. 투여하였다. 종양 부피를 캘리퍼 측정에 의해 1주에 2회 측정하고, 체중을 병행하여 결정하였다. 종양 부피가 >1600 mm³일 때 또는 윤리적 이유로 인해 마우스가 희생될 필요가 있을 때 (독일 동물 복지 법률에 따름) 동물을 희생시키고 부검을 수행하였다.

[0346] 표 2: 실시예 4에서의 연구의 실험 세부사항

군	처리	단백질 용량 [mg/kg]	스케줄	s.c. 접종된 세포 (제0일)
1	PBS	10 ml/kg	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일	라지
2	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	단일 용량, 제0일	라지
3	아벨루맙	20	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일	라지
4	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	단일 용량, 제0일	라지
	아벨루맙	20	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일	
5	PBS	10 ml/kg	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일	라지 +PBMC 공여자 1 라지 +PBMC 공여자 2 라지 +PBMC 공여자 3 라지 +PBMC 공여자 4
6	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	단일 용량, 제0일	라지 +PBMC 공여자 1 라지 +PBMC 공여자 2 라지 +PBMC 공여자 3 라지 +PBMC 공여자 4
7	아벨루맙	20	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일	라지 +PBMC 공여자 1 라지 +PBMC 공여자 2 라지 +PBMC 공여자 3 라지 +PBMC 공여자 4
8	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	단일 용량, 제0일	라지 +PBMC 공여자 1
	아벨루맙	20	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일, 제13일	라지 +PBMC 공여자 2 라지 +PBMC 공여자 3 라지 +PBMC 공여자 4

[0347]

[0348] 연구 결과는 도 6에 제시된다. 인간 PBMC의 부재 하에, 0.3 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb와 20 mg/kg 체중의 용량의 PD-L1-특이적 항체 아벨루맙의 조합물은 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 단독에 의해 달성되는 것보다 생체내 종양 부피의 더 높은 감소를 생성하지 않았다. 대조적으로, 인간 PBMC의 존재 하에, 0.3 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb와 20 mg/kg 체중의 용량의 PD-L1-특이적 항체 아벨루맙의 조합물은 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 단독에 의해 달성된 감소와 비교하여 생체내 종양 부피의 더 높은 감소를 생성하였다.

[0349] 결론적으로, 생체내 ATAC와 면역 체크포인트 억제제의 상승작용적 세포독성 효과는 사용된 마우스 모델에서의 인간 PBMC의 존재에 의존한다.

[0350] 실시예 5: 인간 PBMC로 재구성된 NOD/SCID 마우스의 라지 종양 이종이식편 모델에서의 아마니틴 기반 항-CD19 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 및 램브롤리주맙의 효능

[0351] 표 3: 실시예 5의 연구의 실험 세부사항

군	처리	용량 [mg/kg]	스케줄	s.c. 접종된 세포 (d 0)
1	0.9% NaCl	10mL/kg	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일	라지 +PBMC 라지 +PBMC 라지 +PBMC
2	chiBCE19-D265C-XIIb	0.1	단일 용량, 제0일	라지 +PBMC 라지 +PBMC 라지 +PBMC
3	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	단일 용량, 제0일	라지 +PBMC 라지 +PBMC 라지 +PBMC
4	웹브롤리주맵	20	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일	라지 +PBMC 라지 +PBMC 라지 +PBMC
5	chiBCE19-D265C-XIIb	0.1	단일 용량, 제0일	라지 +PBMC
	웹브롤리주맵*	20	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일	라지 +PBMC 라지 +PBMC
6	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	단일 용량, 제0일	라지 +PBMC
	웹브롤리주맵*	20	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일	라지 +PBMC 라지 +PBMC

[0352] * chiBCE19-D265C-XIIb 및 웹브롤리주맵의 투여를 제0일에 순차적으로 수행하였다

[0353] 연구는 각각 9마리의 동물을 갖는 6개의 실험군으로 이루어졌다. 모든 군에 대해, CD19-양성 라지 세포 (인간 버킷 림프종, DSMZ)를 인간 PBMC (저먼 레드 크로스)와 예비혼합하고, 제0일에 피하로 접종하였다. PBS, 0.1 mg/kg 및 0.3 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 단독, 또는 20 mg/kg 체중의 용량의 PD-1-특이적 항체 웹브롤리주맵 (키트루다®) 단독, 또는 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 및 PD-1-특이적 항체 웹브롤리주맵의 조합물로의 처리를 세포 접종 후 제0일에 시작하였다 (세부사항에 대해 표 3 참조). 종양 부피를 캘리퍼 측정에 의해 1주에 2회 측정하고, 체중을 병행하여 결정하였다. 종양 부피가 >1600 mm³일 때 또는 윤리적 이유로 인해 마우스가 희생될 필요가 있을 때 (독일 동물 복지 법률에 따름) 동물을 희생시키고 부검을 수행하였다. 연구의 결과를 도 9에 제시하며, 이는 생체내 ATAC 및 항-PD-1 면역 체크포인트 억제제의 상승작용적 세포독성 효과가 사용된 마우스 모델에서의 인간 PBMC의 존재에 의존하고, 면역 체크포인트 억제제의 활성화와 상승작용하는 면역원성 세포 사멸을 유도하기 위해 항-CD19 ATAC에 대한 유효 용량이 필요함을 예시한다.

[0354] 실시예 6: 인간 PBMC로 재구성된 NOD/SCID 마우스의 라지 종양 이종이식편 모델에서 항-CD19 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 및 이필리무맵의 효능

[0356] 표 4: 실시예 6의 연구의 실험 세부사항, 모든 동물을 제0일에 라지+PBMC 세포 (s.c.)로 접종하였음

군	처리	용량 [mg/kg]	적용 부피 [mL/kg]	스케줄
1	0.9% NaCl	10mL/kg	10	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일
2	chiBCE19-D265C-XIIb	0.1	10	단일 용량, 제0일
3	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	10	단일 용량, 제0일
4	에르보이 (이필리무맙)	4	10	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일
5	chiBCE19-D265C-XIIb	0.1	10	단일 용량, 제0일
	에르보이 (이필리무맙)*	4	10	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일
6	chiBCE19-D265C-XIIb	0.3	10	단일 용량, 제0일
	에르보이 (이필리무맙)*	4	10	제0일, 제3일, 제6일, 제8일, 제10일

[0357]

[0358] * chiBCE19-D265C-XIIb 및 이필리무맙의 투여를 제0일에 순차적으로 수행하였다.

[0359] 연구는 각각 12마리의 동물을 갖는 6개의 실험군으로 이루어졌다. 모든 군에 대해, CD19-양성 라지 세포 (인간 버킷 림프종, DSMZ)를 인간 PBMC (저먼 레드 크로스)와 예비혼합하고, 제0일에 피하로 접종하였다. PBS, 0.1 mg/kg 및 0.3 mg/kg 체중의 용량의 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 단독, 또는 4 mg/kg 체중의 용량의 CTLA4-특이적 항체 이필리무맙 (에르보이®) 단독, 또는 CD19-특이적 ATAC chiBCE19-D265C-XIIb 및 CTLA4-특이적 항체 이필리무맙의 조합물로의 처리를 세포 접종 후 제0일에 시작하였다 (세부사항에 대해 표 4 참조). 중앙 부피가 >1600 mm³일 때 또는 윤리적 이유로 인해 마우스가 희생될 필요가 있을 때 (독일 동물 복지 법률에 따름) 동물을 희생시키고 부검을 수행하였다. 연구의 결과는 CTLA4 면역 체크포인트 억제제 및 항-CD19-ATAC의 조합 처리를 받은 동물 (군 6)에서의 생존에 대한 상승작용적 효과를 제시하는 도 10에 제시된다. 결과는 유효량의 항-CD19 ATAC가 각각의 처리 군의 연장된 생존에 의해 입증된 바와 같이 상승작용적으로 작용하는 CTLA4 체크포인트 억제제 (예를 들어 이필리무맙)와 조합되어 면역원성 세포 사멸을 유도하는 데 필요함을 나타낸다.

[0360] 참고문헌

[0361] Darvin P *et al.* (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental & Molecular Medicine* Vol. 50: 165-176.

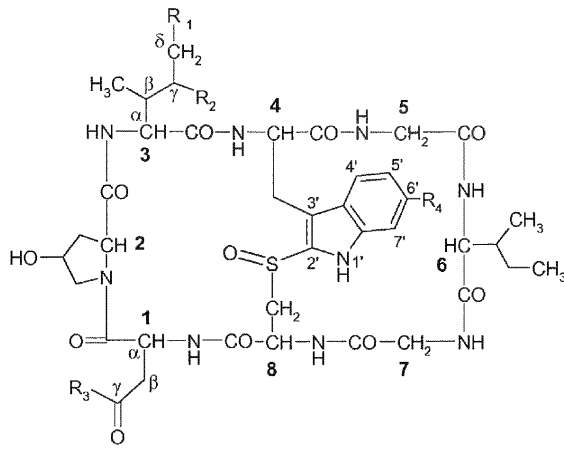
[0362] Dyck L and Mills KHG (2017). Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur. J. Immunol.* Vol. 47: 765-779.

[0363] Hemler ME (2001). Specific tetraspanin functions. *The Journal of Cell Biology* Vol. 155(7): 1103-1107.

- [0364] Kroemer G *et al.* (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 31: 51-72.
- [0365] Li *et al.* (2016). A mini-review for cancer immunotherapy: molecular understanding of PD-1/PD-L1 pathway and translational blockade of immune checkpoints. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 17: 1151 (doi:10.3390/ijms17071151).
- [0366] Marshall HT and Djamgoz MBA (2018). Immuno-oncology: Emerging targets and combination therapies. *Front. Oncol.* Vol. 8: 315 (doi: 10.3389/fonc.2018.00315)
- [0367] Martins *et al.* (2019). Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nature Reviews - Clinical Oncology* Vol. 16: 563-580.
- [0368] Obeid *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine* Vol. 13: 54-61.
- [0369] Qin *et al.* (2019). Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Molecular Cancer* Vol. 18: 155-168.
- [0370] Sambhi M *et al.* (2019). Current challenges in cancer immunotherapy: multimodal approaches to improve efficacy and patient response rates. *Journal of Oncology* Vol. 2019 (doi.org/10.1155/2019/4508794).
- [0371] Singh S *et al.* (2020). Immune checkpoint inhibitors: a promising anticancer therapy. *Drug Discovery Today* Vol. 25(1): 223-229.
- [0372] Taams LS and de Gruijl TD (2020). Immune checkpoint inhibition: from molecules to clinical application. *Clinical and Experimental Immunology* Vol. 200: 105-107.
- [0373] Wei SC *et al.* (2018). Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov.* Vol. 8(9): 1069-1086.
- [0374] Wieland *et al.* (1978). Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous amanita mushroom. *CRC Crit Rev Biochem.* Vol. 5: 185-260.
- [0375] Xu-Monette ZY *et al.* (2016). Assessment of CD37 B-cell antigen and cell of origin significantly improves risk prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* Vol. 128(26): 3083-3100.
- [0376] Zou F *et al.* (2018). Expression and Function of Tetraspanins and Their Interacting Partners in B Cells. *Frontiers in Immunology* Vol. 9. Article 1606.

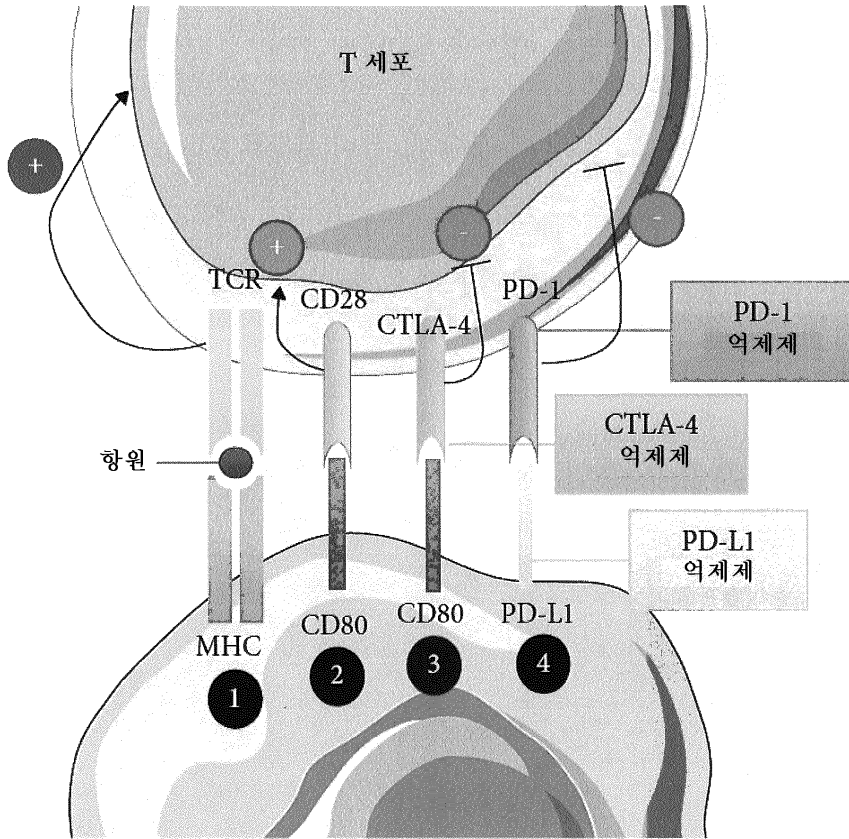
도면

도면1

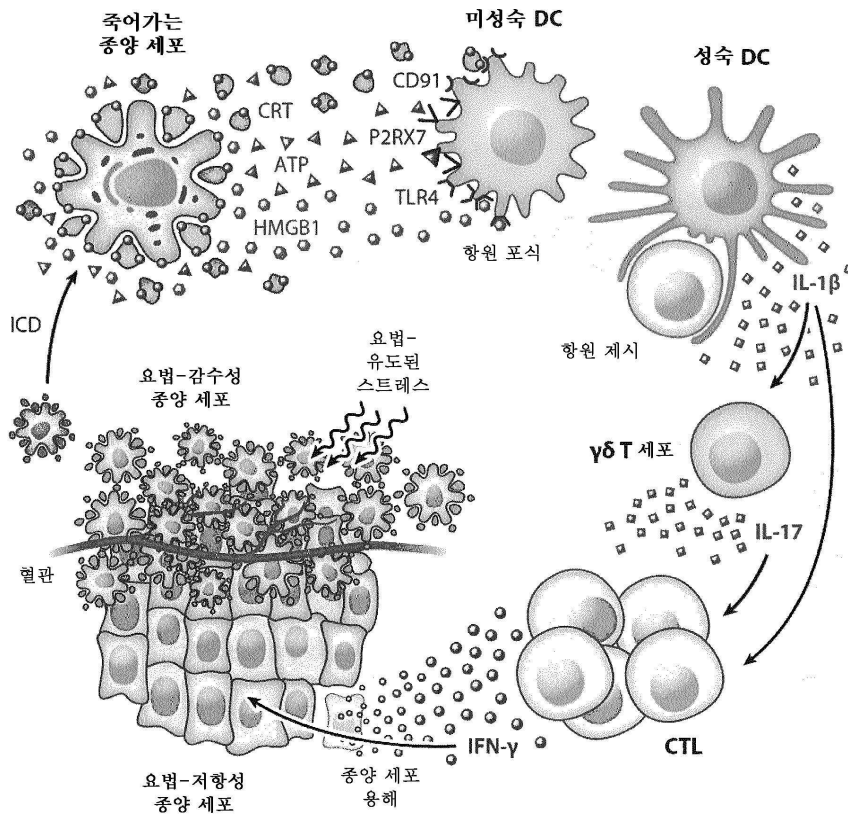


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α-아마니틴	OH	OH	NH ₂	OH
β-아마니틴	OH	OH	OH	OH
γ-아마니틴	H	OH	NH ₂	OH
ε-아마니틴	H	OH	OH	OH
아마닌	OH	OH	OH	H
아마닌아미드	OH	OH	NH ₂	H
아마놀린	H	H	NH ₂	OH
아마놀린산	H	H	OH	OH
γ-아마닌	H	OH	OH	H
γ-아마닌아미드	H	OH	NH ₂	H

도면2

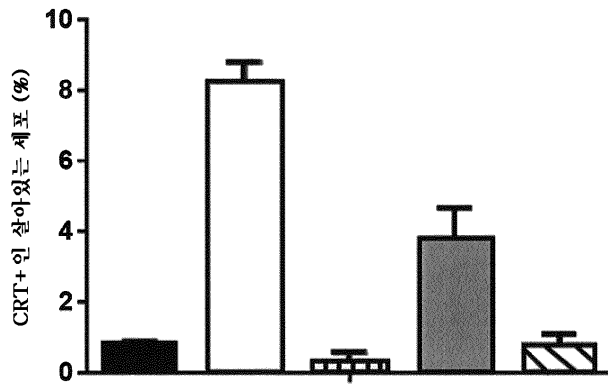


도면3

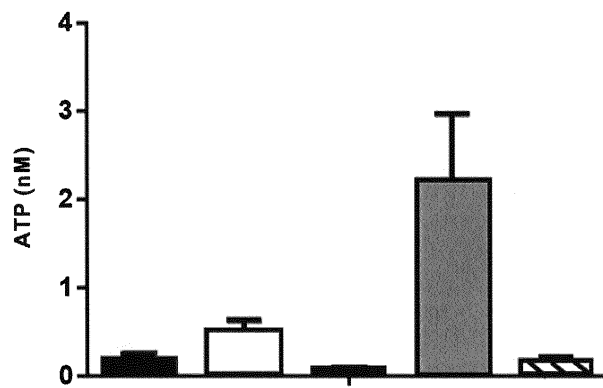


도면4i

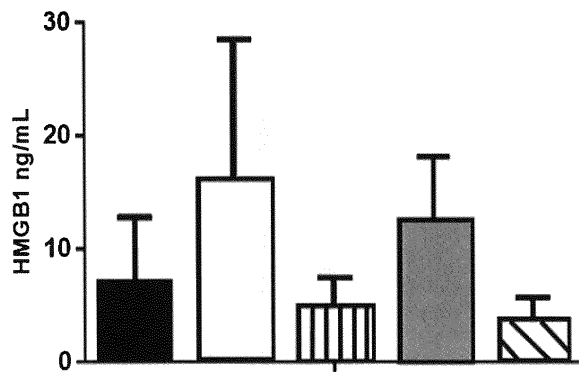
A



B

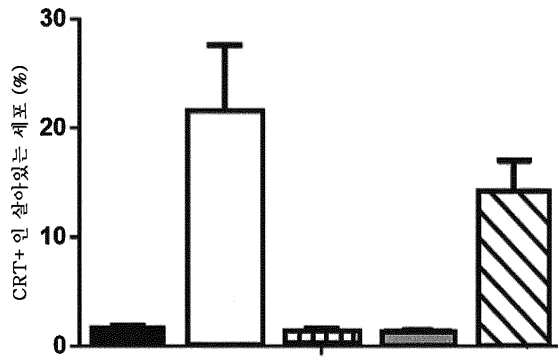


C

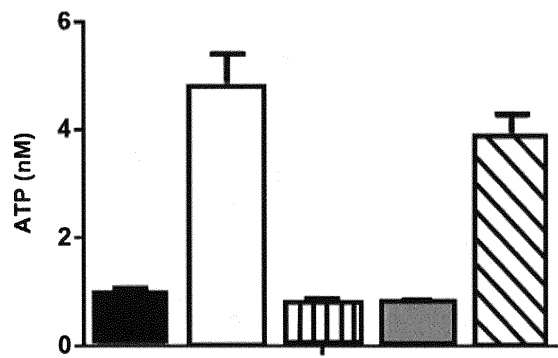


도면4ii

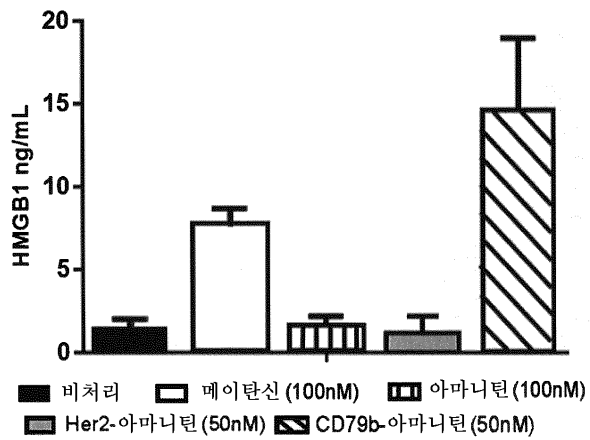
D



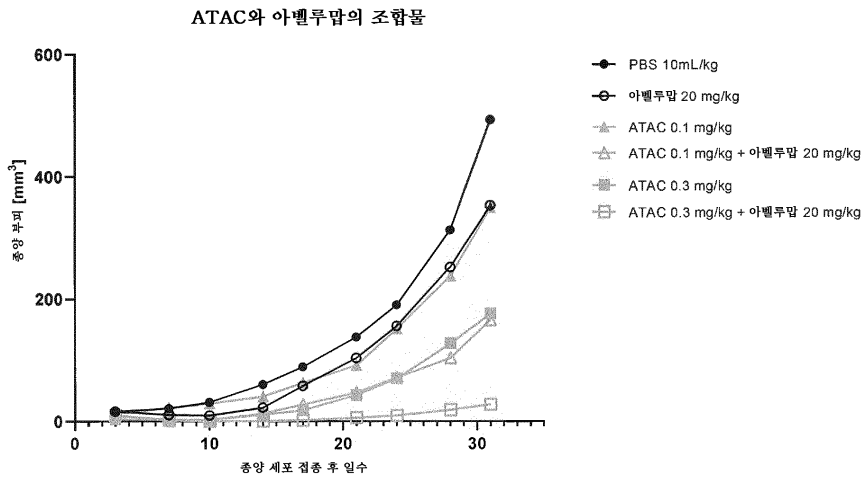
E



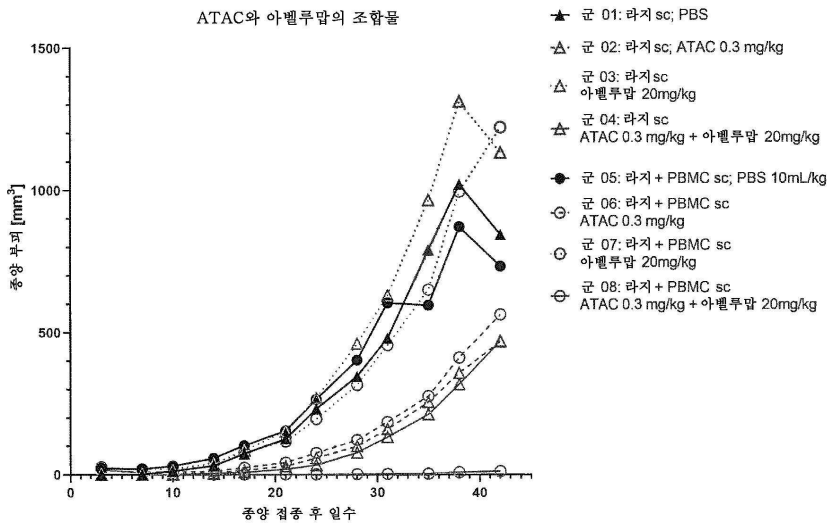
F



도면5



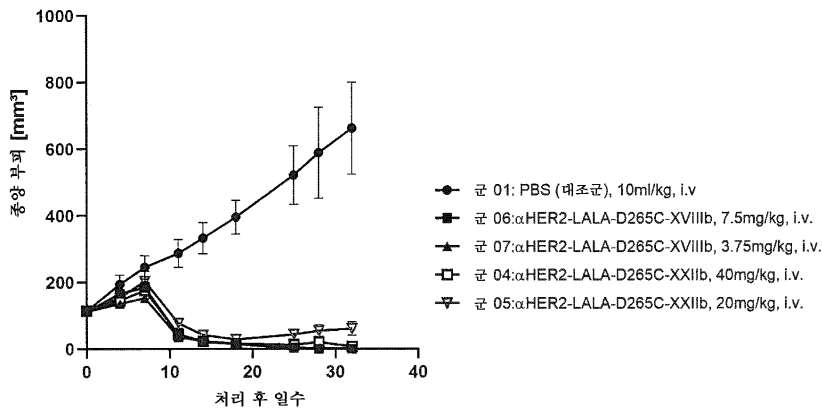
도면6



도면7

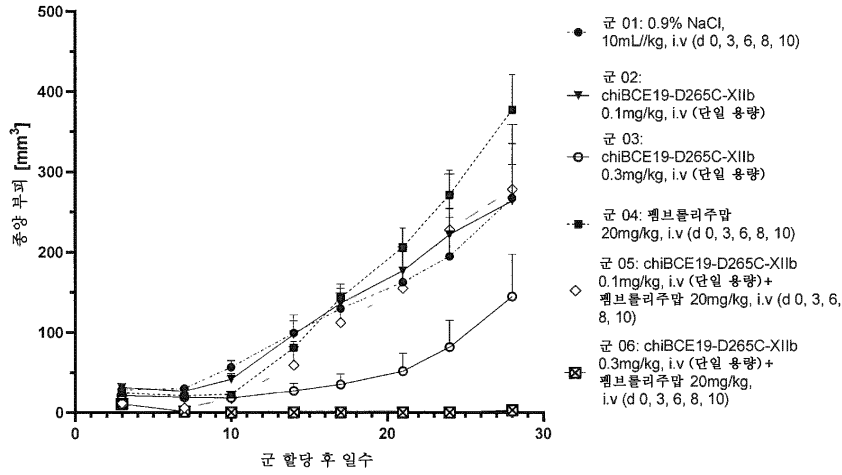
ATAC	SKBR-3 내 세포독성 활성 EC50 [nM]	JIMT-1 내 세포독성 활성 EC50 [nM]	BT474 내 세포독성 활성 EC50 [nM]
αHER2-LALA-D265C-XIXb	7.05x10 ⁻³	0.046	0.035
αHER2-LALA-D265C-XVIIIb	0.031	0.201	n.d.
αHER2-LALA-D265C-XIIIb	0.028	0.211	0.112
αHER2-LALA-D265C-XIIb	0.038	0.492	0.158
αHER2-LALA-D265C-XXIIb	0.158	-	0.378
αHER2-LALA-D265C-XXIb	0.152	-	0.217

도면8



도면9

항-CD19 ATAC와 PD-1 체크포인트 억제제의 조합물



도면10

항-CD19 ATAC와 CTLA4 체크포인트 억제제의 조합물

