



등록특허 10-2464778



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월07일  
(11) 등록번호 10-2464778  
(24) 등록일자 2022년11월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 47/64* (2017.01) *A61K 31/519* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01) *A61K 47/55* (2017.01)  
*A61K 47/65* (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 47/64* (2017.08)  
*A61K 31/519* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7016784(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년08월11일  
심사청구일자 2021년08월11일
- (85) 번역문제출일자 2020년06월11일
- (65) 공개번호 10-2020-0071152
- (43) 공개일자 2020년06월18일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7003716  
원출원일자(국제) 2016년08월11일  
심사청구일자 2018년03월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2016/094704
- (87) 국제공개번호 WO 2017/025057  
국제공개일자 2017년02월16일
- (30) 우선권주장  
201510489556.6 2015년08월11일 중국(CN)  
201510489560.2 2015년08월11일 중국(CN)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2015106599 A1

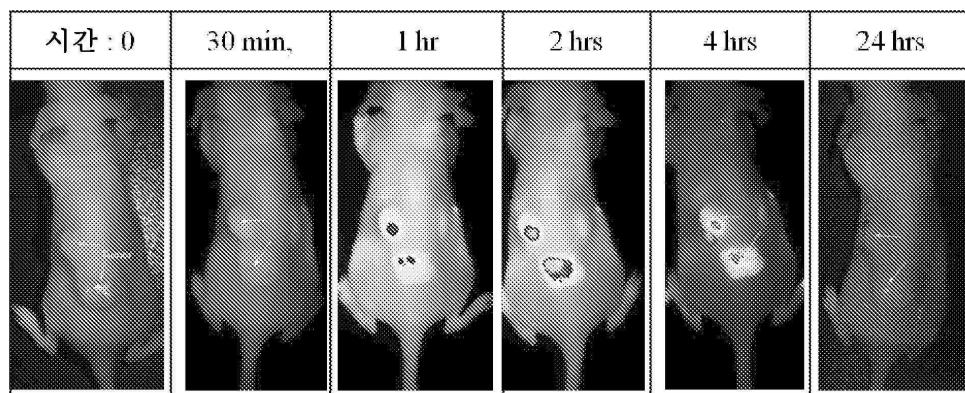
- (73) 특허권자  
코히런트 바이오파마 I, 리미티드  
중국 홍콩 애드미럴티 퀸즈웨이 엔오. 90 타워 투  
리포 센터 4/에프. 유닛 417
- (72) 발명자  
후양, 바오후아 로버트  
중국 215200 지앙수 수쯔우 우지양 디스트릭트 광  
양 로드 8 짠후아 사이언티픽 빌딩 써드 플로어  
준-디  
다이, 지안  
중국 215200 지앙수 수쯔우 우지양 디스트릭트 광  
양 로드 8 짠후아 사이언티픽 빌딩 써드 플로어  
준-디  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **다중-리간드 약물 접합체 및 그의 용도****(57) 요약**

접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 페이로드 및 2종류 이상의 세포-상호작용 분자를 포함한다. 세포-상호작용 분자는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드이다. 질환을 치료하는 방법은 페이로드를 대상체에게 전달하는 것을 포함한다.

**대 표 도** - 도4

(52) CPC특허분류

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61K 47/551* (2017.08)

*A61K 47/65* (2017.08)

(72) 발명자

**왕, 종보**

중국 215200 지양수 수조우 우지양 디스트릭트 광  
양 로드 8 짠후아 사이언티픽 빌딩 써드 플로어  
존-디

**씨에, 쑤에위안**

중국 215200 지양수 수조우 우지양 디스트릭트 광  
양 로드 8 짠후아 사이언티픽 빌딩 써드 플로어  
존-디

---

**리우, 시아오동**

중국 215200 지양수 수조우 우지양 디스트릭트 광  
양 로드 8 짠후아 사이언티픽 빌딩 써드 플로어  
존-디

**후, 신리**

중국 215200 지양수 수조우 우지양 디스트릭트 광  
양 로드 8 짠후아 사이언티픽 빌딩 써드 플로어  
존-디

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

페이로드 및 2종류 이상의 세포-상호작용 분자를 포함하는 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이며, 여기서 페이로드는 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개와 접합되고, 2종류 이상의 세포-상호작용 분자는

(a) 제1 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 리간드 및 제2 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 리간드이며, 여기서 제1 및 제2 세포 표면 수용체는 서로 상이한 것인 제1 및 제2 리간드; 또는

(b) 제1 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 리간드 및 세포내이입을 매개할 수 있는 세포내이입 분자

를 포함하고,

여기서 제1 및 제2 세포 표면 수용체는 소마토스타틴-14 (SST-14) 수용체, 황체형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 수용체, 및 일시적 수용체 전위 양이온 채널 서브페밀리 V 멤버 6 (TRPV6)으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

세포내이입 분자는 폴레이트, 5-메틸테트라하이드로폴레이트, 5-포르밀테트라하이드로폴레이트, 메토트렉세이트, 5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트, 및 서열식별번호: 19 또는 서열식별번호: 20의 아미노산 서열을 갖는 웹티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인

접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 페이로드가 링커를 통해 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개와 접합되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 페이로드가 제1 리간드와 접합되고, 제1 리간드가 제2 리간드와 접합되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 제1 리간드가 스페이서를 통해 제2 리간드와 접합되고, 여기서 스페이서는 서열식별번호: 1-14, Arg-Arg, Ala-Ser-Asn, Ala-Ala-Ala, Ser-Ser-Arg, Pro-Arg, 및 Pro-Leu-Gly로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 페이로드가 직접적으로 각각의 제1 리간드 및 제2 리간드와 접합되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 페이로드가 제1 링커를 통해 제1 리간드와 접합되고, 페이로드가 제2 링커를 통해 제2 리간드와 접합되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제3 리간드를 추가로 포함하는 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 제1, 제2 및 제3 세포 표면 수용체가 서로 상이한 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과의 페이로드를 포함하는 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 페이로드가 소분자 화합물, 뉴클레오티드, 웨티드 및 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 소분자 화합물이 메이탄신, 탁신올, 아우리스타틴, 에포틸론, 블레오마이신, 탁티노마이신, 플리카마이신, 및 미토마이신 C로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 12

제10항에 있어서, 소분자 화합물이 아우리스타틴인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 13

제7항에 있어서, 제1 및 제2 리간드는 서열식별번호: 15-18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 웨티드를 포함하고, 제3 리간드는 웨티드를 포함하는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 제3 리간드가 서열식별번호: 15-18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 웨티드를 포함하는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 15

제2항 또는 제6항에 있어서, 링커가 웨티드 링커, 디슬피드 링커 또는 pH-의존성 링커인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 웨티드 링커가 발린-시트룰린, 페닐알라닌-리신 및 발린-리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 17

제15항에 있어서, 디슬피드 링커가 하기 구조를 갖는 DMDS, MDS, DSDM 및 NDMDS로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염:

DMDS	
MDS	
DSDM	
NDMDS	

청구항 18

제15항에 있어서, pH-의존성 링커가 시스-아코니트산 무수물의 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 .

청구항 19

제1항에 있어서, 페이로드, 제1 세포내이입 문자 및 제2 세포내이입 문자를 포함하며, 여기서 제1 세포내이입 문자는 제2 세포내이입 문자와 동일하고, 제1 및 제2 세포내이입 문자는 세포내이입 문자에 대해 정의된 군으로부터 선택되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 20

제1항에 있어서, 페이로드, 제1 세포내이입 문자 및 제2 세포내이입 문자를 포함하며, 여기서 제1 세포내이입 문자는 제2 세포내이입 문자와 상이하고, 제1 및 제2 세포내이입 문자는 세포내이입 문자에 대해 정의된 군으로부터 선택되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 21

제1항에 있어서, 페이로드, 제1 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 리간드 및 세포내이입 분자를 포함하는 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 세포-상호작용 분자를 추가로 포함하며, 여기서 제3 세포-상호작용 분자는 폴레이트, 5-메틸테트라히드로폴레이트, 5-포르밀테트라히드로폴레이트, 메토트렉세이트 및 5,10-메틸렌테트라히드로폴레이트, 및 Arg-Gly-Asp로 이루어진 군으로부터 선택된 세포내이입 분자인 접합체화합물 또는 그의 제약성 허용되는 염.

청구항 23

제1항 내지 제6항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 페이로드의 전달을 필요로 하는 대상체에게 페이로드를 전달하기 위한 제약 조성물.

**청구항 24**

제1항 내지 제6항 및 제19항 내지 제21항 중 어느 한 항의 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**발명의 설명****기술 분야**

[0001]

관련 출원에 대한 상호-참조

[0002]

본 출원은 2015년 8월 11일에 출원된 중국 특허 출원 번호 201510489556.6 (발명의 명칭: "세포내이입을 유도할 수 있는 리간드-약물 접합체") 및 2015년 8월 11일에 출원된 중국 특허 출원 번호 201510489560.2 (발명의 명칭: "세포내이입을 유도할 수 있는 다중-리간드 약물 접합체")의 우선권의 이익을 청구하며, 이들 출원은 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

기술 분야

[0004]

본 출원은 일반적으로 접합체 화합물, 제약 조성물 및 그의 사용 방법에 관한 것이다. 본 출원은 보다 구체적으로 다중-리간드 약물 접합체 (mLDC), 특히 세포내이입을 유도할 수 있는 mLDC, 뿐만 아니라 그의 제약 조성물, 페이로드를 필요로 하는 대상체에게 페이로드를 전달하는데 있어서의 그의 사용 방법, 및 질환을 치료하는데 있어서의 그의 사용 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005]

통상적으로, 이환 세포 및 정상 세포의 병리학적 및 생리학적 특징은 유의하게 상이하며, 그 차이 중 하나는 이환 세포의 표면은 특정한 또는 과다발현된 물질 (예컨대, 항원, 화학적 신호, 수용체 등)을 갖지만, 정상 세포에서는 이들이 존재하지 않거나 또는 저-발현된다는 것이다. 이러한 원리에 기초하여, 항체-약물 접합체 (ADC) 및 폴리펩티드-약물 접합체 (PDC)가 질환의 치료를 위해 개발되었다. 현재, 일부 ADC 및 PDC 약물이 시판되었거나 또는 임상 연구 중에 있지만, 이들 약물의 설계 근거로 인해 임상에서 ADC 및 PDC에 많은 제약이 있다.

[0006]

ADC는 2011년 시애틀 제네티克斯(Seattle Genetics)의 애드세트리스 및 2013년 제넨테크(Genentech)의 카드실라승인으로 최근에 큰 발판을 마련한 바 있으며, 30종이 넘는 약물이 임상 시험 중에 있어 유망한 R&D 개발 영역으로 남아 있다. 그럼에도 불구하고, ADC 개발은 ADC의 복잡한 성질 및 큰 분자량으로 인해, 적합한 표적의 결여, 제조 상의 난관 및 낮은 약물 안정성에 이르는 수많은 어려움에 직면해 있다. 현재, ADC는 주로 암의 치료에 사용된다. 일부 경우에, 암 세포 표면 상의 항원에 대한 표적 항체의 친화도는  $10^{-9} \sim 10^{-12}$  (Kd, 몰/리터) 정도로 높을 수 있다. 따라서, ADC는, 표적 세포에 대한 높은 특이성을 가짐과 동시에, 또한 표적 세포와 동일한 표적 수용체(들)를 갖는 정상 세포에 대해서도 높은 특이성을 갖는다. 한편, ADC가 생체내에서 대사되는 데에는 오랜 시간 (1 내지 3주)이 걸릴 수 있으며, 그 동안에 계속해서 정상 세포를 사멸시킬 수 있고, 따라서

ADC의 독성 부작용을 유의하게 증가시킬 수 있다. 따라서, ADC의 보다 이상적인 적응증은 종양 및 정상 세포에서의 세포 표면 항원의 양이 유의하게 상이한 것을 특징으로 하는 질환일 것이다. 그러나, 관련 기술분야에 공지된 극소수의 질환이 이러한 엄격한 요건을 충족시킬 수 있다.

[0007] 약물 접합체 화합물의 또 다른 그룹은 리간드가 웹티드 또는 소분자인, 리간드-약물 접합체 (LDC)이다. 그러나, LDC의 적용에는 생체이용률, 안정성, 효능에서부터 독성에 이르는 다양한 문제가 있다. 예를 들어, 많은 리간드는 이들의 큰 분자량, 친지성 또는 다른 속성으로 인해 세포에 들어갈 수 없어, 이들의 치료 용도를 제한한다. 또한, 리간드가 통상적인 화학요법제 (예컨대 독소루비신, 파클리탁셀 등)와 접합되는 경우에 치료 효과는 일반적으로 낮고, 반면 이들이 고도로 효과적인 약물 분자 (예컨대 MMAE, DM1)와 접합되는 경우에는 독성이 높아서, 따라서 심지어 종양 치료를 위한 치료 유효량이 달성되기 전에 동물 중독 사망으로 이어진다.

### 발명의 내용

[0008] 본 출원은 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 그의 제약 조성물 및 그의 사용 방법에 관한 것이다. 본 출원은 보다 구체적으로 다중-리간드 약물 접합체 (mLDC), 특히 세포내이입을 유도할 수 있는 mLDC, 뿐만 아니라 그의 제약 조성물, 페이로드를 필요로 하는 대상체에게 페이로드를 전달하는데 있어서의 그의 사용 방법, 및 암, 면역 질환, 심혈관 질환, 대사 질환 및 신경계 질환을 비제한적으로 포함한 질환을 치료하는데 있어서의 그의 사용 방법에 관한 것이다.

[0009] 본 출원의 한 측면은 페이로드 및 2종류 이상의 세포-상호작용 분자를 포함하며, 여기서 페이로드는 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개와 접합되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 개시한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 페이로드는 직접적으로 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개와 접합된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 간접적으로 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개와 접합된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 링커를 통해 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개와 접합된다. 일부 실시양태에서, 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개는 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 리간드이다. 일부 실시양태에서, 세포-상호작용 분자 중 적어도 2개는 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 리간드이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 제1 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 리간드 및 제2 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 리간드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 제1 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 리간드 및 제2 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 리간드를 포함하며, 여기서 제1 세포 표면 수용체 및 제2 세포 표면 수용체는 서로 상이하다.

[0012] 일부 실시양태에서, 페이로드는 제1 리간드와 접합되고, 제1 리간드는 제2 리간드와 접합된다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드는 직접적으로 제2 리간드와 접합된다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드는 간접적으로 제2 리간드와 접합된다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드는 스페이서를 통해 제2 리간드와 접합된다.

[0013] 일부 실시양태에서, 페이로드는 임의의 링커 없이 직접적으로 각각의 제1 리간드 및 제2 리간드와 접합된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 제1 링커를 통해 제1 리간드와 접합되고, 페이로드는 제2 링커를 통해 제2 리간드와 접합된다. 일부 실시양태에서, 제1 링커 및 제2 링커는 동일하다. 일부 다른 실시양태에서, 제1 링커 및 제2 링커는 상이하다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 임의의 링커 없이 직접적으로 제1 리간드와 접합되고, 페이로드는 링커를 통해 제2 리간드와 접합된다.

[0014] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 제3 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 제3 리간드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 세포 표면 수용체, 제2 세포 표면 수용체 및 제3 세포 표면 수용체는 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 세포 표면 수용체, 제2 세포 표면 수용체 및 제3 세포 표면 수용체 중 적어도 2개는 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 동일하다.

[0015] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제1, 제2 및 제3 세포 표면 수용체는 독립적으로 트랜스페린 수용체 (TFR), 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR), 폴레이트 수용체 (FR), 요산 키나제 수용체, 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR), 인테그린 수용체 LFA-1, 소마토스타틴 SST-14 수용체, 황체형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 수용체, TRPV6 수용체 및 프로테아제 표면 항원 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 독립적으로 웹티드, 폴레이트 및 그의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0017] 일부 실시양태에서, 리간드는 Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg (서열식별번호: 15, P10이라 명명됨), Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys (서열식별번호: 16, P11이라 명명됨), Ala-Gly-[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys] (서열식별번호: 17, P12라 명명됨), Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys (서열식별번호: 18, P13이라 명명됨), Arg-Gly-Asp (RGD라 명명됨)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 웨티드, 서열식별번호: 15-18 중 임의의 것에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 상동 웨티드를 포함하며, 여기서 상동 웨티드는 각각 서열식별번호: 15-18의 웨티드의 기능적 등가물이다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개는 세포내이입을 매개할 수 있는 세포내이입 분자이다. 일부 실시양태에서, 세포내이입 분자는 또한 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 세포내이입 분자는 폴레이트 및 그의 유사체, 세포내이입을 매개할 수 있는 웨티드 및 세포-침투 웨티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 링커는 웨티드 링커, 디슬피드 링커 또는 pH-의존성 링커이다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 웨티드 링커는 특정 생리학적 환경 하에 프로테아제 절단 또는 환원에 의해 절단가능하다. 일부 실시양태에서, 웨티드 링커는 발린-시트룰린, 페닐알라닌-리신 및 발린-리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 디슬피드 링커는 DMDS, MDS, DSDM 및 NDMDS로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0023] 일부 실시양태에서, pH-의존성 링커는 시스-아코니트산 무수물이다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 적어도 1개의 페이로드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과의 페이로드를 포함한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 페이로드는 소분자 화합물, 뉴클레오티드, 웨티드, 단백질 및 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 소분자 화합물이다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 치료제이다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물은 페이로드, 2종류, 3종류 또는 그 초과의 리간드 및 임의로 링커 또는 스페이서를 포함하는 다중-리간드 접합체 화합물이다. 일부 실시양태에서, 접합체 화합물은 페이로드, 2종류의 리간드 및 임의로 링커 및/또는 스페이서를 포함하는 이중-리간드 접합체 화합물이다. 일부 실시양태에서, 접합체 화합물은 페이로드, 3종류의 리간드 및 임의로 링커 및/또는 스페이서를 포함하는 삼중-리간드 접합체 화합물이다. 일부 실시양태에서, 접합체 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다: 본원에서 도 1에 제시된 바와 같은 LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC12H.
- [0027] 본 출원의 또 다른 측면은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 개시한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내로, 피하로, 경구로, 근육내로, 비경구로 또는 뇌실내로 투여된다.
- [0028] 본 출원의 또 다른 측면은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 본원에 제공된 제약 조성물의 치료 유효량을 페이로드를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에게 페이로드를 전달하는 방법을 개시한다.
- [0029] 본 출원의 또 다른 측면은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 본원에 제공된 제약 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 개시한다. 일부 실시양태에서, 질환은 암, 면역 질환, 심혈관 질환, 대사 질환 및 신경계 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 암은 유방암, 폐암, 전립선암, 신암, 난소암, 위암, 자궁암, 자궁내막 암종, 간암, 갑상선암, 췌장암, 결장암, 결장직장암, 식도암, 피부암, 림프종, 백혈병 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 면역 질환은 자가면역 질환이다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 결합 조직 질환, 전

신 경화증, 류마티스 관절염 및 전신 홍반성 루푸스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 일부 실시양태에서, 심혈관 질환은 협심증, 심근경색, 출중, 심장 발작, 고혈압 심장 질환, 류마티스성 심장 질환, 심근병증, 심장 부정맥 및 선천성 심장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0033] 일부 실시양태에서, 대사 질환은 당뇨병, 통풍, 비만, 저혈당증, 고혈당증 및 이상지혈증으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0034] 일부 실시양태에서, 신경계 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 두부 손상, 다발성 경화증, 혼기증, 혼수 및 간질로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 본원에 제공된 제약 조성물과 조합하여 1종 이상의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 항암 치료 표적을 표적화하거나, 암에 대한 면역 반응을 유도 또는 부스팅하거나, 또는 화학요법 제이다.

### 도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H 및 LDC12H의 구조를 제시한다.

도 2는 LDC10B의 세포내이입 시험 결과를 제시한다. 패널 A 및 B는 폴레이트-FITC가 KB 세포 (폴레이트 수용체 양성 세포)에는 들어가나, A375 세포 (폴레이트 수용체 음성 세포)에는 들어가지 않는다는 것을 제시하고; 패널 C 및 D는 10A-FITC가 KB 세포 또는 A375 세포에 들어갈 수 없다는 것을 제시하며; 패널 E 및 F는 이중-리간드 접합체 10B-FITC가 KB 세포에는 들어가나, A375 세포에는 들어가지 않는다는 것을 제시한다.

도 3은 폴레이트-FITC, 10A-FITC 및 10B-FITC의 구조를 제시한다.

도 4는 종양 부위에 집중된 형광-표지 LDC10B-Cy5를 제시하는 살아있는 마우스 영상화를 제시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 다양한 측면 및 실시양태가 본원에서 개시될 것이지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 본 출원의 대상 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 측면 및 실시양태에 대한 다양한 등가의 변화 및 변형을 이를 수 있다는 것이 명백하다. 본원에 개시된 다양한 측면 및 실시양태는 단지 설명하기 위한 것이며 제한하는 것으로 의도되지 않으며, 진정한 범주는 첨부된 청구범위에 의해 나타내어진다. 본원에 인용된 모든 공개, 특히 또는 특허 출원은 그 전문이 참조로 포함된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술 과학 용어는 본 출원이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0038] 본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 용어 "어느 하나의" (또는 "어느 한"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 또한, 용어 "포함하는", "포함한" 및 "갖는"도 상호교환가능하게 사용될 수 있다는 것이 주목되어야 한다.

[0039] 본 출원의 한 측면은 페이로드 및 2종류 이상의 세포-상호작용 분자를 포함하며, 여기서 페이로드는 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개와 접합되는 것인 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 개시한다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "페이로드"는 표적 세포 또는 조직에 전달될 분자 또는 물질을 지칭한다. 비제한적으로, 페이로드는 대상체에서의 질환의 진단, 치료 또는 예방에 사용하도록 의도된 임의의 제약 화합물일 수 있다.

[0041] 일부 실시양태에서, 페이로드는 소분자 화합물, 뉴클레오티드 (예를 들어, DNA, 플라스미드 DNA, RNA, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 암타미 등), 웨პ티드, 단백질 (예를 들어, 효소) 또는 나노입자이다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 소분자 화합물이다. 일부 실시양태에서, 소분자 화합물은 메이탄신 및 그의 임의의 유도체, 탁신을 및 그의 임의의 유도체, 아우리스타틴 및 그의 임의의 유도체, 에포테린 및 그의 임의의 유도체, 블레오마이신 및 그의 임의의 유도체, 닉티노마이신 및 그의 임의의 유도체, 폴리카마이신 및 그의 임의의 유도체, 및 미로마이신 C로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 아우리스타틴 또는 그의 임의의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 제약 화합물은 암을 완화 또는 치료하기 위해 사용되는 화학요법 제이다.

- [0042] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 1개의 페이로드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 적어도 1개의 페이로드를 포함한다. 예를 들어, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 초과의 페이로드를 포함한다. 다중 페이로드를 함유하는 접합체 분자에서, 각각의 페이로드는 서로 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 페이로드 중 적어도 2개는 서로 상이하다.
- [0043] 본원에 사용된 용어 "세포-상호작용 문자"는 표적 세포 또는 표적 세포의 세포 표면 수용체와 상호작용하여, 이러한 세포-상호작용 문자를 함유하는 접합체 분자의 표적 세포에의 특이적 결합, 접합체 분자의 표적 세포에의 한 세포내이입 및/또는 달리 접합체 분자의 표적 세포와의 특이적 회합 및 유지 유발을 촉발하거나 또는 용이하게 할 수 있는 임의의 문자 또는 모이어티를 지칭한다.
- [0044] 세포-상호작용 문자는 작은 화학 분자 또는 큰 생체분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포-상호작용 문자는 항체, 리간드 또는 세포내이입 문자이다. 일부 실시양태에서, 세포-상호작용 문자 중 적어도 1개는 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 리간드이다. 일부 실시양태에서, 세포-상호작용 문자 중 적어도 1개는 세포내이입을 매개할 수 있는 세포내이입 문자이다.
- [0045] 본원에 개시된 바와 같은 리간드는 선택된 표적, 예를 들어 세포 표면 수용체, 세포, 조직, 기관 등에 대해 특이적 결합 친화도를 가질 수 있는 매우 다양한 화학적 또는 생물학적 개체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 리간드는 표적 세포의 표면 상에 발현된 단백질 또는 마커에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 출원의 리간드는  $10^{-6} \sim 10^{-9}$  (Kd 값)의 친화도로 세포 표면 수용체에 결합한다. 일부 실시양태에서, 리간드는 적어도  $10^{-7}$ , 적어도  $10^{-8}$ , 적어도  $10^{-9}$  M (Kd 값)의 친화도로 세포 표면 수용체에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 출원의 리간드는 다른 비-표적화 세포 표면 단백질 또는 마커에 대해서보다 표적 세포 표면 수용체에 대해 적어도 2, 3, 4배 또는 그 초과의 배수만큼 더 높은 친화도로 세포 표면 수용체에 결합한다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 본 출원의 2종류 이상의 세포-상호작용 문자는 상이한 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 2종류 이상의 리간드이다. 일부 실시양태에서, 본 출원의 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 2개의 리간드를 함유하며, 여기서 제1 리간드는 제1 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고, 제2 리간드는 제2 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체 분자는 2개의 리간드를 함유하며, 여기서 제1 리간드는 폴레이트 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고, 제2 리간드는 황체형 성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체 분자는 3개의 리간드를 함유하며, 여기서 제1 리간드는 폴레이트 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고, 제2 리간드는 LHRH 수용체에 특이적으로 결합할 수 있으며, 제3 리간드는 SST-14 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 초과의 세포-상호작용 문자를 포함한다. 접합체 분자에서, 각각의 세포-상호작용 문자는 서로 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포-상호작용 문자 중 적어도 2개는 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 각각의 세포-상호작용 문자는 서로 상이하다.
- [0048] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 분자는 다중 세포-상호작용 문자와 접합된 단지 단일의 페이로드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 분자는 다중 세포-상호작용 문자와 접합된 다중 페이로드를 포함한다.
- [0049] 본원에 사용된 용어 "접합된"은 2개의 화학적 기의 공유 결합을 통해, 직접적으로 2개의 화학적 기 사이에 공유 결합을 형성하거나, 또는 간접적으로 링커를 통해 2개의 화학적 기를 연결하는 연결을 지칭한다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 페이로드 및 2종류 이상의 세포-상호작용 문자를 포함하며, 여기서 페이로드는 직접적으로 세포-상호작용 문자 중 적어도 1개에 공유 연결된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 직접적으로 각각의 세포-상호작용 문자에 공유 연결된다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 페이로드 및 2종류 이상의 세포-상호작용 문자를 포함하며, 여기서 페이로드는 링커를 통해 세포-상호작용 문자 중 적어도 1개에 공유 연결된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 링커를 통해 각각의 세포-상호작용 문자에 공유 연결된다.
- [0052] 본원에 사용된 용어 "링커"는 페이로드를 세포-상호작용 문자에 공유 연결하는 문자 또는 모이어티를 지칭한다. 링커는 페이로드 및 세포-상호작용 문자 중 적어도 1개에 연결하기 위한 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에

서, 관능기는 2개의 반응성 모이어티를 포함할 수 있으며, 그 중 하나는 페이로드에의 연결을 위한 것이고, 나머지 다른 하나는 세포-상호작용 분자에의 연결을 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 관능기는 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 관능기는 티올-반응 모이어티 및 아민-반응 모이어티를 함유하는 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 서로 동일하다. 일부 실시양태에서, 관능기는 말레이미드 기이다.

[0053] 일부 실시양태에서, 본 출원의 링커는 적어도 1개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 페이로드 및 적어도 2개 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 세포-상호작용 분자를 결합시킬 수 있는 다가 링커이다. 다가 링커에 결합된 페이로드는 동일하거나 또는 상이할 수 있고, 다가 링커에 결합된 세포-상호작용 분자는 동일하거나 또는 상이할 수 있다.

[0054] 한 측면에서, 링커는 표적 세포 또는 조직으로의 페이로드의 유효량을 증가시키고 독성을 방지하기 위해 혈액 순환 동안에는 페이로드의 의도하지 않은 방출을 방지하기에 충분히 안정할 것이다. 또 다른 측면에서, 링커는 표적 세포를 효율적으로 사멸시키거나 또는 표적 세포의 기능을 차단하기 위해 표적 세포 주위에 또는 그 안에 페이로드를 방출할 수 있을 것이다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 1개의 절단가능한 관능기를 포함한다. 바람직하게는, 절단가능한 관능기는 표적 세포 외부에서는 충분히 안정하지만, 표적 세포에 들어가면 절단되어 페이로드를 방출한다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 관능기는 대상체의 혈액 또는 혈청에서보다 표적 세포에서 적어도 10, 20, 30, 50, 100배 또는 그 보다 더 효율적으로 절단된다.

[0055] 절단가능한 링커는 가수분해, 효소적 반응 또는 환원 반응에 의해, 또는 pH 변화에 의해 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 특정 생리학적 환경 하에, 예를 들어 적절한 pH 환경 하에 절단가능하다. 일부 실시양태에서, 링커는 약 6.5 이하의 pH를 갖는 산성 환경에서, 또는 일반적 산으로서 작용할 수 있는 효소와 같은 작용제에 의해 절단가능하다. 일부 실시양태에서, 링커는 절단 작용제, 예를 들어 pH, 산화환원 전위 또는 분해성 분자의 존재에 민감하다.

[0056] 일부 실시양태에서, 링커는 절단불가능하다. 본원에 사용된 바와 같은 절단불가능한 링커는 세포내 대사 동안 무손상으로 남아 있는 링커를 지칭한다.

[0057] 일부 실시양태에서, 링커는 웨티드 결합에 의해 연결된 아미노산의 직쇄 또는 분지쇄로 이루어진 웨티드 링커이다. 일부 실시양태에서, 웨티드 링커는 표적 세포 주위에서 또는 그 안에서 고도로 또는 특이적으로 발현되는 프로테아제, 예를 들어 리소솜 또는 엔도솜 내 카텝신 B에 의해 절단가능하다. 본원에 사용된 바와 같은 웨티드 링커는 다양한 길이를 가질 수 있다. 전형적으로, 본 출원의 웨티드 링커는 1 내지 50개 아미노산의 길이이다. 일부 실시양태에서, 웨티드 링커는 2 내지 45개, 2 내지 40개, 2 내지 35개, 2 내지 30개, 2 내지 25개, 2 내지 20개, 2 내지 15개, 2 내지 10개, 2 내지 9개, 2 내지 8개, 2 내지 7개, 2 내지 6개, 2 내지 5개, 2 내지 4개, 2 내지 3개 아미노산의 길이이다. 본원에 기재된 바와 같은 웨티드 링커의 아미노산 수는 범위의 종점을 포함한, 상기 수치 범위 내의 임의의 정수 값일 수 있다. 일부 실시양태에서, 웨티드 링커는 2, 3, 4 또는 5개 아미노산 길이의 길이를 갖는 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 웨티드 링커는 발린-시트룰린 (Val-Cit), 페닐알라닌-리신, 또는 발린-리신이다.

[0058] 일부 실시양태에서, 링커는 디슬피드 결합을 함유하는 디슬피드 링커이다. 디슬피드 결합은 세포내 환원성 환경 하에 절단될 수 있고, 반면 순환계에서는 안정한 상태를 유지한다. 본 출원의 디슬피드 링커는 DSDM, DMDS, MDS 또는 NDMDS일 수 있다. 이들 디슬피드 링커의 구조는 하기 표 1에 제시되어 있다.

[0059]

표 1: DSDM, DMDS, MDS 및 NDMDS의 구조

[0060]

[0061]

일부 실시양태에서, 링커는 pH-의존성 링커이다. 본원에 기재된 바와 같은 pH-의존성 링커는 특정 pH 환경 하에 절단가능할 수 있다. 일부 실시양태에서, pH-의존성 링커는 알칼리성 조건 하에 안정할 수 있고, 반면 산성 조건, 예를 들어 6.5 이하의 pH 값 하에서는 절단가능하다. 일부 실시양태에서, pH-의존성 링커는 시스-아코니트산 무수물이다.

[0062]

일부 실시양태에서, 본 출원의 링커는 상기 기재된 바와 같은 링커 중 어느 하나 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 출원의 링커는 링커의 부분으로서 스페이서를 함유할 수 있다.

[0063]

일부 실시양태에서, 페이로드는 직접적으로 또는 간접적으로 제1 세포-상호작용 문자와 접합되고, 제1 세포-상호작용 문자는 직접적으로 또는 간접적으로 제2 세포-상호작용 문자와 접합된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 직접적으로 각각의 제1 및 제2 세포-상호작용 문자와 접합된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 간접적으로 각각의 제1 및 제2 세포-상호작용 문자와 접합된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 간접적으로, 예를 들어 링커를 통해 제1 세포-상호작용 문자와 접합되고, 제1 세포-상호작용 문자는 직접적으로 또는 간접적으로 제2 세포-상호작용 문자와 접합된다. 일부 실시양태에서, 페이로드는 제1 링커를 통해 제1 세포-상호작용 문자와 접합되고, 페이로드는 제2 링커를 통해 제2 세포-상호작용 문자와 접합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 1개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 페이로드 및 적어도 2개 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 리간드를 결합시키는 다가 링커이다. 다가 링커는 또한 다중 페이로드 및 다중 세포-상호작용 문자를 포함하는 접합체 문자를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0064]

일부 실시양태에서, 2개의 세포-상호작용 분자는 스페이서를 통해 서로에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 스페이서가 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 세포-상호작용 분자를 연결하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 표적 세포에 의해 특이적으로 발현되거나 또는 표적 세포에 의해 발현되도록 촉발되는 프로테아제에 의해 절단가능하다. 이러한 프로테아제는, 예를 들어, 하기 표 2에 열거된 바와 같은 프로테아제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 하기 표 2에 열거된 바와 같은 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0065]

표 2: 효소적으로 절단가능한 서열의 목록

프로테아제	인식 부위의 아미노산 서열	SEQ ID NO.
카텝신 B	RR	-
레구마인	ASN	-
메트립아제	KSRAEDE	SEQ ID NO: 1
MMP-2	PLGLAG	SEQ ID NO: 2
전립선 특이적 항원	SSLY	SEQ ID NO: 3
스트로멜리신-3	AAA	-
TMPRSS2	LLRSLIG	SEQ ID NO: 4
우로카나제형 플라스미노겐 활성화제	SSR	-
활성화 단백질 C	LVKR	SEQ ID NO: 5
인자 Ixa	LVVR	SEQ ID NO: 6
인자 VIIa	QLTR	SEQ ID NO: 7
인자 Xa	LEGR	SEQ ID NO: 8

[0066]

트롬빈	PR	-
칼파인-a	PLFAEP	SEQ ID NO: 9
칼파인-2	GLGSEP	SEQ ID NO: 10
엔테로펩티다제	DDDDK	SEQ ID NO: 11
MMP-8	GPSG	SEQ ID NO: 12
카텝신 L	PLG	-
전구단백질 컨버타제 5	RSKR	SEQ ID NO: 13
칼파인-3	VGVF	SEQ ID NO: 14

[0067]

[0068]

본원에 사용된 용어 "절단가능한" 또는 "절단된"은 본원에 제공된 접합체 화합물 상에서의 대사 과정 또는 반응 과정으로서, 이에 의해 페이로드와 세포-상호작용 문자 사이의 링커, 또는 세포-상호작용 문자 사이의 스페이서가 파괴되어 유리 페이로드 또는 세포-상호작용 문자를 방출하는 과정을 지칭한다. 링커 및 스페이서는 프로테아제에 의해 절단되거나 또는 특정 생리학적 환경, 예를 들어 pH 환경 하에 절단된다.

[0069]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 3개의 리간드와 접합된 페이로드를 함유하며, 여기서 제1 리간드는 제1 세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고, 제2 리간드는 제2 세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있으며, 제3 리간드는 제3 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0070]

일부 실시양태에서, 제3 리간드는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 스페이서를 통해 제1 리간드와 접합된다. 일부 실시양태에서, 제3 리간드는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 링커를 통해 페이로드와 접합된다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 스페이서를 통해 제2 리간드와 접합되고, 제2 리간드는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 스페이서를 통해 제3 리간드와 접합된다.

[0071]

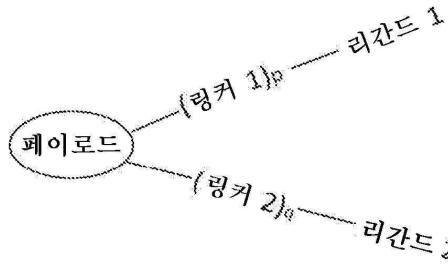
일부 실시양태에서, 제1 세포 표면 수용체, 제2 세포 표면 수용체 및 제3 세포 표면 수용체는 구조 또는 기능에 있어서 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 세포 표면 수용체, 제2 세포 표면 수용체 및 제3 세포 표면 수용체 중 적어도 2개는 구조 또는 기능에 있어서 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 동일하다.

[0072]

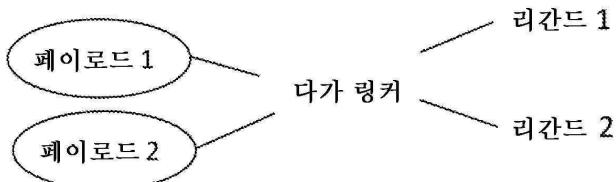
일부 실시양태에서, 접합체 분자는 하기 제시된 화학식 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX 또는 X의 구조를 가지며, 여기서 n, m, p, q, r 및 s는 독립적으로 0 또는 1이고, 이는 링커 및 스페이서가 독립적으로 존재 또는 부재함을 나타낸다.



(화학식 I)

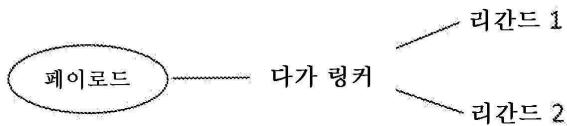


(화학식 II)

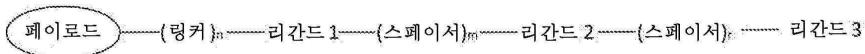


(화학식 III)

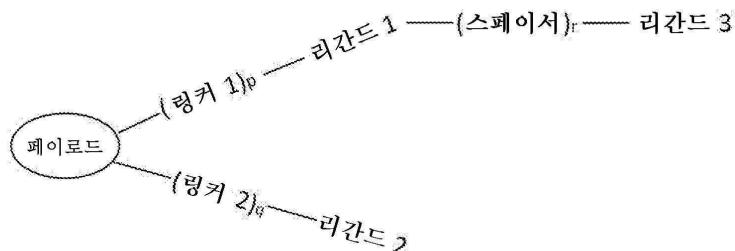
[0073]



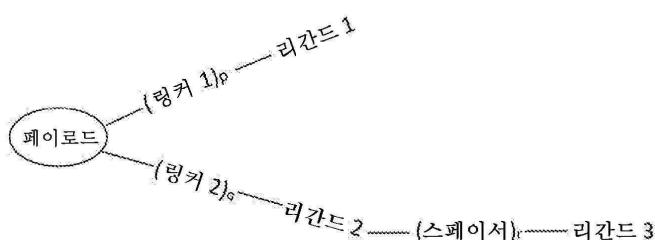
(화학식 IV)



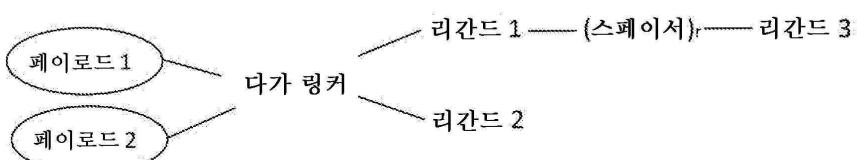
(화학식 V)



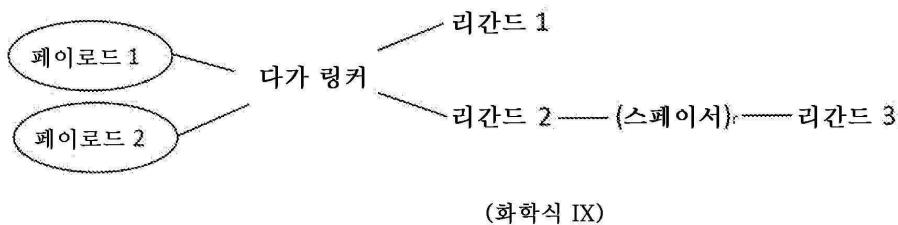
(화학식 VI)



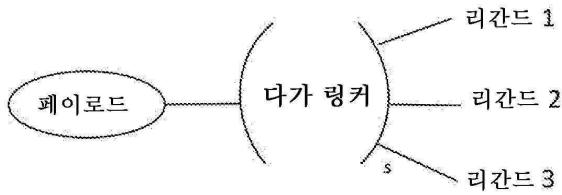
(화학식 VII)



(화학식 VIII)



(화학식 IX)



(화학식 X)

[0075]

바람직한 실시양태에서, 세포 표면 수용체의 발현은 정상 세포에서보다 표적 세포 (예를 들어 암 세포)에서 유의하게 더 높다. 본원에 사용된 용어 "유의하게"는 통계적으로 유의한 차이, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인식될 수 있는 유의한 차이를 지칭한다.

[0077]

일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체의 발현 수준은 정상 세포에서보다 표적 세포 (예를 들어 암 세포)에서 2-1,000,000배 더 높으며, 예를 들어 정상 세포에서보다 표적 세포 (예를 들어 암 세포)에서 2-10, 2-100, 2-1,000, 2-10,000, 2-100,000, 2-1,000,000배 (범위의 종점을 포함한, 상기 수치 범위 내의 임의의 값일 수 있음) 더 높다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체의 발현 수준은 정상 세포에서보다 표적 세포 (예를 들어 암 세포)에서 적어도 10배 더 높거나, 또는 100배 더 높거나, 또는 1,000배 더 높거나, 또는 10,000배 더 높거나, 또는 100,000배 더 높다. 일부 실시양태에서, 정상 세포 표면 수용체의 수준은 표적 세포 (예를 들어 암 세포) 상의 세포 표면 수용체의 수준과 비교 시 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감소된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 표면 수용체는 정상 세포 상에서 검출불가능하다.

[0078]

일부 실시양태에서, 제1, 제2 및 제3 세포 표면 수용체는 독립적으로 트랜스페린 수용체 (TFR), 저밀도 지단백질 수용체 (LDLR), 폴레이트 수용체 (FR), 요산 키나제 수용체, 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR), 인테그린 수용체 LFA-1, SST-14 수용체, LHRH 수용체, TRPV6 수용체 및 프로테아제 표면 항원 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0079]

일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 동일하다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드 중 적어도 2개는 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 동일한 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 상이한 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 2개 이상의 상이한 세포 표면 수용체에 결합할 수 있다.

[0080]

일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 독립적으로 폴레이트 및 그의 유사체, 및 웨티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 독립적으로 폴레이트 또는 그의 유사체이고, 리간드 중 적어도 2개는 서로 상이하다. 일부 실시양태에서, 폴레이트의 유사체는 5-메틸테트라하이드로폴레이트, 5-포르밀테트라하이드로폴레이트, 술파닐아미드, 메토트렉세이트 및 5, 10-메틸렌테트라하이드로폴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0081]

일부 실시양태에서, 제1 리간드, 제2 리간드 및 제3 리간드는 독립적으로 웨티드이다. 일부 실시양태에서, 웨티드는 서열식별번호: 15, 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, RGD, 서열식별번호: 15-18 중 임의의 것에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 상동 웨티드로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상동 웨티드는 각각 서열식별번호: 15-18의 웨티드의 기능적 등가물이다.

- [0082] 본원에 사용된 용어 "에 대한 퍼센트 (%) 상동성"은, 아미노산 서열의 경우에, 최대의 동일한 아미노산 수를 달성하도록 후보 및 참조 서열을 정렬하고, 필요에 따라 캡을 도입한 후의 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성의 백분율을 지칭하고; 뉴클레오티드 서열의 경우에, 최대의 동일한 뉴클레오티드 수를 달성하도록 후보 및 참조 서열을 정렬하고, 필요에 따라 캡을 도입한 후의 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성의 백분율을 지칭한다.
- [0083] 상동성의 백분율은 관련 기술분야에 널리 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열의 비교는 하기 공개적으로 이용가능한 툴에 의해 달성될 수 있다: BLASTp 소프트웨어 (국립 생물 정보 센터 (NCBI)의 웹사이트 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>로부터 이용가능함, 또한 문헌 [Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)] 참조), ClustalW2 (유럽 생물정보학 연구소의 웹사이트: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>로부터 이용가능함, 또한 문헌 [Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)] 참조), 및 Tcoffee (스웨덴 생물정보학 연구소의 웹사이트로부터 이용가능함, 또한 문헌 [Poirot O. et al., Nucleic Acids Res., 31(13): 3503-6 (2003); Notredame C. et al., J. Mol. Biol., 302(1): 205-17 (2000)] 참조). 서열의 정렬이 소프트웨어를 사용하여 수행되는 경우에, 소프트웨어에서 이용가능한 디폴트 파라미터가 사용될 수 있거나, 또는 달리 파라미터는 정렬 목적에 적합하게 사용자 정의될 수 있다. 이들은 모두 관련 기술분야의 통상의 기술자의 지식 범주 내에 있다.
- [0084] 본원에 사용된 용어 "기능적 등가물"은 유도체 펩티드가 유래된 원래 펩티드 서열의 것과 실질적으로 유사한 생물학적 활성을 보유하는 유도체 펩티드를 지칭한다. 기능적 등가물은 천연 유도체일 수 있거나 또는 합성적으로 제조된다. 예시적인 기능적 등가물은 1개 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단 펩티드의 생물학적 활성을 보존된다. 치환시키는 아미노산은 바람직하게는 치환된 아미노산의 것과 유사한 화학-물리적 특성을 갖는다. 바람직한 유사한 화학-물리적 특성은 전하, 벌크성, 소수성, 친수성 등에서의 유사성을 포함한다.
- [0085] 일부 실시양태에서, 기능적 등가물은 아미노산 잔기의 보존적 치환을 포함한다. 아미노산 잔기의 보존적 치환은 유사한 특성을 갖는 아미노산 사이의 치환, 예를 들어 극성 아미노산 사이의 치환 (예컨대 글루타민과 아스파라긴 사이의 치환), 소수성 아미노산 사이의 치환 (예컨대 류신, 이소류신, 메티오닌 및 발린 중에서의 치환), 뿐만 아니라 동일한 전하를 갖는 아미노산 사이의 치환 (예컨대 아르기닌, 리신 및 히스티딘 중에서의 치환, 또는 글루탐산과 아스파르트산 사이의 치환) 등을 지칭한다.
- [0086] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 세포-상호작용 분자 중 적어도 1개는 세포내이입을 매개할 수 있는 세포내이입 분자이다.
- [0087] 본원에 사용된 용어 "세포내이입 분자"는 이러한 분자가 표적 세포와 상호작용한 후에 본원에 개시된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 표적 세포로의 세포내이입, 내재화 또는 흡수를 매개할 수 있는 분자를 지칭한다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 세포내이입 분자는 폴레이트 및 그의 유사체, 세포내이입을 매개할 수 있는 펩티드 및 세포-침투 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0089] 일부 실시양태에서, 세포내이입 분자는 또한 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포내이입 분자는 폴레이트 또는 그의 유사체이다. 일부 실시양태에서, 폴레이트의 유사체는 5-메틸테트라하이드로폴레이트, 5-포르밀테트라하이드로폴레이트, 술파닐아미드, 메토트렉세이트 및 5, 10-메틸렌테트라하이드로폴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0090] 폴레이트는 그의 작은 분자량, 비면역원성 및 우수한 안정성으로 인해 다른 기와 화학 결합을 형성하는데 있어서 유익하다. 폴레이트는 세포 표면 상에 발현된 폴레이트 수용체와 고친화도로 화합되어 폴레이트의 세포 흡수를 매개할 수 있다. 폴레이트 수용체는 대부분의 정상 세포에서 매우 낮은 수준으로 발현되지만, 수많은 암 세포에서는 낮은 폴레이트 조건 하에 급속하게 분열하는 세포의 높은 폴레이트 요구량을 충족시키기 위해 높은 수준으로 발현된다 (문헌 [Kelemen LE, Int J Cancer, 2006; 119: 243-50; Kane MA, et al., J Clin Invest. 1988; 81: 1398-406; Matsue H, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 6006-9; Zhao R, et al., Annu Rev Nutr. 2011; 31: 177-201] 참조). 폴레이트는 세포 표면 상의 폴레이트 수용체에 특이적으로 결합할 수 있으며, 또한 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 표적 세포로의 세포내이입을 매개할 수 있는 세포내이입 분자이다.
- [0091] 일부 실시양태에서, 세포내이입 분자는 세포내이입을 매개할 수 있는 펩티드이다. 일부 실시양태에서, 세포내

이입 분자는 추가로 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내이입을 매개할 수 있는 웨티드는 서열식별번호: 16, 서열식별번호: 17, 서열식별번호: 18, RGD, 서열식별번호: 16-18 중 임의의 것에 대해 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 상동 웨티드로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상동 웨티드는 각각 서열식별번호: 16-18의 웨티드의 기능적 등가물이다.

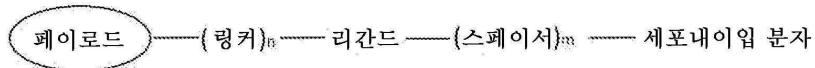
[0092] 일부 실시양태에서, 세포내이입 분자는 세포-침투 웨티드이다. 또한 단백질 전달 도메인 (PTD)이라고도 공지된, 세포-침투 웨티드 (CPP)는 수용체-비의존성 방식으로 세포의 내부에 접근하는 능력을 갖는 짧은 웨티드 (일반적으로 40개 미만의 아미노산)이다. 세포-침투 웨티드는, 폐이로드에 접합 시, 폐이로드의 막횡단 수송을 매개할 수 있으며, 단백질 전달의 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포-침투 웨티드는 종양-지향성 웨티드, 미토콘드리아 침투 웨티드, 활성화 가능한 세포-침투 웨티드 및 항박테리아 웨티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포-침투 웨티드는 서열식별번호: 19 (RRRRRRRR, R9 라 명명됨) 및 서열식별번호: 20 (Tat 웨티드인 GRKKRRQRRPPQ, 즉 전사 단백질의 HIV 전사활성인자의 세포-침투 웨티드)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포내이입을 매개할 수 있는 웨티드는 서열식별번호: 16-20, RGD의 서열과 비교하여 단지 1개의 아미노산 부위에서 아미노산의 보존적 치환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포내이입을 매개할 수 있는 웨티드는 서열식별번호: 16-20의 서열과 비교하여 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 부위에서 아미노산의 보존적 치환을 갖는다.

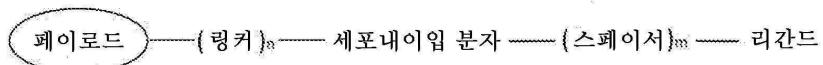
[0094] 본원에 기재된 바와 같은 세포내이입을 매개할 수 있는 웨티드는 또한, 그의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 전제-조건에서, 예를 들어  $\beta$ -플루오로-알라닌, 1-메틸-히스티딘,  $\gamma$ -메틸렌-글루탐산,  $\alpha$ -메틸-류신, 4,5-데히드로-리신, 히드록시프롤린, 3-플루오로-페닐알라닌, 3-아미노-티로신, 4-메틸-트립토판 등을 포함한 비-자연 발생 아미노산을 함유할 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 적어도 1개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 및 그 초과)의 본원에 제공된 바와 같은 폐이로드, 적어도 1개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 및 그 초과)의 본원에 제공된 바와 같은 리간드, 적어도 1개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 및 그 초과)의 본원에 제공된 바와 같은 세포내이입 분자, 및 임의로 본원에 제공된 바와 같은 링커 또는 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 1개의 본원에 제공된 바와 같은 폐이로드, 1개의 본원에 제공된 바와 같은 리간드, 1개의 본원에 제공된 바와 같은 세포내이입 분자, 및 임의로 본원에 제공된 바와 같은 링커 또는 스페이서를 포함한다.

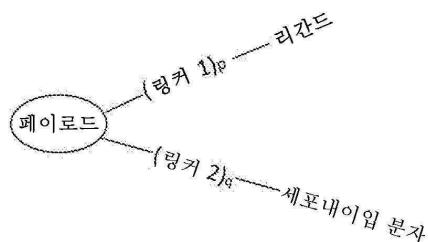
[0096] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물은 하기와 같이 제시된 화학식 XI, XII, XIII, XIV 또는 XV의 구조를 가지며, 여기서 n, m, p, q 및 s는 독립적으로 0 또는 1이고, 이는 링커, 다가 링커 및 스페이서가 독립적으로 존재 또는 부재함을 나타낸다.



(화학식 XI)

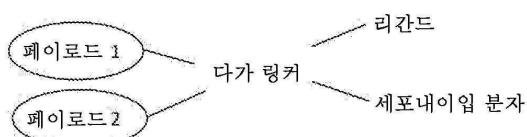


(화학식 XII)



(화학식 XIII)

[0097]



(화학식 XIV)



(화학식 XV)

[0098]

[0099]

일부 실시양태에서, 본 출원의 접합체 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다: LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC12H, LDC13H. LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H 및 LDC12H의 구성요소는 하기 표 3에 제시되어 있다.

[0100]

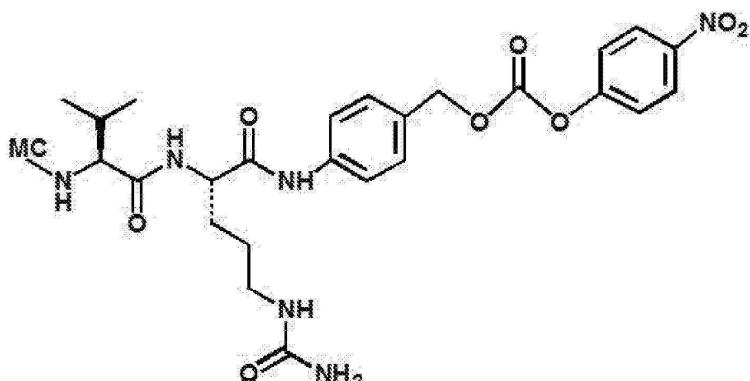
표 3: 접합체 화합물의 구성요소

접합체 화합물의 명칭	세포-상호작용 분자	링커	페이지
LDC10B	폴레이트; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BR	폴레이트; P10; RGD	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BX	폴레이트; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11B	폴레이트; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12B	폴레이트; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13B	폴레이트; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC1013	P10; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10H	R9; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11H	R9; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12H	R9; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13H	R9; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE

[0101]

[0102]

MC-Val-Cit-PAB의 구조는 하기와 같다:



[0103]

[0104]

LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H 및 LDC12H의 구체적 구조는 도 1에 제시되어 있다.

[0105]

일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 페이로드 및 2개의 세포-상호작용 문자를 포함하며, 여기서 그 중 하나는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드이고, 나머지 다른 하나는 세포내이입 문자이고, 그 예로는 LDC10H, LDC10B, LDC1013이 있다. 일부 실시양태에서, 세포내이입 문자는 또한 세포 표면 수용체에 결합할 수 있고, 그 예로는 LDC10B, LDC1013이 있다. 일부 실시양태에서, 세포내이입 문자는 세포-침투 문자이고, 그 예로는 LDC10H가 있다.

[0106]

일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 페이로드 및 2개의 세포-상호작용 분자를 포함하며, 이들은 둘 다 세포내이입 분자이고, 그 예로는 LDC11B, LDC12B, LDC13B가 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 제1 세포내이입 분자 및 제2 세포내이입 분자를 포함하며, 여기서 제1 세포내이입 분자는 제2 세포내이입 분자와 동일하다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 제1 세포내이입 분자 및 제2 세포내이입 분자를 포함하며, 여기서 제1 세포내이입 분자는 제2 세포내이입 분자와 상이하고, 그 예로는 LDC11B, LDC12B, LDC13B가 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 페이로드 및 2개의 세포-상호작용 분자를 포함하며, 이들은 둘 다 또한 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 세포내이입 분자이고, 그 예로는 LDC11B, LDC12B, LDC13B가 있다. 일부 실시양태에서, 제1 세포내이입 분자는 또한 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있고, 제2 세포내이입 분자는 세포 침투 분자이고, 그 예로는 LDC11H, LDC12H, LDC13H가 있다.

[0107]

일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 페이로드 및 2개의 세포-상호작용 분자를 포함하며, 이들은 둘 다 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 제1 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 제1 세포-상호작용 분자 및 제2 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 제2 세포-상호작용 분자를 포함하며, 여기서 제1 세포-상호작용 분자는 제2 세포-상호작용 분자와 동일하다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 제1 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 제1 세포-상호작용 분자 및 제2 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 제2 세포-상호작용 분자를 포함하며, 여기서 제1 세포-상호작용 분자는 제2 세포-상호작용 분자와 상이하고, 그 예로는 LDC10B, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013이 있다.

[0108]

본 출원의 mLDC는 표적 조직 환경 내 표적 세포에 임의의 페이로드를 특이적으로 전달하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, mLDC 내 다중 리간드의 이점은 3가지이다. 첫째로, 다중 리간드는 부작용을 감소시킴과 동시에, 개선된 치료 효과를 유발하면서, 다중 방식으로, 종종 상승작용적으로 작용할 수 있다. 둘째로, 다중-리간드 결합은 mLDC의 표적 수용체 또는 표적 세포에 대한 친화도 및 결합력을 증가시키고, 따라서 그의 특이성을 증진시키며 표적 독성을 방지한다. 마지막으로, 적절하게 설계 시, 다중 리간드의 조합은 종종 약물 접합체를 필요로 하는 다중-기능 요건을 충족시킬 수 있다.

[0109]

본 출원의 mLDC는 하기를 비제한적으로 포함한 예상외의 기술적 효과를 달성한다: (1) 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 리간드 및 세포내이입 분자의 조합은 접합체 화합물이 특이적으로 표적 세포에 들어가도록 한다; (2) mLDC는 고도로 효과적인 화학요법제 예컨대 MMAE를 환자에게 전달하고, 이러한 작용제의 치료 범위를 확장시키며, 부작용을 방지하도록, 약물 화합물의 친화도 및 표적화 특이성을 증진시킨다; (3) 링커는 표적 세포 외부에서의 (예를 들어, 혈액 순환계, 세포간 물질 등) 페이로드의 방출을 방지할 수 있으며, 이는 혈액 순환 동안 접합체 화합물의 안정성을 보장하고, 약물의 독성을 감소시킨다. 표적 세포에 들어간 후, 링커는 절단되어 페이로드를 방출함으로써 약물의 효과를 발휘한다. 한편, 다중 약물 내성 (MDR)을 방지하는 것이 가능하다; (4) 매우 다양한 약물이 본 출원의 접합체 화합물 형태로 전달될 수 있고, 따라서 관련 약물의 적용 범주를 넓힌다. 따라서, 본 출원의 mLDC는 LDC 약물의 표적화 범주 및 치료 범위를 확장시킬 뿐만 아니라, 또한 일부 약물의 독성 및 부작용을 감소시킨다.

[0110]

예를 들어, 이중 리간드가 접합체에 사용될 수 있으며, 여기서 하나의 리간드는 암 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하고, 반면 나머지 다른 리간드는, 암 특이적 프로테아제에 의해 단지 고형 종양 내부에서만 드러나, 세포내이입을 촉발하면서, 접합체가 약물 페이로드를 단지 암 세포에만 특이적으로 전달하게 하고 수용체(들) 중 어느 하나 또는 둘 다를 발현하는 정상 세포에 대한 독성을 방지한다.

[0111]

예를 들어, 2개의 리간드로서 P10 웨პ티드 및 폴레이트를 함유하는 LDC10B는 이중 방식 및 심지어 삼중 방식으로 기능할 수 있다. P10 웨პ티드 자체는 제1상 시험에서 아마도 TRPV6 길항제로서 작용하는 효과적인 암 약물인 것으로 제시된 바 있고, 폴레이트는 세포내이입을 통해 효율적으로 세포독소 페이로드를 전달하여 암 세포를 사멸시키는데 도움이 되는 것으로 제시된 바 있다. 이중-리간드 약물 접합체로서, LDC10B는 잠재적으로 TRPV6 및 폴레이트 수용체를 둘 다 발현하는 암 세포를 사멸시키는데 있어서 하기 3가지 방식으로 상승작용적으로 기능할 수 있다. 첫째로, P10 웨პ티드 부분 자체는 TRPV6 길항제로서 기능한다. 둘째로, P10 웨პ티드는 매우 효율적이지는 않지만, 잠재적으로 내재화를 통해 접합된 세포독소를 전달할 수 있고; 폴레이트는 폴레이트 수용체에 결합하여 세포내이입을 통해 세포독소를 효율적으로 전달할 수 있다. 마지막으로, 이중 리간드로서, P10 웨პ티드 및 폴레이트는 상승작용적으로 이들의 각각의 수용체에 결합하고, 세포독소 페이로드를 이들 수용체를 둘 다 발

현하는 표적 세포 내부에 전달할 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드"는 상호교환가능하게 사용될 수 있으며, 아미노산의 종합체를 지칭한다. 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는 자연-발생 아미노산, 뿐만 아니라 비-자연-발생 아미노산, 또는 아미노산의 유사체 및 모방체를 함유할 수 있다. 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는 관련 기술분야에 널리 공지된 임의의 방법, 예를 들어 비제한적으로 천연 물질로부터의 단리 및 정제, 재조합 발현, 화학적 합성 등에 의해 수득될 수 있다.

[0113] 본 출원의 또 다른 측면은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 개시한다.

[0114] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는"은, 타당한 의학적 판단의 범주 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등이 없이 인간 및 다른 동물의 세포와 접촉 상태로 사용하기에 적합하며, 합리적인 이익/위험 비에 부합하는 것을 의미한다.

[0115] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 염"은 본 출원의 접합체 화합물의 상대적으로 비-독성의, 무기 및 유기 산 부가염 및 염기 부가염을 지칭한다. 대표적인 산 부가염은 히드로브로마이드, 히드로클로라이드, 술페이트, 비술페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 발레레이트, 올레에이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 보레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 시트레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락티오비오네이트, 술파메이트, 말로네이트, 살리실레이트, 프로피오네이트, 메틸렌-비스-b-히드록시나프토에이트, 젠티세이트, 이세티오네이트, 디-p-톨루오일타르트레이트, 메탄-술포네이트, 에탄술포네이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 시클로헥실술파메이트 및 퀴나테스라우릴술포네이트 염 등을 포함한다. 염기 부가염은 제약상 허용되는 금속 및 아민 염을 포함한다. 적합한 금속 염은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 바륨, 아연, 마그네슘 및 알루미늄 염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 나트륨 및 칼륨 염이 바람직하다. 적합한 무기 염기 부가염은, 예를 들어, 수소화나트륨, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘, 수산화알루미늄, 수산화리튬, 수산화마그네슘 및 수산화아연을 포함하는 금속 염기로부터 제조된다. 적합한 아민 염기 부가염은 안정한 염을 형성하기에 충분한 염기도를 가지며, 바람직하게는 그의 낮은 독성 및 의학적 용도를 위한 허용가능성 때문에 의약 화학에 빈번하게 사용되는 하기 아민을 포함하는 아민으로부터 제조된다: 암모니아, 에틸렌디아민, N-메틸-글루카민, 리신, 아르기닌, 오르니틴, 콜린, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 디에탄올아민, 프로카인, N-벤질페네틸아민, 디에틸아민, 피페라진, 트리스(히드록시메틸) -아미노메탄, 테트라메틸암모늄 히드록시드, 트리에틸아민, 디벤질아민, 에페나민, 데히드로아비에틸아민, N-에틸피페리딘, 벤질아민, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 에틸아민, 염기성 아미노산, 예를 들어 리신 및 아르기닌, 및 디시클로헥실아민 등.

[0116] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 담체"는 접합체 화합물의 구조 및 특성을 간접하지 않는, 본원에 제공된 접합체 화합물을 대상체에게 전달하기 위한 제약상 허용되는 용매, 혼탁화제 또는 임의의 다른 약리학적 불활성 비히클을 지칭한다. 특정한 이러한 담체는 접합체 화합물이, 예를 들어, 대상체에 의한 경구 섭취를 위한 정제, 환제, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 혼탁액 및 파스탈로서 제제화되도록 한다. 특정한 이러한 담체는 접합체 화합물이 주사, 주입 또는 국부 투여를 위해 제제화되도록 할 수 있다.

[0117] 본원에 제공된 제약 조성물에 사용하기 위한 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어, 제약상 허용되는 액체, 젤 또는 고체 담체, 수성 비히클 (예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장성 텍스트로스 주사액, 멸균수 주사액, 또는 텍스트로스 및 락테이트화 링거 주사액), 비수성 비히클 (예컨대 식물성 기원의 고정 오일, 목화씨 오일, 옥수수 오일, 참깨 오일 또는 땅콩 오일), 항미생물제, 등장화제 (예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스), 완충제 (예컨대 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 항산화제 (예컨대 중황산나트륨), 마취제 (예컨대 프로카인 히드로클로라이드), 혼탁화제/분산화제 (예컨대 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 또는 폴리비닐피롤리돈), 킬레이트화제 (예컨대 EDTA (에틸렌디아민 테트라아세트산) 또는 EGTA (에틸렌 글리콜 테트라아세트산)), 유화제 (예컨대 폴리소르베이트 80 (트윈-80)), 희석제, 아주반트, 부형제 또는 비-독성 보조 물질, 관련 기술분야에 공지된 다른 성분, 또는 그의 다양한 조합을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 적합한 성분은, 예를 들어, 충전제, 결합제, 완충제, 보존제, 윤활제, 향미제, 증점제, 착색제 또는 유화제를 포함할 수 있다.

[0118] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 주사 제제이다. 주사 제제는 멸균수 용액 또는 분산액, 혼탁액 또는 에멀션을 포함한다. 모든 경우에, 주사 제제는 멸균성이어야 하며, 용이한 주사를 위한 유체일 것이다. 이는 제조

및 저장 조건 하에 안정해야 하며, 미생물 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 주사 제제는 적절한 유동성을 유지하여야 한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 코팅 예컨대 레시틴의 사용, 계면활성제의 사용 등에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 폐놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다.

[0119] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 경구 제제이다. 경구 제제는 캡슐, 카쉐, 환제, 정제, 로젠지 (향미 베이스, 통상적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트를 사용함), 분말, 과립을 포함하거나, 또는 수성 또는 비-수성 액체 중의 용액 또는 혼탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 액체에 멀젼으로서, 또는 엘리시르 또는 시럽으로서, 또는 파스틸 (불활성 베이스, 예컨대 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로스 및 아카시아를 사용함)로서 및/또는 구강 세정제 등으로서 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0120] 경구 투여를 위한 고체 투여 형태 (예를 들어, 캡슐, 정제, 환제, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 접합체 화합물은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 예컨대 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 하기 중 임의의 것과 혼합된다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산; (2) 결합제, 예컨대 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 함습제, 예컨대 글리세롤; (4) 봉해제, 예컨대 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨; (5) 용해 지연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 4급 암모늄 화합물; (7) 습윤제, 예컨대 아세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및 그의 혼합물; 및 (10) 착색제.

[0121] 경구 투여를 위한 액체 투여 형태에서, 접합체 화합물은 하기 중 임의의 것과 혼합된다: 제약상 허용되는 액체, 마이크로에멀젼, 용액, 혼탁액, 시럽 및 엘리시르. 접합체 화합물 이외에도, 액체 투여 형태는 관련 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예컨대 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 올리브, 피마자 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 그의 혼합물을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에도, 경구 조성물은 또한 아주반트 예컨대 습윤제, 유화제 및 혼탁화제, 감미제, 향미제, 착색제, 퍼퓸제 및 보존제를 포함할 수 있다.

[0122] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 구강 스프레이 제제 또는 비강 스프레이 제제이다. 스프레이 제제는 수성 에어로졸, 비수성 혼탁액, 리피도솜 제제 또는 고체 과립 제제 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 수성 에어로졸은 작용제의 수성 용액 또는 혼탁액 및 통상적인 제약상 허용되는 담체 및 안정화제를 혼합함으로써 제조된다. 담체 및 안정화제는 특정한 화합물의 요건에 따라 변화하지만, 일반적으로 이들은 비이온성 계면활성제 (트윈 또는 폴리에틸렌 글리콜), 올레산, 레시틴, 아미노산 예컨대 글리신, 완충제 용액, 염, 당 또는 당 알콜을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장성 용액에 의해 제조되며, 분무기에 의해 전달될 수 있다.

[0123] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 1종 이상의 다른 약물과 혼합하여 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 1종의 다른 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다른 약물은 항신생물 약물, 심혈관 약물, 항염증 약물, 항바이러스 약물, 소화기계 약물, 신경계 약물, 호흡기계 약물, 면역계 약물, 피부과 약물, 대사 약물 등이다.

[0124] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 경구, 주사 (예컨대 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 심장내, 척수강내, 흉막내, 복강내 주사 등), 점막 (예컨대 비강, 구강내 투여 등), 설하, 직장, 경피, 안내, 및 폐 투여를 비제한적으로 포함한, 적절한 경로에 의해 그를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물 조성물은 정맥내로, 피하로, 경구로, 근육내로 또는 뇌실내로 투여될 수 있다.

[0125] 일부 페이로드의 특성, 예를 들어 높은 독성, 높은 친수성으로 인해, 페이로드를 보다 특이적으로 및 보다 효율적으로 그를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 암 치료에서, 화학요법제를, 정상 세포에 대한 독성 없이, 특이적으로 암 세포에 전달하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 출원의 또 다른 측면은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 본원에 제공된 제약 조성물의 치료 유효량을 페이로드를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에게 페이로드를 전달하는 방법을 개시한다. 본원에 기재된 페이로드는 질환을 예방, 억제, 호전 또는 치료하는데 있어서 연구원, 수의사, 의사 또

는 다른 임상의에 의해 추구되고 있는 조직, 계, 동물, 개체 또는 인간에서의 생물학적 또는 의약적 반응을 도출하는 임의의 제약 작용제일 수 있다.

[0126] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 지칭한다. 비-인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물을 포함한다. 대상체는 또한 축산 동물 예컨대, 소, 돼지, 양, 가금류 및 말, 또는 가축 예컨대 개 및 고양이일 수 있다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있으며, 노인일 수 있으며, 성인, 청소년, 소아 또는 유아일 수 있다. 인간 대상체는 백인, 아프리카인, 아시아인, 셈족, 또는 다른 인종 배경, 또는 이러한 인종 배경의 혼혈일 수 있다.

[0127] 본원에 사용된 용어 "치료 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애의 1종 이상의 증상을 어느 정도까지 완화하고/거나; 질환 또는 장애와 연관되거나 또는 그의 원인이 되는 1개 이상의 생리학적 또는 생화학적 파라미터를 부분적으로 또는 완전히 정상으로 회복시키고/거나; 질환 또는 장애의 개시 가능성을 감소시키는 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 제약 조성물의 양을 지칭한다. 이러한 양은 일반적으로 결정하고 설명하기 위해 본원에 제공된 기재를 고려하여 충분히 통상의 기술자의 이해 범위 내에서 수많은 인자에 따라 달라진다. 이들은 비제한적으로: 특정한 대상체, 뿐만 아니라 그의 연령, 체중, 신장, 일반적인 신체 조건, 및 병력, 사용되는 특정한 화합물, 뿐만 아니라 상기 화합물이 제제화된 담체 및 그를 위해 선택된 투여 경로; 및 치료되는 병태의 성질 및 중증도를 포함한다.

[0128] 일부 실시양태에서, 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 제약 조성물의 양은 대상체에서 질환 또는 장애를 억제하거나, 또는 질환 또는 장애의 개시를 예방적으로 억제하거나 또는 예방하기에 충분하다. 치료 유효량이 상이한 대상체에서 달라질 수 있지만, 이는 일반적으로 0.01 내지 100 mg/kg, 예를 들어 0.01 내지 90 mg/kg, 0.01 내지 80 mg/kg, 0.01 내지 70 mg/kg, 0.01 내지 60 mg/kg, 0.01 내지 50 mg/kg, 0.01 내지 40 mg/kg, 0.01 내지 30 mg/kg, 0.01 내지 20 mg/kg, 0.01 내지 10 mg/kg, 0.01 내지 5 mg/kg, 0.01 내지 4 mg/kg, 0.01 내지 3 mg/kg, 0.01 내지 2 mg/kg, 0.01 내지 1 mg/kg, 0.01 내지 0.1 mg/kg의 범위이다. 본원에 기재된 바와 같은 치료 유효량은 범위의 종점을 포함한, 상기 수치 범위 내의 임의의 값일 수 있다.

[0129] 본 출원의 또 다른 측면은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 본원에 제공된 제약 조성물의 치료 유효량을 페이로드를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에게 페이로드를 전달하는 방법을 개시한다.

[0130] 본 출원의 또 다른 측면은 본원에 제공된 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 본원에 제공된 제약 조성물의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 개시한다.

[0131] 일부 실시양태에서, 질환은 유방암, 폐암, 전립선암, 신암, 난소암, 위암, 자궁암, 자궁내막 암종, 간암, 갑상선암, 퀘장암, 결장암, 결장직장암, 식도암, 피부암, 림프종, 백혈병 및 다발성 골수종을 비제한적으로 포함한 암이다.

[0132] 일부 실시양태에서, 질환은 면역 질환, 예를 들어 결합 조직 질환, 전신 경화증, 류마티스 관절염 및 전신 홍반성 루푸스를 비제한적으로 포함한 자가면역 질환이다.

[0133] 일부 실시양태에서, 질환은 협심증, 심근경색, 출중, 협심증, 심근경색, 출중을 비제한적으로 포함한 고혈압 심장 질환, 심장 발작, 고혈압 심장 질환, 류마티스성 심장 질환, 심근병증, 심장 부정맥 및 선천성 심장 질환을 비제한적으로 포함한 심혈관 질환이다.

[0134] 일부 실시양태에서, 질환은 당뇨병, 통풍, 비만, 저혈당증, 고혈당증 및 이상지혈증을 비제한적으로 포함한 대사 질환이다.

[0135] 일부 실시양태에서, 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 두부 손상, 다발성 경화증, 혈기증, 혼수 및 간질을 비제한적으로 포함한 신경계 질환이다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 접합체 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 제약 조성물과 조합하여 1종 이상의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 항암 치료 표적을 표적화하거나, 암에 대한 면역 반응을 유도 또는 부스팅하거나, 또는 화학요법제이다.

[0137] 본 출원은 구체적 실시예로서 더욱 상세히 기재될 것이다. 하기 실시예는 단지 설명하기 위한 목적으로 제공되며, 어떠한 방식으로도 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 본질적으로 동일한 결과를 산출하도록 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 비임계적 파라미터를 용이하게 인식할 것이

다.

[0138] 실시예

[0139] 하기 실시예는 본 출원을 추가로 설명하는 것으로 의도된다. 본 출원의 이점 및 특색은 기재로 명백해질 것이다. 그러나, 이들 설명은 단지 예시적이며, 본 출원의 범주에 대한 제한으로서 구성되어서는 안된다.

[0140] 실시예 I: 접합체 분자의 제조

[0141] 단계 I: 폴레이트-NHS의 합성

[0142] 폴레이트 (44.1 g, 100 mmol)를 DMSO (2 L) 중에 용해시킨 다음, N, N'-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC) (24.8 g, 120 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS) (23 g, 200 mmol)와 혼합하였다. 혼합물을 표준 온도의 암실에서 18시간 동안 교반하였다. 용해되지 않은 물질을 여과하고, 진공 하에 건조시켜 콜로이드성 고체를 수득하였다. 콜로이드성 고체를 열음 에테르로 3회 세척하고, 건조시켜 황색 분말 (53.8 g)을 수득하였고, 이를 추가 정제 없이 후속 반응에 사용할 수 있었다.

[0143] 단계 II: P10 보호된 웨티드 수지의 합성

[0144] 왕 수지 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 구입, 100 g, 치환도: 1.1 mmol/g)를 측정하여 고체 상 반응 칼럼에 첨가하고, 이어서 DMF를 첨가한 다음, 30분 동안 질소 기체 베블링으로 팽윤시켰다. 개별 삼각 플라스크에서, Fmoc-Arg (pbf)-OH (142.7 g, 220 mmol), HOt (35.6 g, 264 mmol) 및 DMAP (2.7 g, 22 mmol)를 측정하여 DMF 중에 용해시키고, 빙수조로 0°C로 냉각시켰다. 이어서, DIC (40.8 ml, 264 mmol)를 첨가하고, 5분 동안 반응하도록 하였다. 용액을 반응 칼럼에 첨가하고, 3시간 동안 반응시킨 다음, 진공으로 건조시키고, DMF로 3회 세척하였다.

[0145] 아세트산 무수물 (104 ml) 및 페리딘 (88.5 ml)을 DMF (500 ml) 중에 용해시키고, 혼합물을 상기 세척된 수지에 첨가하고, 밀봉하고, 실온에서 5시간 동안 정지해 두고, DMF로 3회 세척하고, 메탄올로 수축시킨 다음, 수지를 건조시켜 Fmoc-Arg (pbf)-왕 수지를 수득하였다. 치환도는 0.53 mmol/g인 것으로 결정되었다.

[0146] 37.7 g (20 mmol)의 Fmoc-Arg (pbf)-왕 수지 (치환도: 0.53 mmol/g)를 측정하여 반응 칼럼에 첨가하고, DMF로 3회 세척하고, 30분 동안 DMF로 팽윤시켰다. Fmoc 보호기를 DBLK에 의해 제거한 다음, DMF로 6회 세척하였다. Fmoc-Pro-OH (20.2 g, 60 mmol) 및 HOt (9.7 g, 72 mmol)를 측정하여 DMF 중에 용해시키고, 빙수조로 0°C로 냉각시켰다. 이어서, DIC (11.1 ml, 72 mmol)를 첨가하고, 5분 동안 반응하도록 하였다. 용액을 반응 칼럼에 첨가하고, 2시간 동안 반응시킨 다음, DBLK를 첨가하여 Fmoc 보호기를 제거하였다.

[0147] 상기 절차를 웨티드 서열에서 C-말단에서부터 N-말단으로 각각의 아미노산의 첨가를 위해 반복하였다. Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH 및 Fmoc-Cys(Trt)-OH를 웨티드 서열에 따라 하나씩 접합시킨 다음, DBLK를 첨가하여 Fmoc 보호기를 제거하였다. 용액을 DMF로 6회 세척하고, 메탄올로 2회 수축시키고, 건조시켜 P10 보호된 웨티드 수지 (85.8 g)를 수득하였다.

[0148] 단계 III: 중간체 폴레이트-P10 (폴레이트-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)의 합성

[0149] 폴레이트-NHS (32.3 g, 60 mmol)를 측정하여 DMSO 중에 용해시키고, 단계 II에서 수득된 P10 보호된 웨티드 수지 (85.8 g)를 첨가하고, 5분 동안 반응시키고, DIEA (21 ml, 120 mmol)를 적가하고, 반응을 실온에서 4시간 동안 계속시켰다. 반응 생성물을 DMF로 3회 세척하고, 메탄올로 수축시키고, 진공 하에 건조시켜 완전 보호된 웨티드 수지 (320.3 g)를 수득하였다.

[0150] 상기에서 수득된 보호된 웨티드 수지 (80 g)를 1000 ml 1구 플라스크에 첨가하고, 절단 용액 (640 ml, TFA : 티오아니솔 : EDT : 아니솔 = 90 : 5 : 3 : 2 (부피 비))을 사전 제조하여 플라스크에 첨가하고, 실온에서 2.5시간 동안 반응시켰다. 수지를 여과하고, TFA (100 ml)로 세척하고, 여과물을 합하여 무수 에테르 (4500 ml)에 첨가하여 황색 고체를 분리하였다. 고체를 원심분리하고, 무수 에테르로 세척하고, 진공 하에 건조시켜 황색 고체 (40.6 g)를 수득하였다. 조 웨티드 수율은 97.1%이고, HPLC 순도는 76.3%였다. 수득된 황색 고체를 HPLC에 의해 정제하고, 동결-건조시켜 폴레이트-P10 (28.25 g, 순도: 98.6%)을 수득하였다.

[0151] 단계 IV: 중간체 R9-P10 (Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)의 합성

- [0152] 단계 II에서 수득된 P10 보호된 웨티드 수지의 일부를 측정하여, R9의 웨티드 서열에 따라 접합시켜 중간체 R9-P10을 수득하였다.
- [0153] 단계 V: 중간체 Mc-Val-Cit-PAB-MMAE의 합성
- [0154] MMAE (7.18 g, 10 mmol)를 측정하여 250 ml 3구 플라스크에 첨가하고, 무수 DMF 중에 용해시키고, N<sub>2</sub> 보호 하에 실온에서 투명해질 때까지 교반하였다. Mc-Val-Cit-PAB-PNP (7.37 g) 및 HOAt (72 mg, 2 mmol)를 용액에 첨가하고, 5분 동안 반응시킨 다음, DIEA (3.5 ml, 20 mmol)를 적가하고, 반응을 실온에서 30분 동안 계속시킨 다음, 온도를 40~50°C로 증가시키고, 20시간 동안 반응시켰으며, 그 동안에 HPLC를 사용하여 반응을 모니터링하였다. DMF를 진공 하에 건조시켜 제거하고, 생성물 Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (10.7 g, 순도: 99.3%)를 추가의 HPLC 정제에 의해 수득하였다.
- [0155] 단계 VI: 접합체 LDC10B 및 LDC10H의 합성
- [0156] 단계 V에서 수득된 Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (6.59 g, 5 mmol)를 측정하여 5000 ml 1구 플라스크에 첨가하고, 3300 ml의 포스페이트 완충제를 첨가하고, pH=7.2 하에 투명해질 때까지 교반하였다. 중간체 폴레이트-P10 또는 R9-P10 (10.5 g, 5.02 mmol)을 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 반응시켰으며, 그 동안에 HPLC를 사용하여 반응을 모니터링하였다. 반응이 완료된 후, 용액을 여과하고, LDC10B (14.53 g, 순도: 99.2%, 수율: 85.02%) 및 LDC10H (12.37 g, 순도: 98.7%, 수율: 81.34%)를 HPLC 및 동결-건조에 의해 수득하였다.
- [0157] 접합체 LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC11H 및 LDC12H를 유사한 절차에 의해 수득할 수 있었다.
- [0158] 단계 VII: 폴레이트-FITC (FITC-ACP-Lys (폴레이트)-OH)의 합성
- [0159] 왕 수지 (1 g, 치환도: 1.1 mmol/g)를 측정하여 고체 상 반응 칼럼에 첨가하고, 이어서 DMF를 첨가한 다음, 30분 동안 질소 기체 버블링으로 팽윤시켰다. 개별 삼각 플라스크에서, 2 당량 몰 (eq.)의 Fmoc-Lys(Dde)-OH 및 2.4 eq.의 HOBT 및 0.2 eq.의 DMAP를 측정하여 DMF 중에 용해시키고, 빙수조로 0°C로 냉각시켰다. 이어서, 2.4 eq.의 DIC를 첨가하고, 5분 동안 반응하도록 하였다. 용액을 반응 칼럼에 첨가하고, 3시간 동안 반응시킨 다음, 진공으로 건조시키고, DMF로 3회 세척하였다.
- [0160] 10 eq.의 아세트산 무수물 및 피리딘을 각각 DMF (10 ml) 중에 용해시키고, 혼합물을 상기 세척된 수지에 첨가하고, 밀봉하고, 실온에서 5시간 동안 정치해 두고, DMF로 3회 세척하고, 메탄올로 수축시킨 다음, 수지를 건조시켜 Fmoc-LYS(Dde)-왕 수지를 수득하였다. 치환도는 0.51 mmol/g인 것으로 결정되었다.
- [0161] 1.3 g의 Fmoc-LYS(Dde)-왕 수지 (치환도: 0.51 mmol/g)를 측정하여 반응 칼럼에 첨가하고, DMF로 3회 세척하고, 30분 동안 DMF로 팽윤시켰다. Fmoc 보호기를 DBLK에 의해 제거하고, 이어서 DMF로 6회 세척하였다. 2 eq.의 Fmoc-6-ACP-OH 및 2.4 eq.의 HOBT를 측정하여 DMF 중에 용해시키고, 빙수조로 0°C로 냉각시켰다. 이어서, 2.4 eq.의 DIC를 첨가하고, 5분 동안 반응하도록 하였다. 용액을 반응 칼럼에 첨가하고, 2시간 동안 반응시킨 다음, DBLK를 첨가하여 Fmoc 보호기를 제거하였다.
- [0162] DMF 중 1.5 eq. FITC를 수지에 첨가한 다음, 3 eq.의 DIEA를 적가하였다. 반응을 2시간 동안 진행시키고, 수지를 DMF로 3회 세척하였다.
- [0163] DMF 중 2% 히드라진 수화물을 상기 수지에 첨가하고, 15분 동안 반응하도록 하였다. 2회 반복한 다음, DMF로 6회 세척하였다.
- [0164] 폴레이트-NHS (2 eq.)를 측정하여 DMSO 중에 용해시키고, 수지에 첨가하고, 5분 동안 반응시키고, DIEA (21 ml, 120 mmol)를 적가하고, 반응을 실온에서 4시간 동안 계속시켰다. 반응 생성물을 DMSO 및 DMF로 각각 3회 세척하고, 메탄올로 수축시키고, 진공 하에 건조시켜 완전 보호된 웨티드 수지를 수득하였다.
- [0165] 탈보호 및 수지로부터의 절단 후에, 조 폴레이트-FITC를 HPLC에 의해 정제하여 95% 순도를 갖는 황색 고체 형태로 생성물을 수득하였다. 폴레이트-FITC의 구조는 도 3에 제시되어 있다.
- [0166] 단계 VIII: 10A-FITC의 합성
- [0167] 단계 II로부터의 P10 보호된 웨티드 수지 0.1 mmol (0.43 g)을 측정하여 고체 상 반응 칼럼에 첨가하고, 이어서 DMF를 첨가한 다음, 30분 동안 질소 기체 버블링으로 팽윤시켰다. 2 eq.의 Fmoc-e-ACP-OH 및 이어서 2 eq.의 DBLK를 첨가하여 Fmoc 보호기를 제거하였다. 용액을 DMF로 6회 세척하였다.

- [0168] DMF 중 1.5 eq.의 FITC를 수지에 첨가한 다음, 3 eq.의 DIEA를 적가하였다. 반응을 2시간 동안 진행시키고, 수지를 DMF로 3회 세척하였다.
- [0169] 탈보호 및 수지로부터의 절단 후에, 조 10A-FITC를 HPLC에 의해 정제하여 95% 순도의 황색 고체 형태 생성물을 수득하였다. 10A-FITC의 구조는 도 3에 제시되어 있다.
- [0170] 단계 IX: 10B-FITC의 합성
- [0171] 단계 II로부터의 P10 보호된 펩티드 수지 0.1 mmol (0.43 g)을 측정하여 고체 상 반응 칼럼에 첨가하고, 이어서 DMF를 첨가한 다음, 30분 동안 질소 기체 버블링으로 팽윤시켰다. 2 eq.의 Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-e-ACP-OH, 및 이어서 2 eq.의 DBLK를 첨가하여 Fmoc 보호기를 제거하였다. 용액을 DMF로 6회 세척하였다.
- [0172] DMF 중 1.5 eq.의 FITC를 수지에 첨가한 다음, 3 eq.의 DIEA를 적가하였다. 반응을 2시간 동안 진행시키고, 수지를 DMF로 3회 세척하였다.
- [0173] DMF 중 2% 히드라진 수화물을 상기 수지에 첨가하고, 15분 동안 반응하도록 하였다. 2회 반복한 다음, DMF로 6회 세척하였다.
- [0174] 폴레이트-NHS (2 eq.)를 측정하여 DMSO 중에 용해시키고, 수지에 첨가하고, 5분 동안 반응시키고, DIEA (21 ml, 120 mmol)를 적가하고, 반응을 실온에서 4시간 동안 계속시켰다. 반응 생성물을 DMSO 및 DMF로 각각 3회 세척하고, 메탄올로 수축시키고, 진공 하에 건조시켜 완전 보호된 펩티드 수지를 수득하였다.
- [0175] 탈보호 및 수지로부터의 절단 후에, 조 10B-FITC를 HPLC에 의해 정제하여 95% 순도의 황색 고체 형태 생성물을 수득하였다. 10B-FITC의 구조는 도 3에 제시되어 있다.
- [0176] 단계 X: LDC10B-CY5의 합성
- [0177] 단계 II로부터의 P10 보호된 펩티드 수지 0.1 mmol (0.43 g)을 측정하여 고체 상 반응 칼럼에 첨가하고, 이어서 DMF를 첨가한 다음, 30분 동안 질소 기체 버블링으로 팽윤시켰다. 2 eq.의 Fmoc-Lys(Dde)-OH 및 이어서 2 eq.의 DBLK를 첨가하여 Fmoc 보호기를 제거하였다. 용액을 DMF로 6회 세척하였다.
- [0178] DMF 중 100 mg의 형광 염료 Cy5, 1.5 eq HATU 및 1.5 eq의 HOBT를 수지에 첨가한 다음, 3 eq.의 DIEA를 적가하였다. 반응을 2시간 동안 진행시키고, 수지를 DMF로 3회 세척하였다.
- [0179] DMF 중 2% 히드라진 수화물을 상기 수지에 첨가하고, 15분 동안 반응하도록 하였다. 2회 반복한 다음, DMF로 6회 세척하였다.
- [0180] 폴레이트-NHS (2 eq.)를 측정하여 DMSO 중에 용해시키고, 수지에 첨가하고, 5분 동안 반응시키고, DIEA (21 ml, 120 mmol)를 적가하고, 반응을 실온에서 4시간 동안 계속시켰다. 반응 생성물을 DMSO 및 DMF로 각각 3회 세척하고, 메탄올로 수축시키고, 진공 하에 건조시켜 완전 보호된 펩티드 수지를 수득하였다.
- [0181] 탈보호 및 수지로부터의 절단 후에, 조 LDC10B-CY5를 HPLC에 의해 정제하여 95% 순도의 황색 고체 형태 생성물을 수득하였다. LDC10B-CY5는 LDC10B의 형광 프로브 CY5 표지된 버전이며, 여기서 이중-리간드 모이어티는 리신 스페이서를 통해 CY5 염료에 접합되었다.
- [0182] 실시예 II: 접합체의 효능 검정
- [0183] 관련된 접합체는 하기와 같다: LDC10B, LDC10BX, LDC10BR, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC103, LDC10H, LDC11H, LDC13H, LDC1, LDC10A, LDC11A 및 LDC13A. LDC1, LDC10A, LDC11A 및 LDC13A는 일부 실험에서 대조군으로서 사용되었으며, 이들의 구조는 하기와 같다.
- [0184] LDC1: 폴레이트-(PEG)<sub>3</sub>-MC-Val-Cit-PAB-MMAE
- [0185] LDC10A: P10-MC-Val-Cit-PAB-MMAE
- [0186] LDC11A: P11-MC-Val-Cit-PAB-MMAE
- [0187] LDC13A: P13-MC-Val-Cit-PAB-MMAE
- [0188] 1. 접합체 LDC10B의 세포내이입 시험
- [0189] 관련된 접합체는 하기와 같다: 폴레이트-FITC (FITC-ACP-Lys (폴레이트)-OH), 10B-FITC 및 10A-FITC.

- [0190] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 폴산 무함유
- [0191] 실험 방법:
- [0192] 1) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375, 인간 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.
- [0193] 2) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375, 인간 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954를 웰당 1x10<sup>3</sup>개 세포로 플레이팅하고 (96-웰 플레이트), 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0194] 3) 1 μM의 FITC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 세포에 첨가하고, 37°C에서 10-15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 웰 내의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 세포를 PBS로 3회 세척하였다.
- [0195] 4) 이어서, 세포를 공초점 현미경 (브랜드)으로 영상화하여 세포내이입을 가시화하였다.
- [0196] 결과 및 분석:
- [0197] 플레이트 리간드의 첨가가 폴레이트 수용체 매개된 세포내이입을 이중-리간드 LDC10B에 부여할 수 있음을 제시하기 위해, KB (플레이트 수용체 양성 세포) 및 A375 (플레이트 수용체 음성 세포)를 10A-FITC, 폴레이트-FITC 및 10B-FITC를 사용하여 시험하였다. 도 2에 제시된 바와 같이, 폴레이트-FITC는 폴레이트 수용체 매개된 세포내이입을 통해 KB (플레이트 수용체 양성 세포)에는 들어갔지만, A375 (플레이트 수용체 음성 세포)에는 들어가지 않았고 (폐널 A 및 B), 반면 10A-FITC는 세포내이입의 결여로 인해 어느 세포에도 들어갈 수 없었다 (폐널 C 및 D). 그러나, 10A-FITC를 이중-리간드 접합체, 즉 10B-FITC로 전환시키는 폴레이트 리간드의 첨가는 폴레이트 수용체 매개된 세포내이입을 통해 KB에는 들어가지만 (폐널 E), A375에는 들어가지 않는 (폐널 F) 능력을 접합체에 부여하였다. 게다가, 50 mM (접합체의 50배 과량) 유리 폴레이트와 함께 KB 세포를 예비-인큐베이션하면 폴레이트-FITC 및 10B-FITC 둘 다의 세포내이입이 완전히 차단되었고 (데이터는 제시되지 않음), 이는 세포내이입이 실제로 폴레이트 수용체에 의해 매개되었음을 확인해 준다.
- [0198] 2. 접합체 LDC10B의 세포독성 시험
- [0199] 시험 샘플: LDC10B
- [0200] 대조군 샘플: MMAE, LDC1, LDC10A
- [0201] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 폴산 무함유
- [0202] 실험 방법:
- [0203] 1) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375, 인간 폐암 세포 H1299, 만성 골수성 백혈병 세포주 K562, 인간 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954, 인간 위암 세포 N87 및 인간 유방암 세포 SK-BR-3을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.
- [0204] 2) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375, 인간 폐암 세포 H1299, 만성 골수성 백혈병 세포주 K562, 인간 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954, 인간 위암 세포 N87 및 인간 유방암 세포 SK-BR-3을 웰당 1x10<sup>3</sup>개 세포로 플레이팅하고 (96-웰 플레이트), 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0205] 3) PBS 용액 중 LDC 접합체 또는 대조군의 원액을 제조하였다. 100 μL/웰의 연속적으로 희석된 LDC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 시험 세포에 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15-30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 내의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 시험 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2-3일 동안 접합체를 함유하지 않는 새로운 배양 배지 (150 μL/웰) 내에서 인큐베이션하였다.
- [0206] 4) 셀타이터 96® 아큐어스 원 솔루션 세포 증식 검정 (프로메가(Promega))을 각 웰에 첨가하여 사멸 세포의 양을 측정하고, 각 플레이트를 인큐베이터 내 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0207] 5) 각 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서 490 nm에서 판독하고, 세포 생존을 LDC 접합체 처리의 존재 하의 또는 부재 하의 시험 세포에 대해 비교하였다. 50% 세포 사멸을 위해 요구되는 LDC 약물 농도 ( $IC_{50}$  값)를 결정하였다.

[0208] 결과 및 분석:

[0209] LDC10B는 매우 효율적으로 하기 암 세포: 인간 비인두암 세포주 KB, 인간 폐암 세포 H460, 인간 폐암 세포 H1299, 만성 골수성 백혈병 세포주 K562, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954, 인간 위암 세포 N87, 인간 유방암 세포 SK-BR-3을 사멸시킬 수 있고, LDC10B의  $IC_{50}$  값은 LDC1 및 LDC10A 대조군의 값보다 더 낮았다 (더 강력함) (표 4 참조). 이들 세포주는 플레이트 수용체 및/또는 TRPV6 수용체의 발현을 갖는 것으로 공지되어 있다. 그러나, LDC10B의 세포독성은 플레이트 수용체 발현이 결여된 흑색종 세포주 A375에 대해 유의하게 더 낮았다 (더 높은  $IC_{50}$  판독치).

[0210] LDC10B는 플레이트 수용체 및 TRPV6 수용체 둘 다에 결합할 수 있는 이중-리간드 약물 접합체이다. 수용체 양성 세포주에 대해, 표 5로부터, LDC10B의 세포독성이 단일-리간드 약물 접합체 LDC1 또는 LDC10A보다 2-15배 더 강력한 것 ( $IC_{50}$  값이 2-15배 더 낮았음)으로 제시될 수 있다. 플레이트 수용체가 결여된 흑색종 세포주 A375에 대해서는, LDC1 및 LDC10A와 유사하게, LDC10B의 독성이 약 15배 더 낮았고, 이는 우수한 특이성을 나타낸다. 따라서, 이중-리간드 약물 접합체 LDC10B는 상승작용적 효과를 제시하며, 약물의 효능에 기여한다.

[0211] 표 4: 접합체 LDC10B vs 대조군의 세포독성 시험 결과 ( $IC_{50}$  값)

[0212] (단위: mol/l, M)

[0213] 표 4A: 인큐베이션 시간 30분

세포	H1299	K562	H460	SKOV3	HCC1954	N87	SK-BR-3
MMAE	$0.86 \times 10^{-9}$	$0.54 \times 10^{-9}$	$0.77 \times 10^{-9}$	$0.62 \times 10^{-9}$	$0.45 \times 10^{-9}$	$0.68 \times 10^{-9}$	$0.52 \times 10^{-9}$
LDC1	$2.62 \times 10^{-7}$	$9.31 \times 10^{-8}$	$1.92 \times 10^{-7}$	$1.02 \times 10^{-7}$	$9.44 \times 10^{-8}$	$2.39 \times 10^{-7}$	$9.82 \times 10^{-8}$
LDC10A	$5.09 \times 10^{-7}$	$1.11 \times 10^{-7}$	$4.83 \times 10^{-7}$	$1.25 \times 10^{-7}$	$1.06 \times 10^{-7}$	$5.17 \times 10^{-7}$	$1.09 \times 10^{-7}$
LDC10B	$5.88 \times 10^{-8}$	$1.48 \times 10^{-8}$	$5.04 \times 10^{-8}$	$1.57 \times 10^{-8}$	$1.41 \times 10^{-8}$	$7.51 \times 10^{-8}$	$1.59 \times 10^{-8}$

[0214]

[0215] 표 4B: 인큐베이션 시간 15분

세포	A375		KB
MMAE	$1 \times 10^{-7}$		$8.9 \times 10^{-8}$
LDC1	$1 \times 10^{-5}$		$1.5 \times 10^{-5}$
LDC10A	$1 \times 10^{-5}$		$8.5 \times 10^{-6}$
LDC10B	$1 \times 10^{-5}$		$7.6 \times 10^{-7}$

[0216]

[0217] 3. 접합체 LDC11B의 세포독성 시험

[0218] 시험 샘플: LDC11B

[0219] 대조군 샘플: MMAE, LDC1, LDC11A

[0220] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 폴산 무함유

[0221] 실험 방법:

[0222] 1) 인간 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 인간 배아 신장 세포 293A를 37°C, 5%  $CO_2$ 의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.

[0223] 2) 인간 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 인간 배아 신장 세포 293A를 웰당  $1 \times 10^3$  개 세포로 플레이팅하고

(96-웰 플레이트), 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.

[0224] 3) PBS 용액 중 LDC 접합체 또는 대조군의 원액을 제조하였다. 100 μL/웰의 연속적으로 희석된 LDC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 세포에 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15-30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 내의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2-3일 동안 접합체를 함유하지 않는 새로운 배양 배지 (150 μL/웰) 내에서 인큐베이션하였다.

[0225] 4) 셀타이터 96® 아큐어스 원 솔루션 세포 증식 검정 (프로메가)을 각 웰에 첨가하여 사멸 세포의 양을 측정하고, 플레이트를 인큐베이터 내 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0226] 5) 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서 490 nm에서 판독하고, 세포 생존을 LDC 접합체 처리의 존재 하의 또는 부재 하의 세포에 대해 비교하였다. 50% 세포 사멸을 위해 요구되는 LDC 약물 농도 (IC<sub>50</sub> 값)를 결정하였다.

[0227] 결과 및 분석:

[0228] LDC11B는 하기 암 세포를 사멸시키거나 또는 이들의 성장을 억제할 수 있었다: 인간 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 인간 배아 신장 세포 293A. 이들 세포주는 플레이트 수용체 및/또는 LHRH 수용체의 높은 수준의 발현을 갖는 것으로 공지되어 있다. LDC11B의 IC<sub>50</sub> 값은 LDC1 및 LDC11A 대조군의 값보다 더 낮았다 (표 5 참조).

[0229] LDC11B는 폴레이트 수용체 및 LHRH 수용체 둘 다를 결합시킬 수 있는 이중-리간드 약물 접합체이다. 표 5로부터, LDC11B의 세포독성이 단일-리간드 접합체 LDC1 또는 LDC11A보다 거의 10배 더 강력한 것 (IC<sub>50</sub> 값이 거의 10배 더 낮았음)으로 제시될 수 있다. 따라서, 이중-리간드 약물 접합체 LDC11B는 상승작용적 효과를 제시하며, 약물의 효능에 기여한다.

[0230] 표 5: 접합체 LDC11B vs 대조군의 세포독성 시험 결과 (IC<sub>50</sub> 값)

[0231] (단위: mol/1, M)

세포	H460	SKOV3	293A
MMAE	0.58×10 <sup>-9</sup>	0.44×10 <sup>-9</sup>	0.86×10 <sup>-9</sup>
LDC1	5.26×10 <sup>-7</sup>	2.95×10 <sup>-7</sup>	7.15×10 <sup>-7</sup>
LDC11A	6.67×10 <sup>-7</sup>	3.41×10 <sup>-7</sup>	1.31×10 <sup>-6</sup>
LDC11B	8.13×10 <sup>-8</sup>	4.38×10 <sup>-8</sup>	5.24×10 <sup>-7</sup>

[0232]

[0233] 4. 접합체 LDC12B의 세포독성 시험

[0234] 시험 샘플: LDC12B

[0235] 대조군 샘플: MMAE

[0236] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 폴산 무함유

[0237] 실험 방법:

[0238] 1) 인간 자궁내막암 세포 HEC-1A, 인간 위암 세포주 GTL-16, 인간 결장 암종 HCT-116, 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.

[0239] 2) 인간 자궁내막암 세포 HEC-1A, 인간 위암 세포주 GTL-16, 인간 결장 암종 HCT-116, 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y를 웰당 1x10<sup>3</sup>개 세포로 플레이팅하고 (96-웰 플레이트), 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.

[0240] 3) PBS 용액 중 LDC 접합체 또는 대조군의 원액을 제조하였다. 100 μL/웰의 연속적으로 희석된 LDC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 세포에 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15-30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 내

의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2-3일 동안 접합체를 함유하지 않는 새로운 배양 배지 (150 μL/웰) 내에서 인큐베이션하였다.

[0241] 4) 셀타이터 96® 아큐어스 원 솔루션 세포 증식 검정 (프로메가)을 각 웰에 첨가하여 사멸 세포의 양을 측정하고, 플레이트를 인큐베이터 내 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0242] 5) 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서 490 nm에서 판독하고, 세포 생존을 LDC 접합체 처리의 존재 하의 또는 부재 하의 세포에 대해 비교하였다. 50% 세포 사멸을 위해 요구되는 LDC 약물 농도 (IC<sub>50</sub> 값)를 결정하였다.

[0243] 결과 및 분석:

[0244] LDC12B는 하기 암 세포를 사멸시키거나 또는 이들의 성장을 억제할 수 있었다: 인간 자궁내막암 세포 HEC-1A, 인간 위암 세포주 GTL-16, 인간 결장 암종 HCT-116, 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y. IC<sub>50</sub> 값이 표 6에 제시되어 있다.

[0245] 표 6: 접합체 LDC12B vs MMAE의 세포독성 시험 결과 (IC<sub>50</sub> 값)

[0246] (단위: mol/1, M)

세포	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	SH-SY5Y
MMAE	1.27×10 <sup>-8</sup>	6.38×10 <sup>-9</sup>	8.74×10 <sup>-9</sup>	2.4×10 <sup>-8</sup>
LDC12B	8.26×10 <sup>-7</sup>	6.12×10 <sup>-7</sup>	6.31×10 <sup>-7</sup>	3.96×10 <sup>-7</sup>

[0247] [0248] 5. 접합체 LDC13B의 세포독성 시험

[0249] 시험 샘플: LDC13B

[0250] 대조군 샘플: MMAE, LDC1, LDC13A

[0251] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 풀산 무함유

[0252] 실험 방법:

[0253] 1) 인간 비인두암 세포주 KB, 인간 결장 암종 HCT-116, 인간 전립선암 세포 PC-3, 인간 위암 세포주 GTL-16, 인간 자궁내막암 세포 HEC-1A 및 인간 위암 세포 N87을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.

[0254] 2) 인간 비인두암 세포주 KB, 인간 결장 암종 HCT-116, 인간 전립선암 세포 PC-3, 인간 위암 세포주 GTL-16, 인간 자궁내막암 세포 HEC-1A 및 인간 위암 세포 N87을 웰당 1x10<sup>3</sup>개 세포로 플레이팅하고 (96-웰 플레이트), 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.

[0255] 3) PBS 용액 중 LDC 접합체 또는 대조군의 원액을 제조하였다. 100 μL/웰의 연속적으로 희석된 LDC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 세포에 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15-30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 내의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2-3일 동안 접합체를 함유하지 않는 새로운 배양 배지 (150 μL/웰) 내에서 인큐베이션하였다.

[0256] 4) 셀타이터 96® 아큐어스 원 솔루션 세포 증식 검정 (프로메가)을 각 웰에 첨가하여 사멸 세포의 양을 측정하고, 플레이트를 인큐베이터 내 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0257] 5) 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서 490 nm에서 판독하고, 세포 생존을 LDC 접합체 처리의 존재 하의 또는 부재 하의 세포에 대해 비교하였다. 50% 세포 사멸을 위해 요구되는 LDC 약물 농도 (IC<sub>50</sub> 값)를 결정하였다.

[0258] 결과 및 분석:

[0259] LDC13B는 하기 암 세포를 사멸시키거나 또는 이들의 성장을 억제할 수 있었다: 인간 비인두암 세포주 KB, 인간 결장암 세포 HCT-116, 인간 위암 세포주 GTL-16, 인간 자궁내막암 세포 HEC-1A, 인간 전립선암 세포 PC-3, 인간 위암 N87. 특히, LDC13B는 플레이트 및 LHRH 수용체를 둘 다 갖는 세포주인 KB에 대해 고도로 강력하였다. 게다가, 이중-리간드 LDC13B는 단일-리간드 약물 접합체, 즉 LDC1 및 LDC13A 어느 것보다도 2-10배 더 강력하였고, 이는 효능에 있어서의 이중-리간드 약물 접합체의 이점을 확인해 준다. IC<sub>50</sub> 값이 표 7에 제시되어 있다.

[0260] 표 7: 접합체 LDC13B vs 대조군의 세포독성 시험 결과 (IC<sub>50</sub> 값)

[0261] (단위: mol/l, M)

세포	KB	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	PC-3	N87
MMAE	$2.88 \times 10^{-8}$	$1.27 \times 10^{-8}$	$6.38 \times 10^{-9}$	$8.74 \times 10^{-9}$	$1.28 \times 10^{-8}$	$3.83 \times 10^{-9}$
LDC1	$6.5 \times 10^{-8}$	-	-	-	-	-
LDC13A	$4.5 \times 10^{-6}$	-	-	-	-	-
LDC13B	$2.57 \times 10^{-8}$	$1.07 \times 10^{-6}$	$7.55 \times 10^{-7}$	$9.4 \times 10^{-7}$	$1.18 \times 10^{-6}$	$3.26 \times 10^{-7}$

[0262]

6. 접합체 LDC10H의 세포독성 시험

[0263] 시험 샘플: LDC10H

[0264] 대조군 샘플: MMAE, LDC1, LDC10A

[0265] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 폴산 무함유

[0266] 실험 방법:

[0267] 1) 인간 폐암 세포 H1299, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954 및 인간 폐암 세포 H460을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.

[0268] 2) 인간 폐암 세포 H1299, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954 및 인간 폐암 세포 H460을 웨일 1x10<sup>3</sup>개 세포로 플레이팅하고 (96-웰 플레이트), 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.

[0269] 3) PBS 용액 중 LDC 접합체 또는 대조군의 원액을 제조하였다. 100 μL/웰의 연속적으로 희석된 LDC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 세포에 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 15-30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 내의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 2-3일 동안 접합체를 함유하지 않는 새로운 배양 배지 (150 μL/웰) 내에서 인큐베이션하였다.

[0270] 4) 셀타이터 96® 아큐어스 원 솔루션 세포 증식 검정 (프로메가)을 각 웰에 첨가하여 사멸 세포의 양을 측정하고, 플레이트를 인큐베이터 내 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0271] 5) 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서 490 nm에서 판독하고, 세포 생존을 LDC 접합체 처리의 존재 하의 또는 부재 하의 세포에 대해 비교하였다. 50% 세포 사멸을 위해 요구되는 LDC 약물 농도 (IC<sub>50</sub> 값)를 결정하였다.

[0272] 결과 및 분석:

[0273] LDC10H는 하기 세포를 사멸시키거나 또는 이들의 성장을 억제할 수 있었다: 인간 폐암 세포 H1299, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954 및 인간 폐암 세포 H460. 이중-리간드 LDC10H는 단일-리간드 약물 접합체 LDC10A보다 10배 더 강력하였고, 이는 막 침투 웹티드 서열 (H)이 세포내이입에 의한 약물의 세포 내로의 전달을 도울 수 있음을 나타낸다. 게다가, LDC10H는 또한 단일-리간드 접합체 LDC1보다 더 강력하였고, 이는 효능에 있어서의 이중-리간드 약물 접합체의 이점을 확인해 준다. LDC10H의 IC<sub>50</sub> 값은 LDC1 및 LDC10A 대조군보다 더 낮았다 (표 8 참조).

[0274] 표 8: 접합체 LDC10H vs 대조군의 세포독성 시험 결과 (IC<sub>50</sub> 값)

[0276] (단위: mol/l, M)

세포	HCC1954	H1299	SKOV3	H460
MMAE	$0.29 \times 10^{-9}$	$0.71 \times 10^{-9}$	$0.49 \times 10^{-9}$	$0.56 \times 10^{-9}$
LDC1	$7.79 \times 10^{-8}$	$1.86 \times 10^{-7}$	$2.01 \times 10^{-7}$	$1.37 \times 10^{-7}$
LDC10A	$4.18 \times 10^{-7}$	$7.88 \times 10^{-7}$	$6.41 \times 10^{-7}$	$7.24 \times 10^{-7}$
LDC10H	$3.6 \times 10^{-8}$	$9.04 \times 10^{-8}$	$7.38 \times 10^{-8}$	$8.53 \times 10^{-8}$

[0277]

[0278] 7. 접합체 LDC1013의 세포독성 시험

[0279] 대조군 샘플: MMAE, LDC1, LDC10A

[0280] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 폴란 무함유

[0281] 실험 방법:

[0282] 1) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375 및 인간 폐암 세포 H460을  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.[0283] 2) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375 및 인간 폐암 세포 H460을 웨들  $1 \times 10^3$ 개 세포로 플레이팅하고 (96-웰 플레이트),  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.[0284] 3) PBS 용액 중 LDC 접합체 또는 대조군의 원액을 제조하였다.  $100 \mu\text{L}/\text{웰}$ 의 연속적으로 희석된 LDC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 세포에 첨가하고,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 15-30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 내의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 세포를  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 2-3일 동안 접합체를 함유하지 않는 새로운 배양 배지 ( $150 \mu\text{L}/\text{웰}$ ) 내에서 인큐베이션하였다.[0285] 4) 셀타이터 96® 아큐어스 원 솔루션 세포 중식 검정 (프로메가)을 각 웰에 첨가하여 사멸 세포의 양을 측정하고, 플레이트를 인큐베이터 내  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.[0286] 5) 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서 490 nm에서 판독하고, 세포 생존을 LDC 접합체 처리의 존재 하의 또는 부재 하의 세포에 대해 비교하였다. 50% 세포 사멸을 위해 요구되는 LDC 약물 농도 ( $\text{IC}_{50}$  값)를 결정하였다.

[0287] 결과 및 분석:

[0288] LDC1013은 하기 세포주: 인간 비인두암 세포주 KB, 인간 폐암 세포 H460을 사멸시키고, 흑색종 세포주 A375의 성장을 억제하는데 효과적이며, LDC1013의  $\text{IC}_{50}$  값은 LDC1 및 LDC10A 대조군의 값보다 더 낮았다 (더 강력함) (표 9 참조). 그러나, LDC1013의 세포독성은 대조군 세포주인 흑색종 세포주 A375에 대해 유의하게 더 낮았다 (더 높은  $\text{IC}_{50}$  판독치).[0289] LDC1013은 LHRH 수용체 및 TRPV6 수용체 둘 다에 결합할 수 있는 이중-리간드 약물 접합체이다. 수용체 양성 세포주에 대해, 표 9로부터, LDC1013의 세포독성이 단일-리간드 약물 접합체 LDC1 또는 LDC10A보다 2-15배 더 강력한 것 ( $\text{IC}_{50}$  값이 2-15배 더 낮았음)으로 제시될 수 있다. A375에 대해서는, LDC 1013의 독성이 각각 H460 및 KB에 대해서보다 약 10-100배 더 낮았고, 이는 우수한 특이성을 나타낸다. 따라서, 이중-리간드 약물 접합체 LDC1013은 상승작용적 효과를 제시하며, 약물의 효능에 기여한다.[0290] 표 9: 접합체 LDC1013 vs 대조군의 세포독성 시험 결과 ( $\text{IC}_{50}$  값)

[0291] (단위: mol/l, M)

	MMAE	FA-MMAE	LDC10A	LDC1013
KB	$2 \times 10^{-8}$	$4 \times 10^{-6}$	$5.8 \times 10^{-6}$ M	$1.3 \times 10^{-7}$
H460	$3.7 \times 10^{-8}$	$9.4 \times 10^{-6}$	$1.39 \times 10^{-5}$ M	$2.2 \times 10^{-6}$
A375	$8.5 \times 10^{-8}$	$3.7 \times 10^{-5}$	$3.94 \times 10^{-5}$ M	$1.19 \times 10^{-5}$

[0292] 8. 접합체 LDC10BR의 세포독성 시험

[0293] 대조군 샘플: MMAE 및 LDC10B

[0294] 배양 배지: RPMI 1640 배지, 폴산 무함유

[0295] 실험 방법:

[0296] 1) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375 및 인간 폐암 세포 H460을  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.[0297] 2) 인간 비인두암 세포주 KB, 흑색종 세포주 A375 및 인간 폐암 세포 H460을 웨들 1x $10^3$ 개 세포로 플레이팅하고 (96-웰 플레이트),  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 8-12시간 동안 인큐베이션하였다.[0298] 3) PBS 용액 중 LDC 접합체 또는 대조군의 원액을 제조하였다. 100  $\mu\text{L}$ /웰의 연속적으로 희석된 LDC 접합체 또는 대조군을 플레이트 내 세포에 첨가하고,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 15-30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰 내의 배양 배지를 흡인에 의해 제거하고, 세포를  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 2-3일 동안 접합체를 함유하지 않는 새로운 배양 배지 (150  $\mu\text{L}$ /웰) 내에서 인큐베이션하였다.[0299] 4) 셀타이터 96® 아큐어스 원 솔루션 세포 증식 검정 (프로메가)을 각 웰에 첨가하여 사멸 세포의 양을 측정하고, 플레이트를 인큐베이터 내  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.[0300] 5) 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 상에서 490 nm에서 판독하고, 세포 생존을 LDC 접합체 처리의 존재 하의 또는 부재 하의 세포에 대해 비교하였다. 50% 세포 사멸을 위해 요구되는 LDC 약물 농도 ( $\text{IC}_{50}$  값)를 결정하였다.

[0301] 결과 및 분석:

[0302] LDC10BR은 하기 세포주: 인간 비인두암 세포주 KB, 인간 폐암 세포 H460을 사멸시키고, 흑색종 세포주 A375의 성장을 억제하는데 효과적이며, LDC10BR의  $\text{IC}_{50}$  값은 이중-리간드 접합체 LDC10B와 유사하였다 (표 10 참조).

[0303] LDC10BR은 RGD (인테그린 알파) 수용체, 폴레이트 수용체 및 TRPV6 수용체에 결합할 수 있는 삼중-리간드 약물 접합체이다. 수용체 양성 세포주에 대해, 표 10으로부터, LDC10BR의 세포독성이 이중-리간드 접합체 LDC10B와 유사한 것으로 제시될 수 있다. 따라서, 삼중-리간드 약물 접합체 LDC10BR은 적어도 이중-리간드 LDC10B만큼 효과적이었다. 게다가, 삼중-리간드 LDC는 모든 3종의 수용체의 발현을 갖는 암 세포에 대해 우월한 세포독성 및 선택성을 가질 수 있으며, 3개의 리간드는 상승작용적 효과를 제시하며, 약물의 효능에 기여한다.

[0304] 표 10: 접합체 LDC10BR vs LDC10B의 세포독성 시험 결과 ( $\text{IC}_{50}$  값)

[0305] (단위: mol/l, M)

	MMAE	LDC10B	LDC10BR
KB	$2 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^{-6}$	$6.6 \times 10^{-6}$
H460	$3.7 \times 10^{-8}$	$6.8 \times 10^{-6}$	$6.4 \times 10^{-6}$
A375	$8.5 \times 10^{-8}$	$5.13 \times 10^{-5}$	$3.81 \times 10^{-5}$

[0306] 실시예 III: 동물 모델에서의 접합체의 효능 연구

[0307] 목적: 암의 치료를 위한 마우스 모델에서의 접합체의 항종양 효능의 연구.

- [0310] 1. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC10B 및 LDC10H의 억제 검정
- [0311] 처리를 위해 사용된 접합체: LDC10B, LDC10H
- [0312] 동물: 누드 마우스, 6-8주령, 암컷
- [0313] 실험 방법:
- [0314] 1) 인간 대세포 폐암 세포 H460, 인간 폐암 세포 A549, 난소암 세포 SKOV3 및 유방암 세포주 HCC1954를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 IMDM 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.
- [0315] 2) 종양의 발생: 7x10<sup>6</sup>개 종양 세포를 누드 마우스의 등쪽에서 피하로 주사하고, 종양 크기가 약 100-200 mm<sup>3</sup> 정도로 커진 후에 마우스를 처리를 위해 그룹화하였다.
- [0316] 3) 처리: 3마리 마우스/그룹, LDC10B, LDC10H, 뿐만 아니라 대조군 MMAE 및 PBS의 5 및 10 mg/kg의 용량으로 5 일마다 3회 주사하여 처리.
- [0317] 4) 동물의 신체 수행능, 체중 및 종양 크기를 모니터링하였다. 동물 사망 수를 실험 동안 기록하였다.
- [0318] 결과 및 분석:
- [0319] LDC10B 및 LDC10H는 인간 대세포 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3 및 유방암 세포주 HCC1954의 종양 성장을 억제할 수 있으며, 5 및 10 mg/kg의 용량으로 3회 주사한 후에 대부분의 종양이 사라졌다. 상세한 결과는 표 11 및 표 12에 제시되어 있다.
- [0320] 표 11: 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC10B의 억제 효능

시간	이식된 H460 종양				이식된 HCC1954		이식된 SKOV3	
	5mg/kg		10mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )						
주사 전	23.13	89.25	22.51	97.38	21.85	225.32	22.96	178.68
1차 주사 후 5일	22.53	78.63	22.53	45.74	22.2	108.73	22.44	163.05
2차 주사 후 5일	22.26	49.11	23.37	6.32	22.55	0	23.23	120.51
3차 주사 후 5일	21.65	52.5	23	0	22.38	0	23.53	68.31

[0321]

[0322]

표 12: 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC10H의 억제 효능

LDC10H	이식된 H460 종양				이식된 HCC1954 종양	
	5mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )
주사 전	23.29	136.49	23.37	126	22.05	88.6
1차 주사 후 5일	24.26	71.51	24.39	108.15	23.32	16.77
2차 주사 후 5일	23.14	65.73	22.12	37.5	22.87	0
3차 주사 후 5일	23.22	11.64	23.61	2.34	22.51	0

[0323]

2. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC11A, LDC11B의 억제 검정

[0324]

처리를 위해 사용된 접합체: LDC11A 및 LDC11B

[0325]

동물: 누드 마우스, 6-8주령, 암컷

[0326]

실험 방법:

[0327]

1) 인간 대세포 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3, 유방암 세포주 HCC1954 및 인간 유방암 세포 SK-BR-3을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 IMDM 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.

[0328]

2) 종양의 발생: 7x10<sup>6</sup>개 종양 세포를 누드 마우스의 등쪽에서 피하로 주사하고, 종양 크기가 약 100~200 mm<sup>3</sup> 정도로 커진 후에 마우스를 처리를 위해 그룹화하였다.

[0329]

3) 처리: 3마리 마우스/그룹, LDC11A, LDC11B, 뿐만 아니라 대조군 MMAE 및 PBS의 5 및 10 mg/kg의 용량으로 5 일마다 3회 주사하여 처리.

[0330]

4) 동물의 신체 수행능, 체중 및 종양 크기를 모니터링하였다. 동물 사망 수를 실험 동안 기록하였다.

[0331]

결과 및 분석:

[0332]

LDC11B는 인간 대세포 폐암 세포 H460, 난소암 세포 SKOV3 및 유방암 세포주 HCC1954의 종양 성장을 억제할 수 있으며, 10 mg/kg의 용량으로 연속 3회 주사한 후에 대부분의 종양이 사라졌다. 반면, LDC11A와 관련하여서는 강한 독성으로 인해 동물이 제1 주사 후에 사망하였다. 상세한 결과는 표 13 및 표 14에 제시되어 있다.

[0334]

표 13: 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC11B의 억제 효능

시간	이식된 H460 종양		이식된 SKOV3 종양		이식된 HCC1954 종양	
	10mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )
주사 전	21.85	225.32	22.11	169.22	22.76	218.76
1차 주사 후 5일	22.2	108.73	24.28	137.66	22.56	87.51
2차 주사 후 5일	22.55	0	23.6	76.13	23.15	0
3차 주사 후 5일	22.38	0	24.92	27.84	23.48	0

[0335]

[0336]

표 14. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC11A의 억제 효능

LDC11A	이식된 H460 종양	
	10mg/kg	
	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )
주사 전	24.46	294
1차 주사 후 3일	18.25	300
1차 주사 후 5일	사망	사망

[0337]

[0338]

3. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC13B의 억제 검정

[0339]

처리를 위해 사용된 접합체: LDC13B

[0340]

동물: 누드 마우스, 6-8주령, 암컷

[0341]

실험 방법:

[0342]

1) 인간 대세포 폐암 세포 H460을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 IMDM 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.

[0343]

2) 종양의 발생: 7x10<sup>6</sup>개 종양 세포를 누드 마우스의 등쪽에서 피하로 주사하고, 종양 크기가 약 200 mm<sup>3</sup> 정도로 커진 후에 마우스를 처리를 위해 그룹화하였다.

[0344]

3) 처리: 3마리 마우스/그룹, LDC13B 뿐만 아니라 대조군 MMAE 및 PBS의 2.5 및 5 mg/kg의 용량으로 3일마다 4회 주사하여 처리.

[0345]

4) 동물의 신체 수행능, 체중 및 종양 크기를 모니터링하였다. 동물 사망 수를 실험 동안 기록하였다.

[0346] 결과 및 분석:

[0347] LDC13B는 인간 대세포 폐암 세포 H460의 종양 성장을 억제할 수 있으며, 대부분의 종양이 2.5 mg/kg의 용량으로 급속하게 축소되었고, 5 mg/kg의 용량으로 4회 주사한 후에는 완전히 사라졌다. 상세한 결과는 표 15에 제시되어 있다.

[0348] 표 15. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC13B의 억제 효능

시간	이식된 H460 종양			
	2.5mg/kg		5 mg/kg	
	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )
주사 전	22.7	294	20.95	196
1차 주사 후 3일	22.73	384	18.36	144
2차 주사 후 3일	22.65	384	19.65	40
3차 주사 후 3일	22.47	144	18.21	18
4차 주사 후 3일	21.76	144	18.22	13.5

[0349]

[0350] 4. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC1013의 억제 검정

[0351] 처리를 위해 사용된 접합체: LDC1013

[0352] 동물: 누드 마우스, 6-8주령, 암컷

[0353] 실험 방법:

[0354] 1) 인간 유방암 세포 HCC1954를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 IMDM 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.

[0355] 2) 종양의 발생: 7x10<sup>6</sup>개 종양 세포를 누드 마우스의 등쪽에서 피하로 주사하고, 종양 크기가 약 180-320 mm<sup>3</sup> 정도로 커진 후에 마우스를 처리를 위해 그룹화하였다.

[0356] 3) 처리: 3마리 마우스/그룹, LDC1013 뿐만 아니라 대조군 MMAE 및 PBS의 2.5 및 5 mg/kg의 용량으로 3일마다 4회 주사하여 처리.

[0357] 4) 동물의 신체 수행능, 체중 및 종양 크기를 모니터링하였다. 동물 사망 수를 실험 동안 기록하였다.

[0358] 결과 및 분석:

[0359] LDC1013은 각각 3일마다 주사된 2.5 mg/kg의 7회 용량 및 5 mg/kg의 7회 용량으로 HCC1954 이종이식 종양을 완전히 제거할 수 있었다. 상세한 결과는 표 16에 제시되어 있다.

[0360] 표 16. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC1013의 억제 효능

시간	이식된 HCC1954 종양			
	2.5mg/kg		5 mg/kg	
	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )	마우스의 체중 (g)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> )
주사 전	24.14	180	21.92	320
1차 주사 후 3일	24.46	198	20.7	405
2차 주사 후 3일	24.54	198	20.43	405
3차 주사 후 3일	23.94	180	21.31	288
4차 주사 후 3일	24.3	113	21.15	88
5차 주사 후 4일	24.98	64	21.21	40
6차 주사 후 5일	24.73	22	20.49	0
7차 주사 후 6일	24.43	0	24.49	-

[0361]

[0362] 5. 이종이식 종양에 대한 접합체 LDC10BX의 억제 검정

[0363] 처리를 위해 사용된 접합체: LDC10BX

[0364] 동물: 누드 마우스, 6-8주령, 암컷

[0365] 실험 방법:

[0366] 1) 인간 폐암 세포 H460을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 IMDM 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.[0367] 2) 종양의 발생: 7x10<sup>6</sup>개 종양 세포를 누드 마우스의 등쪽에서 피하로 주사하고, 종양 크기가 약 180-320 mm<sup>3</sup> 정도로 커진 후에 마우스를 처리를 위해 그룹화하였다.

[0368] 3) 처리: 3마리 마우스/그룹, LDC10BX 뿐만 아니라 대조군 LDC13A의 10 mg/kg의 용량으로 3일마다 3회 주사하여 처리.

[0369] 4) 동물의 신체 수행능, 체중 및 종양 크기를 모니터링하였다. 동물 사망 수를 실험 동안 기록하였다.

[0370] 결과 및 분석:

[0371] LDC10BX는 3일마다 주사된 10 mg/kg의 3회 용량으로 H460 이종이식 종양을 제거하였다.

[0372] 6. 이종이식 종양 모델에서의 접합체 농도의 검출

[0373] 샘플: LDC10B, LDC10H

[0374] 동물: 누드 마우스, 6-8주령, 암컷

[0375] 실험 방법:

[0376] 1) 인간 난소암 세포 SKOV3 및 유방암 세포주 HCC1954를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의, 10% 태아 소 혈청을 함유하는 IMDM 배지 내에서 인큐베이션하고, 세포를 2-3일마다 계대하였다.[0377] 2) 종양의 발생: 7x10<sup>6</sup>개 종양 세포를 누드 마우스의 등쪽에서 피하로 주사하고, 종양 크기가 약 100~200 mm<sup>3</sup> 정도로 커진 후에 마우스를 처리를 위해 그룹화하였다.

[0378] 3) 처리: 3마리 마우스/그룹, 10 mg/kg, 복막 주사.

[0379] 4) 혈액 수집: 처리 전의 혈액 수집 시간을 0으로 설정하고, 혈액을 처리 후 20분, 2시간, 4시간 및 24시간에 수집하였다. 혈액을 원심분리하여 혈청을 수집하고, 이를 동결시켜 보존하였다.

[0380] 5) 검출: MMAE, LDC10B, LDC10H, 뿐만 아니라 LDC10B 및 LDC10H의 MMAE 대사물의 혈청 내 총량을 마우스 항-MMAE ELISA 키트에 의해 검출하였다.

[0381] 결과 및 분석:

[0382] 미량의 LDC10B가 처리 후 24시간에 혈청 내에서 검출되었고, 반면 LDC10H 및 그의 MMAE 대사물은 검출되지 않았으며, 이는 유리 약물이 생체내에서 빠르게 배출/대사되었음을 나타낸다. 상세한 결과는 표 17에 제시된 바와 같다.

[0383] 표 17: 이종이식 종양을 갖는 동물에서의 접합체의 농도

농도 (ug/ml)	LDC10B	LDC10H
처리 전	0	0
20분	10.8	0.77
2시간	5.035	0.58
4시간	0.53	0.196
24시간	0.1179	0

[0384]

[0385] 상기에 비추어 보면, 시험관내 및 생체내 연구는 하기를 제시한 바 있다:

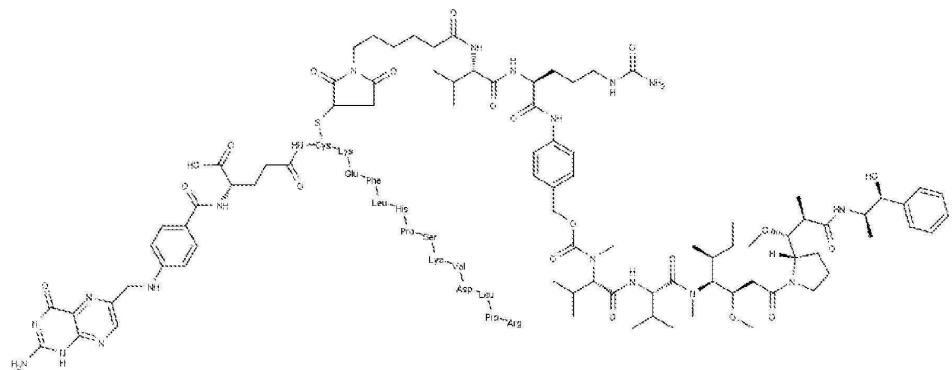
[0386] (a) 다중-리간드 약물 접합체 (mLDC)는 표적 세포에 결합하고/거나 세포내이입에 의해 표적 세포에 들어가서 세포독성 페이로드의 효과를 통해 세포를 사멸시킨다. 20종이 넘는 다양한 암 세포주가 시험된 바 있으며, 그 결과는 상기 결론을 확인해 주었다.

[0387] (b) 동물 생체 영상화는 형광 표지된 LDC10B-Cy5가 종양 덩이의 원위치에 집중되며 24시간에 걸쳐 지속됨을 제시하였다 (도 4 참조).

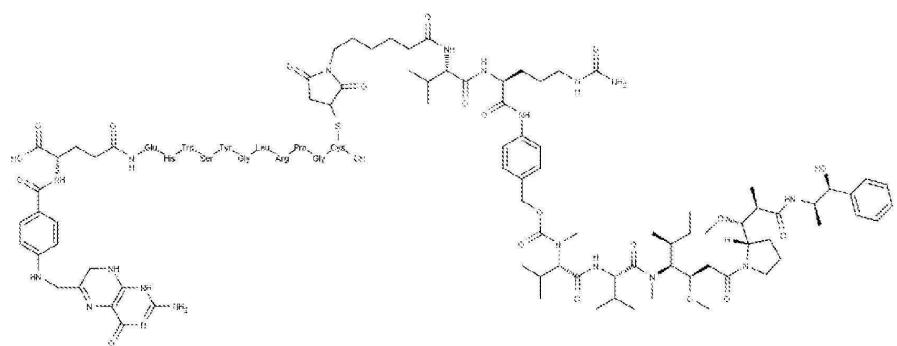
[0388] (c) mLDC는 마우스 모델에서 이종이식 종양을 완전히 제거할 수 있다. 대부분의 선도 화합물은 체중 감소 또는 다른 명백한 독성을 유발하지 않으면서, 용량 및 수용체 발현 수준 의존성 방식으로 이종이식 종양을 제어 또는 제거하는 탁월한 효능을 제시하였다. 종양이 완전히 제거되었을 때, 마우스는 그 뒤 사망할 때까지 종양이 없는 상태를 유지하였다 (>6개월).

도면

도면 1a

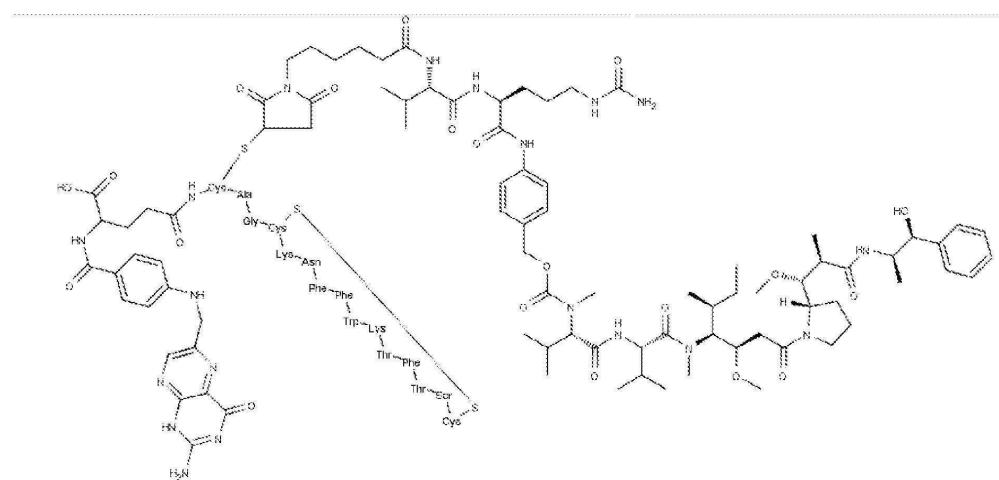


LDC10B

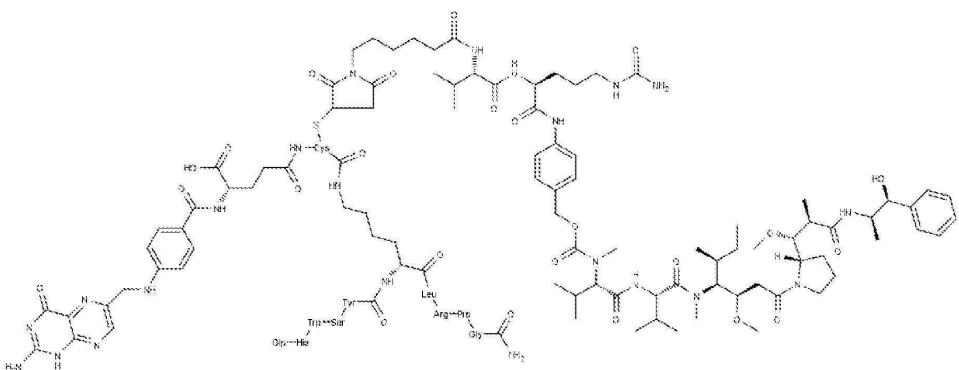


LDC11B

## 도면 1b

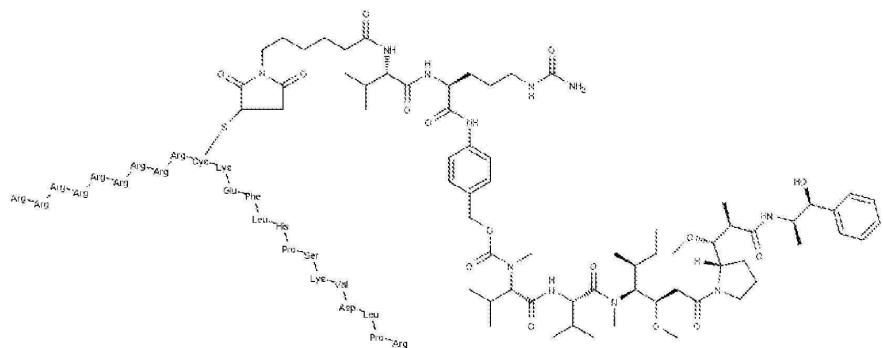


LDC12B

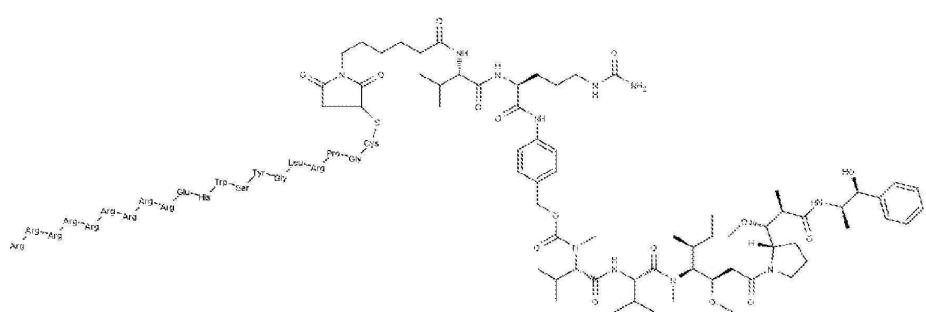


LDC13B

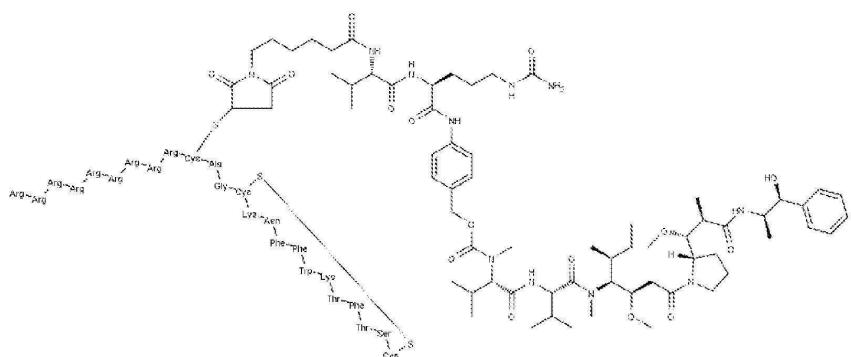
## 도면 1c



**LDC10H**

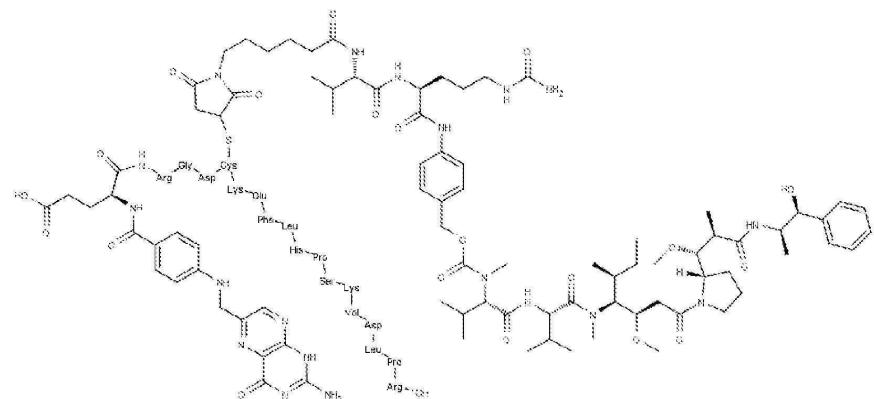


LDC11H

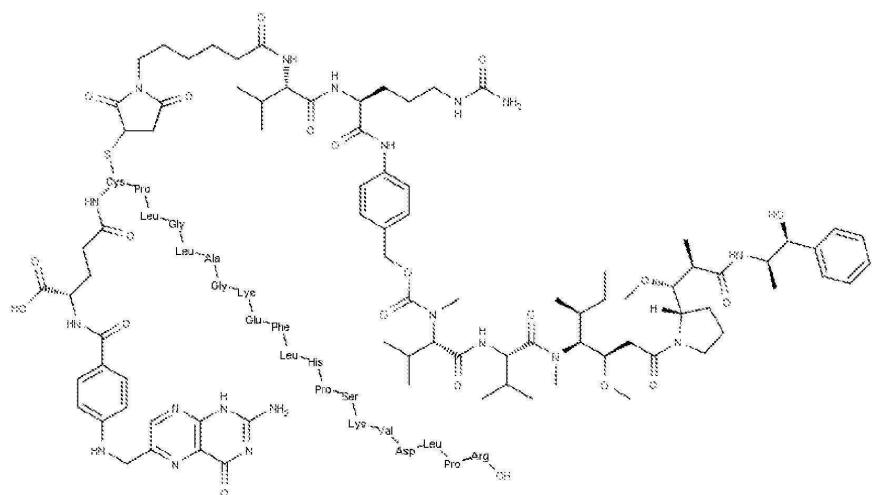


**LDC12H**

## 도면 1d

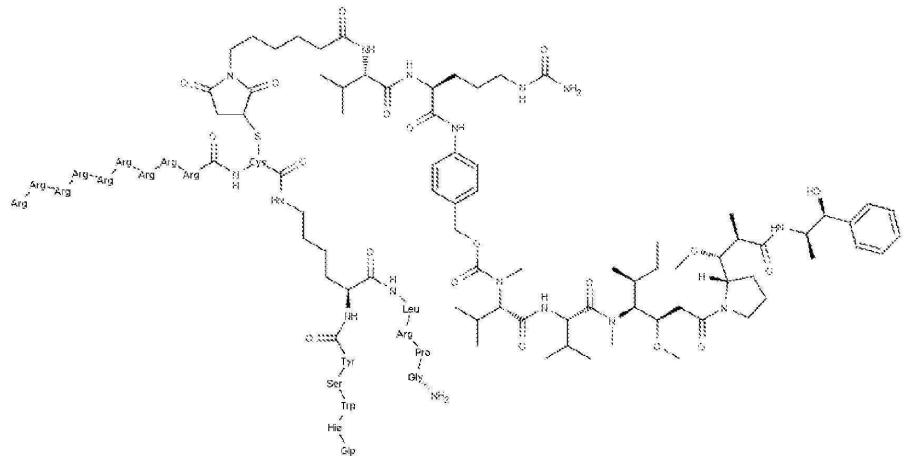


LDC10BR



LDC10BX

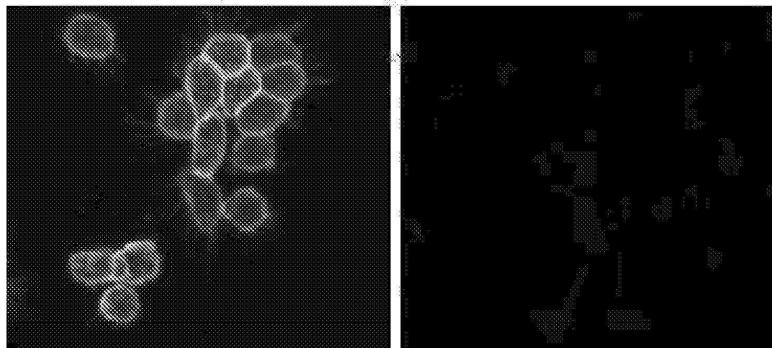
## 도면 1e



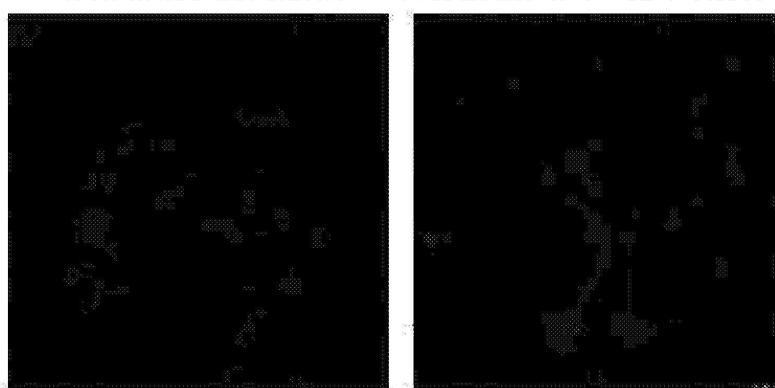
**LDC1013**

도면2

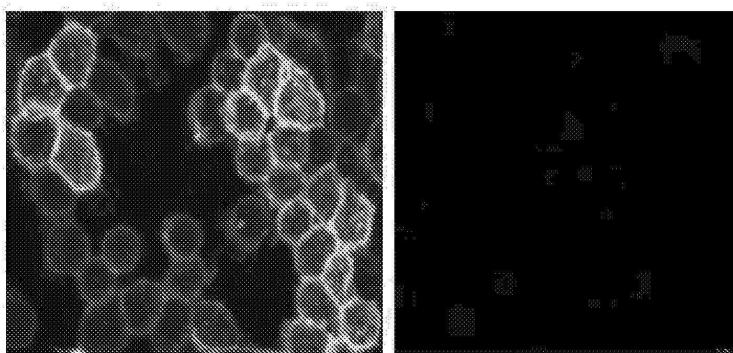
A: KB+플레이트-FITC B: A375+플레이트-FITC



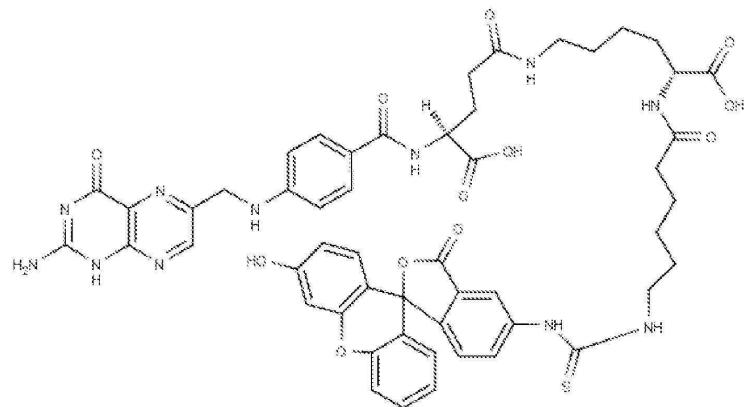
C: KB+10A-FITC D: A375+10A-FITC



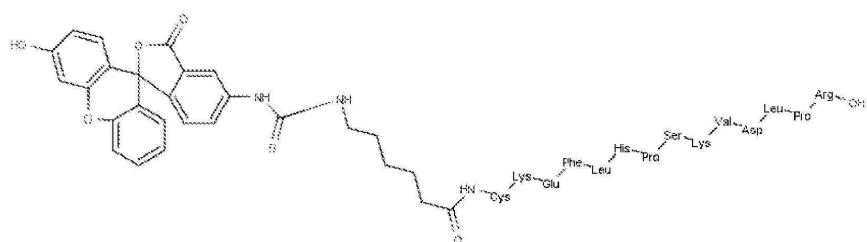
E: KB+10B-FITC F: A375+10B-FITC



도면3a

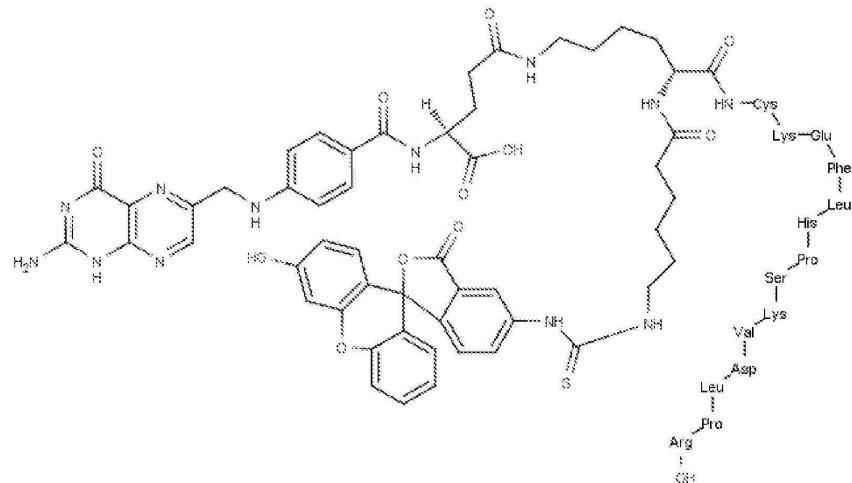


플레이트-FITC



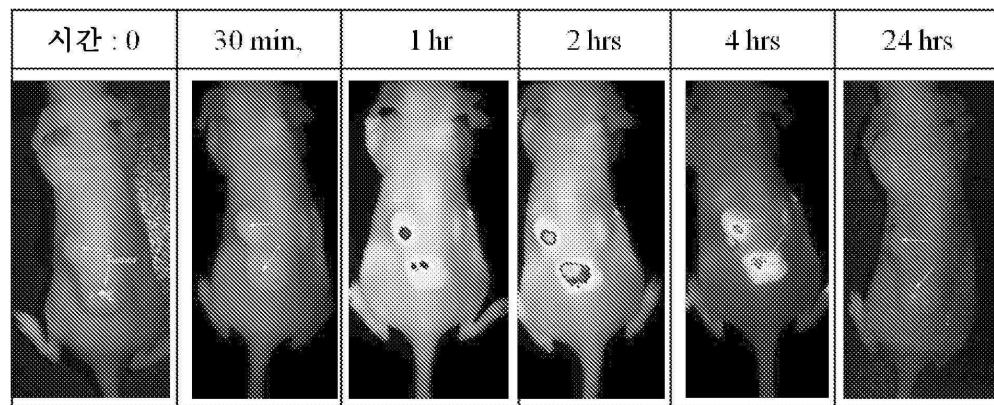
10A-FITC

## 도면3b



## 10B-FITC

## 도면4



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Coherent Biopharma

&lt;120&gt; Multi-Ligand Drug Conjugates and Uses Thereof

&lt;130&gt; 066138-8001W001

&lt;150&gt; CN201510489556.6

&lt;151&gt; 2015-08-11

<150> CN201510489560.2

<151> 2015-08-11

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Matripase

<400> 1

Lys Ser Arg Ala Glu Asp Glu

1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for MMP-2

<400> 2

Pro Leu Gly Leu Ala Gly

1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Prostate Specific Antigen

<400> 3

Ser Ser Leu Tyr

1

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for TMPRSS2

<400> 4

Leu Leu Arg Ser Leu Ile Gly

1 5

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Activated Protein C

<400> 5

Leu Val Lys Arg

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Factor Ixa

<400> 6

Leu Val Val Arg

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Factor VIIa

<400> 7

Gln Leu Thr Arg

1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Factor Xa

<400> 8

Leu Glu Gly Arg

1

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Calpain-a

<400> 9

Pro Leu Phe Ala Glu Pro

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Calpain-2

<400> 10

Gly Leu Gly Ser Glu Pro

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Enteropeptidase

<

400> 11

Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for MMP-8

<400> 12

Gly Pro Ser Gly

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Prpprotein Covertase 5

<400> 13

Arg Ser Lys Arg

1

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recognition Site for Calpain-3

<400> 14

Val Gly Val Phe

1

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P10

<400> 15

Cys Lys Glu Phe Leu His Pro Ser Lys Val Asp Leu Pro Arg

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P11

<400> 16

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Cys

1 5 10

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; P12

&lt;400&gt; 17

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys

1 5 10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; P13

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (6)..(6)

&lt;223&gt; Xaa=D-Lys

&lt;400&gt; 18

Glu His Trp Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Gly Cys

1 5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; R9

&lt;400&gt; 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Tat peptide

&lt;400&gt; 20

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln

1 5 10