(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월30일
(11) 등록번호 10-2701678
(24) 등록일자 2024년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/12 (2006.01) *A61K 51/04* (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 51/1251 (2013.01)
A61K 51/0478 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7031663
(22) 출원일자(국제) 2016년04월07일
심사청구일자 2021년04월06일
(85) 번역문제출일자 2017년10월31일
(65) 공개번호 10-2018-0002645
(43) 공개일자 2018년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/026434
(87) 국제공개번호 WO 2016/164578
국제공개일자 2016년10월13일
(30) 우선권주장
62/144,278 2015년04월07일 미국(US)
62/151,943 2015년04월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20130039848 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
코넬 유니버시티
미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로드 395 엣 코넬 유니버시티(씨티엘) 센터 포 테크놀로지 라이센싱
더 큐레이터스 오브 더 유니버시티 오브 미주리
미국, 65211 미주리, 콜럼비아, 유니버시티 홀 316
(72) 발명자
유, 바니
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275 메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터 (내)
퀴인, 톰
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275 메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터 (내)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

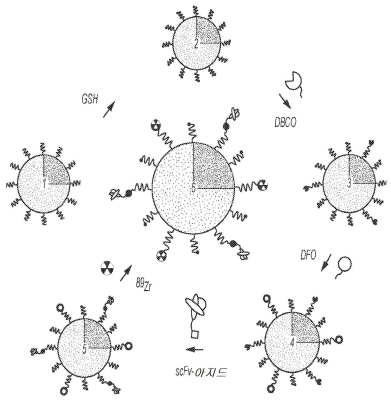
전체 청구항 수 : 총 26 항 심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **나노입자 면역컨쥬게이트**

(57) 요 약

치료제 및/또는 진단제로서 유용한 나노입자 면역컨쥬게이트가 본원에 기재된다. 면역컨쥬게이트는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖는다. 특정 구체예에서, 컨쥬게이트는 단일쇄 항체 단편이 여기에 부착된 실리카-기반 나노입자이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 51/10 (2020.05)
(72) 발명자
브래드버리, 미첼
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275 메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터 (내)
비즈너, 울리히
미국 14850 뉴욕 이티카 화이트 파크 로드 105
루이스, 제이슨
미국 10021 뉴욕 뉴욕 이스트 68 스트리트 345 아파트먼트 3에이
마, 카이
미국 14850 뉴욕 이타카 노스 트리퍼머 로드 2250 아파트먼트 엔2에이
첸, 펭
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275 메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터 (내)

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 코팅된 실리카 나노입자; 및

PEG로 코팅된 실리카 나노입자에 컨쥬게이션된 단일쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는 면역컨쥬게이트로서,

PEG로 코팅된 실리카 나노입자가 1 나노미터 내지 20 나노미터의 직경을 가지는, 면역컨쥬게이트.

청구항 2

제 1항에 있어서, scFv가 25kDa 내지 30kDa인 면역컨쥬게이트.

청구항 3

제 1항에 있어서, 실리카 나노입자가 형광 화합물을 실리카 나노입자 코어 내에 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 4

제 1항에 있어서, 실리카 나노입자가 여기에 부착된 1개 내지 10개의 단일쇄 가변 단편을 갖는 면역컨쥬게이트.

청구항 5

제 1항에 있어서, 실리카 나노입자가 1 nm 내지 15 nm 범위의 직경을 갖는 면역컨쥬게이트.

청구항 6

제 1항에 있어서, scFv가 항-VEGF-A를 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 7

제 1항에 있어서, 치료제를 추가로 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 8

제 7항에 있어서, 치료제가 화학요법 약물을 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 9

제 7항에 있어서, 치료제가 방사성동위원소를 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 방사성동위원소가 ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{67}Cu, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{166}Ho, ^{149}Pm, ^{90}Y, ^{213}Bi, ^{103}Pd, ^{109}Pd, ^{159}Gd, ^{140}La, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{165}Dy, ^{166}Dy, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{89}Zr, ^{225}Ac, 및 ^{192}Ir로 구성된 군으로부터 선택되는 구성원인 면역컨쥬게이트.

청구항 11

제 1항에 있어서, 나노입자가 1 내지 10 나노미터의 직경을 갖는 면역컨쥬게이트.

청구항 12

제 8항에 있어서, 화학요법 약물이 소라페닙, 파클리탁셀, 도세탁셀, MEK162, 에토포시드, 라파티닙, 닐로티닙, 크리조티닙, 풀베스트란트, 베무라페닙, 벡사로텐, 및 캄프토테신으로 구성된 군으로부터 선택되는 구성원인 면역컨쥬게이트.

청구항 13

폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 코팅된 실리카 나노입자;

PEG로 코팅된 실리카 나노입자에 컨쥬게이션된 단일쇄 가변 단편(scFv),및

PEG로 코팅된 실리카 나노입자에 컨쥬게이션된 치료제를 포함하는 면역컨쥬게이트로서,

치료제가 펩티드 링커를 통해 컨쥬게이션되며,

PEG로 코팅된 실리카 나노입자가 1 나노미터 내지 20 나노미터의 직경을 가지는, 면역컨쥬게이트.

청구항 14

제 13항에 있어서, 펩티드 링커는 리소솜 프로테아제에 의해 절단되는 면역컨쥬게이트.

청구항 15

제 14항에 있어서, 리소솜 프로테아제는 카텝신-B인 면역컨쥬게이트.

청구항 16

제 13항에 있어서, 펩티드 링커는 디펩티드 링커인 면역컨쥬게이트.

청구항 17

제 16항에 있어서, 디펩티드는 발린-시트룰린인 면역컨쥬게이트.

청구항 18

제 13항에 있어서, scFv가 25kDa 내지 30kDa인 면역컨쥬게이트.

청구항 19

제 13항에 있어서, 실리카 나노입자는 코어 내 형광 화합물을 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 20

제 13항에 있어서, 실리카 나노입자는 여기에 부착된 1개 내지 10개의 단일쇄 가변 단편을 가지는 면역컨쥬게이트.

청구항 21

제 13항에 있어서, 실리카 나노입자는 1nm 내지 15nm의 직경을 가지는 면역컨쥬게이트.

청구항 22

제 14항에 있어서, scFv가 항-VEGF-A를 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 23

제 13항에 있어서, 치료제는 화학요법 약물을 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 24

제 13항에 있어서, 치료제는 방사성동위원소를 포함하는 면역컨쥬게이트.

청구항 25

제 24항에 있어서, 방사성동위원소가 ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{67}Cu, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{166}Ho, ^{149}Pm, ^{90}Y, ^{213}Bi, ^{103}Pd, ^{109}Pd, ^{159}Gd, ^{140}La, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{165}Dy, ^{166}Dy, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{89}Zr, ^{225}Ac, 및 ^{192}Ir로 구성된 군으로부터 선택되는 구성원인 면역컨쥬게이트.

청구항 26

제 23항에 있어서, 화학요법 약물이 소라페닙, 파클리탁셀, 도세탁셀, MEK162, 에토포시드, 라파티닙, 닐로티닙, 크리조티닙, 풀베스트란트, 베무라페닙, 벡사로텐, 및 캄프토테신으로 구성된 군으로부터 선택되는 구성원인 면역컨쥬게이트.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원의 전후 참조**

[0002] 본 출원은 2015년 4월 7일에 출원된 미국 특허 일련 번호 62/144,278호 및 2015년 4월 23일에 출원된 미국 특허 일련 번호 62/151,943호의 이익을 주장하며, 이들의 전체내용은 참조로서 본원에 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로, 예를 들어, 암 및 다른 질병의 검출, 예방, 및/또는 치료에 유용한 나노입자 면역컨쥬게이트(예컨대, 20 나노미터 미만의 직경)에 관한 것이다.

[0005] **정부 기금**

[0006] 본 발명은 NIH에 의해 부여된 수여 번호 U54 CA199081-01에 따른 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

배 경 기 술

[0007] **발명의 배경**

[0008] 나노-치료 및/또는 진단용 전달 비히클은 본질적으로 치료용(예를 들어, 활성 약학 성분이 없음)이거나, 치료 또는 진단용 전달 시스템으로 기능하는 1 - 1,000 nm 크기 범위의 통상적으로 거대분자 또는 초분자 다성분 시스템이다. 현재까지, 리포솜 나노입자 및 생물제제는 광범위한 비율의 FDA-승인된 생성물 또는 다양한 암 유형을 치료 및/또는 검출하는데 사용되는 임상 시험 중인 생성물의 수를 포함하는 반면, 다수의 중합체-기반 입자 제형은 현재 초기 시험 중이다.

[0009] 나노치료용 전달 시스템을 위한 바람직한 후보는 조절된 방식으로 약물 화합물을 혼입하고 방출하는 공통된 특징을 공유하며, 이는 표적외 독성을 최소화시키면서 약물 생체이용률 및 약동학을 유리하게 변경시킬 수 있다. 이상적으로는, 질병 부위에서의 정확한 국소화 및 보유를 평가하기 위해 영상화 표지가 그 안에 혼입된다.

[0010] 그러나, 이들 시스템은 다양한 메커니즘을 이용하여 기능한다. 예를 들어, 항체 약물 컨쥬게이트(ADC)는 주로 종양 세포의 활성 표적화 및 약물 분자의 조건부 방출을 통해 약물 독성을 낮춘다. 세포 표면 항원에 결합시, 활성 약물 방출은 세포 내재화 및 엔도솜 흡수 후에 발생한다. 다른 한편으로, 더 큰 페이로드(payload)(Doxil에 대해 ~10,000 약물 분자)로 수동적으로 로딩되는 통상적으로 훨씬 더 큰 어셈블리된 복합체(~20-150 nm 직경) 또는 영상화 작용제인 리포솜 및 중합체-기반 약물 전달 시스템은 일반적으로 결핍된 표적화 능력을 갖는다(BIND-014는 예외이다). 따라서, 이들 복합체는 주로 나노-제형화된 약물의 성공적인 전달을 위해 널리 공지된 향상된 투과성 및 보유(EPR) 효과에 의존한다. 리포솜의 사이질 투과는 이들의 크기로 인해 불량할 수 있는 반면, 자유 약물은 완전히 이해되지 않은 다양한 메커니즘을 통해 방출된다. 예를 들어, 아브락산(Abraxane)(~140 nm)은 소수성 화합물의 생체이용률을 향상시키기 위해 다양한 접근법에 의존한다. 이러한 경우, 알부민 및 약물(파클리탁셀(paclitaxel))의 특정 제형이 최초 복합체를 형성하고, 이는 주입시 더 작은 단백질-약물 응집물로 분산되는 것으로 차례로 판단된다.

[0011] 전이성 질환은 면역요법으로 효과적으로 치료될 수 있다; 그러나, 상당한 하위집단은 암의 항원성 돌연변이 또

는 면역-회피 성질의 결여로 인해 반응하지 않을 것이다. 또한, 방사선 요법(RT)이 암에 대한 표준 치료이지만, 국소적인 실패가 발생한다. 전임상 자료에 따르면 RT는 면역요법의 전신 효능을 강화시킬 수 있는 반면, 선천 및 적응 면역 시스템의 활성화는 RT의 국소 효능을 향상시킬 수 있다.

[0012] 암 및 다른 질환의 검출, 예방, 및/또는 치료에 사용될 수 있는 플랫폼이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0013] **발명의 개요**

[0014] 표적화된 진단 및/또는 치료용 플랫폼을 위한 표적-특이적 나노입자 면역컨쥬게이트(예컨대, 입자 표면에 결합된 단일쇄 항체 단편)가 본원에 기재된다. 특정 구체예에서, 나노입자 면역컨쥬게이트의 직경은 20 nm 미만(예컨대, 6 내지 10 nm)이다. 이 작은 크기는 치료 및/또는 영상화 응용분야에서 이점을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 기재된 면역컨쥬게이트는 병적인 조직의 개선된 표적화 및 기관에 의한(예컨대, 간에 의한) 감소된 비특이적 흡수를 제공할 수 있다. 더 작은 면역컨쥬게이트는 또한 면역 반응성을 감소시켜, 효능을 더욱 개선시킬 수 있다.

[0015] 면역컨쥬게이트 및 치료용 방사성동위원소를 포함하는 다중-치료 플랫폼이 또한 본원에 기재된다. 특정 구체예에서, 조합된 방사선 요법 및 면역요법의 상승 효과를 위해 면역컨쥬게이트 및 치료용 방사성동위원소가 함께 전달된다. 특정 구체예에서, 항체 단편 및 치료용 방사성동위원소는 나노입자에 부착되어, 표적-특이적 나노입자 면역컨쥬게이트를 생성한다. 주어진 나노입자는 여기에 부착된 방사성핵종(방사성동위원소) 및 항체(및/또는 항체 단편) 둘 모두를 지닐 수 있다(이 경우에, 면역컨쥬게이트는 방사성면역컨쥬게이트이다). 또한, 일부 구체예에서, 투여된 나노입자의 부분은 부착된(공유적으로 또는 비공유적으로 결합된, 또는 나노입자와 달리 회합된) 방사성핵종을 갖는 반면, 투여된 다른 나노입자는 부착된 항체 단편을 갖는다. 또한, 기존의(예컨대, 전통적인) 방사선요법이 본원에 기재된 나노입자 면역컨쥬게이트의 투여와 조합되거나, 기존의(예컨대, 전통적인) 면역요법이 나노입자 방사성컨쥬게이트(결합된 방사성동위원소를 갖는 나노입자)의 투여와 조합된 조합 요법이 다양한 구체예에 포함된다.

[0016] 특정 구체예에서, 표적-특이적 나노입자 면역컨쥬게이트는 표적화 펩티드를 포함한다. 특정 구체예에서, 치료용 방사성동위원소는 표적-특이적 나노입자 면역컨쥬게이트와 별도로 전달된다(예컨대, 방사선 요법을 통해 또는 별도의 표적-특이적 나노입자에 부착됨에 의해). 특정 구체예에서, 면역요법은 표적-특이적 면역컨쥬게이트와 별도로 전달된다. 특정 구체예에서, 항체 단편은 하나의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티에 부착되고(특정 킬레이터를 통해) 방사성동위원소는 또 다른 PEG 모이어티에 부착된다(또 다른 킬레이터를 통해). 그 후 PEG 모이어티는 나노입자에 부착된다.

[0017] 한 양태에서, 본 발명은 나노입자; 및 나노입자에 컨쥬게이션된 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자의 직경(예컨대, 평균 직경)은 20 나노미터 이하이다(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다).

[0018] 특정 구체예에서, 항체 단편은 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다.

[0019] 특정 구체예에서, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG))로 코팅된다(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다).

[0020] 특정 구체예에서, 표적화 펩티드(예컨대, alphaMSH, 자연에서 면역조절성 및 항염증성인 것으로 알려진 임의의 펩티드).

[0021] 특정 구체예에서, 항체 단편은 약 5kDa 내지 약 25kDa의 범위이다(예컨대, 약 10kDa 내지 약 20kDa, 예컨대, 약 15 kDa)(예컨대, 항체 단편은 기능성 단일 도메인 항체 단편을 포함한다).

[0022] 특정 구체예에서, 항체 단편은 약 20 kDa 내지 약 45 kDa이다(예컨대, 약 25 kDa 내지 약 30 kDa)(예컨대, 항체 단편은 기능성 단일쇄 항체 단편을 포함한다).

[0023] 특정 구체예에서, 항체 단편은 약 40 kDa 내지 약 80 kDa이다(예컨대, 약 50 kDa 내지 약 70 kDa, 예컨대, 약 60 kDa)(예컨대, 항체 단편은 기능성 fab 단편을 포함한다).

[0024] 특정 구체예에서, 나노입자는 실리카를 포함한다.

[0025] 특정 구체예에서, 나노입자는 실리카-기반 코어 및 코어의 적어도 일부를 둘러싸는 실리카 쉘을 포함한다.

[0026] 특정 구체예에서, 나노입자는 형광 화합물을 코어 내에 포함한다.

[0027] 특정 구체예에서, 항체 단편은 재조합 항체 단편(fAb), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 단일 도메인 항체(sdAb) 단편으로 구성된 세트로부터 선택되는 구성원이다.

[0028] 특정 구체예에서, 항체 단편은 단일쇄 가변 단편(scFv)이다.

[0029] 특정 구체예에서, 항체 단편은 단일 도메인(sdAb) 단편이다.

[0030] 특정 구체예에서, 나노입자(단일 나노입자)는 여기에 부착된 1 내지 10개의 항체 단편을 갖는다(예컨대, 1 내지 7개, 예컨대, 1 내지 5개, 예컨대, 2 내지 7개, 예컨대, 2 내지 5개, 예컨대, 1 내지 4개, 예컨대, 2 내지 4개).

[0031] 특정 구체예에서, 항체 단편은 PEG 모이어티 및 킬레이터를 통해 나노입자에 컨쥬게이션된다.

[0032] 특정 구체예에서, 나노입자는 15 나노미터 이하(예컨대, 13 나노미터 이하, 예컨대, 10 나노미터 이하)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖는다.

[0033] 특정 구체예에서, 나노입자는 1 nm 내지 20 nm(예컨대, 2 nm 내지 15 nm, 예컨대, 5 nm 내지 15 nm, 예컨대, 1 nm 내지 10 nm, 예컨대, 2 nm 내지 10 nm, 예컨대, 5 nm 내지 10 nm) 범위의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖는다.

[0034] 특정 구체예에서, 항체 단편은 항-CEA scFv, 항-GPIIb/IIIa, 항-VEGF-A, 및 항-TNF-α(예컨대, 페길화)로 구성된 세트로부터 선택되는 구성원을 포함한다.

[0035] 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 하나 이상의 영상화 작용제(예컨대, 나노입자 내에, 나노입자에 부착된, 및/또는 항체 단편에 부착된)를 포함한다.

[0036] 특정 구체예에서, 하나 이상의 영상화 작용제는 PET 트레이서(예컨대, ^{89}Zr, ^{64}Cu, 및/또는 [^{18}F] 플루오로데옥시글루코스)를 포함한다.

[0037] 특정 구체예에서, 하나 이상의 영상화 작용제는 형광단(예컨대, 시아닌)을 포함한다.

[0038] 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 치료제(예컨대, 치료제는 나노입자, 또는 항체 단편, 또는 나노입자와 항체 단편 둘 모두에 부착되고, 예컨대, 부착은 공유적이거나 비공유적이다)를 추가로 포함한다.

[0039] 특정 구체예에서, 치료제는 화학요법 약물(예컨대, 소라페닙(sorafenib), 파클리탁셀, 도세탁셀(docetaxel), MEK162, 에토포시드(etoposide), 라파티닙(lapatinib), 닐로티닙(nilotinib), 크리조티닙(crizotinib), 풀베스트란트(fulvestrant), 베무라페닙(vemurafenib), 벡소로텐(bexorotene), 및/또는 캄프토테신(camptotecin))을 포함한다.

[0040] 특정 구체예에서, 치료제는 방사성동위원소(예컨대, 방사성동위원소는 제2 킬레이터를 통해 나노입자에 부착된다)를 포함한다(예컨대, 방사성동위원소는 치료용 방사성동위원소이다).

[0041] 특정 구체예에서, 방사성동위원소는 ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{67}Cu, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{149}Pm, ^{90}Y, ^{213}Bi, ^{103}Pd, ^{109}Pd, ^{159}Gd, ^{140}La, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{165}Dy, ^{166}Dy, ^{67}Cu, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{89}Zr, ^{225}Ac, 및 ^{192}Ir로 구성된 군으로부터 선택되는 구성원이다.

[0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체에 면역컨쥬게이트(예컨대, 암과 같은 특정 유형의 조직을 표적으로 하는)를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0043] 특정 구체예에서, 상기 방법은 치료용 방사성동위원소를 투여하는 것을 포함한다(예컨대, 치료용 방사성동위원소는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨

대, 평균 직경)을 갖는 제2 나노입자에 부착된다(예컨대, 방사성동위원소는 제2 킬레이터를 통해 제2 나노입자에 부착된다))(예컨대, 제2 나노입자는 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm의 직경을 갖는다).

[0044] 또 다른 양태에서, 본 발명은 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체에 면역컨쥬게이트(예컨대, 암과 같은 특정 유형의 조직을 표적으로 하는)를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다(예컨대, 조합된 방사선 요법 및 면역요법을 위한).

[0045] 특정 구체예에서, 약학적 조성물은 담체를 추가로 포함한다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 발명은 생체내 영상화(예컨대, 수술 중 영상화) 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체에 면역컨쥬게이트(예컨대, 면역컨쥬게이트가 특정 영역, 예컨대, 암과 같은 특정 조직 유형 내에 또는 근처에 우선적으로 모이도록)를 포함하는 조성물을 투여하고(면역컨쥬게이트는 영상화 작용제를 포함한다); (예컨대, PET, X-선, MRI, CT, 등을 통해); 영상화 작용제를 검출하는 것을 포함한다.

[0047] 또 다른 양태에서, 본 발명은 면역컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 나노입자-PEG-티올을 단백질-말레이미드와 접촉시켜, 면역컨쥬게이트를 생산하는 것을 포함한다.

[0048] 특정 구체예에서, 상기 방법은 나노입자를 하나 이상의 화합물과 반응시켜(하나 이상의 화합물은 티올 모이어티 및 아민 모이어티(예컨대, 시스테인 메틸 에스테르 또는 시스테아민-HCl)를 포함한다), 나노입자-PEG-아민을 생산하고; 나노입자-PEG-아민을 SPDP와 반응시킨 다음, 생성물로부터 피리딘 2-티온을 제거하여(예컨대, TCEP 이용), 나노입자-PEG-티올을 생산하는 것을 추가로 포함한다.

[0049] 또 다른 양태에서, 본 발명은 면역컨쥬게이트를 제조하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 항체 단편(단백질)을 제1 클릭 반응성 기(click reactive group)(예컨대, 메틸테트라진-PEG4-NHS 에스테르)로 변형시키고; 나노입자-PEG-아민을 제1 클릭 반응성 기의 클릭 파트너(예컨대, TCO-PEG4-NHS 에스테르)로 변형시키고; 변형된 항체 단편을 변형된 나노입자-PEG와 반응시켜, 면역컨쥬게이트를 생산하는 것을 포함한다.

[0050] 특정 구체예에서, 상기 방법은 나노입자를 하나 이상의 화합물과 반응시켜(하나 이상의 화합물은 티올 모이어티 및 아민 모이어티(예컨대, 시스테인 메틸 에스테르 또는 시스테아민-HCl)를 포함한다), 나노입자-PEG-아민을 생산하는 것을 추가로 포함한다.

[0051] 또 다른 양태에서, 본 발명은 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체에 나노입자; 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 치료용 방사성동위원소를 포함하는 조성물(예컨대, 약학적 조성물)을 투여하는 것을 포함하고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖는다(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 암과 같은 특정 유형의 조직을 표적으로 함).

[0052] 특정 구체예에서, 상기 방법은 면역요법을 투여하는 것을 포함한다(예컨대, 면역요법은 대상체에 면역컨쥬게이트를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다).

[0053] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 나노입자; 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖고(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG))로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다), 상기 치료는 면역컨쥬게이트를 대상체에 전달하고; 치료용 방사성동위원소(예컨대, 치료용 방사성동위원소는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖는 제2 나노입자에 부착된다(예컨대, 방사성동위원소는 제2 킬레이터를 통해 제2

나노입자에 부착된다))를 전달하는 것을 포함한다.

[0054] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 나노입자; 치료용 방사성동위원소(예컨대, 방사성동위원소는 제2 킬레이터를 통해 나노입자에 부착된다)(예컨대, 방사성동위원소는 치료용 방사성동위원소이다); 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖고(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG))로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다), 상기 치료는 면역컨쥬게이트를 대상체에 전달하는 것을 포함한다.

[0055] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 질환 또는 병태의 생체내 진단 방법에 사용하기 위한 나노입자; 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖고(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG))로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다), 면역컨쥬게이트는 영상화 작용제를 포함하며, 생체내 진단은 면역컨쥬게이트를 대상체에 전달하고; 영상화 작용제를 검출하는 것을 포함한다(예컨대, PET, X-선, MRI, CT, 등을 통해).

[0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하는 방법 또는 (b) 대상체에서 질환 또는 병태의 생체내 진단 방법에 사용하기 위한 나노입자; 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖고(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG))로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다), 면역컨쥬게이트는 영상화 작용제를 포함하고, 상기 방법은 대상체에 면역컨쥬게이트(예컨대, 암과 같은 특정 유형의 조직을 표적으로 하는)를 포함하는 약학적 조성물을 투여하고; 선택적으로, 영상화 작용제를 검출하는 것을 포함한다(예컨대, PET, X-선, MRI, CT, 등을 통해).

[0057] 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료에 사용하기 위한 나노입자; 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖는다(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG))로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다).

[0058] 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료에 사용하기 위한 나노입자; 치료용 방사성동위원소(예컨대, 방사성동위원소는 제2 킬레이터를 통해 나노입자에 부착된다)(예컨대, 방사성동위원소는 치료용 방사성동위원소이다); 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공

유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖는다(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다).

[0059] 또 다른 양태에서, 본 발명은 생체내 진단에 사용하기 위한 나노입자; 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 항체 단편을 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖고(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 50 nm 이하, 예컨대, 40 nm 이하, 예컨대, 30 nm 이하, 예컨대, 20 nm 이하, 예컨대, 15 nm 이하, 예컨대, 10 nm 이하의 평균 직경을 갖는다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG))로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터를 포함한다), 면역컨쥬게이트는 영상화 작용제를 포함한다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 나노입자; 및 나노입자에 컨쥬게이션된(예컨대, 링커를 통해 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합되거나 나노입자에 공유적으로 또는 비공유적으로 직접 결합되거나, 예컨대, 반 데르 발스력을 통해 나노입자 또는 나노입자를 둘러싼 조성물과 회합된다) 치료용 방사성동위원소를 포함하는 조성물(예컨대, 약학적 조성물)에 관한 것이고, 나노입자는 20 나노미터 이하(예컨대, 수용액, 예컨대, 염수 용액에서 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정시)의 직경(예컨대, 평균 직경)을 갖고(예컨대, 평균 나노입자 직경은 1 내지 20 nm, 예컨대, 1 내지 15 nm, 예컨대, 1 내지 10 nm, 예컨대, 1 내지 8 nm, 예컨대, 4 내지 10 nm, 예컨대, 4 내지 8 nm이다)(예컨대, 나노입자는 유기 중합체(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG))로 코팅된다)(예컨대, 면역컨쥬게이트는 킬레이터)를 포함한다), 상기 치료는 조성물을 대상체에 전달하고; 면역요법을 전달하는 것을 포함한다(예컨대, 면역요법은 대상체에 면역컨쥬게이트를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다).

[0061] 본 발명의 한 양태(예컨대, 방법)를 포함하는 구체예의 요소는 본 발명의 다른 양태(예컨대, 시스템)를 포함하는 구체예에 적용될 수 있으며, 그 반대일 수도 있다.

[0062] **정의**

[0063] 본 발명의 개시가 더욱 용이하게 이해되도록 하기 위해, 특정 용어가 먼저 하기에서 정의된다. 하기 용어 및 다른 용어에 대한 추가 정의는 명세서 전체에 걸쳐 기재되어 있다.

[0064] 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본 출원에서 사용되는 용어 "-들을 포함하다" 및 이러한 용어의 변형, 예를 들어, "-들을 포함하는" 및 "-을 포함하다"는 다른 부가물, 성분, 정수 또는 단계를 배제하고자 하는 것이 아니다. 본 출원에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 동등하게 사용된다. 약/대략을 갖거나 갖지 않는 본 출원에서 사용되는 임의의 숫자는 관련 분야의 당업자에 의해 인지되는 임의의 일반적인 변동을 포함하는 것을 의미한다. 특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 문맥으로부터 달리 언급되거나 달리 명백하지 않는 한 언급된 참조 값의 어느 한 방향(초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내에 해당하는 값의 범위를 나타낸다(상기 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 예외이다).

[0065] ***"투여":*** 용어 "투여"는 물질을 대상체로 도입시키는 것을 나타낸다. 일반적으로, 예를 들어, 비경구(예를 들어, 정맥내), 경구, 국소, 피하, 복막, 동맥내, 흡입, 질, 직장, 비, 뇌척수액으로의 도입, 또는 신체 구획으로의 점적주입을 포함하는 임의의 경로의 투여가 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 투여는 경구 투여이다. 추가로 또는 대안적으로, 특정 구체예에서, 투여는 비경구 투여이다. 특정 구체예에서, 투여는 정맥내 투여이다.

[0066] ***"항체":*** 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 특정 표적 항원에 특이적인 결합을 부여하기에 충분한 정규 면역글로불린 서열 요소를 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 자연에서 생산된 무손상 항체는 일반적으로 "Y-형" 구조

로 불리는 서로 회합된 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드(각각 약 50 kD) 및 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드(각각 약 25 kD)로 구성된 약 150 kD의 사합체 작용제이다. 각 중쇄는 적어도 4개의 도메인(각각 약 110개 아미노산 길이) - 아미노-말단 가변(VH) 도메인(Y 구조의 끝에 위치함)에 이어 3개의 불변 도메인: CH_1, CH_2, 및 카르복시-말단 CH_3(Y의 줄기 밑에 위치함)으로 구성된다. "스위치"로서 알려진 짧은 영역은 중쇄 가변과 불변 영역을 연결한다. "힌지"는 CH_2 및 CH_3 도메인을 항체의 나머지에 연결한다. 이러한 힌지 영역의 2개의 디설파이드 결합은 무손상 항체에서 2개의 중쇄 폴리펩티드를 다른 하나에 연결한다. 각 경쇄는 다른 "스위치"에 의해 서로 분리된, 2개의 도메인 - 아미노-말단 가변(VL) 도메인에 이어 카르복시-말단 불변(CL) 도메인으로 구성된다. 무손상 항체 사합체는 2개의 중쇄-경쇄 이합체로 구성되고, 여기서 중쇄 및 경쇄는 단일 디설파이드 결합에 의해 서로 연결되고; 2개의 다른 디설파이드 결합은 중쇄 힌지 영역을 서로 연결하여, 이합체가 서로 연결되어 사합체가 형성된다. 자연-생산된 항체는 또한 전형적으로 CH_2 도메인 상에서 당화된다. 자연 항체의 각 도메인은 압축된 역평행 베타 배럴에서 서로에 대해 패킹된 2개의 베타 시트(예컨대, 3-, 4-, 또는 5-가닥 시트)로부터 형성된 "면역글로불린 폴드"를 특징으로 하는 구조를 갖는다. 각 가변 도메인은 "보체 결정 영역"으로 공지된 3개의 과가변 루프(CDR1, CDR2, 및 CDR3) 및 4개의 다소 불변인 "프레임워크" 영역(FR1, FR2, FR3, 및 FR4)을 함유한다. 자연 항체가 접힐 때, FR 영역은 도메인에 대한 구조적 프레임워크를 제공하는 베타 시트를 형성하고, 중쇄 및 경쇄 둘 모두로부터의 CDR 루프 영역은 3차원 공간에 함께 모여, Y 구조의 끝에 위치한 단일 과가변 항원 결합 부위를 형성한다. 자연-발생 항체의 Fc 영역은 보체 시스템의 요소에 결합하고, 또한, 예를 들어 세포 독성을 매개하는 이펙터 세포를 포함하는 이펙터 세포 상의 수용체에 결합한다. Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 친화도 및/또는 다른 결합 속성은 당화 또는 다른 변형을 통해 조절될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명에 따라 생산되고/거나 활용되는 항체는 당화된 Fc 도메인, 예를 들어, 변형되거나 공학처리된 그러한 당화를 지닌 Fc 도메인을 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, 특정 구체예에서, 자연 항체에서 발견되는 충분한 면역글로불린 도메인 서열을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 복합체는, 그러한 폴리펩티드가 자연적으로 생산되든지(예컨대, 항원에 반응하는 유기체에 의해 생성됨), 또는 재조합 공학처리, 화학적 합성, 또는 다른 인공 시스템 또는 방법에 의해 생산되든지 간에, "항체"로서 지칭되고/거나 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 항체는 폴리클로날이다; 특정 구체예에서, 항체는 모노클로날이다. 특정 구체예에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류, 또는 인간 항체의 특징인 불변 영역 서열을 갖는다. 특정 구체예에서, 항체 서열 요소는 당 분야에 공지된 대로 인간화, 영장류화, 키메라, 등이다. 또한, 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 적절한 구체예에서 (달리 언급되지 않거나 문맥상 명확하지 않다면) 대안적인 제시로 항체 구조적 및 기능적 특징을 이용하기 위한 당 분야-공지되거나 개발된 임의의 작제물 또는 포맷을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 구체예에서, 본 발명에 따라 활용된 항체는, 비제한적으로, 무손상 IgG, IgE 및 IgM, 이중- 또는 다중-특이적 항체(예컨대, Zybodies®, 등), 단일쇄 Fv, 폴리펩티드-Fc 융합체, Fab, 카멜로이드(cameloid) 항체, 차폐된 항체(예컨대, Probodies®), 소형 모듈의 면역약제("SMIPs™"), 단일쇄 또는 일렬 디아보디(TandAb®), VHH, Anticalins®, Nanobodies®, 미니보디, BiTE®, 앙키린 반복 단백질 또는 DARPINs®, Avimers®, DART, TCR-유사 항체, Adnectins®, Affilins®, Trans-bodies®, Affibodies®, TrimerX®, 세균단백질(MicroProtein), Fynomers®, Centyrins®, 및 KALBITOR®로부터 선택되는 포맷이다. 특정 구체예에서, 항체는 자연적으로 생산될 경우 지닐 공유 변형(예컨대, 글리칸의 부착)이 결여될 수 있다. 특정 구체예에서, 항체는 공유 변형을 함유할 수 있다(예컨대, 글리칸, 페이로드[예컨대, 검출 가능한 모이어티, 치료용 모이어티, 촉매적 모이어티, 등], 또는 다른 펜던트기[예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 등]의 부착).

[0067] ***"항체 단편":*** 본원에서 사용되는 "항체 단편"은 무손상 항체의 부분, 예컨대, 예를 들어, 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 Fv 단편; 트리아보디; 테트라보디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 예를 들어, 항체 단편은 분리된 단편, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역으로 구성된 "Fv" 단편, 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 펩티드 링커에 의해 연결된 재조합 단일쇄 폴리펩티드 분자("ScFv 단백질"), 및 과가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 구성된 최소 인지 단위를 포함한다. 많은 구체예에서, 항체 단편은 부모 항체의 충분한 서열을 함유하고 이는 부모 항체와 동일한 항원에 결합하는 단편이다; 특정 구체예에서, 단편은 부모 항체와 유사한 친화도로 항원에 결합하고/거나 항원과의 결합에 대해 부모 항체와 경쟁한다. 항체의 단편에 결합하는 항원의 예는, 비제한적으로, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, scFv 단편, Fv 단편, dsFv 디아보디, dAb 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 및 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 영역을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은 임의의 수단으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체의 항원 결합 단편은 무손상 항체의 단편화에 의해 효소적으로 또는 화학적으로 생산될 수 있고/거나 부분적 항체 서열을 인코딩하는 유전자로부터 재조합적으로 생산될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체의

항원 결합 단편은 전체적으로 또는 부분적으로 합성에 의해 생산될 수 있다. 항체의 항원 결합 단편은 단일쇄 항체 단편을 선택적으로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체의 항원 결합 단편은, 예를 들어, 디설파이드 결합에 의해 함께 연결되는 다중 사슬을 포함할 수 있다. 항체의 항원 결합 단편은 다분자 복합체를 선택적으로 포함할 수 있다. 기능성 단일 도메인 항체 단편은 약 5 kDa 내지 약 25 kDa의 범위, 예컨대, 약 10 kDa 내지 약 20 kDa, 예컨대, 약 15 kDa이고; 기능성 단일쇄 단편은 약 10 kDa 내지 약 50 kDa, 예컨대, 약 20 kDa 내지 약 45 kDa, 예컨대, 약 25 kDa 내지 약 30 kDa이고; 기능성 fab 단편은 약 40 kDa 내지 약 80 kDa, 예컨대, 약 50 kDa 내지 약 70 kDa, 예컨대, 약 60 kDa이다.

[0068] ***"회합된":*** 본원에서 사용되는 용어 "회합된"은 통상적으로 2개 이상의 존재물이 직접적 또는 간접적(예를 들어, 연결 작용제로서 작용하는 하나 이상의 추가의 존재물을 통함)으로 서로 물리적으로 근접하여 적절한 조건, 예를 들어, 생리학적 조건하에서 물리적으로 근접한 채로 존재물이 남아 있도록 하기에 충분히 안정적인 구조를 형성하는 것을 나타낸다. 특정 구체예에서, 회합된 모이어티는 서로 공유적으로 연결된다. 특정 구체예에서, 회합된 존재물은 비공유적으로 연결된다. 특정 구체예에서, 회합된 존재물은 특정한 비공유적 상호작용에 의해(예컨대, 예를 들어, 스트렙타비딘/아비딘 상호작용, 항체/항원 상호작용 등과 같이 상호작용 파트너와 사용 환경에 존재하는 다른 존재물 사이를 구별하는 상호작용 리간드 사이의 상호작용에 의해) 서로 연결된다. 대안적으로 또는 추가로, 충분한 수의 보다 약한 비공유적 상호작용은 모이어티가 회합된 채로 유지되도록 하기에 충분한 안정성을 제공할 수 있다. 예시적인 비공유적 상호작용은 정전기적 상호작용, 수소 결합, 친화성, 금속 배위 결합, 물리적 흡착, 주인-손님 상호작용(host-guest interaction), 소수성 상호작용, pi 스태킹(stacking) 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 자기 상호작용, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0069] ***"생체적합성":*** 본원에서 사용되는 용어 "생체적합성"은 생체내에서 실질적인 해로운 반응을 유발하지 않는 물질을 기재하기 위한 것이다. 특정 구체예에서, 물질은 세포에 대해 독성인 아닌 경우에 "생체적합성"이다. 특정 구체예에서, 물질은 시험관 내에서 이들의 세포에 대한 첨가가 20% 이하의 세포 사멸을 발생시키고/시키거나, 생체내에서의 이들의 투여가 염증 또는 다른 유해 효과를 유도하지 않는 경우에 "생체적합성"이다. 특정 구체예에서, 물질은 생물분해성이다.

[0070] ***"생물분해 가능한":*** 본원에서 사용되는 "생물분해 가능한" 물질은 세포로 도입되는 경우 세포 기구(예를 들어, 효소적 분해)에 의해서나, 세포에 대한 유의한 독성 효과 없이 세포가 재사용하거나 배치할 수 있는 성분으로의 가수분해에 의해 분해되는 물질이다. 특정 구체예에서, 생물분해 가능한 물질의 분해에 의해 생성된 성분은 생체내에서 염증 및/또는 다른 유해 효과를 유도하지 않는다. 특정 구체예에서, 생물분해 가능한 물질은 효소적으로 분해된다. 대안적으로 또는 추가로, 특정 구체예에서, 생물분해 가능한 물질은 가수분해에 의해 분해된다. 특정 구체예에서, 생물분해 가능한 중합체 물질은 이들의 성분 중합체로 분해된다. 특정 구체예에서, 생물분해 가능한 물질(예를 들어, 생물분해 가능한 중합체 물질을 포함함)의 분해는 에스테르 결합의 가수분해를 포함한다. 특정 구체예에서, 물질(예를 들어, 생물분해 가능한 중합체 물질을 포함함)의 분해는 우레탄 결합의 분해를 포함한다.

[0071] ***"담체":*** 본원에서 사용되는 "담체"는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 애쥬번트, 부형제, 또는 비히클을 나타낸다. 상기 약학적 담체는 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 오일, 예를 들어, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 낙화생유, 대두유, 광유, 참기름 등일 수 있다. 물 또는 수용액 염수 용액 및 덱스트로스 및 글리세롤 수용액이 바람직하게는, 특히 주사 용액용 담체로 사용된다. 적합한 약학적 담체는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기재되어 있다.

[0072] ***"영상화 작용제":*** 본원에서 사용되는 용어 "영상화 작용제"는 이에 연결되는 작용제(예를 들어, 다당류 나노입자)의 검출을 촉진하는 임의의 요소, 분자, 작용기, 화합물, 이들의 단편, 또는 모이어티를 나타낸다. 영상화 작용제의 예는 다양한 리간드, 방사선핵종(예를 들어, ^{3}H, ^{14}C, ^{18}F, ^{19}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{135}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{131}I, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{187}Re, ^{111}In, ^{90}Y, ^{99m}Tc, ^{177}Lu, ^{89}Zr 등), 형광 염료(특정한 예시적 형광 염료에 대함, 하기 참조), 화학발광 작용제(예를 들어, 아크리디늄 에스테르, 안정화된 디옥세탄, 등), 생물발광 작용제, 스펙트럼적으로 분해 가능한 무기 형광 반도체 나노크리스탈(즉, 양자점), 금속 나노입자(예를 들어, 금, 은, 구리, 백금, 등) 나노클러스터, 상자성 금속 이온, 효소(효소의 특정 예에 대함, 하기 참조), 비색 표지(예를 들어, 염료, 콜로이드성 금, 등), 비오틴, 디옥시게닌, 합텐, 및 항혈청 또는 모노클로날 항체가 이용 가능한 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 방사선핵종은, 예를 들어, 클릭 화학을 통해 부착될 수 있다.

[0073] ***"단백질":*** 본원에서 사용되는 용어 "단백질"은 폴리펩티드를 나타낸다(즉, 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 적

어도 3-5개 아미노산의 스트링). 단백질은 아미노산 이외의 모이어티(예컨대, 당단백질, 프로테오글리칸, 등일 수 있다)를 포함할 수 있고/거나 달리 처리되거나 변형될 수 있다. 특정 구체예에서 "단백질"은 세포에 의해 생산되고/거나 세포에서 활성인 완전한 폴리펩티드일 수 있다(신호 서열이 있거나 없음); 특정 구체예에서, "단백질"은 세포에 의해 생산되고/거나 세포에서 활성인 폴리펩티드와 같이 특징적인 부분이거나 이들을 포함한다. 특정 구체예에서, 단백질은 하나를 초과하는 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬은 하나 이상의 디설파이드 결합에 의해 연결되거나 다른 수단에 의해 회합될 수 있다. 특정 구체예에서, 본원에 기재된 단백질 또는 폴리펩티드는 L-아미노산, D-아미노산, 또는 둘 모두를 함유할 수 있고/거나 당 분야에 공지된 임의의 다양한 아미노산 변형 또는 유사체를 함유할 수 있다. 유용한 변형으로는, 예컨대, 말단 아세틸화, 아미드화, 메틸화, 등이 있다. 특정 구체예에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 자연 아미노산, 비-자연 아미노산, 합성 아미노산, 및/또는 이의 조합물을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 단백질은 항체, 항체 폴리펩티드, 항체 단편, 이의 생물학적 활성 단편, 및/또는 이의 특징적인 부분이거나 이를 포함한다.

[0074] ***"약학적 조성물":*** 본원에서 사용되는 용어 "약학적 조성물"은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체와 함께 제형화된 활성제를 나타낸다. 특정 구체예에서, 활성제는 적절한 집단에 투여될 때 소정의 치료 효과를 달성할 수 있는 통계적으로 유의한 확률을 보여주는 투여에 적합한 단위 투여량으로 치료 요법에 존재한다. 특정 구체예에서, 약학적 조성물은 하기에 적합화된 것들을 포함하여, 고체 또는 액체 형태로의 투여를 위해 특별히 제형화될 수 있다: 경구 투여, 예를 들어, 드렌치(drenches)(수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예컨대, 협측, 설하, 및 전신 흡수를 위해 표적화된 것들, 볼루스, 분말, 과립, 혀에 적용하기 위한 페이스트; 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액, 또는 서방성 제형과 같이, 예를 들어, 피하, 근내, 정맥내 또는 경막외 주입에 의한 비경구 투여; 예를 들어, 피부, 폐, 또는 구강에 적용되는 크림, 연고, 또는 제어된-방출 패치 또는 스프레이와 같은 국소 적용; 예를 들어, 페서리, 크림, 또는 포움과 같이 질내 또는 직장내; 설하; 안내; 경피; 또는 비내, 폐, 및 다른 점막 표면으로.

[0075] ***"실질적으로":*** 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로", 및 문법적 동의어는 관심 특성 또는 특징의 전체 또는 거의-전체 한도 또는 정도를 나타내는 정성적인 조건을 나타낸다. 당업자는 생물학적 및 화학적 현상이, 비록 있다 해도, 거의 완료되지 않고/거나 완결에 이르지 못하거나 절대적 결과를 달성하거나 회피함을 이해할 것이다.

[0076] ***"대상체"***: 본원에서 사용되는 용어 "대상체"는 인간 및 포유동물(예를 들어, 마우스, 래트, 돼지, 고양이, 개, 및 말)을 포함한다. 많은 구체예에서, 대상체는 포유동물, 특히 영장류, 특히 인간이다. 특정 구체예에서, 대상체는 가축, 예를 들어, 축우, 양, 염소, 소, 돼지, 등; 가금, 예를 들어, 닭, 오리, 거위, 칠면조, 등; 및 길들여진 동물, 특히 애완동물, 예를 들어, 개 및 고양이이다. 특정 구체예에서(예를 들어, 특히 연구 상황에서), 대상체 포유동물은, 예를 들어, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터), 토끼, 영장류, 또는 돼지, 예를 들어, 순계교배 돼지, 등일 것이다.

[0077] "***치료제***": 본원에서 사용되는 구 "치료제"는 대상체에 투여되는 경우 치료적 효과를 갖고/갖거나 바람직한 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 유발하는 임의의 작용제를 나타낸다.

[0078] ***"치료적 유효량":*** 본원에서 사용될 때, 이는 투여시 요망되는 효과를 생성하는 양을 의미한다. 특정 구체예에서, 상기 용어는 치료용 투약 요법에 따라 질환, 장애 및/또는 병태로 고통받거나 취약한 집단에 투여될 때 질환, 장애 및/또는 병태를 치료하기에 충분한 양을 나타낸다. 특정 구체예에서, 치료적 유효량은 질환, 장애, 및/또는 병태의 하나 이상의 증상의 발생 및/또는 중증도를 감소시키고/거나 발병을 지연시키는 것이다. 당업자는 "*치료적 유효량*"이라는 용어가 실제로 특정 개체에서 성공적인 치료를 달성할 것을 요구하지 않음을 이해할 것이다. 오히려, 치료적 유효량은 그러한 치료를 필요로 하는 환자에 투여시 상당한 수의 대상체에서 요망되는 특정 약리학적 반응을 제공하는 양일 수 있다. 특정 구체예에서, 치료적 유효량에 대한 언급은 하나 이상의 특수한 조직(예컨대, 질환, 장애 또는 병태의 영향을 받은 조직) 또는 유체(예컨대, 혈액, 타액, 혈청, 땀, 눈물, 소변, 등)에서 측정된 양에 대한 언급일 수 있다. 당업자는, 특정 구체예에서, 치료적 유효량의 특정 작용제 또는 요법이 단일 용량으로 제형화되고/거나 투여될 수 있음을 이해할 것이다. 특정 구체예에서, 치료적으로 효과적인 작용제는, 예를 들어, 투약 요법의 일부로서, 복수의 용량으로 제형화되고/거나 투여될 수 있다.

[0079] ***"치료":*** 본원에서 사용되는 용어 "치료"(또는 "치료하다" 또는 "치료하는")는 특정 질병, 장애, 및/또는 질환의 하나 이상의 증상, 특징, 및/또는 원인을 부분적으로 또는 완전히 완화시키고/시키거나, 개선시키고/시키거나, 경감시키고/시키거나, 억제하고/하거나, 이들의 발병을 지연시키고/시키거나, 이들의 중증도를 감소시키고/시키거나, 이들의 발병률을 감소시키는 물질의 임의의 투여를 나타낸다. 상기 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환의 징후를 나타내지 않는 대상체 및/또는 질병, 장애, 및/또는 질환의 단지 초기 징후만 나타낸 대상체의 치

료일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 상기 치료는 관련 질병, 장애 및/또는 질환의 하나 이상의 확립된 징후를 나타내는 대상체의 치료일 수 있다. 특정 구체예에서, 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환으로 고통받는 것으로 진단된 대상체의 치료일 수 있다. 특정 구체예에서, 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환의 증가된 발생 위험과 통계적으로 관련된 하나 이상의 민감성 인자를 갖는 것으로 공지된 대상체의 치료일 수 있다.

[0080] 도면은 제한이 아닌 설명의 목적으로 본원에 제시된다.

도면의 간단한 설명

[0081] **도면의 간단한 설명**

본 발명의 개시의 상기 및 다른 목적, 양태, 특징 및 장점은 수반되는 도면과 함께 취해지는 하기 설명을 참조함으로써 더욱 명백해지고 더 잘 이해될 것이다:

도 1은 킬레이터-기반 방사성표지 기술을 이용하여 ^{89}Zr-표지된 C' dot 방사성면역컨쥬게이트의 합성을 보여주는 개략도를 도시한다. 페길화 및 말레이미드-작용기화된 C' dot (C' dot-PEG-Mal, 1)를 먼저 추적 바이오컨쥬게이트용 -NH_2 기를 도입하기 위해 환원된 글루타티온(GSH)과 반응시켜, C' dot-PEG-GSH (2)를 형성하였다. 그 후, 나노입자를 DBCO-PEG4-NHS 에스테르 및 DFO-NCS와 컨쥬게이션시켜, 각각 C' dot-PEG-DBCO (3) 및 DFO-C' dot-PEG-DBCO (4)를 형성하였다. 아지드-작용기화된 소형 표적화 리간드, 예컨대, 단일쇄 가변 단편(scFv-아지드)(또는 단일-도메인 항체, sdAb-아지드)을 변형-촉진된 아지드-알킨 고리화첨가반응에 기반하여 나노입자에 컨쥬게이션시켜, DFO-C' dot-PEG-scFv (5)를 형성하였다. 이를 ^{89}Zr-옥살레이트로 표지시켜 최종 C' dot 방사성면역컨쥬게이트(^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG-scFv, 6)를 얻었다. 도 1에 예시된 구체예는 scFv에 한정되지 않고 다양한 유형의 항체 단편, 예컨대, sdAb를 포함할 수 있다.

도 2A 및 2B는 건강한 누드 마우스에서 상이한 주입 후 시점(10분, 1 h, 1일, 3일 및 6일)에 ^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG의 생체내(도 2A) 관상 및 (도 2B) 시상 PET 이미지를 보여준다. C' dot-PEG-Mal 및 GSH 사이의 반응 비는 1:20으로 유지되었다. PET 이미지는 Focus 120 MicroPET 스캐너를 사용하여 획득하였다.

도 3은 건강한 누드 마우스에서 6일에 ^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG의 생체분포 데이터를 보여준다. 2 %ID/g 미만의 골(및 관절) 흡수가 관찰되었다.

도 4A 및 4B는 킬레이터-비함유 ^{89}Zr 방사성표지 실험예를 보여준다.

도 4A는 다양한 pH 조건하에서 75℃에서 C' dot-PEG-Mal의 ^{89}Zr 표지화 수율을 도시한다.

도 4B는 다양한 조합의 C' dot 대 ^{89}Zr-옥살레이트 비를 이용한 C' dot-PEG-Mal의 ^{89}Zr 표지화 수율을 도시한다.

도 5A 및 5B는 건강한 누드 마우스에서 상이한 주입 후 시점(10분, 1일, 3일 및 6일)에 [^{89}Zr]C' dot-PEG의 생체내 관상 PET 이미지를 보여준다. [^{89}Zr]C' dot-PEG는 킬레이터-비함유 방사성표지 기술을 이용하여 합성되었다. PET 이미지는 Focus 120 MicroPET 스캐너를 사용하여 획득하였다.

도 5A는 EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 없이 획득한 PET 이미지를 보여준다.

도 5B는 EDTA와 함께 획득한 PET 이미지를 보여준다.

도 6은 건강한 누드 마우스에서(n=3) 7일에 [^{89}Zr]C' dot-PEG의 생체분포 데이터를 보여준다. 10 %ID/g 초과의 골(및 관절) 흡수가 이 경우에 관찰되었는데, 이는 킬레이터-비함유 방법을 이용한 덜 안정한 방사성표지를 나타낸다(킬레이터-기반 방법에 비해).

도 7은 주입 후 48 h에 건강한 누드 마우스에서 ^{89}Zr-DFO-C' dot, ^{89}Zr-DFO-C' dot-DBCO 및 ^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG-sdAb의 생체분포 데이터를 보여준다. 각 C' dot로부터 DFO, DBCO 및 sdAb의 수를 최적화함에 의해 개선된 약동학적 프로파일(연장된 혈액 순환 반감기 및 낮은 간 흡수를 지님)이 달성될 수 있다.

도 8은 티올-말레이미드 화학의 예시적인 도식을 보여준다.

도 9는 알켄-테트라진 화학의 예시적인 도식을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] **상세한 설명**

[0083] 설명 전체에 걸쳐, 조성물이 특정 성분을 갖거나, 함유하거나, 포함하는 것으로 기재되거나, 방법이 특정 단계를 갖거나, 함유하거나, 포함하는 것으로 기재되는 경우, 언급된 성분으로 필수적으로 구성되거나, 언급된 성분으로 구성되는 본 발명의 조성물, 및 언급된 처리 단계로 필수적으로 구성되거나, 언급된 처리 단계로 구성되는 본 발명에 따른 방법이 추가로 존재하는 것으로 간주된다.

[0084] 단계의 순서 또는 특정 작용을 수행하기 위한 순서는 본 발명이 실시 가능한 한 중요하지 않음이 이해되어야 한다. 또한, 2개 이상의 단계 또는 작용이 동시에 수행될 수 있다.

[0085] 예를 들어, 배경 섹션에서의 임의의 간행물의 본원의 언급은 상기 간행물이 본원에 제시된 청구범위 중 임의의 청구범위에 대한 선행 기술로서의 역할을 함을 인정하는 것이 아니다. 배경 섹션은 명확성을 목적으로 제시되며, 임의의 청구범위와 관련된 선행 기술의 설명을 의미하지 않는다.

[0086] 분자 치료제(예컨대, 항체)는 면역 체크포인트를 조작함에 의해 항종양 활성을 향해 면역 시스템을 조절할 수 있다(예컨대, 모노클로날 항체 이필리무맙은 면역 시스템의 기능을 억제하는 음성 조절 분자인 CTLA4를 억제한다). 그 근거는 기존의, 그러나 휴면의 항종양 면역 반응을 유발시키는 것이다. 다른 분자 및 경로는 면역 스위치로서 작용하였다. T 세포에서 발현되는 또 다른 음성 조절 수용체인 PD-1이 또한 표적화되었다. 단일 면역 체크포인트를 스위치시키는 것은 항종양 반응을 유도하는데 충분하지 않을 수 있는데, 이는 PD-1 또는 CTLA4와 같은 단일 면역 조절 체크포인트를 표적화한 실패의 일부를 설명한다. 그러나, 어떤 이론에 구속되길 바라지 않으며, 치료는, 일부 경우에, 면역조절 특성을 갖는 것으로 여겨지는 RT의 첨가에 의해 강화될 수 있다. 이러한 경우에, RT 치료 지역 외부의 종양은 RT에 의해 야기된 추정상 전신 염증 또는 면역 반응의 결과로서 감소되는 것으로 밝혀졌는데, 이는 방사선이 전신 항종양 면역 반응을 일으킬 가능성을 강조한다. 면역 활성을 증대시키는 것은 또한 RT의 국소 효과를 강화시킬 수 있다.

[0087] 이러한 면역컨쥬게이트의 농도만을 높임에 의해, 질병이 치료될 수 있다. 추가로 질병을 치료하기 위해 치료용 방사성표지가 또한 추가될 수 있다. 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 치료용 방사성표지없이 고농도의 치료제로서 작용된다. 특정 구체예에서, 방사성표지는 올인원 다중-치료 플랫폼에서 동일한 나노입자에 부착된다. 대안적으로, 치료용 방사성동위원소는 독립적으로 투여될 수 있다.

[0088] 표적화된 진단 및/또는 치료용 플랫폼을 위한 표적-특이적 나노입자 면역컨쥬게이트(예컨대, 입자 표면에 결합된 단일쇄 항체 단편)가 본원에 기재된다. 특정 구체예에서, 나노입자 면역컨쥬게이트는 20 nm 미만(예컨대, 6 내지 10 nm)의 직경이다. 이렇게 작은 크기는 치료용 및/또는 영상화 응용에서 이점을 제공하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 기재된 면역컨쥬게이트는 병적인 조직의 개선된 표적화 및 기관에 의한(예컨대, 간에 의한) 감소된 비특이적 흡수를 제공할 수 있다. 더 작은 면역컨쥬게이트는 또한 감소된 면역 반응성을 나타내어, 효능을 더욱 개선시킬 수 있다.

[0089] 특정 구체예에서, 나노입자는 실리카, 중합체(예컨대, 폴리(락틱-코-글리콜산)(PLGA)), 및/또는 금속(예컨대, 금, 철)을 포함한다.

[0090] 특정 구체예에서, 실리카-기반 나노입자 플랫폼은 초소형 나노입자 또는 일정 범위의 모듈형 기능과 함께 10 nm 아래 범위까지 조절 가능한 직경을 갖는 형광의 오르가노-실리카 코어 껍질 입자인 "C dots"를 포함한다. C dots는 미국 특허 번호 8298677 B2호 "Fluorescent silica-based nanoparticles", 미국 공개 번호 2013/0039848 A1호 "Fluorescent silica-based nanoparticles", 및 미국 공개 번호 US 2014/0248210 A1호 "Multimodal silica-based nanoparticles"에 기재되어 있으며, 이들의 전체내용은 참조로서 본원에 포함된다. 별개의 광학 특성을 제공하는 근적외선 염료 분자, 예를 들어, Cy5.5가 코어의 실리카 매트릭스에 혼입된다. 코어를 둘러싸는 것은 실리카의 층 또는 껍질이다. 실리카 표면은 수성 및 생물학적 관련 조건에서 안정성을 향상시키기 위해 실릴-폴리에틸렌 글리콜(PEG) 기로 공유적으로 변형된다. 이들 입자는 생체내에서 평가되었고, 대부분 이들의 크기 및 비활성 표면으로 인해 우수한 청소 특성을 나타낸다. C dots로 혼입되는 추가 기능은 외과적 적용을 위한 림프절 시각화, 및 암에서의 흑색종 검출에서의 사용을 가능케 하는 화학 감지의 비-광학적(PET) 이미지 대조 및 시험관내/생체내 표적화 능력이다.

[0091] C dots는 알콜-기반 변형된 Stober 공정을 통해 합성된다. C' dots는 물에서 합성된다.

[0092] C dots 또는 C' dots는 이들의 물리적 특성 뿐만 아니라 입증된 인간 생체내 특징으로 인해 약물 전달을 위한 독특한 플랫폼을 제공한다. 이들 입자는 초소형이며, 바람직한 청소 및 약동학 특성을 보유하면서 종양 미세환경에서 EPR 효과로부터 이익을 얻는다. 이를 위해, 특정 구체예에서, 약물 작제물이 C dots 또는 C' dots(또는 다른 나노입자)에 공유적으로 부착된 나노입자 약물 전달 시스템이 본원에 기재된다.

[0093] C dots 또는 C' dots는 단일 플랫폼 상에서 항체 단편을 치료용 방사성표지(예컨대, ^{177}Lu, ^{225}Ac, ^{90}Y, ^{89}Zr)와 조합시키기 위해 매우 특이적이고 강력한 다중-치료 표적화된 입자 프로브로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 자연에서 면역조절성이고 항-염증성인 것으로 알려진, alphaMSH와 같은, 표적화 펩티드의 C dot 또는 C' dot 커플링은 또한 강화된 효능을 달성하기 위해 C dot 또는 C' dot 방사성치료용(및/또는 다른 입자-기반) 플랫폼과 조합될 수 있다. 특정 구체예에서, 방사성동위원소 및/또는 항체 단편의 농도는 진단용 적용에 비해 치료용 적용에서 더 높다.

[0094] 다른 다중모드 플랫폼과 대조적으로, 면역컨쥬게이트는 나노입자 자체에 부착된 상이한 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 방사성동위원소가 나노입자에 부착되고 항체 단편이 나노입자에 부착된다 - 다시 말해, 이러한 구체예에서, 방사성표지는 항체 단편 자체에 부착되지 않는다. 또 다른 예로서, 면역컨쥬게이트는 나노입자에 부착된 표적화 리간드, 나노입자에 부착된 방사성동위원소, 및 나노입자에 부착된 항체 단편을 포함할 수 있다. C dot에 부착된 상이한 모이어티의 화학량론적 비는 나노입자 면역컨쥬게이트의 생체분포에 영향을 줄 것이다.

[0095] 면역컨쥬게이트, 예컨대, C dot-항체(mAb) 및 -항체-단편(vFab) 컨쥬게이트는 두 가지 접근법 중 어느 하나를 이용하여 제조될 수 있다. 도식 1은 도 8에 도시된 대로, 티올-말레이미드 화학을 포함한다. 도식 1은 말레이미드기를 함유하도록 변형된 단백질 주위에 설계된다. 도식 2는 도 9에 도시된 알켄-테트라진 화학을 포함한다.

[0096] 도 8에 도시된 도식 1에서, PEG 및 말레이미드기로 표면 작용기화된, Cy5 염료를 함유하는 C dots(C dots-(Cy5)-PEG-mal)는 문헌[Bradbury et al., 2014]에 종래 기재된 대로 제조되었다. Cy5 형광단으로 변형된 실란을 제조하고, NH_4OH의 희석 용액으로 테트라메틸오르토실란(TMOS)과 함께 적정(TMOS:Cy5:NH3:H20의 몰 비는 1:0.001:0.44:1215임)시키고, 24시간 동안 혼합시켰다(Urata C, Aoyama Y, Tonegawa A, Yamauchi Y, Kuroda K. Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silica nanoparticles. Chem Commun (Camb). 2009;(34):5094-6)(Yamada H, Urata C, Aoyama Y, Osada S, Yamauchi Y, Kuroda K. Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems, Chem. Mater. 2012;24(8):1462-71.)(Wang J, Sugawara-Narutaki A, Fukao M, Yokoi T, Shimojima A, Okubo T. Two-phase synthesis of monodisperse silica nanospheres with amines or ammonia catalyst and their controlled self-assembly. ACS Appl Mater Interfaces. 2011;3(5):1538-44). 이는 Cy5 캡슐화된 실리카 입자를 발생시켰고, 이의 표면을 추가로 페길화시키고, PEG-실란(500 g/mole)(Suzuki K, Ikari K, Imai H. Synthesis of silica nanoparticles having a well-ordered mesostructured using a double surfactant system. J Am Chem Soc. 2004;126(2):462-3) 및 말레이미드-PEG-실란을 이용한 처리에 의해 말레이미드기로 작용기화시켰다(1:2.3:0.006의 PEG-실란:TMOS:mal-PEG-실란 몰 비). 그 후 입자를 티올 및 아민을 함유하는 화합물(예컨대, 시스테인 메틸 에스테르 또는 시스테아민-HCl)과 반응시켜 말레이미드기를 아민기로 효과적으로 전환시킬 수 있다. 그 후 생성된 C dot-(Cy5)-PEG-아민은 석신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)로 후속하여 변형될 수 있다. 피리딜디티올은 적어도 두 가지 목적으로 기능한다: 첫째로, 이를 이용하여 컨쥬게이션 효율을 정량할 수 있다; 둘째로, 이는 티올기의 산화를 최소화하는 '보호기' 역할을 할 수 있다; 기타 등등. 그 후 TCEP를 이용하여 피리딘 2-티온을 방출시키는 기를 제거할 수 있으며, 이는 정량을 위한 HPLC 또는 UV-흡수에 의해 측정될 수 있다. 그 후 생성된 C dot-(Cy5)-PEG-티올을 단백질-말레이미드와 반응시켜 요망되는 C dot-(Cy5)-PEG-mAb 또는 C dot-(Cy5)-PEG-vFab를 생성할 수 있다.

[0097] 도 9에 도시된 도식 2에서, 알켄-테트라진 화학이 단백질 부착에 활용된다. 여기에서, mAb 또는 vFab는 메틸테트라진-PEG_4-NHS 에스테르와 같은 클릭 반응성 기로 변형된다. 그 후, 도 8(도식 1)에 기재된 대로, C dot-(Cy5)-PEG-아민은 적절한 클릭 파트너(예컨대, TCO-PEG_4-NHS 에스테르)로 변형된다. 최종 단계에서, 메틸테트라진-mAb 또는 -vFab는 그 후 C dot-(Cy5)-PEG-TCO와 반응하여 C dot-(Cy5)-PEG-mAb 또는 C dot-(Cy5)-PEG-vFab

생성물을 생성할 수 있다.

[0098] 항체 단편(fAb)은 표준 모노클로날 항체(mAb)에 비해 장점(예컨대, 크기, 감소된 면역원성에 대한 Fc 영역 없음, 확장성, 및 적응성)을 제공한다. fAb는 발현 숙주(예컨대, E. 콜라이(*E. Coli*))에서 일반적으로 단일 연속 서열로서 발현되는 항체의 스트리핑-다운(stripped-down) 결합 영역이다. 특정 구체예에서, fAb 또는 mAb는 15 kDa(+/- 5kDa)만큼 작을 수 있다(예컨대, 약 3nm). 다른 구체예에서, fAb 또는 mAb는 150 kDa 이하일 수 있다(예컨대, 20 nm 이하). 한 구체예에서, fAb는 약 60 kDa이다(예컨대, +/- 15 kDa). fAb는 면역글로불린 경쇄의 상응하는 도메인에 연결된 면역글로불린 중쇄 가변 및 불변 도메인을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 항체 포맷은 약 30 kDa(예컨대, +/- 10 kDa)인 단일쇄 가변 단편(scFv) 단편일 수 있다. scFv 단편은 경쇄 가변 도메인에 연결된 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 항체 포맷은 약 15 kDa(예컨대, +/- 5 kDa)인 단일 도메인 항체(sdAb) 단편일 수 있다. sdAb 단편은 단일 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 구체예에서, 항체 단편은 상이한 종양을 표적화하는 항-CEA scFv이다.

[0099] 특정 구체예에서, 다양한 링커가 사용된다. 특정 구체예에서, 절단 가능한 링커(예컨대, 펩티드, 하이드라진, 또는 디설파이드)가 사용된다. 특정 구체예에서, 절단 불가능한 링커(예컨대, 티오에테르)가 사용된다. 특정 구체예에서, 펩티드 링커는 리소솜 프로테아제(예컨대, 카텝신-B)에 의해 선택적으로 절단된다. 특정 구체예에서, 발린-시트룰린 디펩티드 링커가 사용된다.

[0100] 특정 구체예에서, 미국 특허 번호 4,680,338, 5,122,368, 5,141,648, 5,208,020, 5,416,064, 5,475,092, 5,543,390, 5,563,250 5,585,499, 5,880,270, 6,214,345, 6,436,931, 6,372,738, 6,340,701, 6,989,452, 7,129,261, 7,375,078, 7,498,302, 7,507,420, 7,691,962, 7,910,594, 7,968,586, 7,989,434, 7,994,135, 7,999,083, 8,153,768, 8,236,319, 문헌[Zhao, R.; et al, (2011) J. Med. Chem. 36, 5404; Doronina, S.; et al, (2006) Bioconjug Chem, 17, 114; Hamann, P.; et al. (2005) Bioconjug Chem. 16, 346](이의 내용은 본원에 참조로서 포함된다)에 기재된 상이한 링커가 사용된다.

[0101] 특정 구체예에서, mAb 및/또는 fAb는 특정 용도로 U.S. 승인되었다. mAb 및 fAb의 비제한적인 예는 항-GPIIb/IIIa, 항-VEGF-A, 및 항-TNF-α를 포함한다. ReoPro(아브식시맙(abciximab))은 문헌[Nelson and Reichert, "Development trends for therapeutic antibody fragments," Nature Biotechnology, 27(4), 2009]에 기재된 대로 Centocor/Eli Lilly에 의해 개발된 항-GPIIb/IIIa, 키메라 fAb, IgG1-κ이다. Lucentis(라니비주맙(ranibizumab))는 습윤 노화-관련 황반 변성을 예방하는데 이용되는 Genentech(Nelson and Reichert, 2009)에 의해 개발된 항-VEGF-A, 인간화된 Fab IgG1-κ이다. Cimzia(세르톨리주맙 페골(certolizumab pegol))은 중등도 내지 중증 크론병을 예방하는데 이용되는 UCB(Nelson and Reichert, 2009)에 의해 개발된 항-TNF-α, 페길화된 인간화 fAb이다.

[0102] 특정 구체예에서, PET(양전자 방출 단층촬영술) 트레이서가 영상화 작용제로서 이용된다. 특정 구체예에서, PET 트레이서는 ^{89}Zr, ^{64}Cu, [^{18}F] 플루오로데옥시글루코스를 포함한다.

[0103] 특정 구체예에서, 형광단은 형광색소, 형광색소 켄처 분자, 임의의 유기 또는 무기 염료, 금속 킬레이트, 또는 프로테아제 활성화 가능한 효소 기질을 포함하는 임의의 형광 효소 기질을 포함한다. 특정 구체예에서, 형광단은 장쇄 카르보필릭 시아닌을 포함한다. 다른 구체예에서, 형광단은 DiI, DiR, DiD, 등을 포함한다. 형광색소는 근적외선(far red) 및 근적외선(near infrared) 형광색소(NIRF)를 포함한다. 형광색소는 비제한적으로 카르보시아닌 및 인도시아닌 형광색소를 포함한다. 특정 구체예에서, 영상화 작용제는 비제한적으로 Cy5.5, Cy5 및 Cy7(GE Healthcare); AlexaFlour660, AlexaFlour680, AlexaFluor750, 및 AlexaFluor790(Invitrogen); VivoTag680, VivoTag-S680, 및 VivoTag-S750(VisEn Medical); Dy677, Dy682, Dy752 및 Dy780(Dyomics); DyLight547, DyLight647(Pierce); HiLyte Fluor 647, HiLyte Fluor 680, 및 HiLyte Fluor 750(AnaSpec); IRDye 800CW, IRDye 800RS, 및 IRDye 700DX(Li-Cor); 및 ADS780WS, ADS830WS, 및 ADS832WS(American Dye Source) 및 Kodak X-SIGHT 650, Kodak X-SIGHT 691, Kodak X-SIGHT 751(Carestream Health)를 포함하는 시판되는 형광색소를 포함한다.

[0104] 특정 구체예에서, 클릭 반응성 기가 사용된다('클릭 화학'을 위해). 클릭 반응성 기의 예는 하기를 포함한다: 알킨, 아지드, 티올(설피드릴(sulfydryl)), 알켄, 아크릴레이트, 옥심, 말리에미드(maliemide), NHS(N-하이드록시석신이미드), 아민(일차 아민, 이차 아민, 삼차 아민, 및/또는 사차 암모늄), 페닐, 벤질, 하이드록실, 카르보닐, 알데하이드, 카르보네이트, 카르복실레이트, 카르복실, 에스테르, 메톡시, 하이드로퍼옥시, 퍼옥시, 에테르, 헤미아세탈, 헤미케탈, 아세탈, 케탈, 오르토에스테르, 오르토카르보네이트 에스테르, 아미드, 카르복시아미드, 이민(일차 케티민, 이차 케타민, 일차 알디민, 이차 알디민), 이미드, 아조(디이미드), 시아네이트(시아

네이트 또는 이소시아네이트), 니트레이트, 니트릴, 이소니트릴, 니트라이트(니트로소옥시기), 니트로, 니트로소, 피리딜, 설파이드, 디설파이드, 설피닐, 설포닐, 설피노, 설포, 티오시아네이트, 이소티오시아네이트, 카로노티오일, 티온, 티알, 포스핀, 포스포노, 포스페이트, 포스포디에스테르, 보로노, 보로네이트, 보르니노, 보리네이트, 할로, 플루오로, 클로로, 브로모, 및/또는 아이오도 모이어티.

[0105] 치료될 수 있는 암은, 예를 들어, 전립선암, 유방암, 고환암, 자궁경부암, 폐암, 결장암, 골암, 신경아교종, 아교모세포종, 다발성 골수종, 육종, 소세포 암종, 흑색종, 신장암, 간암, 두경부암, 식도암, 갑상선암, 림프종, 및/또는 백혈병을 포함한다.

[0106] 특정 구체예에서, C dots에 부착된 표적화 펩티드 리간드, 예컨대, 알파-MSH는 치료 반응을 향상시키기 위한 다른 요법과 함께 면역조절제 역할을 할 수 있다.

[0107] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 면역컨쥬게이트의 투여 외에, 치료 방법은 항체, 소분자 약물, 방사선, 약물요법, 화학요법, 냉동요법, 온열요법, 전기요법, 광선요법, 초음파 요법 및/또는 수술의 투여를 포함할 수 있다.

[0108] 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 치료제, 예컨대, 약물(예컨대, 화학요법 약물) 및/또는 치료용 방사성동위원소를 포함한다. 본원에서 사용되는 "치료제"는 대상체에 투여될 때, 치료적 효과를 갖고/갖거나 요망되는 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 유도하는 임의의 작용제를 나타낸다.

[0109] 특정 구체예에서, 방사성동위원소는 모니터/영상화될 수 있는 방사성표지이다(예컨대, PET 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영술(SPECT)을 통해). 이용될 수 있는 방사성동위원소의 예는 베타 방사체(예컨대, ^{177}루테늄) 및 알파 방사체(예컨대, ^{225}Ac)를 포함한다. 특정 구체예에서, 하기 방사성동위원소 중 하나 이상이 이용된다: ^{99}mTc, ^{111}In, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{177}Lu, ^{67}Cu, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{149}Pm, ^{90}Y, ^{213}Bi, ^{103}Pd, ^{109}Pd, ^{159}Gd, ^{140}La, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{165}Dy, ^{166}Dy, ^{67}Cu, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{89}Zr, ^{225}Ac, 및 ^{192}Ir.

[0110] 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 하나 이상의 약물, 예컨대, 하나 이상의 화학요법 약물, 예컨대, 소라페닙, 파클리탁셀, 도세탁셀, MEK162, 에토포시드, 라파티닙, 닐로티닙, 크리조티닙, 풀베스트란트, 베무라페닙, 벡소로텐, 및/또는 캄프토테신을 포함한다.

[0111] 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 킬레이터, 예를 들어, 1,4,8,11-테트라아자바이사이클로[6.6.2]헥사데칸-4,11-디일)디아세트산(CB-TE2A); 데스페록스아민(desferoxamine)(DFO); 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA); 1,4,7,10-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA); 틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 에틸렌 글리콜비스(2-아미노에틸)-N,N,N',N'-테트라아세트산(EGTA); 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,8,11-테트라아세트산(TETA); 에틸렌비스-(2-4 하이드록시-페닐글리신)(EHPG); 5-Cl-EHPG; 5Br-EHPG; 5-Me-EHPG; 5t-Bu-EHPG; 5-sec-Bu-EHPG; 벤조디에틸렌트리아민 펜타아세트산(벤조-DTPA); 디벤조-DTPA; 페닐-DTPA, 디페닐-DTPA; 벤질-DTPA; 디벤질 DTPA; 비스-2 (하이드록시벤질)-에틸렌-디아민디아세트산(HBED) 및 이의 유도체; Ac-DOTA; 벤조-DOTA; 디벤조-DOTA; 1,4,7-트리아자사이클로노난 N,N',N"-트리아세트산(NOTA); 벤조-NOTA; 벤조-TETA, 벤조-DOTMA(이 때 DOTMA는 1,4,7,10-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라(메틸 테트라아세트산)이다), 벤조-TETMA(이 때 TETMA는 1,4,8,11-테트라아자사이클로테트라데칸-1,4,8,11-(메틸 테트라아세트산)이다); 1,3-프로필렌디아민테트라아세트산(PDTA)의 유도체; 트리에틸렌테트라아민헥사아세트산(TTHA); 1,5,10-N,N',N"-트리스(2,3-디하이드록시벤조일)-트리카테콜레이트(LICAM)의 유도체; 및 1,3,5-N,N',N"-트리스(2,3-디하이드록시벤조일)아미노메틸벤젠(MECAM), 또는 다른 금속 킬레이터를 포함한다.

[0112] 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 하나를 초과하는 킬레이터를 포함한다.

[0113] 특정 구체예에서, 방사성동위원소-킬레이터 쌍은 ^{89}Zr-DFO이다. 특정 구체예에서, 방사성동위원소-킬레이터 쌍은 ^{177}Lu-DOTA이다. 특정 구체예에서, 방사성동위원소-킬레이터 쌍은 ^{225}Ac-DOTA이다.

[0114] 특정 구체예에서, 치료제(예컨대, 약물 및/또는 방사성동위원소)는 생물직교 컨쥬게이션 접근법(예컨대, 아민/NHS-에스테르, 티올/말레이미드, 아지드/알킨 클릭, 또는 테트라진/TCO 클릭)을 이용하여, 나노입자 또는 항체 단편(단백질), 또는 둘 모두에 부착된다. 라디오메탈을 이용한 방사성표지를 위해, 라디오메탈 킬레이터를 먼저 입자 또는 단백질 또는 둘 모두에 부착한 다음, 라디오메탈을 부착할 수 있다. 대안적으로, 라디오메탈/킬레이터 복합이 수행된 다음, 입자 또는 단백질 또는 둘 모두에 부착될 수 있다. 방사성요오드화는 또한 입자 또는

단백질 또는 둘 모두의 티로신 또는 페놀기가 친전자성 첨가 화학에 의해 변형되는 표준 접근법을 이용하여 달성될 수 있다.

[0115] 특정 구체예에서, 면역컨쥬게이트는 질환 또는 병태의 치료를 위해 특정 질환 또는 병태(예컨대, 암)로 고통받는 대상체에 투여된다.

[0116] **실험예**

[0117] *C dot-(Cy5)-PEG-말레이미드의 제조:*

[0118] 말레이미드 및 NHS 에스테르 작용기화된 폴리에틸렌 글리콜(mal-dPEG$_{12}$-NHS)을 DMSO 중 아미노실란(APTES)과 컨쥬게이션시켰다(몰 비 mal-PEG-NHS:APTES:DMSO 1:0.9:60). 반응 혼합물을 48시간 동안 실온에서 질소하에 두어, 실란 작용기화된 mal-dPEG(mal-dPEG-APTES)를 생성시켰다. 말레이미드 작용기화된 Cy5(mal-Cy5)를 DMSO 중 티올-실란(MPTMS)과 반응시켰다(몰 비 Cy5:MPTMS:DMOS 1:25:1150). 반응물을 24시간 동안 실온에서 질소하에 두어, 실란 작용기화된 Cy5(Cy5-MPTMS)를 생성시켰다. 이후, TMOS 및 Cy5-MPTMS를 암모니아 하이드록사이드 용액(~pH 8)으로 적정하였다(몰 비 TMOS:Cy5:NH3:H2O 1:0.001:0.44:1215). 용액을 24시간 동안 실온에서 600 rpm에서 교반하여 균일한 Cy5 캡슐화 실리카 나노입자를 형성시켰다. 이후, mal-dPEG-APTES 및 실란 작용기화된 폴리에틸렌 글리콜(PEG-실란, MW 약 500, Gelest)을 합성 용액에 첨가하여 페길화시키고, 입자를 표면 작용기화시켰다(PEG-실란:TMOS:mal-PEG-APTES 1:2.3:0.006). 용액을 24시간 동안 실온에서 600 rpm에서 교반한 후, 교반 없이 또 다른 24시간 동안 80℃에서 인큐베이션하였다. 용액을 2일 동안 2000 mL 탈이온수(10k MWCO)에서 투석시키고, 200 nm 주사기 필터로 여과시키고, 최종적으로 크로마토그래피 정제(Superdex 200)하여, 바람직한 mal-C dots를 생성하였다.

[0119] *C dot 면역컨쥬게이트의 제조*

[0120] 컨쥬게이트 단일쇄 항체 단편 (scFv)을 C dot 코어 실리카 나노입자에 컨쥬게이션하기 위한 연구를 수행하였다. 매트릭스 금속단백분해효소 12(MMP-12)에 결합된 scFv를 E. 콜라이에서 발현시켰다. 작제물은 니켈 친화성 크로마토그래피 및 면역-검출을 위한 C-말단 His 및 FLAG 태그를 함유하였다. 폴리펩티드 사슬의 마지막 아미노산이 시스테인(Cys)으로 전환된 돌연변이체 scFv를 작제하였다. 변화는 돌연변이체 유전자를 시퀀싱함에 의해 확인되었다. 야생형 scFv 및 C-말단 Cys 함유 돌연변이체의 발현 및 니켈 친화성 정제를 scFv와 일치하는 분자량에서 쿠마시 블루 염색으로 가시화된, 소듐 도데실 설페이트(SDS) 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)에 의해 확인하였다. 항-FLAG tag HRP 컨쥬게이트로 scFv SDS PAGE 겔의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 웨스턴 블롯 분석으로 겔 밴드의 실체가 scFv였음을 확인하였다.

[0121] scFv는 이작용성 링커를 함유하는 아지드로 클론 변형되었다. 야생형 scFv는 N-하이드록시-석신이미드(NHS) 에스테르 - 폴리에틸렌 글리콜(PEG)$_4$-아지드로 변형되었다. 어떤 이론에 구속되길 바라지 않으며, 야생형 scFv를 NHS 에스테르-PEG$_4$-아지드로 변형시키면 PEG$_4$-아지드가 표면 리신 잔기 상의 유리 아민에 무작위로 혼입된다. C-말단 scFv Cys 작제물을 Cys 설프하이드릴에 대한 부위 특이적 PEG$_3$-아지드 도입을 위해 말레이미드-PEG$_3$-아지드와 컨쥬게이션시켰다. scFv 작제물을 디벤조사이클로옥틴(DBCO)-PEG-Cy5 형광 프로브와의 반응에 의해 아지드 혼입에 대해 분석하였다. 아지드는 금속 비함유 클릭 화학 반응을 통해 DBCO와 반응하여 공유 결합을 형성한다. 반응하지 않은 DBCO-Cy5 염료는 40 kDa 컷오프 크기 배제 스핀 컬럼에 의해 반응 혼합물로부터 제거되었다. BioRad Versa-Doc 이미저를 사용하여 야생형 및 C-말단 Cys scFv-PEG-Cy5 형광 염료 작제물을 가시화함에 의해 scFv의 표면에 아지드기가 성공적으로 도입되었음을 확인하였다.

[0122] 그 후 아지드 컨쥬게이션된 scFv를 표면에 1-3개 DBCO를 함유하는 C dots와 반응시켰다. 반응을 실온에서 12시간 동안 지속시켰다. 컨쥬게이션되지 않은 scFv는 50,000 분자량 컷오프 스핀 컬럼에서 포스페이트 완충된 염수 세척액, G-200 크기 배제 컬럼 크로마토그래피 또는 수크로스 쿠션을 고려한 크기 배제 스핀 컬럼 및 속도 침강을 포함하는 다수의 기술을 사용하여 컨쥬게이션된 dscFv-C dots로부터 정제되었다. 속도 침강 및 크기 배제 크로마토그래피가 가장 확장성 있는 정제 방법인 것으로 보인다. 정제된 scFv C-dot 컨쥬게이트는 도트 블롯 scFv 면역-검출/입자 형광 검정, 겔 전기영동 및 고정된 MMP-12에 의한 형광 ELISA에 의해 분석되었다.

[0123] 이러한 방법은 다른 유형의 항체 단편, 예컨대, sdAb에 적용될 수 있다.

[0124] 도 1은 킬레이터-기반 방사성표지 기술을 이용하여 ^{89}Zr-표지된 C'dot 방사성면역컨쥬게이트의 합성을 보여주는 개략도를 도시한다. 페길화 및 말레이미드-작용기화된 C' dot (C' dot-PEG-Mal, 1)를 먼저 추적 바이오컨쥬게이

트용 -NH_2 기를 도입하기 위해 환원된 글루타티온(GSH)과 반응시켜, C' dot-PEG-GSH (2)를 형성하였다. 그 후, 나노입자를 DBCO-PEG4-NHS 에스테르 및 DFO-NCS와 컨쥬게이션시켜, 각각 C' dot-PEG-DBCO (3) 및 DFO-C' dot-PEG-DBCO (4)를 형성하였다. 아지드-작용기화된 소형 표적화 리간드, 예컨대, 단일쇄 가변 단편(scFv-아지드)(또는 단일-도메인 항체, sdAb-아지드)을 변형-촉진된 아지드-알킨 고리화첨가반응에 기반하여 나노입자에 컨쥬게이션시켜, DFO-C' dot-PEG-scFv (5)를 형성하였다. 이를 ^{89}Zr-옥살레이트로 표지시켜 최종 C' dot 방사성면역컨쥬게이트(^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG-scFv, 6)를 얻었다. 도 1에 예시된 도식은 scFv에 한정되지 않고 다양한 유형의 항체 단편, 예컨대, sdAb를 포함할 수 있다.

[0125] 도 2A 및 2B는 건강한 누드 마우스에서 상이한 주입 후 시점(10분, 1 h, 1일, 3일 및 6일)에 ^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG의 생체내(도 2A) 관상 및 (도 2B) 시상 PET 이미지를 보여준다. C' dot-PEG-Mal 및 GSH 사이의 반응 비는 1:20으로 유지되었다. PET 이미지는 Focus 120 MicroPET 스캐너를 사용하여 획득하였다.

[0126] 도 3은 건강한 누드 마우스에서 6일에 ^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG의 생체분포 데이터를 보여준다. 2 %ID/g 미만의 골(및 관절) 흡수가 관찰되었다.

[0127] 도 4A 및 4B는 킬레이터-비함유 ^{89}Zr 방사성표지 실험예를 보여준다.

[0128] 도 4A는 다양한 pH 조건하에서 75℃에서 C' dot-PEG-Mal의 ^{89}Zr 표지화 수율을 도시한다.

[0129] 도 4B는 다양한 조합의 C' dot 대 ^{89}Zr-옥살레이트 비를 이용한 C' dot-PEG-Mal의 ^{89}Zr 표지화 수율을 도시한다.

[0130] 도 5A 및 5B는 건강한 누드 마우스에서 상이한 주입 후 시점(10분, 1일, 3일 및 6일)에 [^{89}Zr]C' dot-PEG의 생체내 관상 PET 이미지를 보여준다. [^{89}Zr]C' dot-PEG는 킬레이터-비함유 방사성표지 기술을 이용하여 합성되었다. PET 이미지는 Focus 120 MicroPET 스캐너를 사용하여 획득하였다.

[0131] 도 5A는 EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 없이 획득한 PET 이미지를 보여준다.

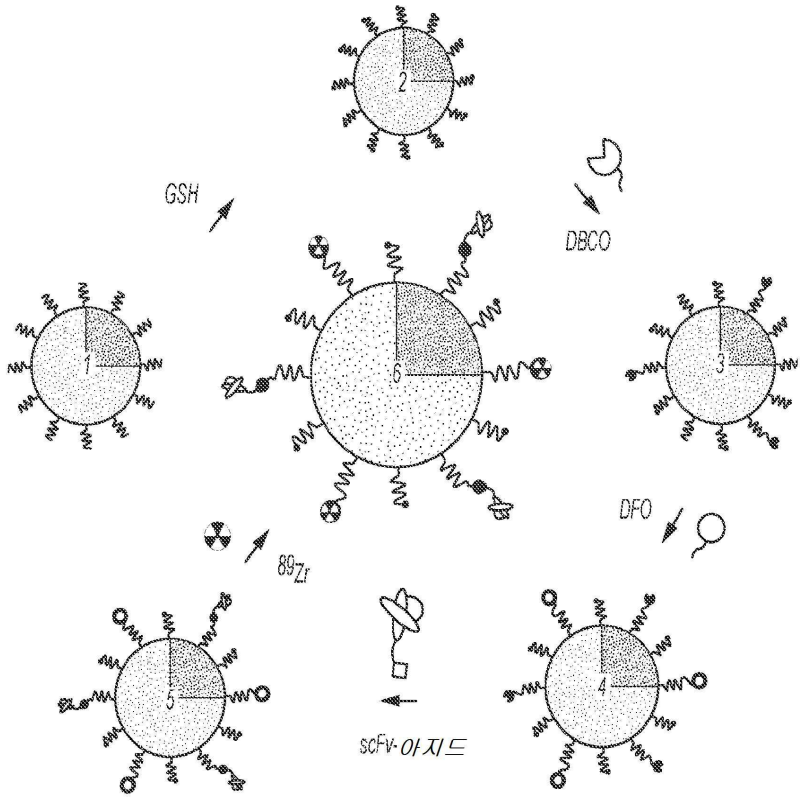
[0132] 도 5B는 EDTA와 함께 획득한 PET 이미지를 보여준다.

[0133] 도 6은 건강한 누드 마우스에서(n=3) 7일에 [^{89}Zr]C' dot-PEG의 생체분포 데이터를 보여준다. 10 %ID/g 초과의 골(및 관절) 흡수(붉은색 상자로 강조 표시됨)가 이 경우에 관찰되었는데, 이는 킬레이터-비함유 방법을 이용한 덜 안정한 방사성표지를 나타낸다(킬레이터-기반 방법에 비해).

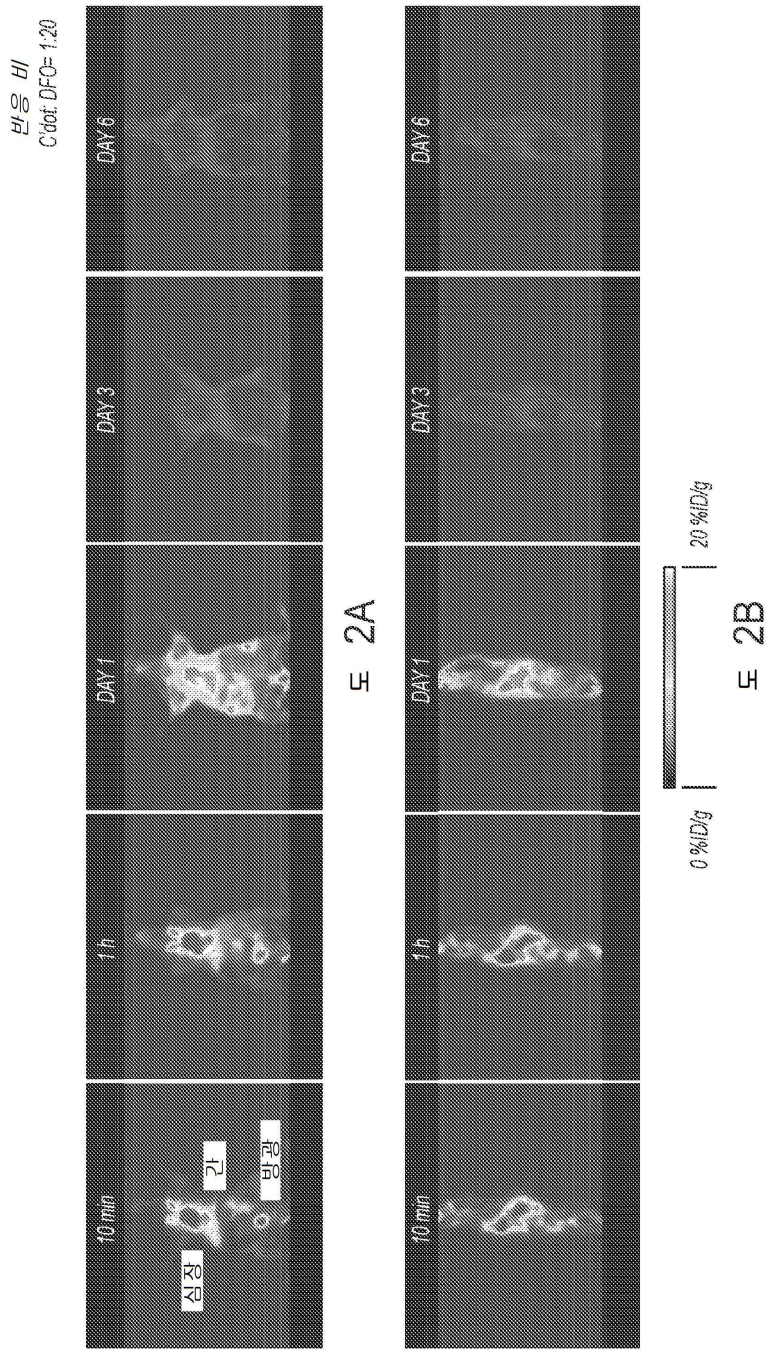
[0134] 도 7은 주입 후 48 h에 건강한 누드 마우스에서 ^{89}Zr-DFO-C' dot, ^{89}Zr-DFO-C' dot-DBCO 및 ^{89}Zr-DFO-C' dot-PEG-sdAb의 생체분포 데이터를 보여준다. 각 C' dot로부터 DFO, DBCO 및 sdAb의 수를 최적화함에 의해 개선된 약동학적 프로파일(연장된 혈액 순환 반감기 및 낮은 간 흡수를 지님)이 달성될 수 있다.

도면

도면1



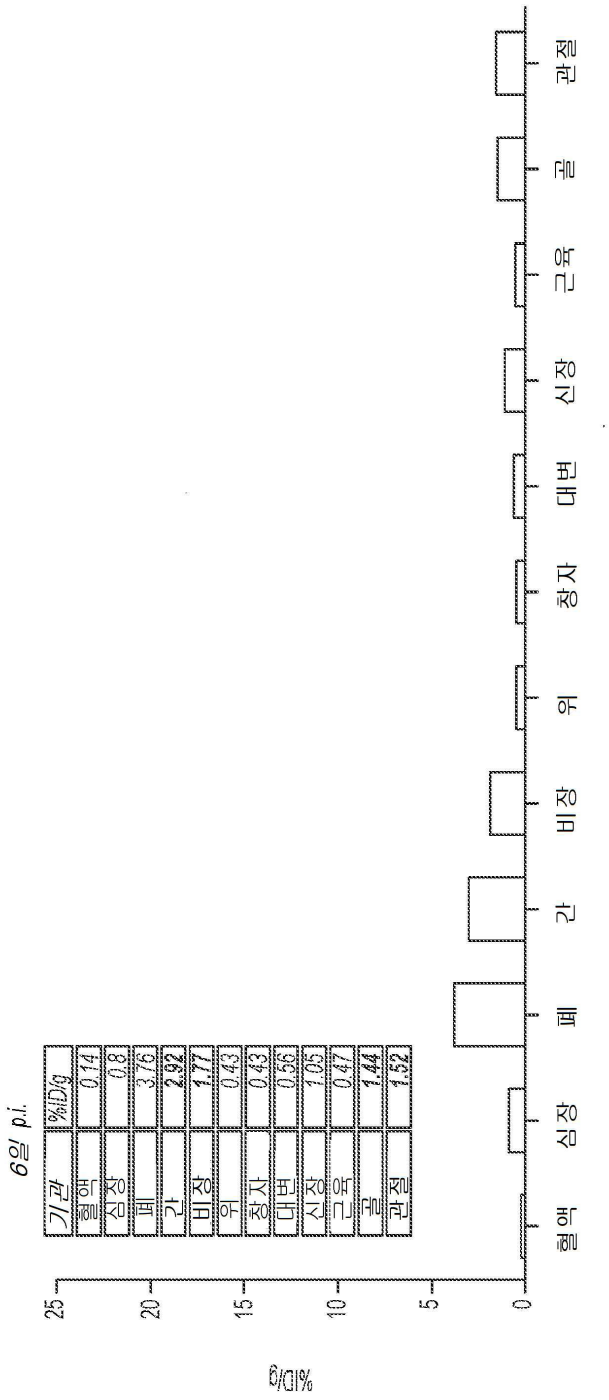
도면2



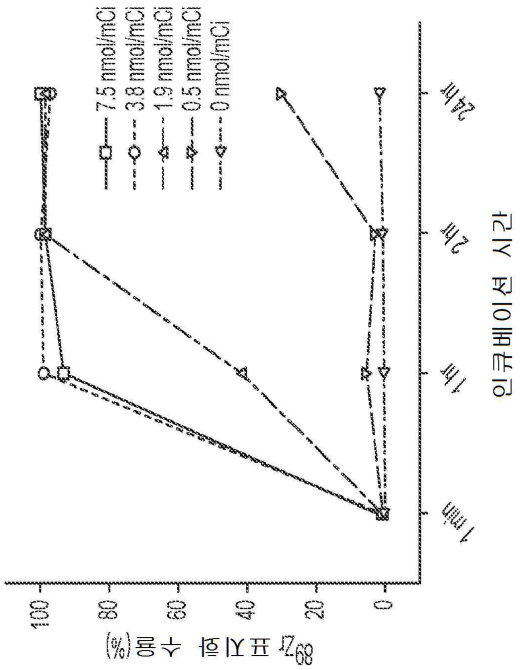
도 2A

도 2B

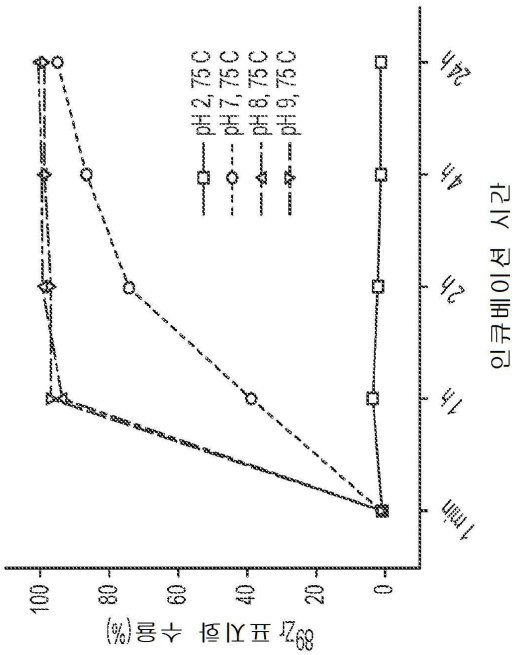
도면3


6일 p.i.
기관 %ID/g
혈액 0.14
심장 0.8
폐 3.16
간 2.92
비장 1.77
위 0.43
창자 0.43
대변 0.56
신장 1.05
근육 0.47
골 1.44
관절 1.52
%ID/g
25
20
15
10
5
0
혈액
심장
폐
간
비장
위
창자
대변
신장
근육
골
관절

도면4

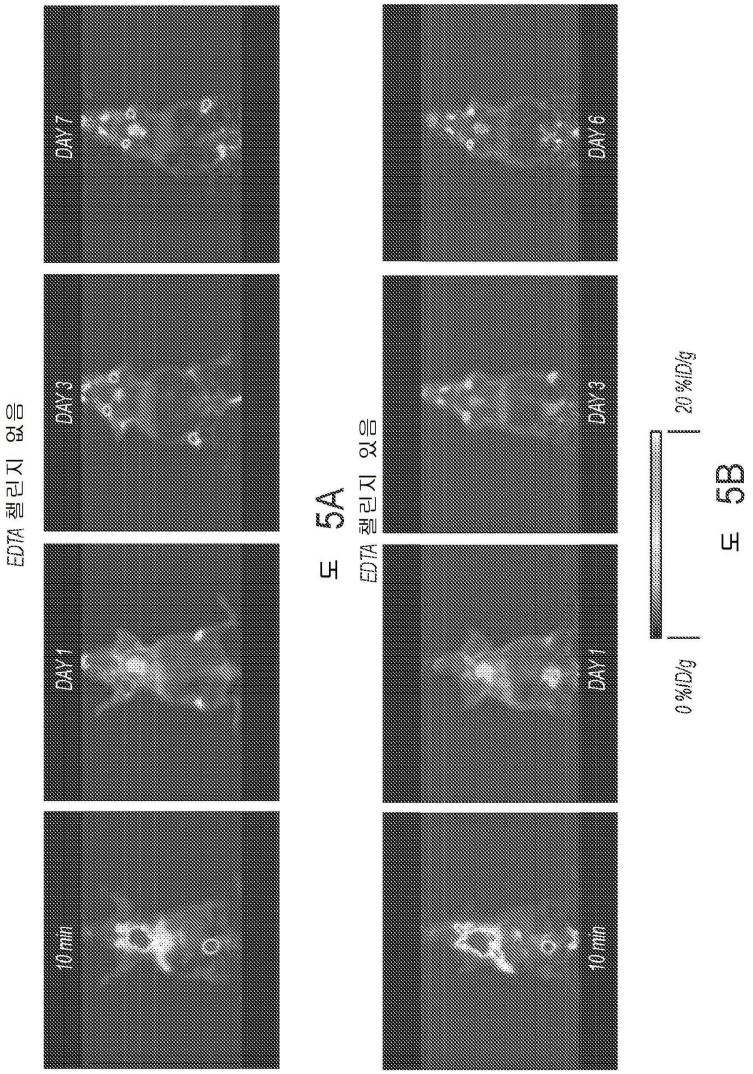

7.5 nmol/mCi
3.8 nmol/mCi
1.9 nmol/mCi
0.5 nmol/mCi
0 nmol/mCi
89Zr 표지화 수율(%)
0
20
40
60
80
100
1min
1h
2h
4h
24h
인큐베이션 시간

도 4B


pH 2, 75 C
pH 7, 75 C
pH 8, 75 C
pH 9, 75 C
89Zr 표지화 수율(%)
0
20
40
60
80
100
1min
1h
2h
4h
24h
인큐베이션 시간

도 4A

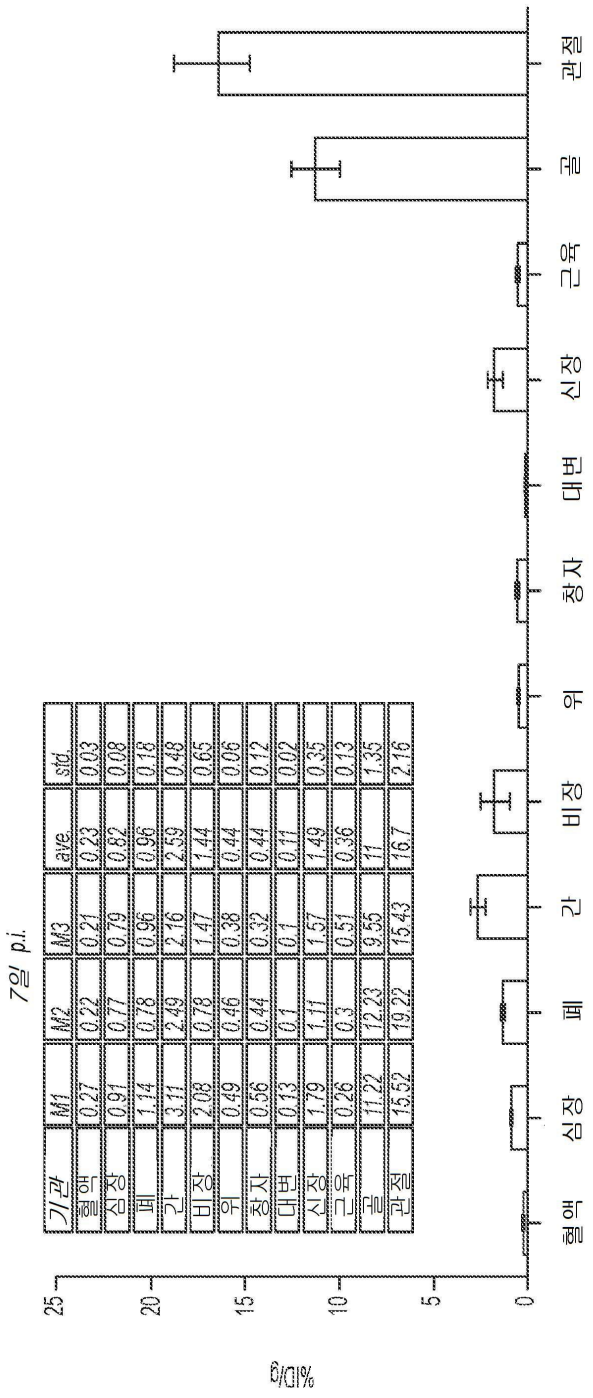
도면5


EDTA 첼리지 없음
10 min
DAY1
DAY3
DAY7
EDTA 첼리지 있음
10 min
DAY1
DAY3
DAY6
0 %ID/g
20 %ID/g

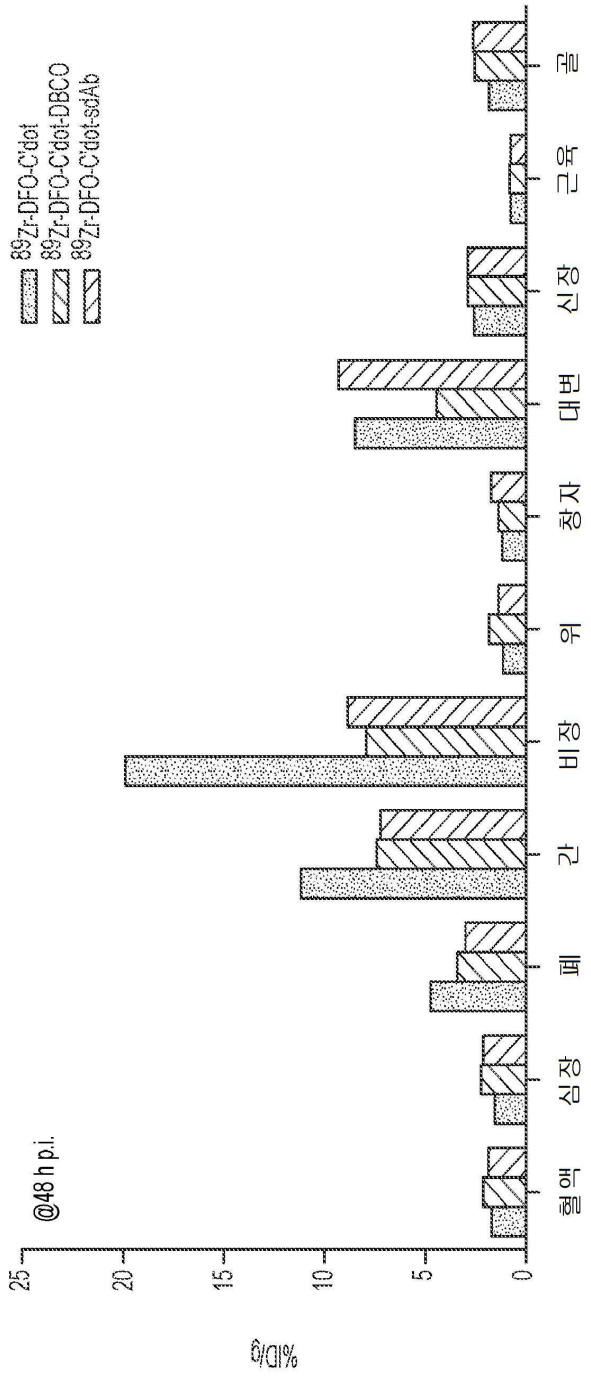
도 5A

도 5B

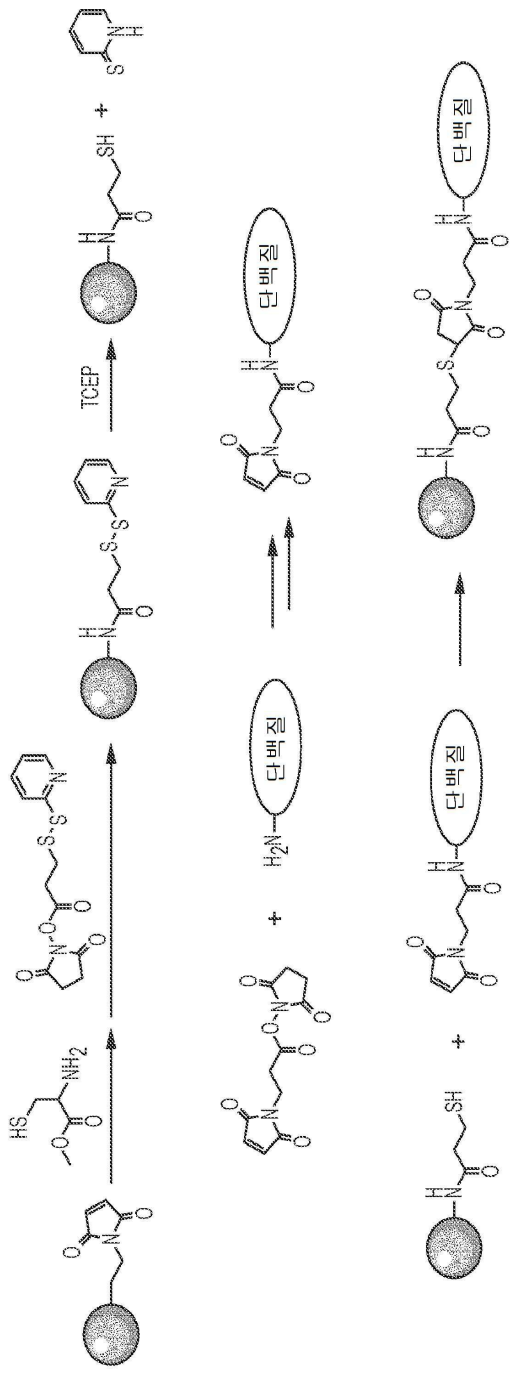
도면6


7일 p.i.
%ID/g
25
20
15
10
5
0
혈액
심장
폐
간
비장
위
창자
대변
신장
근육
골
관절
기관 M1 M2 M3 ave std
혈액 0.27 0.22 0.21 0.23 0.03
심장 0.91 0.77 0.79 0.82 0.08
폐 1.14 0.78 0.96 0.96 0.16
간 3.11 2.49 2.16 2.59 0.48
비장 2.08 0.78 1.47 1.44 0.65
위 0.49 0.46 0.38 0.44 0.06
창자 0.56 0.44 0.32 0.44 0.12
대변 0.13 0.1 0.1 0.11 0.02
신장 1.79 1.11 1.57 1.49 0.35
근육 0.26 0.3 0.51 0.36 0.13
골 11.22 12.23 9.55 11 1.35
관절 15.52 19.22 15.43 16.7 2.16

도면7

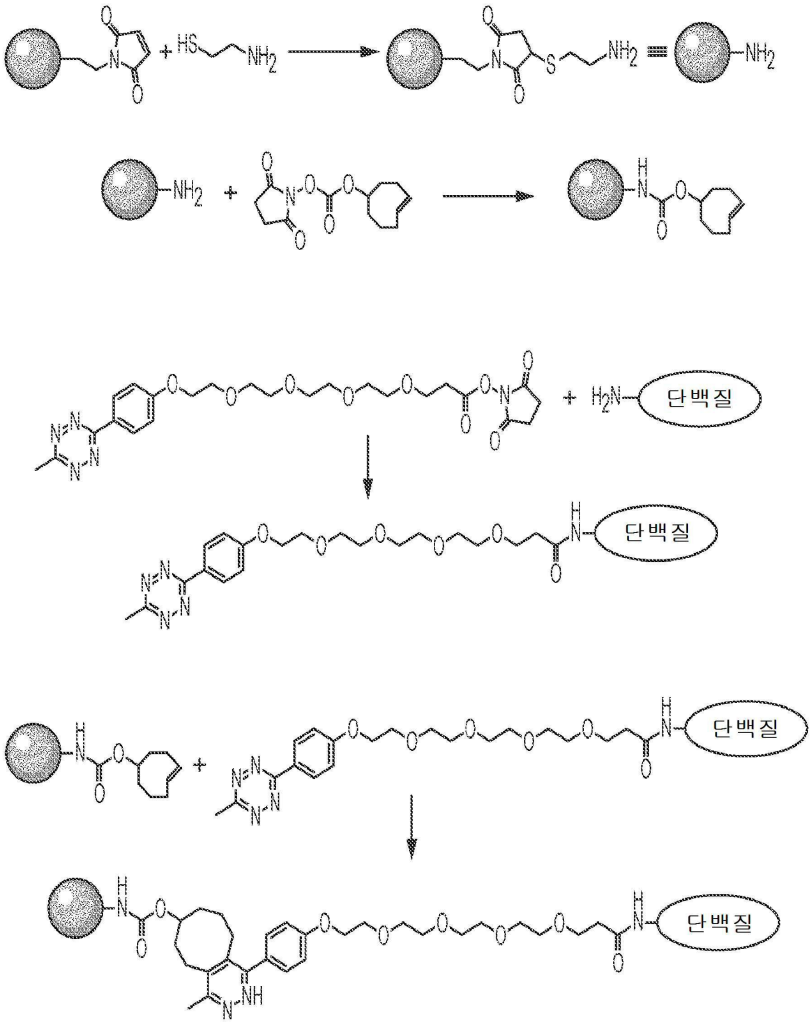

89Zr-DFO-Cdot
89Zr-DFO-Cdot-DBCO
89Zr-DFO-Cdot-sdAb
@48 h p.i.
%ID/g
25
20
15
10
5
0
혈액
심장
폐
간
비장
위
창자
대변
신장
근육
골

도면8



도식 1. 티올-말레이미드 화학

도면9



도식 2. 알켄-테트라진 화학