



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월29일

(11) 등록번호 10-2471267

(24) 등록일자 2022년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01) C07K 16/40 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/3015 (2013.01)

A61K 47/6803 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2018-7029305

(22) 출원일자(국제) 2017년03월17일

심사청구일자 2020년03월17일

(85) 번역문제출일자 2018년10월11일

(65) 공개번호 10-2018-0127398

(43) 공개일자 2018년11월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/022993

(87) 국제공개번호 WO 2017/161288

국제공개일자 2017년09월21일

(30) 우선권주장

15/075,008 2016년03월18일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2015075477 A1*

US07355015 B1

US20160015728 A1

WO2011063127 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

렛저스, 더 스테이트 유니버시티 오브 뉴저지

미국 뉴저지 08909 뉴브런즈윅 올드 퀸즈 쇼머
셋 스트리트

조지타운 유니버시티

미합중국 워싱턴 디시 20057 엔.더블유.오 스트리
트 37번가

(72) 발명자

린, 시앙-요

미국, 뉴저지 08816, 바론 레인 이스트 브런스윅
167

버티노, 조셉, 알.

미국, 코네티컷 06405, 선셋 힐 드라이브 브랜포
드 117

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

허용록

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 김정아

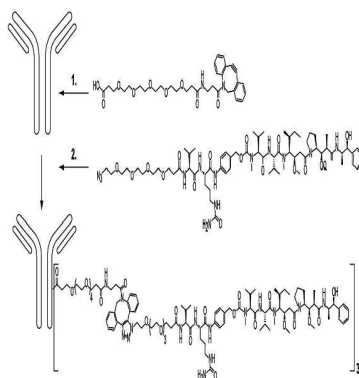
(54) 발명의 명칭 생체내 절단가능한 연결 모이어티에 의해 항-매트립타제 항체에 접합되는 화학요법제를 사용
하여 종양 세포를 표적화하는 방법

(57) 요약

본 발명은 항-매트립타제 항체, 및 항-매트립타제 항체의 세포독성제와의 면역접합체, 및 다발성 골수종 및 유방암의 세포와 같은 매트립타제-발현 암세포의 사멸 또는 성장 억제를 위한 그의 용도에 관한 것이다. 특히, 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE) 및 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)를 포함하는, 아우리스타틴과 같은 항암제 및 항-

(뒷면에 계속)

대표도 - 도11



매트립타제 단클론 항체를 포함하고, 생체내에서 강력한 항 종양 활성을 갖는 면역접합체가 도입된다. 게다가, 중요하게는; 동물에서 체중 감소 또는 다른 독성 증거가 없었으며, 유의한 유리 약물이 접합체로부터 순환 중에 방출되지 않음을 나타냈다. 본 발명은 또한 상기 신규의 면역접합체를 포함하는 조성물, 및 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료를 위한 그의 용도를 제공한다. 또한, 항-매트립타제 항체, 또는 항-매트립타제 항체 및 세포독성제의 면역접합체를 탈리도마이드 또는 그의 유사체와 같은 면역조절제의 투여와 함께 투여하면 상기 암을 보다 효과적으로 치료할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/3038 (2013.01)

C07K 16/3061 (2013.01)

C07K 16/40 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

린, 첸-용

미국, 버지니아 22043, 슈리브 로드 폴스 처치
7610

세켈리, 줄탄

미국, 뉴저지 08901, 뉴 브런스윅 아파트먼트 2에
이, 유니온 스트리트 40

명세서

청구범위

청구항 1

종양 세포에서 발현된 활성화된 매트립타제를 선택적으로 결합하는 항-매트립타제 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 면역접합체로서,

항-매트립타제 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 링커를 통해 세포독성제에 결합되며,

상기 세포독성제는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF) 및 아우리스타틴 PE로 구성된 그룹으로부터 선택되고,

항-매트립타제 항체는 M69 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하거나, 또는 그의 키메라 또는 인간화 형태이며,

링커는 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분을 포함하고, 여기서 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분은 둘 다 PEG를 포함하며,

제1 연결 성분은 트리아졸 모이어티를 통해 제2 연결 성분에 결합되고, 세포독성제는 제2 연결 성분에 결합되는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 링커는 절단가능한 연결 모이어티를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 절단가능한 연결 모이어티는 카텝신 B에 의해 절단가능한, Val-Cit 연결 모이어티 또는 Phe-Lys 연결 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 6

제 1항, 제 4항 및 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 항-매트립타제 항체 상의 라이신 잔기에 공유결합되는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항에 있어서, 제1 연결 성분은 항-매트립타제 항체 상의 라이신 잔기에 공유결합되는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항에 있어서, 제2 연결 성분은 절단가능한 연결 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 12

제 11항에 있어서, 절단가능한 연결 모이어티는 카텝신 B에 의해 절단가능한, Val-Cit 연결 모이어티 또는 Phe-Lys 연결 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제 1항의 면역접합체를 포함하는, 악성종양 치료용 약학 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, 악성종양은 혈액 악성종양을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, 혈액 악성종양은 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소형 림프구성 림프종(SLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 단구성 백혈병(AMOL), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종(BL), 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBL), 맨틀 세포 림프종(MCL) 및 다발성 골수종(MM)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 19

제 16항에 있어서, 악성종양은 상피 악성종양을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상피 악성종양은 전립선, 유방, 뇌, 신장, 폐, 결장, 방광, 피부, 갑상선, 난소 종양 및 중피종으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 21

제 16항에 있어서, 매트립타제를 활성화하는 면역조절제를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 22

제 21항에 있어서, 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 23

항-매트립타제 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하고, 랑커를 통해 세포독성제에 공유결합된 면역접합체로서,

세포독성제는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF) 및 아우리스타틴 PE로 구성된 그룹으로부터 선택되며,

링커는

항-매트립타제 항체 또는 그의 항원-결합 부분 상에 위치된 라이신 잔기를 통해 항-매트립타제 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 결합된 제1 연결 성분; 및

절단가능한 연결 모이어티를 포함하는 제2 연결 성분으로서, 트리아졸 모이어티를 통해 제1 연결 성분에 결합되고 절단가능한 연결 모이어티를 통해 세포독성제에 결합되는 제2 연결 성분

을 포함하며,

절단가능한 연결 모이어티는 카텝신 B에 의해 절단가능한, Val-Cit 연결 모이어티 또는 Phe-Lys 연결 모이어티를 포함하고,

제1 연결 성분은 항-매트립타제 항체 또는 그의 항원-결합 부분 상의 라이신 잔기와 트리아졸 모이어티 사이의 아미드 결합 사이에 3 내지 7 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 단위를 포함하며,

제2 연결 성분은 트리아졸 모이어티와 절단가능한 연결 모이어티 사이에 3 내지 7 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 단위를 포함하고,

항-매트립타제 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 M69 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

청구항 24

삭제

청구항 25

제 23항에 있어서, 세포독성제는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역접합체.

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 미국 특허 출원 제15/075,008호에 우선권을 청구하며, 이 출원은 미국특허법 35 U.S.C. § 120에 의해, 2012년 5월 18일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/510,801호의 일부계속출원이며, 이는 2010년 11월 18일자로 출원된 PCT/US10/57235의 국내단계 진입이며, 이는 차례로 미국특허법 35 U.S.C. § 119(e)에 의해 2010년 1월 7일자로 출원된 미국 가출원 제61/293,030호 및 2009년 11월 18일자로 출원된 미국 가출원 제61/262,373호에 우선권을 청구한다. 상기 모든 참고문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 항암제 및 단클론 항체를 포함하는 신규한 면역접합체 및 혈액 악성종양 및 상피 암을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 매트립타제 발현 암 세포, 예컨대 다발성 골수종 및 유방암 세포의 사멸 또는 성장 억제를 위한 상기 면역접합체의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 매트립타제-발현 암을 치료하는 새로운 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 매트립타제는 유방 및 전립선 종양 세포를 포함하는, 상피 기원 세포에 의해 발현되는 II형 막횡단 세린 프로테아제이다. 매트립타제는 보존된 세포의 도메인 이외에 N-말단 막횡단 도메인 및 다중 세포의 도메인을 특징으로 한다(Lin C.Y., et al., J. Biol. Chem., 1999, 274(26): 18237-18242.). 매트립타제는 단백질분해 절단에 의해 활성화되어 2개의 사슬 활성 효소가 되어야하는 자이모젠(zymogen)이다. 정상적인 생리 조건 하에서는 프로테아제 활성을 엄격히 조절하여 매트립타제에 결합하는 HGF 활성화제 억제제-I(HAI-1)라는 과도한 양의 내인성 억제제가 존재한다(Lin, C.Y., et al., J. Biol. Chem., 1999, 274: 18231 - 18236; Oberst, M.D., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278:26773-26779.). HAI-1은 억제 기능을 발휘하는 것 외에도 매트립타제의 활성화, 적절한 발현 및 세포내 트래피킹(trafficking)에 중요한 역할을 한다(Oberst, M.D., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278: 26773- 26779; Oberst, M.D., et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2005, 289:C462-C470.).

- [0006] 매트립타제는 시험관내에서 간세포 성장 인자(HGF)와 우로키나아제 플라스미노겐 활성화제(uPA) 및 프로테아제-활성화된 수용체를 단백질분해적으로 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Lee, S.L., et al., J. Biol. Chem., 2000, 275:36720-36725; Suzuki, M., et al., J. Biol. Chem., 2004, 279:14899-14908.). HGF와 uPA 모두 세포 침투와 전이 및 세포 운동성에 관여하고 있다(Trusolino, L. and Comoglio, P.M., Nat. Rev. Cancer, 2002, 2:289-300; Sidenius, N. and Blasi, F., Cancer Metastasis Rev., 2003, 22:205-222.). HGF에 대한 동족 수용체는 수용체 티로신 키나제인 Met이다. HGF의 결합시, Met는 Ras-MAPK, PI3K, Src 및 Stat3을 비롯한 여러 신호전달 경로를 유발할 수 있으며, 결국 침습적인 성장을 유도한다. 매트립타제의 과발현과 결합된 높은 Met 수준은 유방암 환자의 빈약한 결과와 관련이 있다.
- [0007] 유방암, 전립선 암, 난소 암을 포함한 여러가지 고상 상피-유래 종양에서의 매트립타제 수준에 대한 연구는 지난 수년간 수행되어 왔다(예를 들어, Uhland, K., Cell. Mol. Life Sci., 2007, 63(24):2968-78 참조). 유방암 환자의 조직 마이크로어레이는 Met, 매트립타제 및 HAI-1의 높은 수준의 발현이 환자의 나쁜 결과와 관련이 있음을 보여주었다(Kang, J.Y., et al., Cancer Res., 2003, 63: 1 101-1105.). 전립선 종양에서는 HAI-1의 감소된 발현에 의한 매트립타제 수준 증가가 종양 등급의 증가와 관련이 있었다(Saleem, M., et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2006: 15, 217-227.). 매트립타제의 과발현은 또한 난소 암 환자의 I II 기의 82%와 III/VI 기의 55%에서 발견되었다.
- [0008] 종양 발생, 진행 및 전이에서의 매트립타제의 중요한 역할을 감안할 때, 이 프로테아제에 대한 여러 억제제가 항암 활성에 대한 동물 모델에서 조사되었다. 매트립타제 억제제, 에코틴에 의한 종양 성장 및 전이 형성 감소는 PC-3 전립선 암 이종이식 모델에서 발견되었다(Takeuchi, N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 11054-11061.). 또 다른 매트립타제 억제제인 CVS-3983은 안드로젠-독립적 전립선 암의 마우스 모델에서 종양 크기를 감소시켰다(Galkin, A.V., et al., Prostate, 2004, 61, 228-235).
- [0009] 모노메틸 아우리스타틴(auristatin) E("MMAE")는 FDA-승인받은 합성 항종양제로서 화학요법에 기반한 치료에 유망한 용도를 보여주었다. MMAE는 강력한 유사분열억제 화합물이지만, 단독 투여시 높은 수준의 세포독성을 나타내어 임상적 가치를 독립적인 화합물로 제한한다. 데스메틸-아우리스타틴 F로도 알려진 모노메틸 아우리스타틴 F("MMAF")는 MMAE와 마찬가지로 유사분열억제제인 실험적 합성 항-종양제이다. MMAE와 마찬가지로 MMAF는 단독 투여시 높은 수준의 세포독성을 나타낸다. 따라서, MMAF 및 MMAE-결합 면역접합체를 이용하는 치료학적으로 효과적인 항체-기반 치료가 시급히 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소형 림프구성 림프종(SLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 단구성 백혈병(AMOL)), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종(BL), 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBL), 맨틀 세포 림프종(MCL) 및 다발성 골수종(MM)을 포함하는 혈액 암 치료용 신규 치료제 뿐만 아니라, 전립선, 유방, 뇌, 신장, 폐, 결장, 방광, 피부, 갑상선 및 난소 종양을 포함하는 다양한 상피 암 및 상기 요구를 충족시키기 위한 중피종의 치료를 위한 새로운 치료제를 제공한다.
- [0011] 막-결합된 세린 타이프 II 프로테아제인 매트립타제는 다발성 골수종(MM) 및 기타 혈액 및 상피 암세포의 세포주에서 발현된다. 본 발명은 매트립타제 발현 세포를 선택적으로 표적화하기 위해 세포독성제, 예를 들어, 아우리스타틴 MMAE 및 MMAF에 결합된 항-매트립타제 항체를 제공한다. 매트립타제-발현 암세포를 표적화하는 강력한 항암제와 결합된 항체는 다양한 이점을 갖는다. 예를 들어, 매트립타제를 과발현하는 종양 세포에 화학요법제를 선택적으로 전달하면 정상 조직에 비해 독성이 낮아진다. 또한, 신장, 폐, 결장, 방광, 췌장, 전립선, 피부, 유방, 갑상선 및 난소를 포함한 다른 장기의 종양에서 매트립타제 mRNA의 수준이 발견되었기 때문에 이러한 면역접합체는 상기 암 치료에 유용하다.
- [0012] 일 구현예에서, 본 발명은 항-매트립타제 항체 및 세포독성제의 면역접합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 독소루비신(DOX), 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)를 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아마이신 및 리신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAE이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAF이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 항-매트립타제 항체에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69이다. 따라서, 일부 구현예에서, 면역접합체는 M69에 공유결합된 MMAE이다. 다른 구현예에서, 면역접합체는 M69에 공유결합된 MMAF이다.

- [0013] 일 구현예에서, 본 발명은 또한 면역접합체에 사용하기 위한 링커를 제공한다. 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 연결 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 연결 모이어티는 카텡신(Capthesin) B에 의해 절단가능한 Val-Cit 모이어티 또는 Phe-Lys 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 항체의 표면에 직접 접합된다. 일부 구현예에서, 링커는 라이신 측쇄에 공유결합한다. 일부 구현예에서, 링커는 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 트리아졸 모이어티를 통해 제2 연결 성분에 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 항체의 표면에 결합된다. 일부 구현예에서, 제2 연결 성분은 절단가능한 연결 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 연결 성분은 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 PEG-기반이다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 PEG-기반이다. 일부 구현예에서, 제2 연결 성분은 PEG-기반이다. 일부 구현예에서, 항체는 항-매트립타제 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료제는 세포독성제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 독소루비신(DOX), 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)를 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아마이신 및 리신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAE이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAF이다.
- [0014] 또한, 본 발명에 따라 면역조절제인 탈리도마이드(thalidomide)가 골수종 세포에서 매트립타제의 활성화를 현저하게 유도한다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 MM 및 다른 암을 치료하기 위한, 탈리도마이드 및 이의 유사체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 면역조절제의 투여와 조합하여 활성 매트립타제를 표적화하는 면역접합체의 투여를 제공한다. 탈리도마이드 유사체는 당 업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 레날리도마이드, CC-3052, CC-4047, CC-5103, IMiD3, EM12 및 ENMD0995를 포함한다.
- [0015] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법으로서, 치료적 유효량의 항-매트립타제 항체를 포함하는 조성물을 상기 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69이다.
- [0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 매트립타제를 활성화하는 치료적 유효량의 면역조절제와 조합하여 항-매트립타제 항체를 함유하는 치료적 유효량의 조성물을 혈액 악성종양 치료가 필요한 대상체에게 투여함으로써 혈액 악성종양을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69이다. 일부 구현예에서, 면역조절제는 탈리도마이드 또는 이의 유사체이다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-매트립타제 항체와 세포독성제 사이의 면역접합체를 함유하는 치료적 유효량의 조성물을 혈액 악성종양 치료가 필요한 대상체에게 투여함으로써 악성 세포가 매트립타제를 발현시키는 악성종양을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 독소루비신(DOX), 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF) 및 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아마이신 및 리신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAE이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAF이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 항-매트립타제 항체에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69이다. 따라서, 일부 구현예에서, 면역접합체는 M69에 공유결합된 MMAE이다. 다른 구현예에서, 면역접합체는 M69에 공유결합된 MMAF이다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 매트립타제를 활성화하는 치료적 유효량의 면역조절제와 조합하여, 항-매트립타제 항체와 세포독성제 사이의 면역접합체를 함유하는 치료적 유효량의 조성물을 악성종양 치료가 필요한 대상체에게 투여함으로써, 악성 세포가 매트립타제를 발현시키는 악성종양을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 독소루비신(DOX), 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF) 및 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아마이신 및 리신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAE이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAF이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 항-매트립타제 항체에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69이다. 따라서, 일부 구현예에서, 면역접합체는 M69에 공유결합된 MMAE이다. 다른 구현예에서, 면역접합체는 M69에 공유결합된 MMAF이다. 일부 구현예에서, 면역조절제는 탈리도마이드 또는 이의 유사체이다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 방법은 치료적 유효량의 M69-MMAE 면역접합체를 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체와 함께 투여하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 방법은 치료적 유효량의 M69-MMAF 면역접합체를 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체와 함께 투여하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 방법은 치료적 유효량의 M69-아우리스타틴 PE 면역접합체를 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체와 함께 투여하는 것을 포함한다.
- [0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-매트립타제 항체 및 세포독성제를 포함하는, 매트립타제를 발현하는 암 세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공한다.

- [0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 임의의 구현예에 따라 매트립타제를 발현하는 암 세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 함유하는 조성물을 제공한다.
- [0021] 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유류로부터의 혈액 세포를 함유하는 시험 샘플을 항-매트립타제 항체와 접촉시키고, 항체와 매트립타제 사이의 복합체 형성을 검출함으로써 혈액 악성종양을 진단하는 방법을 제공하며, 상기 복합체의 형성은 악성종양의 지표이다.
- [0022] 또 다른 양태에서, 본 발명은 조혈 세포를 항-매트립타제 항체 또는 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체로 치료함으로써 매트립타제를 발현하는 조혈 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0023] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체를 함유하는, 포유류 조직 또는 세포에서의 매트립타제의 발현을 검출하기 위한 분석 키트를 제공한다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료용 키트를 제공하며, 상기 키트는 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체를 포함한다.
- [0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료를 위한 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체의 용도를 제공한다.
- [0026] 또 다른 양태에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료용 약제의 제조를 위한 상기 임의의 구현예에 따른 면역접합체의 용도를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 상기 양태 및 다른 양태는 이하의 도면 및 상세한 설명을 참조하여 보다 잘 이해될 것이다.

과제의 해결 수단

- [0028] 본 발명에 따르면, 정상 상피세포 및 다양한 상피세포-유래 암종 세포가 주로 매트립타제를 생산하지만, 이 막-결합 프로테아제는 여러가지 혈액 악성종양 세포에도 존재하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명은 매트립타제에 대한 항체를 투여하여 혈액 악성종양을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항-매트립타제 항체 및 세포독성제의 면역접합체, 및 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료를 위한 면역접합체의 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 아우리스타틴, 예를 들어, MMAE, MMAF 또는 아우리스타틴 PE는 골수종 세포를 표적화하기 위해 매트립타제에 대한 단클론 항체와 결합된다. 일부 구현예에서, 항체는 M69이다. 따라서, 일부 구현예에서, 면역접합체는 M69-아우리스타틴, 예를 들어, M69-MMAE, M69-MMAF 및/또는 M69-아우리스타틴 PE이다.
- [0029] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 치료적 유효량의 항-매트립타제 항체를 함유하는 조성물을 이러한 치료가 필요한 대상체에게 투여함으로써 혈액 악성종양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 양태의 일 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 혈액 악성종양은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 암이다.
- [0031] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 혈액 악성종양은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다.
- [0032] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 혈액 악성종양은 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소형 림프구성 림프종(SLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 단구성 백혈병(AMOL), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종(BL), 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBL), 맨틀 세포 림프종(MCL) 및 다발성 골수종으로부터 선택된다.
- [0033] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 혈액 악성종양은 다발성 골수종이다.
- [0034] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 혈액 악성종양은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 암이다.
- [0035] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 단클론 항체(mAb)이다. 일부 구현예에서, 단클론 항체는 M69이다. 추가의 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 세포독성 화합물에 공유결합된다. 또 다른 구현예에서, 세포독성 화합물은 MMAE, MMAF 및/또는 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴이다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명은 MMAE, MMAF 및/또는 아우리스타틴 PE에 결합된 치료적 유효량의 항-매트립타제 항체를 투여함으로써 혈액 악성종양을 치료하는 방법을 제공하며, 추가의 구

현에서 항-매트립타제 항체는 M69이다.

- [0036] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체로부터 선택된다.
- [0037] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0038] 제2 양태에서, 본 발명은 항-매트립타제 항체를 함유하는 치료적 유효량의 조성물을 매트립타제를 활성화시키는 치료적 유효량의 면역조절제와 함께 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 혈액 악성종양을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.
- [0039] 상기 양태의 일 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양이 다발성 골수종이다.
- [0040] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 활성화된 매트립타제에 특이적인 항체이다.
- [0041] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 mAb M69이다.
- [0042] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 항원-결합 단편이다.
- [0043] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- [0044] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 단클론 항체이고, 면역조절제가 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.
- [0045] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 면역조절제는 항-매트립타제 항체를 포함하는 조성물을 투여하기 전에 매트립타제가 활성화되기에 충분한 시간 동안 대상체에게 투여된다.
- [0046] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0047] 제3 양태에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 항-매트립타제 항체와 세포독성제 사이의 면역접합체를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0048] 상기 양태의 일 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 혈액 악성종양은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 암이다.
- [0049] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양은 암이다.
- [0050] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양은 매트립타제-양성 악성 B 세포 림프종 또는 상피 암종이다.
- [0051] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양은 맨틀 세포 림프종(Mantle cell lymphoma, MCL), 버킷 림프종(BL) 및 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBL)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 매트립타제-양성 악성 B 세포 림프종이다.
- [0052] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양은 전립선, 유방, 뇌, 신장, 폐, 결장, 방광, 및 난소로 구성된 그룹으로부터 선택된 상피 암종 뿐만 아니라 갑상선 종양, 피부 종양 및 증피종을 비롯한 기타 종양 유형이다.
- [0053] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양은 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소형 림프구성 림프종(SLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 단구성 백혈병(AMOL), 호지킨 림프종, 비-

호지킨 림프종, 맨틀 세포 림프종(MCL) 및 다발성 골수종으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

- [0054] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양은 다발성 골수종이다.
- [0055] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 단클론 항체(mAb)이다. 일부 구현예에서, 단클론 항체는 M69이다.
- [0056] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 항원-결합 단편은 M69의 항원 결합 단편이다.
- [0057] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- [0058] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제는 독소, 항생제, 및 방사성 동위원소를 포함하는 화합물로부터 선택된다.
- [0059] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제는 독소루비신(DOX), MMAE, MMAF 및 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아 마이신, 및 리신으로부터 선택된다.
- [0060] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제가 독소루비신(DOX)이다.
- [0061] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제는 아우리스타틴이다.
- [0062] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제는 MMAE이다.
- [0063] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제는 MMAF이다.
- [0064] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제는 아우리스타틴 PE이다.
- [0065] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 악성종양은 독소루비신의 치료에 암 난치성이다.
- [0066] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 악성종양은 아우리스타틴의 치료에 암 난치성이다.
- [0067] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 악성종양은 MMAE의 치료에 암 난치성이다.
- [0068] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 악성종양은 MMAF의 치료에 암 난치성이다.
- [0069] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 악성종양은 아우리스타틴 PE의 치료에 암 난치성이다.
- [0070] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 면역접합체는 M24-DOX 또는 M69-DOX이다.
- [0071] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 면역접합체는 M24-아우리스타틴 또는 M69-아우리스타틴이다.
- [0072] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 면역접합체는 M24-MMAE 또는 M69-MMAE이다.
- [0073] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공

하며, 면역접합체는 M24-MMAF 또는 M69-MMAF이다.

- [0074] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 면역접합체는 M24-아우리스타틴 PE 또는 M69-아우리스타틴 PE이다.
- [0075] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 세포독성제는 공유결합을 통해 항-매트립타제 항체에 커플링된다.
- [0076] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 대상체는 포유류 환자이다.
- [0077] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 대상체는 인간이다.
- [0078] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0079] 제4 양태에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 매트립타제를 활성화시키는 치료적 유효량의 면역조절제와 조합하여, 항-매트립타제 항체와 세포독성제 사이의 면역접합체를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0080] 상기 양태의 일 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 상기 악성종양은 다발성 골수종이다.
- [0081] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 활성화된 매트립타제에 특이적인 항체이다.
- [0082] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체가 단클론 항체(mAb)이다. 일부 구현예에서, 단클론 항체는 M69이다.
- [0083] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 항원-결합 단편은 M69의 항원 결합 단편이다.
- [0084] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- [0085] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 mAb M69이고, 세포독성제는 독소루비신(DOX)이다.
- [0086] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 mAb M69이고, 세포독성제는 아우리스타틴이다.
- [0087] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 mAb M69이고, 세포독성제는 MMAE이다.
- [0088] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 mAb M69이고, 세포독성제는 MMAF이다.
- [0089] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 항-매트립타제 항체는 mAb M69이고, 세포독성제는 아우리스타틴 PE이다.
- [0090] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.
- [0091] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 악성 세포가 매트립타제를 발현하는 악성종양의 치료 방법을 제공하며, 면역접합체를 포함하는 조성물의 투여 전에 매트립타제가 활성화되기에 충분한 시간동안 면역조절제가 대상체에게 투여된다.
- [0092] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며; (a) 악성종양이 다발성 골수종이고; (b) 면역접합체는 항-매트립타제 항체 및 DOX를 포함하고; 및 (c) 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.

- [0093] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며; (a) 면역접합체가 항-매트립타제 항체 및 아우리스타틴을 포함하며; 및 (b) 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.
- [0094] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며; (a) 면역접합체가 항-매트립타제 항체 및 MMAE를 포함하고; (b) 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.
- [0095] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며; (a) 면역접합체가 항-매트립타제 항체 및 MMAF를 포함하고; (b) 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.
- [0096] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 혈액 악성종양의 치료 방법을 제공하며; (a) 면역접합체가 항-매트립타제 항체 및 아우리스타틴 PE를 포함하고; (b) 면역조절제는 탈리도마이드 또는 탈리도마이드 유사체이다.
- [0097] 제5 양태에서, 본 발명은 항-매트립타제 항체 및 세포독성제를 포함하는, 매트립타제를 발현하는 암 세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공한다.
- [0098] 상기 양태의 일 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체가 암세포의 표면 상에 발현되는 항원을 인식한다.
- [0099] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체가 단클론 항체(mAb)이다. 일부 구현예에서, 단클론 항체는 M69이다.
- [0100] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체가 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 항원-결합 단편은 M69의 항원 결합 단편이다.
- [0101] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- [0102] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체가 단클론 항체이고, 세포독성제가 독소루비신(DOX), MMAE, MMAF, 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아마이신 및 리신으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.
- [0103] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체와 DOX 모이어티 사이의 공유결합을 통해 접합체가 형성된다.
- [0104] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 DOX의 15 이하의 분자와 커플링된다.
- [0105] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 DOX의 약 5 내지 10 분자와 커플링된다.
- [0106] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 DOX의 약 7 분자와 커플링된다.
- [0107] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체와 아우리스타틴 모이어티 사이의 공유결합을 통해 접합체가 형성된다.
- [0108] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 MMAE, MMAF 및/또는 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴의 10 분자 이하와 커플링된다.
- [0109] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 MMAE, MMAF 및/또는 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴의 약 5 내지 10 분자와 커플링된다.
- [0110] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 MMAE, MMAF 및/또는 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴의 약 3 내지 5 분자와 커플링된다.
- [0111] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합

체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 MMAE, MMAF 및/또는 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴의 약 3 분자와 커플링된다.

[0112] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 항-매트립타제 항체의 1 분자가 MMAE, MMAF 및/또는 아우리스타틴 PE를 포함하는 아우리스타틴의 약 1 내지 3 분자와 커플링된다.

[0113] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 면역접합체는 항-매트립타제 항체의 부재하에 투여될 때 세포독성제와 비교하여 심장 독성이 감소되거나 전혀없다.

[0114] 상기 양태의 또 다른 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 면역접합체는 매트립타제를 발현하지 않는 골수-유래 중간엽 간질세포에 대한 악영향을 최소화시키거나 전혀 갖지 않는다.

[0115] 또 다른 양태에서, 본 발명은 제5 양태에서 상기 기재된 임의의 구현예에 따라 매트립타제를 발현하는 암 세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0116] 상기 양태의 일 구현예에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 암 세포를 선택적으로 표적화하는 면역접합체를 제공하며, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.

[0117] 또 다른 양태에서, 본 발명은 링커를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 항체는 항-매트립타제 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커를 포함하는 면역접합체는 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료제는 본 발명에 따른 임의의 치료제이다. 일부 구현예에서, 치료제는 아우리스타틴을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료제는 MMAE를 포함한다.

[0118] 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 연결 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 연결 모이어티는 Cit-Val 연결 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 링커는 Phe-Lys 연결 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 연결 모이어티는 카텝신 B에 의해 절단가능하다.

[0119] 일부 구현예에서, 링커는 항체의 표면에 접합된다. 일부 구현예에서, 항체는 항-매트립타제 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 노출된 아미노산 잔기에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 노출된 아미노산 잔기는 시스테인을 포함한다. 추가의 구현예에서, 링커는 설프하이드릴-말레이미드 커플링을 통해 시스테인에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 노출된 아미노산 잔기는 라이신을 포함한다. 추가의 구현예에서, 링커는 아실화에 의해 형성된 아미드 결합을 통해 라이신에 공유결합된다.

[0120] 일부 구현예에서, 링커는 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 본 발명의 임의의 양태에 따라 항체의 표면에 접합된다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 제2 연결 성분에 연결된다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 클릭 화학을 통해 제2 연결 성분에 연결된다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 트리아졸 모이어티를 통해 제2 연결 성분에 연결된다. 일부 구현예에서, 제2 연결 성분은 본 발명의 임의의 양태에 따른 절단가능한 연결 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 연결 성분은 본 발명의 임의의 양태에 따른 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료제는 세포독성제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 독소루비신(DOX), 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)을 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아마이신 및 리신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAE이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAF이다.

[0121] 일부 구현예에서, 링커는 PEG-함유 성분이다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 PEG-함유 성분이다. 일부 구현예에서, 제2 연결 성분은 PEG-함유 성분이다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분은 PEG-함유 성분이다.

[0122] 또 다른 양태에서, 본 발명은 라이신 측쇄를 통해 제1 연결 성분에 공유결합된 항-매트립타제 항체를 포함하는 면역접합체를 제공하며, 상기 제1 연결 성분은 PEG-함유 성분이며, 상기 제1 연결 성분은 트리아졸 모이어티를 통해 제2 연결 성분에 결합되며, 상기 제2 연결 성분은 절단가능한 연결 모이어티 및 치료제를 가지며, 상기 제2 연결 성분은 PEG-함유 성분이다. 일부 구현예에서, 항-매트립타제 항체는 M69를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 연결 성분은 1 내지 10 PEG 단위를 함유한다. 일부 구현예에서, 제2 연결 성분은 1 내지 10 PEG 단위를 함유한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 연결 모이어티는 Val-Cit 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 연결 모이어티는 Phe-Lys 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료제는 세포독성제를 포함한다. 일부

구현예에서, 세포독성제는 독소루비신(DOX), 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)을 포함하는 아우리스타틴, 칼리케아마이신 및 리신으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAE이다. 일부 구현예에서, 세포독성제는 MMAF이다.

[0123] 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유류로부터의 혈액 세포를 함유하는 시험 샘플을 항-매트립타제 항체와 접촉시키는 단계 및 항체와 매트립타제 사이의 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함하는 혈액 악성종양의 진단 방법을 제공하며, 상기 복합체 형성이 악성종양의 지표이다.

[0124] 또 다른 양태에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 조혈 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 기재된 구현예 중 어느 하나에 따른 항-매트립타제 항체 또는 면역접합체로 조혈 세포를 치료하는 단계를 포함한다.

[0125] 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유류 조직 또는 세포에서의 매트립타제의 발현을 검출하기 위한 분석 키트를 제공하며, 이는 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체를 포함한다.

[0126] 또 다른 양태에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료용 키트를 제공하며, 상기 키트는 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체를 포함한다.

[0127] 또 다른 양태에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료를 위한 상기 기술된 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체의 용도를 제공한다.

[0128] 또 다른 양태에서, 본 발명은 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료용 약제의 제조를 위한 상기 기술된 구현예 중 어느 하나에 따른 면역접합체의 용도를 제공한다.

[0129] 정의

[0130] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 샘플"은 대상체, 바람직하게는 인간 대상체로부터의 체액, 세포 또는 조직을 포함하는 시편을 지칭한다. 샘플은 자연적으로 또는 인위적인 방법(예를 들어, 수술 수단)으로, 전-악성 병변의 악성 세포 또는 세포들과 접촉한 체액일 수도 있다.

[0131] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "매트립타제의 발현" 등은 매트립타제의 형태 또는 형태들을 발현하는 하나 이상의 세포를 포함하는 임의의 생물학적 샘플을 지칭한다.

[0132] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 동물, 바람직하게는 포유동물, 및 가장 바람직하게는 인간을 지칭한다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 완전한, 무손상 항체 및 그의 Fab 단편 및 F(ab), 단편을 지칭한다. 완전한, 무손상 항체는 무린 단클론 항체(mAb), 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체와 같은 단클론 항체를 포함한다.

[0134] "항체 단편"은 예를 들어 Goldenberg, 미국 특허 제4,036,945호 및 제4,331,647호 및 본원에 포함된 참고문헌에 의해 개시된 바와 같은 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 항체 단편의 또 다른 형태는 단일 상보성-결정 영역(CDR)을 코딩하는 펩타이드이다. CDR은 항체가 결합하는 에피토프와 구조적으로 상보적이고 가변 영역의 다른 부분보다 더 가변적인 항체의 가변 영역의 세그먼트이다. CDR 펩타이드는 관심 항체의 CDR을 코딩하는 유전자를 작제함으로써 획득될 수 있다. 이러한 유전자는, 예를 들면, 항체-생산 세포의 RNA로부터 가변 영역을 합성하기 위해 폴리머라제 연쇄 반응을 사용하여 제조된다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역접합체"는 항체 성분과 분자 또는 치료제 또는 진단제와의 접합체를 지칭한다. 치료제 또는 진단제는 방사성 또는 비-방사성 표지를 포함할 수 있다. 면역접합체를 제조하기 위해 사용된 항체는 단클론 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본원에서 바람직한 면역접합체는 매트립타제 단클론 항체와 세포독성제 간의 접합체이며, 보다 바람직한 면역접합체는 매트립타제 단클론 항체 및 FDA-승인받은 항암제를 포함하는 접합체이며, 독소루비신(DOX), 아우리스타틴, 칼리케아마이신, 또는 리신을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0136] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고, 및/또는 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 화학요법제, 예컨대 메토타렉세이트, 아드리아마이신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포사이드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 기타 인터칼레이팅 제제, 핵산 분해 효소와 같은 효소 및 그의 단편, 항생제, 및 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적으로 활성인 독소과 같은 독소(이들의 단편 및/또는 변이체를 포함함), 및

하기 개시된 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하는 것으로 의도된다. 이 용어는 또한 하나 이상의 방사성 동위원소(예를 들어, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 뿐만 아니라 Lu의 방사성 동위원소)를 포함하는 화합물을 포함한다.

- [0137] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "독소루비신"(또는 "DOX")은 (8S,10S)-10-(4-아미노-5-하이드록시-6-메틸-테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-6,8,11-트리하이드록시-8-(2-하이드록시아세틸)-1-메톡시-7,8,9,10-테트라하이드로테트라센-5,12-디온의 체계적 (IUPAC) 화학물 명칭을 갖는 안트라사이클린 항생제를 지칭한다.
- [0138] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아우리스타틴"은 항균제 모노메틸 아우리스타틴 E("MMAE"), 데스메틸-아우리스타틴 F로도 알려져 있는 모노메틸 아우리스타틴 F("MMAF"), 및 아우리스타틴 PE를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. MMAE는 (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-하이드록시-1-페닐프로판-2-일)아미노)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소프로필)피롤리딘-1-일)-3-메톡시-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸아미노)부탄아미도)부탄아미드의 체계적 (IUPAC) 화학물 명칭을 갖는다. MMAF는 (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-디메틸-2-((S)-3-메틸-2-(메틸아미노)부탄아미도)부탄아미도)-3-메톡시-5-메틸헵타노일)피롤리딘-2-일)-3-메톡시-2-메틸프로판아미도)-3-페닐프로판산의 체계적 (IUPAC) 화학물 명칭을 갖는다. 아우리스타틴 PE는 2-[[[(2S)-2-(디메틸아미노)-3-메틸부타노일]아미노]-N-[(3R,4S,5S)-3-메톡시-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-메톡시-2-메틸-3-옥소-3-(2-페닐에틸아미노)프로필]피롤리딘-1-일]-5-메틸-1-옥소헵탄-4-일]-N,3-디메틸부탄아미드의 체계적 (IUPAC) 화학물 명칭을 갖는다.
- [0139] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "담체"는 치료제 또는 진단제와 결합하여 표적화된 세포로의 약물 전달을 용이하게 할 수 있는 분자 또는 고차원 구조체를 지칭한다. 담체는 양친매성 지질 또는 탄수화물과 같은 지질 또는 폴리머, 또는 미셀, 리포솜 및 나노입자와 같은 고차원 구조체와 같은 분자를 포함할 수 있다.
- [0140] 본원에 개시된 면역접합체 또는 조성물은 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있으며, 하나 이상의 약학적으로 적합한 부형제, 하나 이상의 추가 성분 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0141] 본원에 개시된 면역접합체 또는 조성물은 예를 들어, 볼루스 주사 또는 연속 주입을 통한 정맥내 투여를 위해 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 방부제가 첨가된 단위 투여 형태, 예를 들어 앰풀 또는 다회 투여용 용기로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있으며, 현탁액, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로는, 활성 성분은 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균된 발열원이-없는 물로 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.
- [0142] 면역접합체 또는 조성물은 또한 포유동물에게 피하 또는 심지어 다른 비경구 경로에 의해 투여될 수 있다. 또한, 투여는 연속 주입 또는 단일 또는 다중 볼루스에 의한 것일 수 있다. 일반적으로, 투여된 면역접합체의 투여량은 환자의 연령, 체중, 신장, 성별, 일반적인 건강 상태 및 이전의 병력과 같은 요소에 따라 달라질 것이다.
- [0143] 치료적 또는 진단적 접합체 또는 네이키드 항체의 작용 지속 시간을 조절하기 위해 추가적인 약학적 방법이 사용될 수 있다. 제어 방출 제제는 면역접합체 또는 네이키드 항체를 복합화 또는 흡착하기 위한 폴리머의 사용을 통해 제조될 수 있다.
- [0144] 항체 제제는 투여량이 생리학적으로 중요하다면 "치료적 유효량"으로 투여된다고 한다. 제제의 존재가 암 세포수의 감소, 종양의 크기 감소 또는 종양의 성장 억제를 포함하여, 수렴하는 포유류의 생리학에서 검출가능한 변화를 초래하는 경우, 제제는 생리학적으로 유의하다. 특히, 항체 제제는 그의 존재가 항 종양 반응을 일으키거나, 자가면역 질환 상태의 징후 및 증상을 경감시키면 생리학적으로 유의하다. 생리학적으로 유의한 효과는 또한 수렴하는 포유류에서 체액성 및/또는 세포성 면역 반응의 유발일 수 있다.
- [0145] 주어진 요법에서 사용되는 약학적 조성물의 실제 바람직한 양은 이용되는 특정 형태, 제형화된 특정 조성물, 투여 방식, 특정 투여 부위, 환자의 체중, 일반적 건강, 성별 등, 치료되는 특정 징후 등, 및 담당의사 또는 수의사를 포함하는 당업자에 의해 인식되는 다른 요인에 따라 달라질 것이라는 것을 이해할 것이다. 주어진 투여 프로토콜에 대한 최적 투여 속도는 통상의 투여량 측정 시험을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0146] **면역접합체의 제조**
- [0147] 본원에 기술된 면역접합체는 항체를 지질, 탄수화물, 단백질 또는 다른 분자와 연결시키는 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 결합 분자는 본원에 기재된 하나 이상의 담체(예를 들어, 지질, 폴리머, 리포솜, 미셀 또는 나노입자)와 결합되어 면역접합체를 형성할 수 있으며, 면역접합체는 치료제 또는 진

단제와 공유결합, 비-공유결합 또는 다른 방식으로 결합될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 임의의 결합 분자는 본원에 기재된 하나 이상의 치료제 또는 진단제, 또는 추가의 담체와 추가로 접합될 수 있다. 일반적으로, 하나의 치료제 또는 진단제가 각각의 결합 분자에 부착될 수 있지만, 하나 이상의 치료제 또는 진단제가 동일한 결합 분자에 부착될 수 있다. 또한, 치료제는 동일할 필요는 없지만 상이한 치료제일 수 있다.

[0148] 예를 들어, 항체와 DOX의 면역접합체를 합성하기 위해 먼저 DOX를 숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]사이클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC)와 반응시킨 후, 매트립타제에 대한 항체를 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)와 반응시키고, 이들 2개의 중간체를 커플링시켰다. 면역접합체를 제조하는데 사용될 수 있는 추가의 링커는 하기의 "링커(절단가능 및 절단-불가능)" 부분에서 논의된다.

[0149] 치료 방법

[0150] 본 발명은 매트립타제 항체 또는 면역접합체, 또는 매트립타제를 발현하는 세포를 포함하는 악성종양의 치료를 위한 주요 조성물로서 상기 매트립타제 항체 또는 면역접합체를 포함하는 조성물의 용도를 포함한다. 악성종양은 고형 종양, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 다발성 골수종, B-세포 악성종양 및/또는 T-세포 악성종양을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 고형 종양은 흑색종, 암종 및 육종으로 구성된 그룹으로부터 선택되고, 암종은 신장암종, 폐암종, 장 암종, 위암종 및 흑색종으로 구성된 그룹으로부터 선택된다. B-세포 악성종양은 B-세포 림프종의 무활성 형태, B-세포 림프종의 공격적인 형태, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 및 다발성 골수종, B-세포 장애 및 기타 질병으로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 특히, 본원에 기술된 조성물은 B-세포 림프종의 무활성 형태, B-세포 림프종의 공격적인 형태, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종 및 발덴스트림 거대글로불린혈증 뿐만 아니라 다양한 자가면역의 치료에 특히 유용하다. 치료 방법은 치료를 필요로 하는 포유동물에게 항체 또는 면역접합체를 포함하는 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0151] 항체

[0152] 매트립타제에 대한 항체("항-매트립타제 항체")는 당 분야에 공지된 방법들에 의해 제조될 수 있으며, 및 예를 들어, Lin C. Y., et al., J. Biol. Chem., 1999, 274 (26):18237-18242에 개시되어 있다. 매트립타제에 대한 항체는 잠재적인 매트립타제에 특이적인 항체, 활성화된 매트립타제에 특이적인 항체, 및 잠재적인 및 활성화된 매트립타제를 모두 인식하는 항체를 포함한다.

[0153] 본 발명의 항체 및 그의 면역원성 부분은 상기 질병 상태 중 어느 하나를 예방 또는 치료하기 위해 치료적으로 유효한 농도로 투여된다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 항체는 당 업계에 공지된 다양한 허용가능한 부형제를 사용하여 제형화될 수 있다. 전형적으로, 항체는 바람직하게는 정맥내 또는 복강내 주사로 투여된다. 이러한 투여를 달성하기 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 조성물은 또한 국소 또는 경구 투여되거나, 점막을 가로질러 전염될 수 있다.

[0154] 환자에게 투여하기 전에, 제형화제가 항체에 첨가될 수 있다. 액체 제형이 바람직하다. 예를 들어, 이러한 제형화제는 오일, 폴리머, 비타민, 탄수화물, 아미노산, 염류, 완충액, 알부민, 계면활성제 또는 벌크제를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 탄수화물은 당 또는 당 알콜, 예컨대 모노-, 디- 또는 폴리사카라이드, 또는 수용성 글루칸을 포함한다. 사카라이드 또는 글루칸은 프룩토스, 텍스트로스, 락토스, 글루코스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 말토스, 수크로스, 텍스트란, 폴루란, 텍스트레인, 알파- 및 베타-사이클로텍스트린, 가용성 전분, 하이드록시에틸 전분 및 카르복시메틸셀룰로오스 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0155] 또한, 항체는 순환 반감기를 증가시키기 위해 폴리머와 공유결합시킴으로써 화학적으로 변형될 수 있다. 바람직한 폴리머, 및 이들을 펩타이드에 부착시키는 방법은 미국 특허 제4,766,106호; 제4,179,337호; 제4,495,285호; 및 제4,609,546호에 개시되어 있다. 바람직한 폴리머는 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 수용성 폴리옥시에틸화 폴리올 또한 본 발명에 유용하다. 이들은 폴리옥시에틸화 소르비톨, 폴리옥시에틸화 글루코스, 폴리옥시에틸화 글리세롤(POG) 등을 포함한다.

[0156] 본 발명의 항-매트립타제 항체는 키메라 또는 인간화된 항체를 포함할 수 있다. 키메라 및 인간화된 항체는 둘 다 인간에서 자연적으로 생산되는 항체 변이체와의 유사성을 증가시키기 위해 화학적으로 변형된 비-인간 종으로부터 원래 유래된 항체를 포함하며, 결과적으로 면역원성이 적다. 키메라 및 인간화된 항체는 모두 전형적으로 재조합적으로 생산되고, CHO 세포를 통해 포유류 세포 배양물에서 발현된다. 이러한 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 키메라 항-매트립타제 항체 및 인간화된 항-매트립타제 항체 사이의 주요 차이점은 키메라 항-매트립타제 항체가 전형적으로 인간 Fc 영역을 가진 단클론 항체의 Fc 영역의 치환을 포함하는 반면, 인간화된 항체

가 원래의 mAb로부터 상보성 결정 영역(CDRs)이 "치환되어 도입"된 것 외에는 인간 면역글로불린(전형적으로 인간 항체 "스캐폴드"로 지칭됨)과 동일하다.

[0157] 순환 반감기를 증가시키기 위한 또 다른 약물 전달 시스템은 리포솜이다. 리포솜 전달 시스템을 제조하는 방법은 Gabizon et al., Cancer Res. 42: 4734-9 (1982); Szoka et al., Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467-508 (1980); Szoka et al., Meth. Enzymol. 149: 143-7 (1987); and Langne et al., Pol. J. Pharmacol. 51: 211-22 (1999)에 기재되어 있다. 다른 약물 전달 시스템은 당 업계에 공지되어 있다.

[0158] 링커(절단가능 및 절단-불가능)

[0159] 본 발명의 항-매트립타제 항체, 예를 들어, M69는 치료제 또는 진단제, 예를 들어 DOX, 아우리스타틴(MMAE/MMAF)을 포함하지만, 이에 한정되지 않음)에 공유결합하여 면역접합체를 형성한다. 면역접합체 링커-기반 기술의 개요는 Jain N et al., Current ADC Linker Chemistry, Pharm Res. 2015 Nov;32(11):3526-40에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참고문헌으로 통합된다. 상기 면역접합체에서의 공유결합은 절단가능한 연결 모이어티, 예를 들어 라이소솜 내부의 카텝신 B에 의해 절단가능한 Val-Cit 링커를 포함할 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 Val-Cit 링커는 하기 실시예 10에서 사용하기 위해 변형되었다. 다른 절단가능한 연결 모이어티는 카텝신 B에 의해 또한 절단가능한 Phe-Lys 링커를 포함할 수 있다. 가장 간단한 절단가능한 연결 모이어티의 일부는 환원성(즉, 세포내) 환경에서 절단가능한 디설파이드(S-S) 브릿지를 포함한다. 그러나, Val-Cit 링커와 같은 절단가능한 연결 모이어티는 예를 들어, 무분별한 절단을 겪을 수 있는 디설파이드 브릿지보다 더 특이성을 제공하며, 따라서 우수한 옵션을 제공하지만 임의의 이러한 절단가능한 연결 모이어티가 본 발명의 범위 내에서 고려되어야 한다. 본 발명에 적합할 수 있는 절단가능한 연결 모이어티의 개요는 Leriche et al., 화학 생물학에서의 절단가능한 링커, Bioorg Med Chem. 2012년 1월 15일; 20(2):571-82에 제공되어 있으며, 그 전체가 참고문헌으로 포함된다. 대안적으로는, 링커는 절단불가능할 수 있다. 비-절단성 링커는 절단가능한 링커보다 다양하며, 세포내 환경에서 절단에 저항성인 임의의 연결 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 관심의 대상이 될 수 있는 특이적인 비-절단성 링커는 FDA 승인된 면역접합체 트라스투주맙 엠탄신(trastuzumab emtansine)(상품명 Kadcyla)에서 발견되는 SMCC 링커를 포함하고, 또한 M69-DOX 면역접합체의 제조에 대한 하기 실시예 2에서 분석된다.

[0160] 본 발명의 링커(및 상기 링커에 결합된 치료제)는 항체에 직접 접합되거나, 즉 면역글로불린에 공유결합될 수 있다. 공유결합은 가변 도메인 내에서와 달리, 불변 도메인 중 하나 내에 이상적으로 위치하는 면역글로불린 백본을 포함하는 아미노산 중 하나에 직접적으로 일어날 수 있다. 이러한 아미노산은 자연 발생(예를 들어, 자연 발생 라이신 또는 시스테인 잔기)되거나, 결합할 링커에 대한 최소의 입체 장애를 갖는 최적의 결합 부위를 제공하기 위해 면역글로불린이 인위적으로 돌연변이될 수 있다(예를 들어, 비-자연 발생 라이신 또는 시스테인 잔기). 대안적으로는, 링커는 번역 후 변형된 면역글로불린에서 발견되는 화학적 모이어티(예를 들어, N-글리칸에 결합됨)에 결합될 수 있다.

[0161] 대부분의 면역접합체는 항체 백본에 위치한 시스테인 잔기에 링커를 직접 부착시키는 것을 이용한다. 이러한 링커는 "말레이미드-형 링커"로 알려져 있으며, 시스테인(Cys)에서 발견되는 설프하이드릴 측쇄와 말레이미드와의 반응성을 활용한다. 말레이미드 링커의 가장 일반적인 2가지 유형은 말레이미도카프로일(mc) 및 말레이미도메틸 사이클로헥산-1-카르복실레이트(mcc) 링커를 포함한다. 말레이미드 링커의 단점은 면역접합체로부터 약물-링커의 조기 손실을 초래하는 레트로-마이클 반응을 포함하여 혈장에서의 화학적 불안정성이다. 직접 접합의 다른 유형 및 하기 실시예 10에서 사용된 것은 라이신(Lys) 측쇄의 ε-아미노 측쇄에 아실화를 통해 직접 접합되어 링커와 항체 사이에 아마이드 결합을 형성하며, 상기 링커는 아지드 관능기 대신에 활성화된 카르복실기로 구성된다.

[0162] 링커 및 치료제는 본원에 기재된 2-단계 접합 기술을 사용하여 항체에 접합될 수 있다. 이 2-단계 접합 기술은 "클릭 화학(click chemistry)", 특히 구리가 없는 클릭 화학을 활용할 수 있다. 항체 접합에서 클릭 화학의 사용은 반응 모니터링 및 ADR 측정을 위한 성형 클릭 링 시스템의 UV 기반 검출과 같은 몇가지 독특한 이점을 제공할 수 있다. 링커는 초기에 2개의 별개의 연결 성분으로 구성될 수 있으며, 예를 들어(반드시 필수는 아님), 제1 연결 성분은 면역글로불린 백본내에 위치하는 라이신 측쇄에 접합(즉, 아실화)하는 아실화제(예컨대, 예를 들어, 카르복실산, 아실 할로젠화물 또는 무수물)를 함유하며, 변형된(strained) 알킨(예를 들어, DBCO)를 추가로 함유하며, 제2 연결 성분은 아지드(N₃)기 및 치료제를 함유하여, 제1 성분 및 제2 성분이 서로 근접하여 투여될 때, 변형된 알킨은 아지드 기와 반응하여(트리아졸 모이어티를 형성함), 제1 연결 성분을 제2 연결 성분과 연결시킨다. 제1 연결 모이어티 또는 제2 연결 모이어티 중 어느 하나가 변형된 알킨기 및/또는 아지드기를 함

유할 수 있으며, 그 반대일 수도 있고; 즉 제1 연결 모이어티는 변형된 알킨을 포함할 수 있고 제2 연결 모이어티는 아지드기를 포함할 수 있거나, 또는 제1 연결 모이어티는 아지드기를 포함할 수 있고 제2 연결 모이어티는 변형된 알킨을 포함할 수 있다. 따라서, "클릭 화학"을 통해 결합될 때, 본 발명의 링커는 트리아졸 모이어티, 예를 들어 도 11에 예시된 바와 같이 DBCO와 N₃의 반응 사이에 형성된 트리아졸 모이어티를 포함할 수 있다.

[0163] 따라서, 일부 구현예에서, 면역접합체의 전체 구조는 mAb-제1 연결 성분-제 2 연결 성분-치료제를 포함하며, 제1 연결 성분은 (클릭 화학에 의해 형성된) 트리아졸 모이어티를 통해 제2 연결 성분에 접합되며, 제1 연결 성분은 면역글로불린 백본에 위치한 아미노산 잔기(예를 들어, 본원에 기재된 시스테인 또는 바람직하게는 라이신)에 접합되어 있다. 이러한 구현예에서, 절단가능한 연결 모이어티를 제1 및/또는 제2 연결 성분 중 하나, 예를 들어, Val-Cit 링커에 통합시키는 것이 가능하고, 도 11에 도시되어 있다. 이상적으로, 절단가능한 연결 모이어티는 제2 연결 성분(즉, 치료제, 예를 들어 MMAE 및/또는 MMAF를 함유하는 연결 성분)에 위치할 것이다.

[0164] 본 발명의 면역접합체 내의 링커는 PEG-기반 링커일 수 있다. 예를 들어, 도 11에 도시된 바와 같이, 일부 구현예에서, 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분(및 따라서 전체 링커)는 모두 폴리(에틸렌) 글리콜(PEG) 반복을 함유한다. PEG-기반 링커는 PEG를 함유하지 않는 링커에 비해 분명한 수의 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어, PEG-기반 링커는 보다 큰 유연성을 제공하여, 예를 들어, 링커가 항원-결합 도메인(예를 들어, 추가된 영역)에 매우 근접한 아미노산 잔기에 접합되는 경우, 거기에서 링커/치료제가 항원/수용체의 표면 성분과 결합하거나 상호작용하여 전체 면역접합체를 보다 치료 효과가 있게 만들 가능성이 감소될 것이다. 또한, 클릭 화학(예를 들어, DBCO 및 N₃를 사용하여)을 통해 링커가 생성되는 상기 구현예에서, 이론에 구애받기를 바라지는 않지만, 연결 성분에서 PEG의 사용은 트리아졸 모이어티에서 발견되는 테트라사이클릭 고리 구조와 임의의 노출된 방향족 측쇄, 특히 트립토판 측쇄 사이의 비특이적 상호작용(π - π 상호작용)을 방지하기 위한 스페이서로서 작용할 수 있다. 본 발명의 PEG-기반 링커는 총 1 내지 20 PEG 단위의 임의의 반복 단위를 포함할 수 있으며, 예를 들어 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분을 사용하는 상기 구현예에서 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분 각각에 대하여 1 내지 10 PEG 단위를 포함할 수 있다. 보다 통상적으로, 제1 연결 성분 및 제2 연결 성분 각각에 대해 3-7 PEG 단위를 포함할 수 있다. 예를 들어, 하기 실시예 10은 제1 연결 성분에 대해 5 PEG 단위 및 제2 연결 성분에 대해 4 PEG 단위를 함유하는 M69-MMAE 면역접합체를 나타낸다.

[0165] 아우리스타틴, MMAE, MMAF

[0166] MMAE를 포함하는 아우리스타틴은 매우 강력한 세포독성제의 부류를 대표한다. 이론에 구애받음 없이, MMAE와 같은 아우리스타틴은 적절한 세포 분열에 중요한 튜불린의 중합을 차단함으로써 세포 분열을 억제한다고 믿어진다. 따라서, MMAE, MMAF 및 아우리스타틴 PE와 같은 화합물은 유사 분열을 억제하기 위한 "항유사분열제"로 분류된다. 상기 세포독성제의 효능은 중요하다. DOX가 본 발명에서 사용하기에 적합함에도 불구하고, 예를 들어, MMAE는 DOX보다 100 내지 1000배 더 강력하다. 이 강력한 독성으로 인해, MMAE는 약물 자체로서의 투여에 적합하지 않다. 그러나, 매트립타제 항체, 예를 들어 M69와 같은 항체에 커플링될 때, 세포독성 페이로드(payload)는 특정 악성 세포로 향하게 할 수 있다.

[0167] 상기한 바와 같이, 본 발명의 항체 및 조성물은 바람직하게는 상기-정의된 질병 상태 중 임의의 것을 예방 또는 치료하기 위해 인간 환자를 치료하는데 사용된다. 바람직한 투여 경로는 비경구적이다. 비경구 투여에서, 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 비경구적 비히클과 함께 용액, 현탁액 또는 에멀전과 같은 단위 투여량 주사 형태로 제형화될 것이다. 상기 비히클은 본질적으로 무독성이며, 비-치료적이다. 상기 비히클의 예로는 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 헵크스 용액이 있다. 비-수용성 비히클, 예컨대 고점 오일 및 에틸 올레에이트가 또한 사용될 수 있다.

[0168] mAb-아우리스타틴 및 mAb-Dox 접합체를 비롯한, 본원에 개시된 항-매트립타제 면역접합체는 암세포를 특이적으로 표적화하는 항암제를 개발하기 위한 예를 나타낸다. 항-매트립타제 mAb는 특정 유형의 종양에서 더 잘 작동할 수 있는 항-튜불린 화합물과 같은 다른 유형의 세포독성제에 연결될 수 있거나, 펩타이드, shRNA/siRNA 및 심각한 부작용으로 인해 암 치료에 잠재적인 가능성이 거의 없는 매우 독성이 강한 화합물을 비롯한 임의의 유형의 제제의 표적화된 전달을 위해 리포좀 또는 나노입자와 커플링될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0169] 도 1의 A 내지 D는 인간 림프종 및 골수종 세포에서의 매트립타제 및 HAI-1의 웨스턴 분석을 나타낸다. 패널(A)의 세포주는 Hs 445(라인 2), HuT 78(라인 3), Farage(라인 4), Raji(라인 5), Daudi(라인 6), Namalwa(라인 7), Ramos(라인 8), ST486(라인 9), SU-DHL-4(라인 10), SU-DHL-6(라인 11), OCI-LY-3(라인 12), RPMI-

8226(라인 13)을 포함한다. 패널 (B)의 세포주는 HL-60(라인 2), Reh(라인 3), Jurkat(라인 4), SUP-T1(라인 5), CCRF-CEM(라인 6), CCRF-HSB-2(라인 7), MOLT-3(라인 8), MOLT-4(라인 9), CCRF-SB(라인 10), RS4-11(라인 11), THP-1(라인 12), U937(라인 13)을 포함한다. 패널 (C)는 표시된 바와 같이 3개의 MM 세포주에서의 매트립타제 수준의 평가를 나타낸다. GAPDH는 내부 대조군 역할을 했다. 패널 (D)는 지시된 대로 각각 매트립타제 mAb M24, HAI-1mAb M19 및 활성화된 매트립타제 M69로 염색된 파라핀-포매된 다발성 골수종의 조직 절편을 나타낸다.

도 2는 MM 세포에 대한 M24-DOX의 세포독성 효과를 나타낸다. 24-웰 플레이트에서 MM 세포(1×10^5 /웰)를 48시간 동안 다양한 농도의 M24-DOX를 사용하거나 사용하지 않고 처리하였다. 세포 수는 Vi-Cell 계수기(Beckman)에 의해 계수되었다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 통계적 비교: *, 대조군보다 유의하게 낮았으며, $p < 0.036$. 플롯팅된 값은 3개의 별도의 실험으로부터의 중복값을 나타낸다.

도 3A 및 B는 세포내에서의 M24-DOX의 내재화를 나타낸다. 다양한 기간 동안 MM.1S 세포를 M24-DOX에 노출시킨 후, 세포를 고정하고 염색하였다. 면역접합체를 형광 현미경으로 시각화하였다. DAPI는 핵 염색에 사용되었다.

도 4a 내지 4c는 정상 골수 간엽 세포에 대한 M24-DOX의 감소된 세포독성을 도시한다. 골수-유래된 중간엽 간질 세포(5×10^4 /웰, 24-웰 플레이트)를 4일 동안 다양한 농도의 M24-DOX 또는 유리 DOX로 처리하였다. 세포 수는 Vi-Cell 계수기로 측정하였다. (A)는 M24-DOX가 간질 세포에 대한 세포독성이 없다는 것을 보여주며; (B)는 심근 세포에 대한 세포독성이 감소함을 보여주며; 및 (C)는 M24-DOX와 DOX 및 대조군의 비교를 나타낸다.

도 5는 탈리도마이드에 의해 유도된 MM 세포에서의 매트립타제의 활성화를 설명한다. MM 세포(MM.1S)를 24시간 동안 표시된 바와 같이 다양한 농도의 탈리도마이드로 처리한 후, 효소의 활성 형태에 대한 특정 단클론 항체(M69)를 사용하여 매트립타제의 활성화를 검출하기 위한 웨스턴 분석을 수행하였다. 프로테아제의 잠재적 형태는 또한 불활성 형태 효소에 대한 mAb(M24)를 사용하여 검출되었다. GAPDH가 대조군 역할을 했다.

도 6a 및 6b는 탈리도마이드가 M69-DOX에 대한 MM 세포를 민감화하지만 M24-DOX에 대하여는 민감화하지 않음을 나타낸다: (6a) M69-DOX 단독에 의한 MM 세포의 처리의 M69-DOX/탈리도마이드 조합 처리와의 비교; 및 (6b) M24-DOX 단독에 의한 MM 세포의 처리의 M24-DOX/탈리도마이드 조합 처리와의 비교.

도 7은 탈리도마이드에 의해 유도된 MM 세포에서의 매트립타제의 활성화를 설명한다. MM 세포(MM.1S)를 24시간 동안 표시된 바와 같이 다양한 농도의 탈리도마이드로 처리한 후, 효소의 활성 형태에 대한 특정 단클론 항체(M69)를 사용하여 매트립타제의 활성화를 검출하기 위한 웨스턴 분석을 수행하였다. 프로테아제의 잠재적 형태는 또한 불활성 형태 효소에 대한 mAb(M24)를 사용하여 검출되었다. GAPDH는 대조군 역할을 했다.

도 8은 10 mg/Kg 및 20 mg/Kg 용량의 M69-DOX에 의한 처리를 2 mg/Kg 용량의 DOX 및 대조군에 의한 처리와 비교하는 생체내 유방 종양 성장을 억제하는 활성 매트립타제를 표적화하는 M69-DOX 접합체를 도시한다.

도 9는 2 mg/Kg 용량의 DOX 및 대조군에 의한 처리와 비교하여 10 mg/Kg 및 20 mg/Kg 용량에서 M69-DOX에 의한 종양 중량 감소를 예시한다.

도 10은 대조군과 비교하여 20 mg/Kg 및 2 mg/Kg 용량의 M69-DOX에 의한 또는 2 mg/Kg 용량의 DOX에 의한 처리 동안 마우스의 평균 중량을 도시한다.

도 11은 라이신 측쇄를 PEG₅-DBCO와 함께 사용하는 MMAE와 M69 사이의 접합을 나타낸다.

도 12는 도 11에 도시된 화학적 단계를 적용한 후 면역접합체 M69-MMAE의 MALDI-TOF 분석을 나타낸다.

도 13은 매트립타제-MMAE 접합체가 체중 감소 또는 독성의 징후없이 TNBC MDA-MB-468의 성장을 억제하는 방법을 나타낸다. 마우스에 오른쪽 옆구리에 천만개의 종양 세포가 피하 접종된다. 종양이 만져졌을 때($100-200 \text{ mm}^3$) 마우스를 두 그룹으로 무작위 추출하고($n=6$), 화살표로 표시된 시간에 5 mg(M69-MMAE)/kg(사각형 형상, 하부 라인) 복강내 투여된 면역접합체로 처리하였다. 대조군 마우스는 생리 식염수를 받았다(다이아몬드 형상, 맨 위 라인).

도 14는 전립선 암 세포 및 비-소세포 폐(NSCL) 암세포에서의 매트립타제-양성 및 음성 세포에 대한 M69-MMAE 면역접합체의 IC50을 나타낸다.

도 15a 내지 15c는 삼중 음성 유방암(MDA-MB-468)(A) 비-소세포 폐(NSCL) 암세포(H322)(B) 및 전립선 암세포(DU145)(C)에 대한 M69-MMAE 면역접합체의 생체내 효능을 도시한다. 다이아몬드 형상은 대조군을 나타내며, 정

사각형 형상의 선은 5 mg/mL의 M69-MMAE를 나타내며, 삼각형 형상의 선은 1 mg/mL의 M69-MMAE를 나타낸다. 화살표는 면역접합체로 치료된 시간을 나타낸다.

도 16은 DU145 및 PC3 세포가 pH7.4(다이아몬드 형상) 또는 pH6.5(정사각형 형상), HCl-산성화된 배지에서 72시간 동안 표시된 바와 같이 다양한 농도로 M69-MMAE에 노출되었음을 나타낸다. 생존율은 각각의 배지를 갖는 대조군 웰에서 세포의 생존력의 백분율로서 측정되었다.

도 17은 텍소테어(Taxotere)-내성 및 텍소테어-민감성 전립선 암 세포, PC3R(다이아몬드 형상) 또는 PC3(정사각형 형상)이 지시된 바와 같이 다양한 농도로 M69-MMAE로 처리되었음을 나타낸다. 생존율은 대조군 웰에서 세포의 생존력의 백분율로서 측정되었다.

도 18은 실시예 11 내지 13에서 사용된 ADC 어셈블리의 전체적인 디자인을 도시한다. 팔각형은 DBCO 단위를 나타내며, 화살표는 구리가 없는 클릭 화학을 나타낸다.

도 19는 실시예 11 내지 13에서 사용된 아지도-PEG₄-Val-Cit-PABA-MMAE 구조체의 화학적 합성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0170] 하기 비-제한적인 실시예는 본 발명의 특정 양태를 추가로 예시한다.
- [0171] **실시예**
- [0172] **실시예 1**
- [0173] **다발성 골수종 및 B-세포 림프종 세포에서의 매트립타제 발현**
- [0174] 인간 조혈 악성종양의 24개의 세포주의 패널을 내인성 저해제 HGF 활성화제 저해제-1 또는 HAI-1뿐만 아니라 매트립타제에 대한 웨스턴 블랏팅에 의해 분석하였다(도 1). 세포 용해물은 24개의 조혈 암 세포(라인 2-14) 및 T-47D 유방암 세포(라인 1)로부터 제조하였다. 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다. 항-매트립타제 mAb 및 항-HAI-1 mAb를 지시된대로 사용하여 매트립타제 및 HAI-1의 수준을 면역블롯 분석에 의해 평가하였다(도 1의 A 및 B).
- [0175] 매트립타제는 대다수의 B-세포 림프종 뿐만 아니라 다발성 골수종 세포에서 발현되었는데, 이는 프로테아제가 상기 암의 중요한 표지자임을 나타낸다. 대조적으로, 림프종과 골수종에서의 HAI-1 수치는 암종에서의 수치보다 훨씬 낮으며, HAI-1 발현은 매우 공격적인 림프종에서 종종 상실된다(표 1).
- [0176] 다발성 골수종 세포에서의 매트립타제의 발현을 추가로 확인하기 위해, 파라핀-포매된 MM 시편의 6가지 경우를 조사하였다. 매트립타제는 4가지 경우에 양성이었다고, 그 중 2가지 경우는 HAI-1 양성이었다고, 다른 2가지 경우는 음성이었다(도 1의 D).
- [0177] 다발성 골수종의 세포주에서의 매트립타제의 수준을 평가하였다(도 1의 C). 3개의 MM 세포 모두가 프로테아제를 생산했다.
- [0178] **실시예 2**
- [0179] **DOX-면역접합체의 제조**
- [0180] 약간의 수정이 있는 제조사의 지시에 따라 단백질-단백질 커플링 키트(Invitrogen)를 사용하여, 매트립타제에 대한 단클론 항체(M24 또는 M69, CY Lin, University of Maryland, Baltimore, Md로부터 입수함; Lin C. Y., et al., J. Biol. Chem., 1999, 274 (26):18237-18242; Chen, Y. W., et al. J. Biol. Chem., 2010, 285 (41):31755-31762)를 DOX(Sigma)에 접합하였다. 간단히 말하면, DOX는 일정한 스티핑(stiffing)과 함께 실온에서 1시간 동안 1:3 내지 1:1.5(DOX:SMCC)의 물비(MR)로 가교제 SMCC(숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트)와 반응시켰다. 약 200 mg의 M24 mAb를 실온에서 1시간 동안 SPDP(숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)-프로피오네이트)와 반응시킨 후 원심분리 필터 장치(Ultrafree, Millipore)를 사용하여 인산 완충액을 교환했다. 대안적으로, mAb를 Sephadex G50으로 겔 여과하여 유리 SPDP와 분리할 수 있다. DOX 말레이미드 유도체를 실온에서 3시간 동안 티올화된 M24 또는 M69 mAb에 접합시킨 다음 인산염 완충액에서 투석하여 유리 DOX를 제거하였다. Sephadex G50에 의한 겔 여과를 사용하여 제조 규모가 단백질 1g보다 클 경우 커플링되지 않은 DOX를 제거할 수 있다. DOX에 대한 단백질의 물비는 형광 및 단백질 농도에 의한 DOX 측정을 통해 결정된다.
- [0181] DOX는 UV 여기에 의해 형광을 방출하기 때문에, 면역접합체에 의해 생성된 형광에 기초하여, 항체에 대한 DOX의

커플링을 측정하였다. 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 M24-DOX는 대략 25 nM의 DOX와 동일한 형광 강도를 갖는다. 따라서, mAB의 1 분자는 거의 7 분자의 DOX와 커플링한다.

표 1

인간 림프종 및 백혈병 세포에서의 매트립타제 및 HAI-1 만현의 요약

세포주	세포 유형	전병/공급원	바이러스*	매트립타제	HAI-1
HL-60	전골수아세포	AML	—	—	+ / —
Reh	림프아세포	ALL	—	—	+++
Jurkat	T-림프아세포	ALL	—	—	+
SUP-T1	T-림프아세포	LL	—	+++	—
CCRF-CEM	T-림프아세포	ALL	—	—	+ / —
CCRF-HSB-2	T-림프아세포	ALL	—	—	++
MOLT-3	T-림프아세포	ALL	—	—	—
MOLT-4	T-림프아세포	ALL	—	—	—
CCRF-SB	B-림프아세포	ALL	EBV+	—	+ / —
RS4;11	B-림프아세포	ALL	—	—	+ / —
THP-1	단핵구	급성 단구성 백혈병	—	++	+ / —
U-937	단핵구	조작구 림프종	—	—	—
Hs 445	B-림프아세포	HL	EBV+	—	+ / —
HuT 78	피부 T 림프구	세자리(Sczary) 종양군	—	—	++
Farage	B-림프아세포	EBV- 전환된 B 세포 림프종	EBV+	+ / —	—
RPMI 8266	B-림프아세포	MM	—	++++	+
Daudi	B-림프아세포	BL	EBV+	++++	—
Namalwa	B-림프아세포	BL	EBV+, SMRV+	++++	—
Raji	B-림프아세포	BL	EBV+	++	—
Ramos	B-림프아세포	BL	—	++++	—
ST486	B-림프아세포	BL	—	++++	—
SU-DHL-4	B-림프아세포	DLBL	—	++++	+ / —
SU-DHL-6	B-림프아세포	DLBL	—	++++	+ / —
OCI-LY-3	B-림프아세포	DLBL	—	++++	+ / —

[0182]

[0183] **약어:** AML, 급성 골수성 백혈병; ALL, 급성 림프아구성 백혈병; BL, 버킷 림프종; DLBL, 미만성 거대 B-세포 림프종; EBV, 엡스타인-바아(Epstein-Barr) 바이러스; HL, 호지킨 림프종; LL, 림프아구성 백혈병; MM, 다발성 골수종; SMRV, 다람쥐 원숭이 레트로바이러스.

[0184] **실시예 3**

[0185] **다발성 골수종 세포에 대한 M24-DOX의 세포독성**

[0186] 면역접합체의 세포독성 효과를 평가하기 위해, MM 세포를 다양한 농도로 48시간 동안 상기 집합된 DOX로 처리하였다. 면역접합체는 세포 증식을 용량-의존적인 방식으로 억제하였다. 면역접합체의 EC50은 5 $\mu\text{g/ml}$ (단백질)이었다. 이 세포독성 효과는 200nM에서 유리 DOX의 치료에서도 관찰되었다. 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서의 M24-DOX 농도는 형광

강도에 근거한 유리 DOX 250 nM과 같기 때문에, 접합된 DOX의 효능은 유리 약물과 유사하다. 변형되지 않은 항체에 세포를 노출시키면 세포 성장에 아무런 영향을 미치지 않아, M24-DOX 유도된 세포독성 효과가 DOX 활성을 통해 매개됨을 입증하였다. OPM-2 및 RPMI-8226을 포함하는 2개의 다른 MM 세포주도 도 2에 도시된 바와 같이 M24-DOX의 세포독성 활성에 대해 시험하였으며, 여기서 24-웰 플레이트에서 MM 세포(1×10^5 /웰)를 48시간 동안 다양한 농도로 M24-DOX의 존재 또는 부재하에 처리하였다. 세포 수는 Vi-Cell 계수기(Beckman)에 의해 계수하였다.

[0187] 두 종류의 세포는 MM.1S와 비슷한 방식으로 약물에 대해서도 반응을 보였다.

[0188] 실시예 4

[0189] M24-DOX의 핵 위치화.

[0190] MM.1S 세포에서 DOX의 면역접합체의 내재화를 입증하기 위해, 형광 현미경을 사용하여 다양한 시간의 기간 동안 세포를 약물에 노출시킨 후 M24-DOX의 세포내 위치화를 추적했다. 다양한 시간의 기간 동안 MM.1S 세포를 M24-DOX에 노출시킨 후, 세포를 고정하고 염색하였다. 면역접합체를 형광 현미경으로 시각화하였다. DAPI는 핵 염색에 사용하였다.

[0191] M24-DOX를 3분간 노출시킨 후 소수의 세포에서 미량의 핵 형광이 검출되었다. 형광 염색된 세포의 수와 핵내에 위치하는 신호의 강도는 모두 30분 이상의 배양 시간으로 유의하게 증가하였다(도 3a). 고배율을 갖는 사진은 약물에 60분 이상 동안 노출된 세포의 핵이 팽윤됨을 보여줬으며, 이는 전형적인 DOX-유도된 세포사멸을 나타내었다(도 3b). 이러한 데이터는 항원에 결합한 후, 면역접합체가 신속하게 내재화되고, 치료 10분 후에 DOX의 현저한 핵 위치화가 관찰되었다.

[0192] 실시예 5

[0193] M24-DOX에 대한 골수-유래된 중간엽 줄기 세포(MSCs)의 내성.

[0194] 도 4에 도시된 바와 같이, M64-DOX의 세포독성 선택성을 결정하기 위한 대조군으로서, 매트립타제 발현이 없는 인간 골수-유래된 MSC를 사용하고, 골수-유래된 중간엽 간질 세포(5×10^4 /웰, 24-웰 플레이트)를 4일 동안 다양한 농도로 M24-DOX 또는 유리 DOX로 처리하였다. 세포 수는 Vi-Cell 카운터로 측정하였다.

[0195] MSC는 20 μ g/ml의 높은 농도에서 면역접합체에 민감하지 않은 반면, 유리 DOX는 5 nM에서 세포 증식을 유의적으로 억제할 수 있었다. 매트립타제의 발현은 주로 정상 조직의 상피세포로 제한된다. 심근세포에서 이 프로테아제의 부재는 M24-DOX가 유의하게 감소된 심장독성을 나타낼 것임을 보여준다.

[0196] 실시예 6

[0197] 활성 매트립타제 표적화

[0198] DOX는 또한 효소의 활성 2-사슬에 특이적으로 결합하는 또 다른 매트립타제 mAb(M69)와 접합되었다. 대부분의 유방 종양에서 활성 매트립타제 수준이 발견되었지만, 유선의 정상 조직에서는 활성 형태의 프로테아제가 거의 검출될 수 없다(도 5). 이 데이터는 M69-DOX로 지칭되는 M69를 갖는 DOX-접합체가 정상 조직에 대한 독성에 관해 활성화된 매트립타제를 발현하는 종양을 표적화하는데 있어서 추가의 선택성을 제공한다는 것을 나타낸다. 상피 조직이 매트립타제를 발현하기 때문에, 건강한 조직에 대한 M24-DOX의 독성이 우려된다. 예를 들어 암세포에서 루이스(Lewis)-Y 항원을 표적화하는 BR96이라고 불리는 이전의 DOX-접합체는 상당한 위장관(GI) 독성으로 인해 2 상 시험에서 실패하였다(Tolcher, A. W., et al., J. Clin. Oncol., 1999, 17: 478-484). 상피 조직에서의 잠재적 형태의 매트립타제의 발현과 대조적으로, 이 프로테아제의 활성 형태의 수준은 면역조직화학에 의해 거의 검출될 수 없다. 따라서, M69-DOX는 상피에 덜 독성이다.

[0199] 실시예 7

[0200] 탈리도마이드에 의한 M69-DOX의 향상된 세포독성 효과

[0201] 탈리도마이드는 다발성 골수종 치료제이며, 탈리도마이드와 텍사메타손의 조합은 다발성 골수종 환자의 치료를 위한 가장 흔한 치료법 중 하나이며, 60-70%의 반응률을 보인다(Denz, U., Eur. J. Cancer., 2006, 42:1591-1600; Gieseler, F., et al., Thromb. Haemost., 2008, 99: 1001-1007). 탈리도마이드와 같은 현재의 MM 치료제와 함께 DOX-접합체의 효능을 시험하였다. M69-DOX 단독으로는 M24-DOX보다 덜 강력했다. 놀랍게도, M69-DOX 처리에 의한 세포 증식의 억제는 탈리도마이드에 의해 유의적으로 증가되었지만, M24-DOX의 억제 활성은 변경되

지 않았다(도 6a-b). 탈리도마이드만으로 MM 세포 증식에 영향을 미치지 않았기 때문에, 탈리도마이드와 조합된 M69-DOX에 의한 이러한 강화된 억제 효과는 상승적인 것으로 나타났다(도 6a). 따라서, 이 연구들은 탈리도마이드가 증식 억제를 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0202] 실시예 8

[0203] MM 세포에서 탈리도마이드에 의해 유도된 매트립타제 활성화

[0204] 탈리도마이드 및 M69-DOX 접합체로 인한 세포독성의 증가를 시험하기 위해, 본 발명자들은 활성화된 매트립타제의 발현에 대한 탈리도마이드의 효과를 측정하였다. MM 세포에서의 매트립타제의 활성화는 50 μ M 탈리도마이드로 24시간 처리한 후에 현저하게 증가하였다(도 8). 탈리도마이드는 VEGF 생산의 억제를 통해 MM과 골수 간질 세포 간의 상호 작용을 적어도 부분적으로 방해함으로써 항혈관신생 활성을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 탈리도마이드가 MM 세포의 세포 증식에 거의 영향을 미치지 않는 것처럼 보이지만(도 7A-B), 매트립타제를 활성화시키는 능력은 중요한 신규 발견이며, M69-DOX 접합체에 의해 활성화된 매트립타제-양성 골수종 세포를 표적화함으로써 탈리도마이드 치료에 대한 MM 세포의 반응을 이용하는 새로운 접근법을 제안한다.

[0205] 실시예 9

[0206] 생체내 활성화 매트립타제를 표적화하는 M69-DOX에 의한 유방 종양 성장의 억제

[0207] 생체내 종양 성장을 억제하는 M69-DOX의 효능을 평가하기 위해, 인간 유방 이종이식 종양 모델을 사용하였다. 유방 종양(MDA-MB468)이 있는 NOD/SCID 마우스를 M69-DOX에 의해 20 또는 10 mg/kg으로, DOX에 의해 2 mg/kg으로 주 2회 치료했다. 처리되지 않은 대조군에서 마우스의 종양 크기가 3주째에 현저하게 증가되었지만, 각 용량의 M69-DOX로 처리하고 DOX로 처리한 마우스의 종양 성장은 전체 처리 과정 동안 현저하게 억제되었다(도 8). 단일 mAb가 7 분자의 DOX와 부착되었기 때문에, M69-DOX 10mg/kg에서의 투여량은 투여된 DOX의 0.035mg/kg과 동일하다. 이러한 결과는 생체내에서 유방 종양을 치료하기 위해 활성화된 매트립타제를 표적화하는 DOX 접합체의 강력한 효능 및 효과를 입증한다.

[0208] M69-DOX로 치료한 마우스의 종양 덩어리 무게 감소. 치료 과정이 끝나면 실험 마우스에서 종양 덩어리를 채취하고 중량을 측정했다. 각 용량의 M69-DOX로 처리된 그룹 및 DOX로 처리된 그룹으로부터의 종양의 평균 중량은 치료되지 않은 대조군으로부터의 종양 평균 중량의 약 50%로 감소되었다(도 9). M69-DOX에 의한 종양 중량의 현저한 감소는 활성화된 매트립타제를 발현하는 종양 세포에 대한 DOX의 부위-유도된 전달의 효능을 추가로 확인한다.

[0209] M69-DOX 치료에 의한 최소 독성

[0210] M69-DOX 또는 DOX로 처리된 마우스의 평균 중량은 치료되지 않은 대조군에서의 것과 비교하여 현저하게 감소되지 않았으며(15% 미만의 손실), 이러한 투여량에서의 M69-DOX가 잘 관용되었음을 나타냈다(도 10). M69-DOX 20 mg/kg에서의 용량은 눈에 띄는 독성을 유발하지 않았으며, 약물 용량이 최대 허용 용량에 도달하도록 증가될 수 있음을 나타낸다.

[0211] 실시예 10

[0212] 접합체: M69-MMAE를 형성하기 위해 방출형 링커를 통한 M69 mAb에 대한 MMAE의 커플링.

[0213] MMAE는 M69에 커플링되어 본원에 기술된 바와 같이 면역접합체를 형성한다. 해제가 가능한 링커 기술은 *Bioconjugate Chem.* 2002, 13:855-869; *Blood* 2003, 102:1458-1465; *Nature Biotech.*, 2003, 21:778-784에 기술된 바와 같이 Seattle Genetics의 발린-시트룰린-PABA 링커, 원래의 카텝신 B 절단가능한 링커를 기반으로 했으며, 상기 문헌은 이후에 본원에 참고문헌으로 포함된다. 발린-시트룰린-*p*-아미노벤질알콜 카르바메이트 링커는 (i) 2단계 PEG화, (ii) 구리가 없는 클릭 화학을 통한 접합, 및 (iii) 시스테인 설프하이드릴-말레이미드 커플링 대신 mAb의 라이신 측쇄의 아실화에 의해 변형되었다. ADC 어셈블리의 전체 설계는 도 18에 도시된다. 아지도-PEG₄-Val-Cit-PABA-MMAE 구조물의 화학적 합성은 도 19에 도시된 바와 같다. 본 설계는 DBCO와 N₃을 사용하여 구리-없는 클릭 화학을 사용하여 이 링커 플랫폼을 개선하여, 매우 온화한 조건에서 화학량론적으로 제어된 방식으로 중요한 약물 적재 단계를 수행할 수 있게 했다. 시스테인 잔기의 일시적으로 감소된 설프하이드릴기를 사용하는 대신에 링커-약물 리간드를 항체의 표면에 접합시키는데 라이신 측쇄를 이용하였다(도 11). 이 접근법은 시스테인 사이의 디설파이드 브릿지에 영향을 미치지 않기 때문에, 항-매트립타제 항체는 접합 과정 중에 구조적으로 손상되지 않은 상태로 남아있어 잘못 폴딩된/해리된 항체 사슬에 의한 활성 상실로 인한 문제

를 제거한다. 또한, 라이신 측쇄는 mAb 표면에서 쉽게 얻을 수 있으므로, Cys-Cys 디설파이드 브릿지를 감소시킬 필요가 없으므로 말레이미드 접합 후 mAb의 구조적 불안정화 및 산화시의 불일치된 디설파이드 결합 형성의 문제를 제거할 수 있다. 적절한 분석 절차(HR-MALDI-TOF 질량 분석법)는 최근의 면역접합체 배치가 산업 표준에 부합함을 입증했다(도 11). 매우 소수성인 약물 분자의 사용을 용이하게 하는 클릭 화학의 전구체 모두에서 접합체의 약물-링커 부분에 PEG 스페이서를 사용함으로써 추가의 진전이 달성되었다. PEG 사슬은 mAb와 약물을 분리하여 비특이적 약물 및 항체 상호작용의 가능성을 줄이기에 충분할만큼 길었고, 링커의 PEG₅-PEG₄ 구성은 구리-없는 클릭 화학에 의한 사환체 시스템의 소수성을 보완했다. 선택된 세포독성 화합물은 모노메틸 아우리스타틴 E 또는 MMAE였다. PEG화 링커의 유연성과 길이는 카텝신 B가 MMAE를 분해하고 방출할 수 있는 높은 접근성을 제공한다. 각각의 mAb 분자에 연결된 3.5 약물에 상응하는 평균 MW의 7000 Da 증가를 나타내는 MALDI-TOF 질량 분광분석에 의해 접합 반응을 모니터링하였다.

[0214] M69-MMAE의 세포독성 효능을 입증하기 위해, 삼중 음성 유방암인 MDA-MB468에 대한 면역접합체의 시험관내 세포독성 효능을 평가하였다. 유방암 세포는 IC₅₀이 3.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 MMAE-연결된 면역접합체에 대해 민감하였다. 각각의 M69 분자가 평균 3.5 분자의 MMAE를 함유하기 때문에(도 11), 접합체에서의 MMAE에 대한 민감도는 1.6 nM이었다. 이 실험은 또한 면역접합체가 내재화되고, 세포내로 독소가 방출된다는 것을 입증했다.

[0215] 실시예 11

[0216] M69-MMAE 면역접합체의 시험관내 세포독성

[0217] 실시예 10에서 기술된 바와 같은 M69-MMAE 면역접합체의 시험관내 세포독성을 평가하기 위해, TNBC(MDA-MB-468, MDA-MB-231 및 BT549), 전립선(DU145 및 PC3), 췌장(PANC1 및 MiaPac1), NSCL(H322 및 H1299), 난소(OVCAR5), 위(AGS) 및 맨틀 세포 림프종(Mino, Jeko, Maver 및 Z138) 암과 같은 종양 세포를 지시된 바와 같은 다양한 농도로 M69-MMAE 면역접합체에 노출시켰다. 면역접합체에 72시간 연속 노출한 후, 세포독성을 MTS(Promega) 분석에 의해 다음과 같이 평가하였다: MTS 비색 분석(Promega의 CellTiter 96)을 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 암세포를 8000 세포/웰로 96-웰 플레이트에 도말하고, 37°C에서 72시간 동안 M69-MMAE의 단계적 적정에 노출시켰다. 처리되지 않은 대조군 웰과 비교하여, 생존율을 면역접합체 농도에 대하여 플롯팅하였다. 각 연구의 결과는 5중 측정치의 평균이다. 이들 세포에 대한 M69-MMAE의 IC₅₀ 값을 하기 표 2에 요약하였다. 표시된 종양 세포에 대한 M69-MMAE의 IC₅₀을 설명한 바와 같이 96-웰 플레이트를 사용하여 MTS 비색계 방법으로 측정하였다. IC₅₀ 값은 ADC의 평균($\mu\text{g}/\text{mL}$) + SD 뿐만 아니라, ADC가 3.5 MMAE/mAb의 화학량론적 비율을 갖는 것을 고려하여 동등한 nM의 MMAE 농도로 나타내었다.

[0218] 이들 암세포는 낮은 단일 자리에서부터 수십 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 접합체에 이르는 IC₅₀을 갖는 면역접합체에 대해 민감하였다. 위암 세포인 AGS는 IC₅₀이 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 매우 낮은 MMAE 접합체에 대해 매우 민감한 반면, 맨틀(Mantle) 세포 림프종 세포인 Maver는 IC₅₀에 도달하기 위해 높은 농도(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 접합체가 필요했다. 약 3 분자의 MMAE가 각각의 mAb에 부착됨에 따라, IC₅₀ 값은 지시된 바와 같이 운반된 MMAE 농도로서 나타내었다. 접합체의 선택적 세포독성을 입증하기 위해 BT549 및 H1299와 같은 매트립타제-음성 세포의 IC₅₀을 또한 얻었다(도 14). 매트립타제-양성 및 -음성 세포의 IC₅₀ 비율은 18 대 48(H1299 대 H322, 및 BT549 대 MDA-MB231)의 상당히 유의한 범위였으며, M69-MMAE의 선택도는 부작용을 최소화한 잇점을 제공해야 함을 시사한다.

표 2

다양한 암세포에 대한 M69-MMAE의 IC50s

암 유형	세포주	IC50s (μg/mL), M69-MMAE conc.	IC50s (nM), MMAE conc.
유방	MDA-MB231	2.6 ± 0.09	59.2
	MDA-MB468	3.4 ± 0.30	77.5
	BT549	125.0 ± 10.25	2847.5
전립선	DU145	8.0 ± 3.4	182.2
	PC3	6.8 ± 0.65	154.9
	H322	6.3 ± 0.20	143.5
비-소세포 폐	H1299	113 ± 5.20	2574.1
난소	Ovar5	16.0 ± 0.4	364.5
위장	PANC1	12.0 ± 0.06	273.4
	MiaPaca1	8.0 ± 0.83	182.2
위	AGS	1.5 ± 0.03	34.2
멜라노마 세포 라인	Mino	6.2 ± 0.18	141.2
	JeKo-1	13.9 ± 3.9	316.6
	Z138	19.0 ± 1.9	432.8
	Maver	30.0 ± 2.8	683.4

[0219]

[0220] 실시예 12

[0221] M69-MMAE 면역접합체가 포함된 생체내 이중이식 연구

[0222] 실시예 10에 기술된 바와 같은 M69-MMAE 면역접합체를 사용하여 파일릿 이중이식 연구를 수행하였다. 10mg/kg을 매주 3회 복강내 투여한, 마우스 접합체(N=6)를 갖는 누드 마우스에서의 독성 연구를 키메라 M69-MMAE 접합체를 시험하기 전에 수행하였다. 체중 감량이나 독성 징후가 없었으며, 이는 구조체가 안정적이며 정상 조직을 표적화하지 않았다는 것을 나타낸다. 이 정보를 바탕으로, 인간의 삼중 음성 유방 종양 MDA-MB-468을 지닌 마우스를 M69-MMAE 면역접합체로 처리하였다. 도 13은 접합체가 상기 삼중 음성 유방암에 대해 강력한 항암 활성을 갖고 있음을 보여 주며, 중요하게는; 동물에서 체중 감소 또는 다른 독성 증거가 없었으며, 이는 유의한 유리 약물이 접합체로부터 순환 중에 방출되지 않음을 나타냈다. 이것은 마우스내 마우스 항체이기 때문에, 매트립타제에 대한 항체 반응은 기대되지 않았다. 도 14는 대조군 마우스 및 M69-MMAE 면역접합체로 처리된 마우스의 종양 종양 용적(mm³)의 결과를 도시하며; M69-MMAE로 처리한 경우와 비교하여 대조군에서 종양 크기의 유의한 증가가 관찰되었다.

[0223] 이러한 결과에 기초하여, 추가의 생체내 이중이식 연구가 보증되었다. 이러한 추가적인 이중이식 연구는 다양한 종류의 암에 대한 M69-MMAE의 생체내 효능을 평가하기 위해 수행되었다. 트립신 용액에 의한 기저 성장 단계에서 TNBC(MDA-MB-468 및 MDA-MB-231), 전립선 암 세포(DU145) 및 NSCL 암세포(H322)를 수확하고, PBS로 세척하

었다. PBS 현탁액 100 μ l 중 생존 세포(7×10^6)를 Matrigel(BD Biosciences) 100 μ l와 혼합하고, 동물의 오른 쪽 옆구리에 피하 주사했다. 일단 종양이 만져지면, 마우스를 각각 6마리의 마우스 처리 그룹으로 무작위 추출 하였다. 동물에게 5 mg/kg M69-MMAE 또는 1 mg/kg M69-MMAE를 주 2회 복강 내 주사하였다. 종양 크기는 디지털 캘리퍼스를 사용하여 측정하였으며, 공식 $4/3 \pi \times \text{길이} \times \text{너비}^2$ 를 사용하여 계산하였다. 그 결과는 M69-MMAE(도 15a)의 처리에 의한 삼중 음성 유방 종양(MDA-MB468 및 MDA-MB-231)의 효과적인 퇴행을 나타내었다. NSCL 및 전립선 암 마우스의 종양 성장은 또한 비히클 대조군 중 하나(도 15b, 15c)와 비교하여 상당히 감소되었다. M69-MMAE의 항 종양 활성은 1 mg/kg만큼 낮은 용량에서 여전히 유효하다(도 15b). 놀랍게도, 동물에서 체중 감소 또는 다른 독성 증거가 없었으며, 유의한 유리 약물이 접합체로부터 순환 중에 방출되지 않음을 나타냈다(도 15a).

[0224] 실시예 13

[0225] 전립선 암세포는 산성 세포의 pH 하에서 M69-MMAE에 대해 더 민감하다.

[0226] 매트립타제의 활성화는 산증에 의해 유발된다. 따라서, 활성화된 매트립타제를 발현하는 암세포는 증가된 항원 수준으로 인해 산성 조건 하에서 실시예 10에 기술된 M69-MMAE 면역접합체의 세포독성 효과에 대해 보다 민감하다. 이는 DU145 및 PC3 전립선 암세포가 pH 6.5에서 HCl-산성화된 배지와 면역접합체에 대해 보다 민감해지는 실험에 의해 입증되었다. IC50은 DU145 및 PC3 세포 각각의 경우 8에서 1 μ g/ml로, 그리고 6.8에서 2 μ g/mL 미만으로 현저하게 감소되었다(도 16). 산성 조건에 대한 노출은 CO2 배양기에서 1시간 후에 점차적으로 배지의 탄산염 완충액이 pH를 상승시킴에 따라 약 30분 동안만 유지되었다.

[0227] 종양 미세환경은 산소화 조건에 관계없이 암세포의 높은 글리콜릭 활성으로 인한 젖산의 축적으로 인한 산성 세포의 pH(pHe)를 특징으로 하며, 이는 또한 "와버그 효과(Warburg effect)"라고 불리는 현상이다. 축적된 증거는 높은 젖산 농도가 종양 개발뿐만 아니라 종양의 침윤성 및 전이성 진행의 주된 원동력을 보여준다. 따라서, M69-MMAE는 산성 환경에서 활성화된 매트립타제를 발현하는 전립선 암 세포와 같은 암 세포에 강력한 독소를 선택적으로 전달할 수 있다.

[0228] 실시예 14

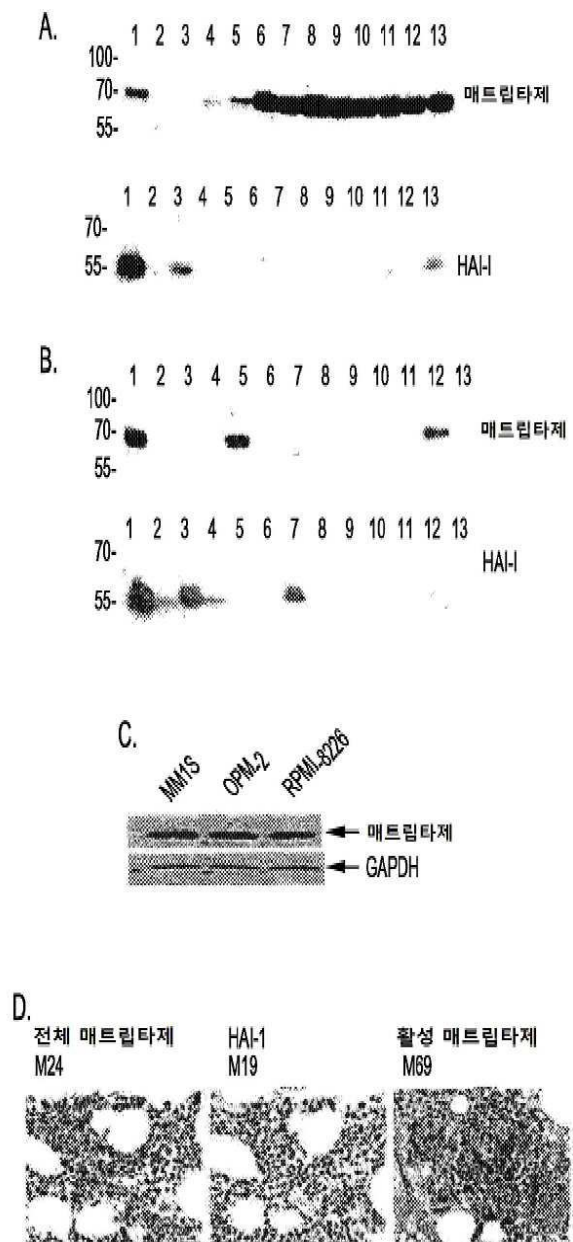
[0229] 탁사테어(Taxatere)-내성 전립선 암 세포(PC3R)는 M69-MMAE에 대해 민감하다

[0230] 화학-내성 암세포에 대한 실시예 10에 기술된 바와 같은 M69-MMAE 면역접합체의 시험관내 효능을 측정하기 위해, 탁스테어(taxtere)-내성 세포를 접합체로 처리하였다. 유사분열 억제에 대한 저항성에도 불구하고, PC3R 세포는 MMAE 접합체에 대한 모체 PC 세포만큼 민감하였다(도 17). 이것은 M69-MMAE가 화학-내성 전립선 암 환자에게 효과적인 치료법임을 강조한다.

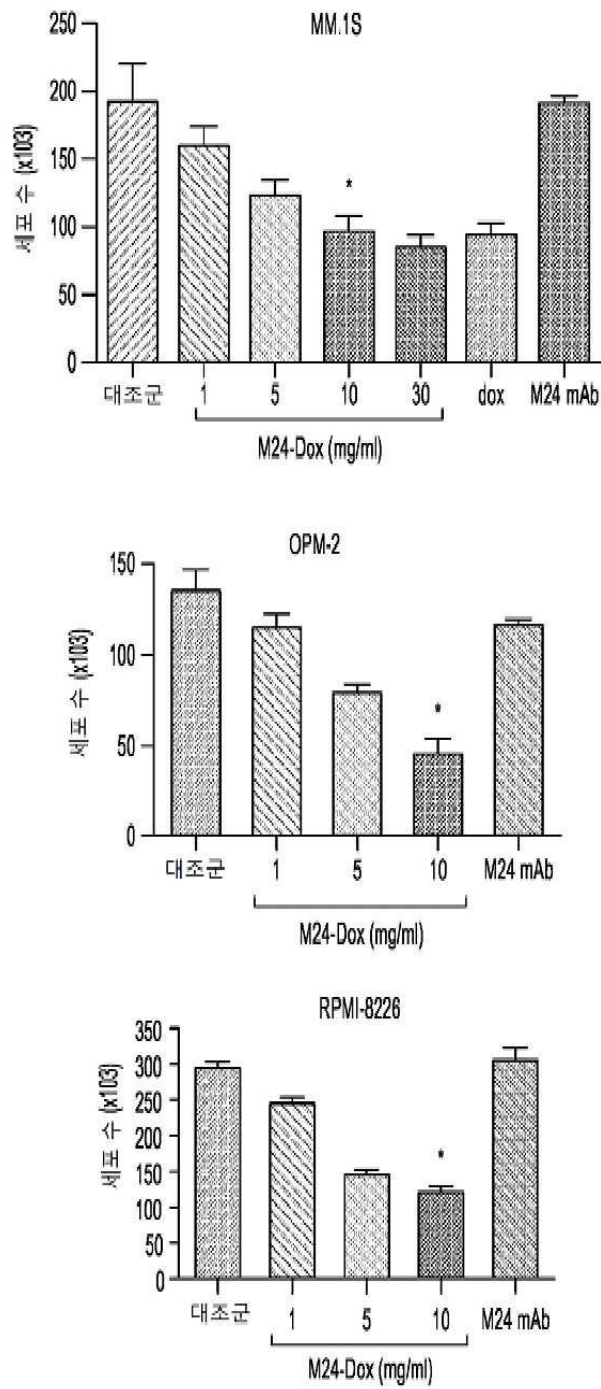
[0231] 본 발명의 범주 및 정신으로부터 벗어나지 않으면서 여러가지 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 당업자라면 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 본 명세서에 기술된 본 발명의 다양한 구현에는 단지 예시적인 것이며, 본 발명의 범주를 제한하려는 의도가 아니라는 것을 이해해야 한다. 본원에 인용된 모든 문헌은 그 전체가 참고문헌으로 포함된다.

도면

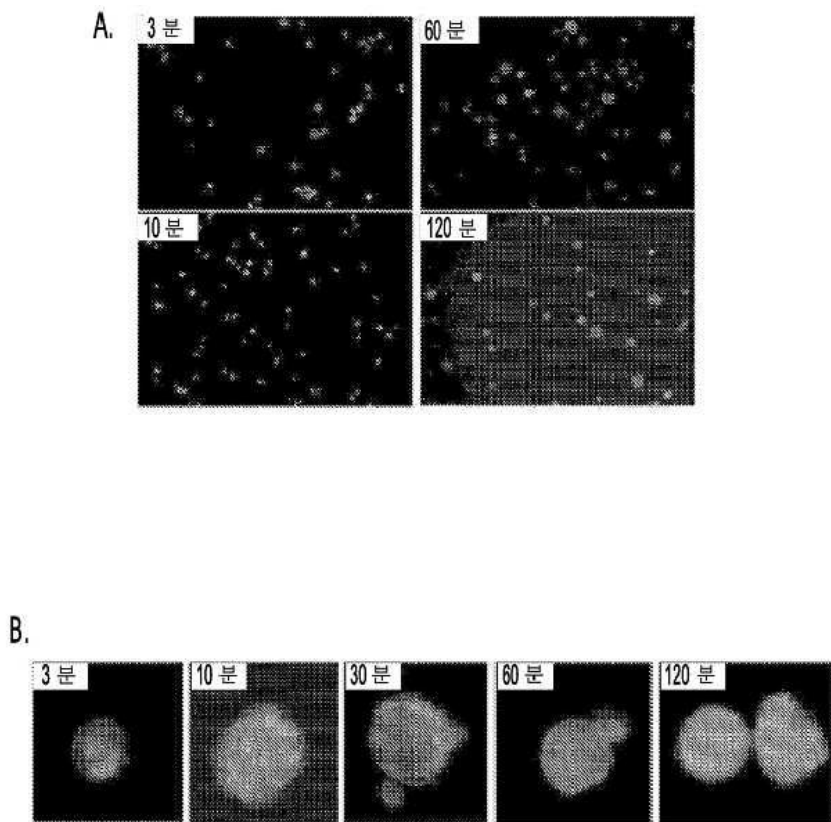
도면1



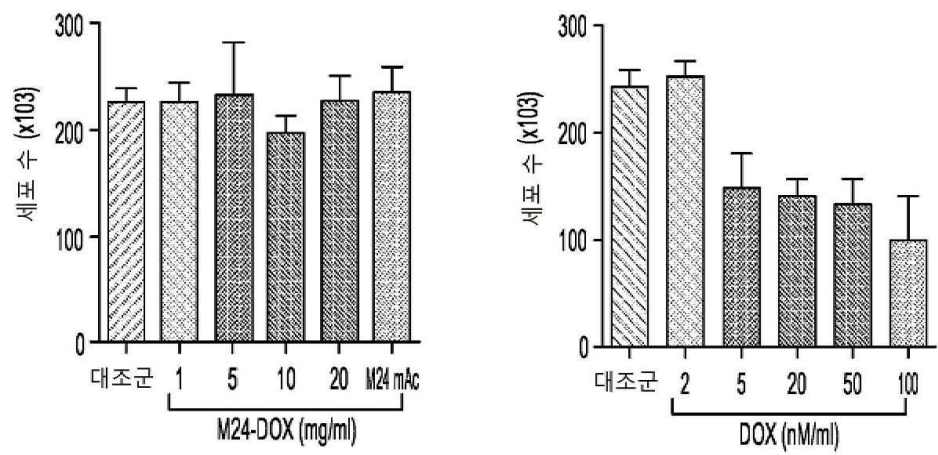
도면2



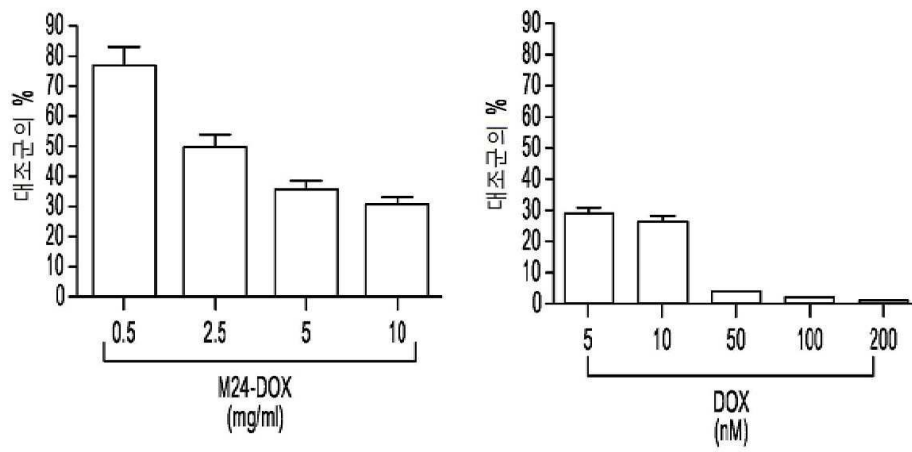
도면3



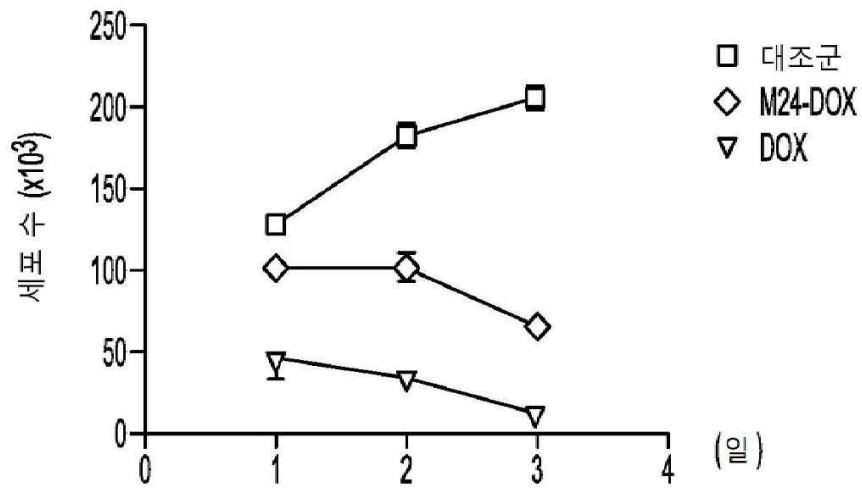
도면4a



도면4b

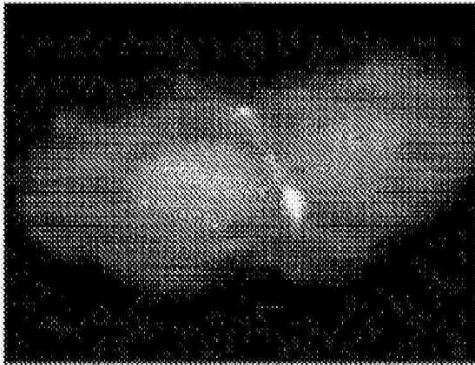


도면4c

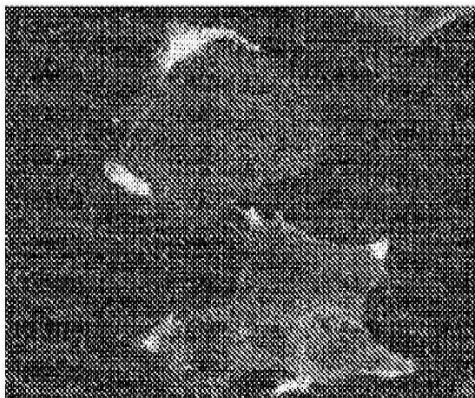


도면5

유선 상피 세포

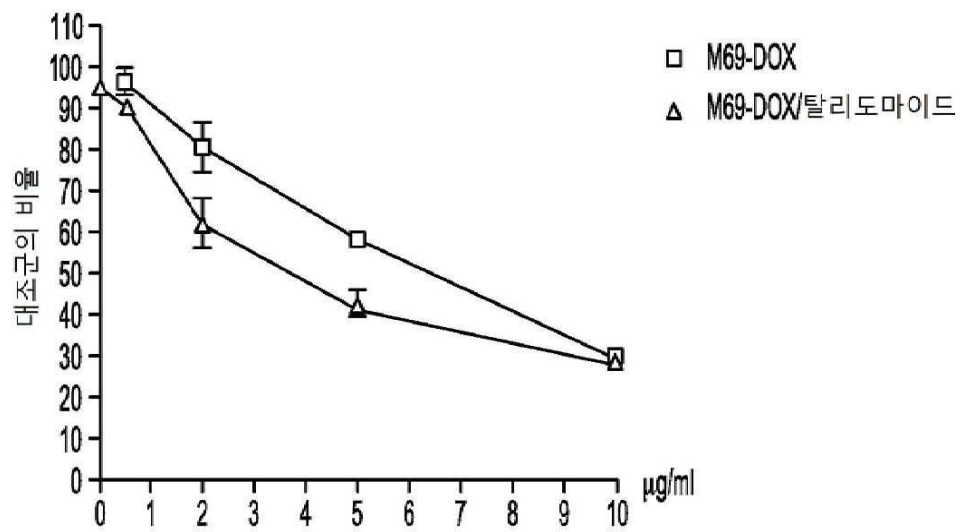


유방 암 세포

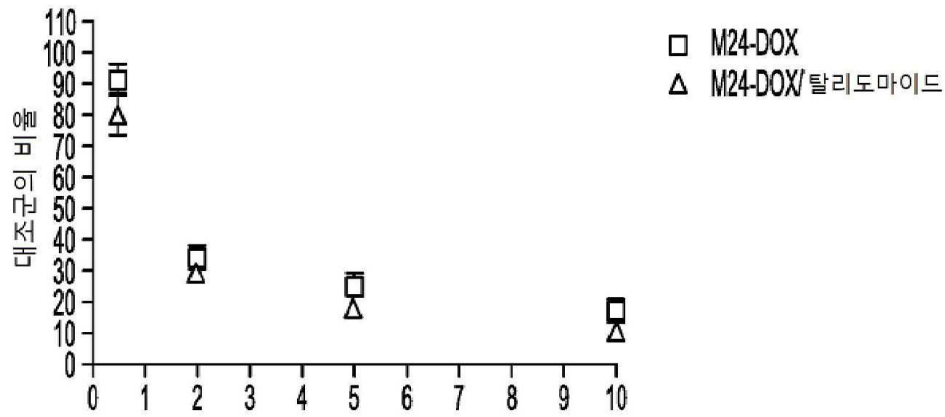


적색: F-액틴
 녹색: 활성화된 매트립타제
 황색: 합병된 이미지

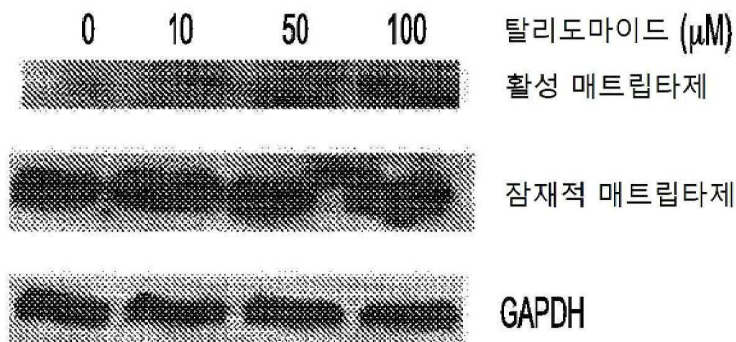
도면6a



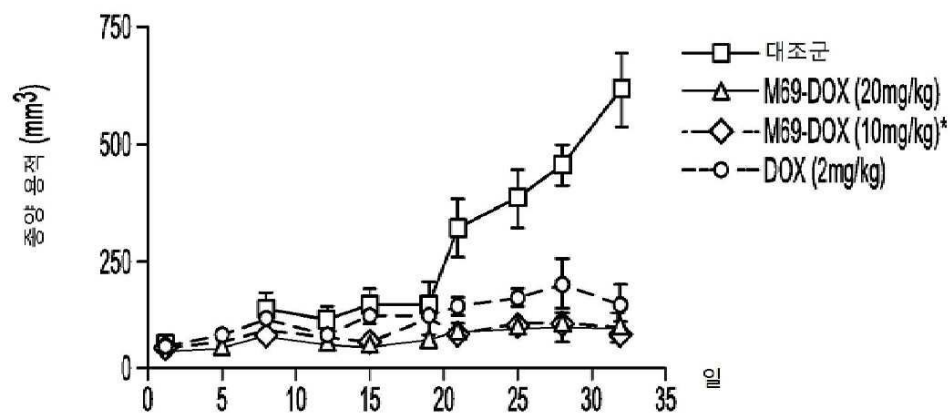
도면6b



도면7

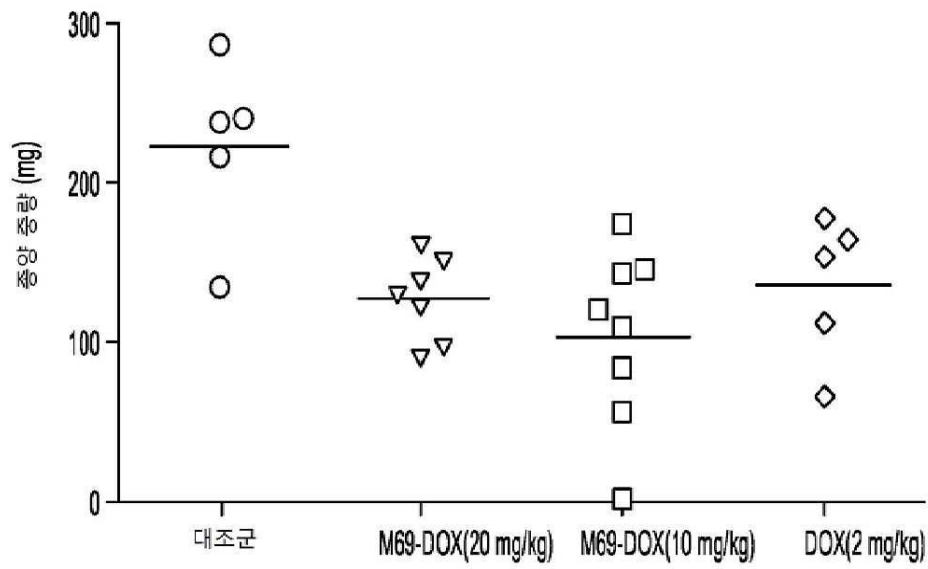


도면8

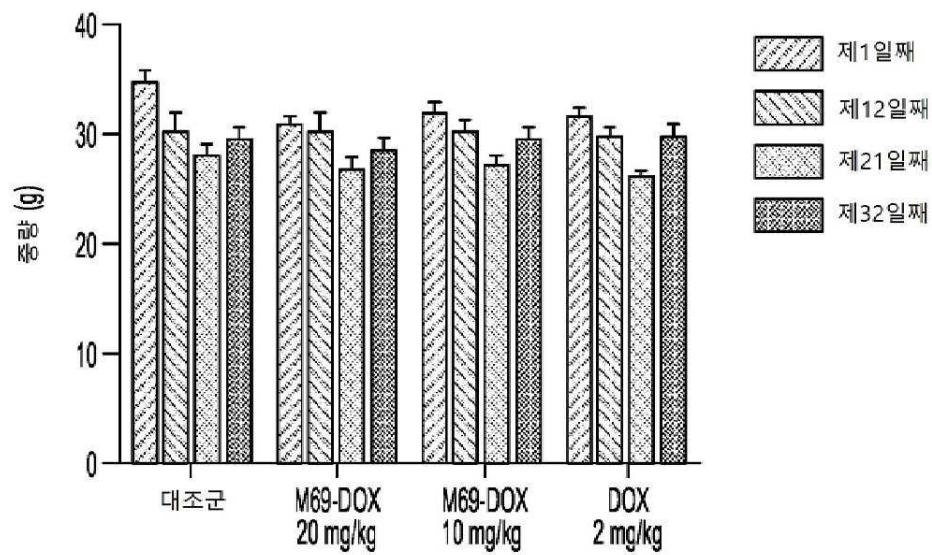


*10 mg M69-DOX = 0.035 mg DOX

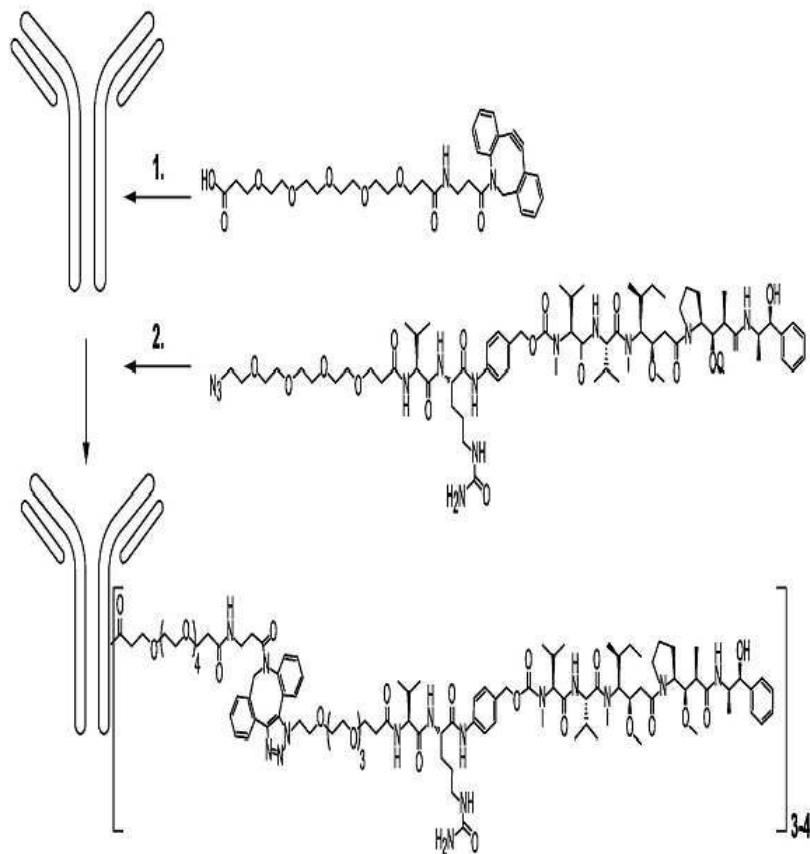
도면9



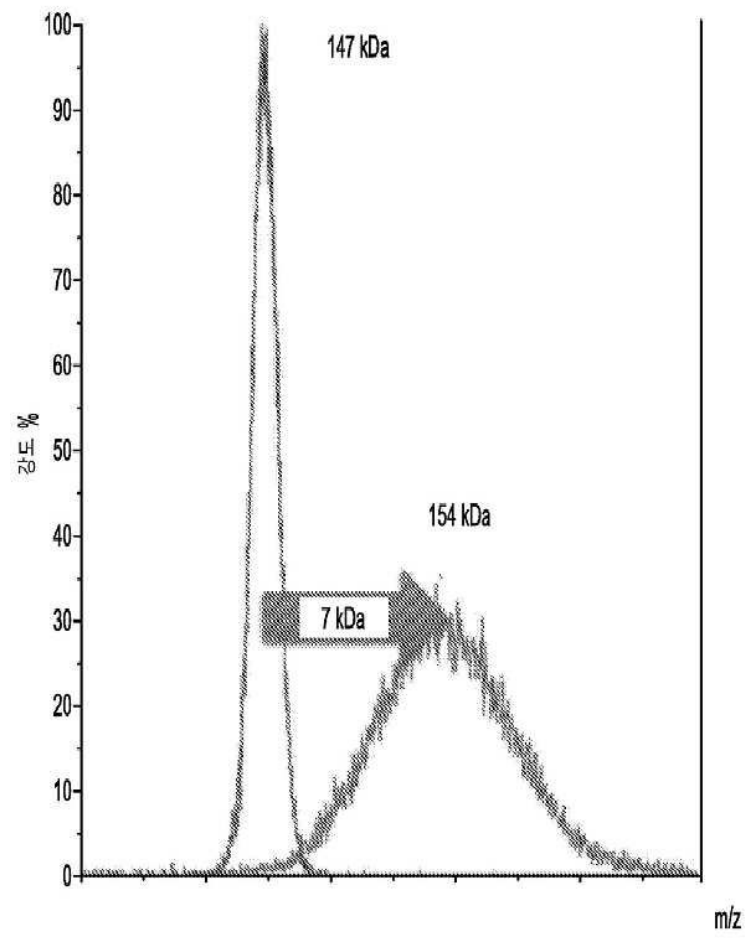
도면10



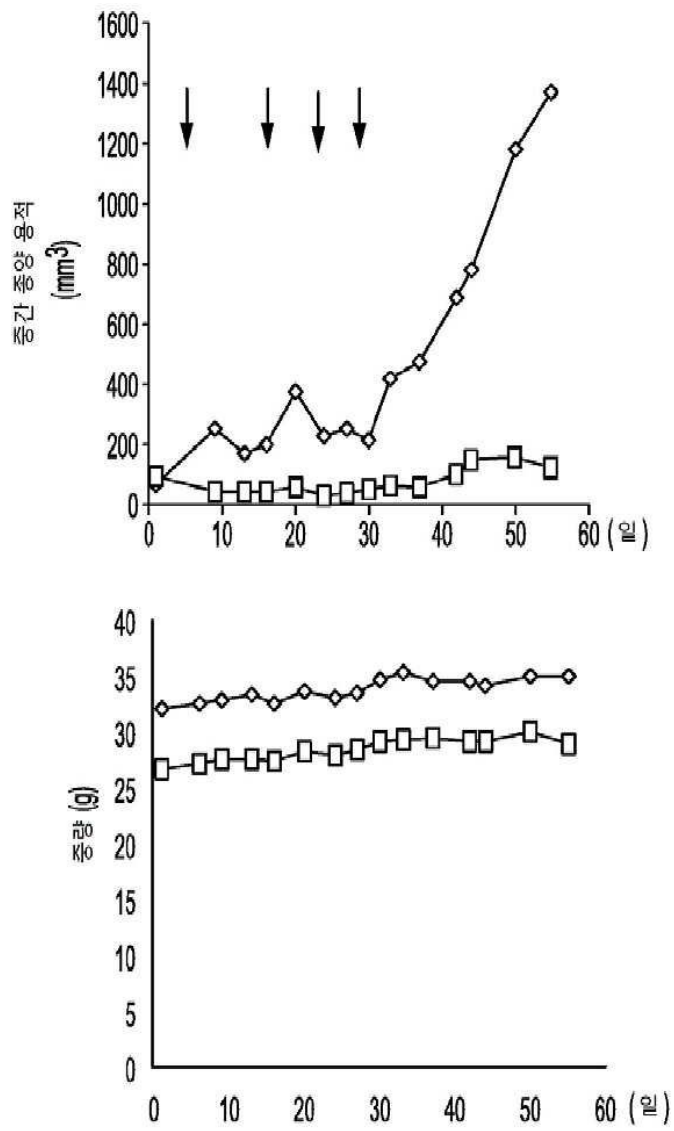
도면11



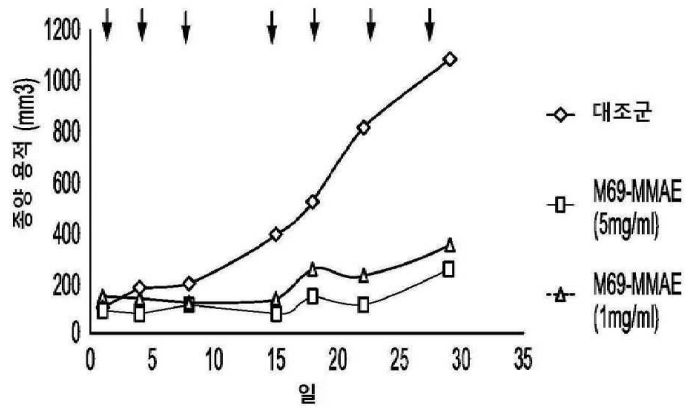
도면12



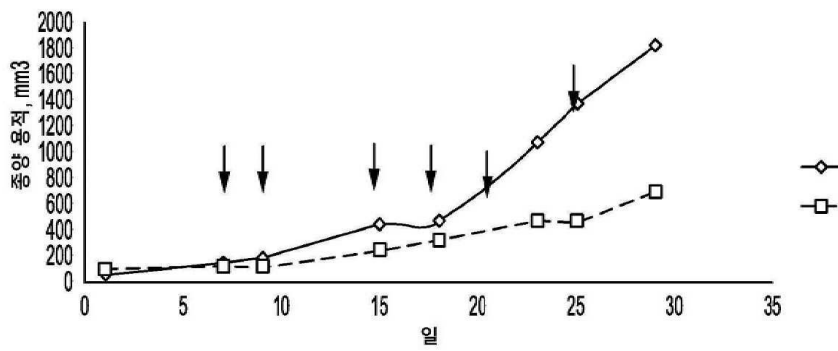
도면13



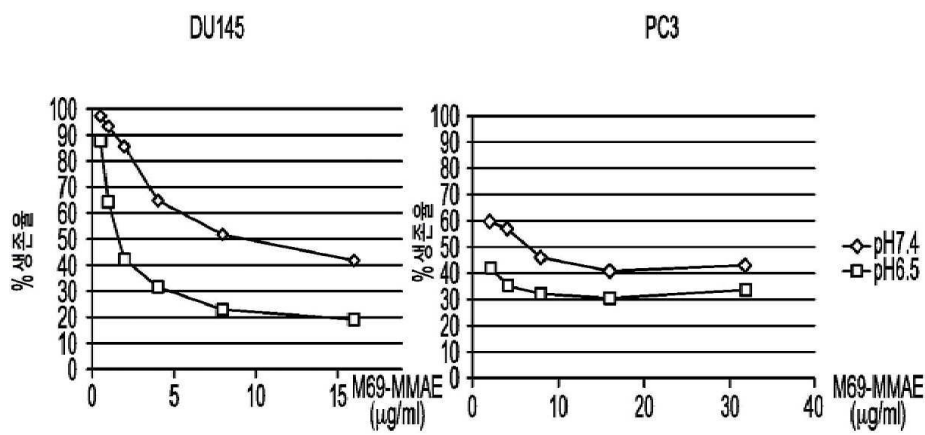
도면15b



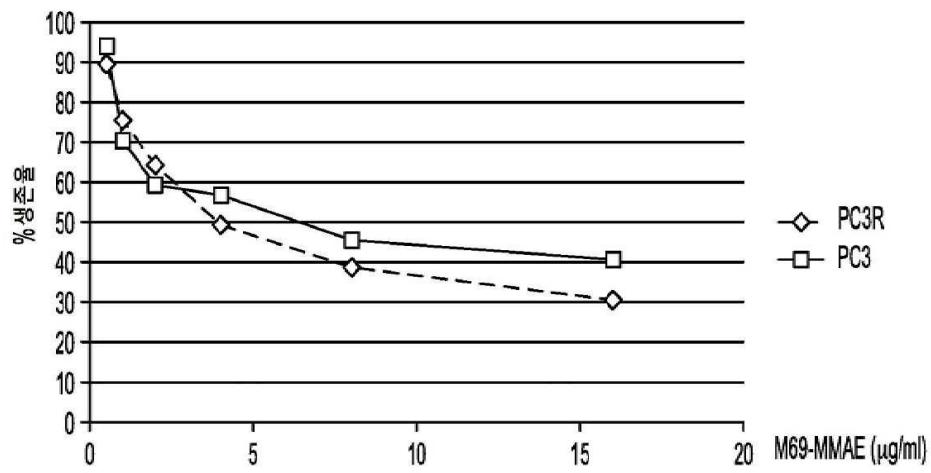
도면15c



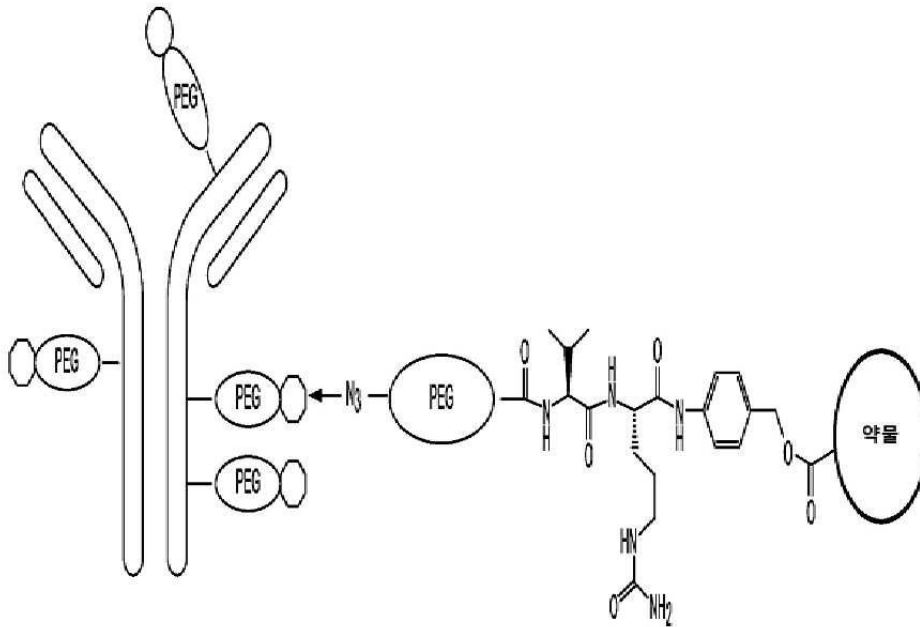
도면16



도면17



도면18



도면19

