



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월11일

(11) 등록번호 10-2250737

(24) 등록일자 2021년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/64 (2017.01) A61P 19/02 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/64 (2017.08)

A61P 19/02 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0065959

(22) 출원일자 2020년06월01일

심사청구일자 2020년11월25일

(56) 선행기술조사문헌

서울대학교대학원 박사학위논문, 최지영,
2019.08.*

KR1020110128732 A

ChemBioChem 2019, 20, 1530 - 1535

Theranostics 2019, Vol. 9, Issue 22,
6706-6718

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 비아이케이테라퓨틱스

서울특별시 강남구 봉은사로18길 79, 3층 (역삼동)

(72) 발명자

이병철

경기도 하남시 위례중양로 185, 6302동 1202 (학암동, 위례신도시엠코타운폴리체)

윤혜원

서울특별시 마포구 백범로 202, 102동 1103호 (신공덕동, 마포케이씨씨웰츠타워)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 이재정

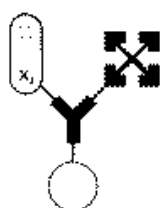
(54) 발명의 명칭 약물 전달과 내재화 효율이 강화된 약물복합체

(57) 요약

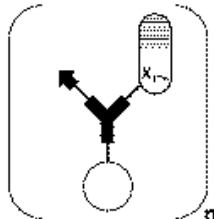
본 발명은 표적 세포에 특이적으로 결합하는 표적화물질과 약물이 연결되어 있는 단위 약물복합체에, 다른 단위 약물복합체와 상호 결합할 수 있는 결합기가 추가로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 단위 약물복합체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단위 약물복합체는 체내에 순차적으로 투여되면 체내 가고 결합을 통해 결합체 간 군집화를 이루게 되고, 이러한 군집화는 약물복합체의 내포작용을 촉진시켜, 약물복합체에 포함된 약물의 세포 내재화 효과를 현저히 개선시킨다.

대표도 - 도1a

선발 단위 약물복합체



후발 단위 약물복합체 (n > 1)



○: 표적화물질: 표적 세포의 막이온단백질을 선택적으로 재분포시켜 표적화물질의 선택적 투과를 유도하는 표적화물질

□: 약물: 진단 또는 치료용 약물로, 속도에 따라 선발 단위 약물복합체와 후발 단위 약물복합체의 결합을 촉진할 수 있음

○-□: 결합: 선발 단위 약물복합체와 후발 단위 약물복합체 간의 상호 작용을 통해 결합할 수 있음

○-□: 결합: 표적화물질과 약물을 연결시켜주는 결합물이다. 결합물에는 표적화물질의 선택적 투과를 유도하는 표적화물질이 포함되어 있을 수 있음

(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

최지영

서울특별시 광진구 구의강변로 94, 603동 1902호
(구의동, 현대아파트)

정재호

서울특별시 광진구 광나루로35길 5 (구의동)

송인호

경기도 용인시 기흥구 기흥로116번길 100, 206동
801호 (언남동, 초원마을성원상떼빌아파트)

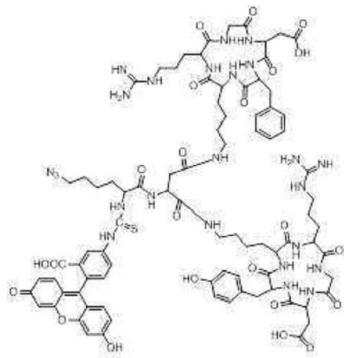
명세서

청구범위

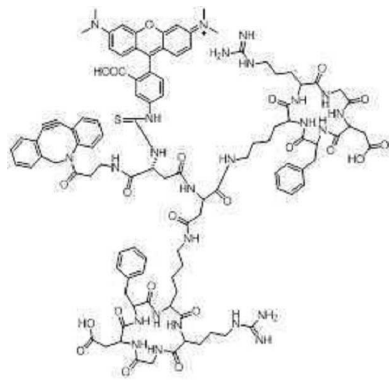
청구항 1

(a) 하기 단위 약물복합체 1 및 단위 약물복합체 2를 포함하는 약물복합체:

단위 약물복합체 1

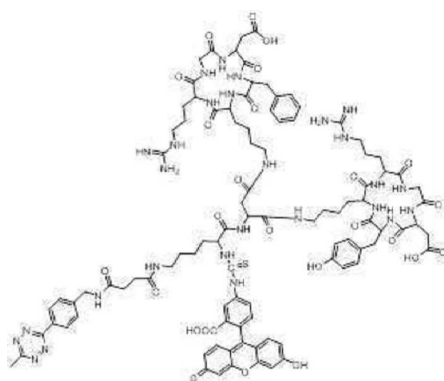


단위 약물복합체 2

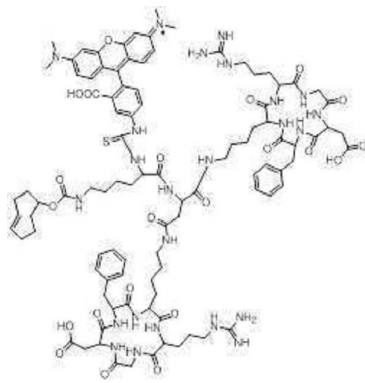


(b) 하기 단위 약물복합체 3 및 단위 약물복합체 4를 포함하는 약물복합체:

단위 약물복합체 3



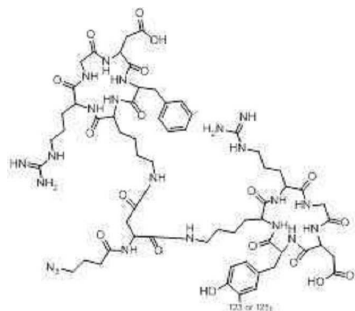
단위 약물복합체 4



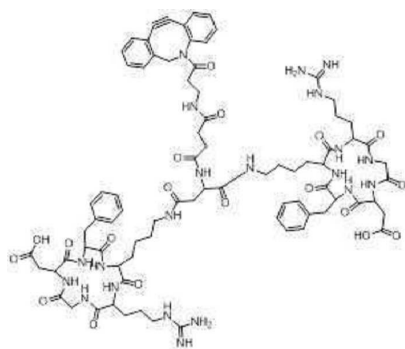
; 또는

(c) 하기 단위 약물복합체 5 및 단위 약물복합체 6을 포함하는 약물복합체:

단위 약물복합체 5



단위 약물복합체 6



;로

상기 단위 약물복합체 1, 단위 약물복합체 3 및 단위 약물복합체 5는 각각 상기 단위 약물복합체 2, 단위 약물복합체 4 및 단위 약물복합체 6과 클릭 반응으로 상호 결합하는 것을 특징으로 하는 약물복합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제1항의 약물복합체를 포함하는 종양 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 단위 약물복합체 1과 단위 약물복합체 2, 상기 단위 약물복합체 3과 단위 약물복합체 4, 상기 단위 약물복합체 5와 단위 약물복합체 6은 각각 순차적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 종양 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 단위 약물복합체 1, 단위 약물복합체 3 및 단위 약물복합체 5는 각각 상기 단위 약물복합체 2, 단위 약물복합체 4 및 단위 약물복합체 6에 선행하여 투여되는 것을 특징으로 하는 종양 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약물 전달과 세포 내재화 효율이 강화된 약물복합체에 관한 것으로, 더 상세하게는 표적 세포에 특이적으로 결합하는 표적화물질과 약물이 연결되어 있는 약물복합체에, 다른 약물복합체와 상호 결합할 수 있는 결합기가 추가로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 단위 약물복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 내포작용 (endocytosis)이란 세포가 분자, 바이러스, 입자 및 미생물과 같은 결합된 세포 외 물질을 흡수 및/또는 배출하고 이들을 세포질 내의 특정 기관으로 전달하는 과정을 정의하는 일반적인 용어이다. 내포작용은 크게 식세포작용 (phagocytosis)과 음세포작용 (pinocytosis)로 구분되며, 음세포작용은 다시 마크로음세포작용 (macropinocytosis), 클라트린 (clathrin)-매개 내포작용, 카베올린 (caveolin)-매개 내포작용, 클라트린- 및 카베올린-독립 내포작용으로 구분될 수 있다.

[0004] 내포작용의 경로는 내포작용 소포 (endocytic vesicle)의 크기, 리간드, 수용체 및 지질과 같은 카고 (cargo)의 성질 및 소포 형성 메커니즘에 따라 달라질 수 있다 (Conner S.D. et al., Nature 2003; 422:37-44). 예를 들어, 마크로음세포작용은 주로 $> 1 \mu\text{m}$ 의 원형질막 함입에 의해 세포 외 물질을 세포 내로 전달하고, 클라트린-매개 내포작용은 $\sim 120 \text{ nm}$, 카베올린-매개 내포작용은 $\sim 60 \text{ nm}$, 클라트린- 및 카베올린-독립 내포작용은 $\sim 90 \text{ nm}$ 의 세포 내 소포의 크기로 세포 외 물질을 세포 내로 유입시킨다.

[0005] 세포 외 물질의 내포작용은 바이러스학, 약물 및 유전자 전달과 같은 분자생물학 분야에서 세포막에 광범위하게 발견되어 있는 분자(예컨대, 수용체)에 특이적으로 결합할 수 있는 약물을 표적 세포 내로 내재화 (internalization)하는데 중요한 역할을 하고 있다. 특히, 약물을 표적 세포 내로 효과적으로 내재화하기 위한 방법으로 세포막에 광범위하게 발견되어 있는 분자(예컨대, 수용체)와 특이적으로 결합할 수 있는 분자(예컨대, 리간드)를 도입하여 효율적인 내포작용을 유도할 수 있다 (Marsh M. et al., Cell 2006; 124:729-40; Smith A.E. et al., Science 2004; 304:237-42). 이 때 약물이 결합된 수용체는 표면 확산에 의해 함입 부위에서 수집되게 되는데, 이러한 수집이 원활하게 일어나지 않으면 내포작용이 빠른 시간 내에 효과적으로 일어나지 않는다.

[0006] 혈관신생 (angiogenesis)은 기존의 미세혈관으로부터 새로운 모세혈관이 형성되는 과정을 의미하며, 정상적인

생리작용으로 발생 과정과 상처치유 (wound healing), 여성의 생식 사이클에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 혈관신생이 자율적으로 조절되지 못하고 병적으로 성장함으로써 야기되는 질환들이 있는데, 예컨대 비정상적으로 과도한 혈관신생은 종양이나 암의 성장과 전이 (metastasis), 당뇨병성 망막병증 (diabetic retinopathy), 연령관련 황반변성 (agerelated macular degeneration), 류마티스성 관절염 (rheumatoid arthritis), 자궁내막증, 건선 (psoriasis) 또는 만성 염증 (chronic inflammation)과 같은 질환에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 혈관신생은 관상 동맥 질환 (coronary artery disease), 뇌졸중 (stroke), 심근경색 (myocardial infarction), 궤양 (ulcer) 또는 상처 치유의 지연 (delayed wound healing) 등과 연관되어 있다.

[0007] 상기한 질환들 중 종양, 특히 악성종양(암)은 육체를 이루는 세포에 내부적 또는 외부적 인자가 작용하여 불규칙하게 분열함으로써, 그 세포 자체가 육체를 구성하는 제어로부터 벗어나 무계획적으로 증식하게 되는 질병을 의미한다. 나아가 주위에 있는 조직을 침범하고 혈관, 림프관 등을 통하여 다른 장기로 전이하며 성장하게 되는데 이 때 혈관신생이 종양의 중요한 메커니즘 중의 하나이다.

[0008] 이처럼 혈관신생과 관련된 질환은 심각한 병증을 나타내기 때문에, 이를 치료하기 위한 다양한 치료제가 개발되었으나 이들 치료제는 주로 혈관신생 형성에 기여하는 성장인자와 신호 전달 기작이 다양하기 때문에 치료 효과가 제대로 발휘되지 않는 경우, 과도한 치료 용량을 반복 투여하게 되어, 해당 치료제에 대한 내성이 생기기 쉽고 뚜렷한 치료 효과를 기대할 수 없는 경우가 많다.

[0009] 또한, 혈관신생과 관련된 질환 치료제의 표적이 되는 표적 수용체는 혈관내피세포에 존재하므로 혈압, 혈류, 혈관투과성 등으로 인해 표적 특이적인 표적화 물질과 수용체 간 결합이 단시간 내에 해리되어 배출될 수 있어 장시간의 치료 효과를 위해서 치료제는 고용량으로 반복 투여하게 됨으로써 다양한 부작용을 야기시킨다.

[0010] 한편, 최근 각광받고 있는 종양 표적 치료 (targeted cancer therapy)는 기존 치료 방법과는 달리 종양 특이적 바이오마커를 표적으로 하는 치료 방법으로 구체적인 치료기술로는 표적항암제 치료, 치료용 방사성동위원소 치료, 광역학 치료 등이 있다. 종양 표적 치료에 사용되는 의약품은 종양 특이적 바이오마커를 표적으로 하여 운반되기 때문에 정상 세포의 손상은 최소화하며 종양세포의 사멸을 유도하게 된다. 이러한 종양 표적 치료에 사용되는 약물이 효과적인 항암 효과를 발휘하기 위해서는 종양 세포에 높은 선택성 및 결합력을 가져야 할 뿐만 아니라 세포 내재화를 통해 종양 세포에 효과적으로 전달되어야 한다.

[0011] 약물의 세포 내재화를 강화시키고자 다수의 표적 수용체에 동시에 결합 가능한 다합체 화합물을 포함하는 리간드가 개발되었으나 (Wu Z. et al., J Nucl Med 2007; 48:1536-1544.) 혈관내피세포의 위치적 특이성(혈압, 혈류, 혈관투과성 등)으로 인해 체내에서의 내포작용에 한계를 나타내며, 약물의 세포 내재화 효과가 낮은 단점이 있다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 혈관신생 관련 질환과 같은 다양한 질병의 진단이나 치료에 사용되는 종래 약물복합체의 경우 체내 내포작용의 한계로 약물의 내재화 효율이 매우 낮다는 점에 착안하여, 내포작용에 의한 약물복합체의 세포내재화가 강화된다면 진단의 민감도와 정확도를 현저히 향상시킬 수 있고 약물의 표적 치료 효능을 크게 증진시킬 수 있을 것이라 예상하였다. 이를 위해 신규 약물복합체 및 약물 전달 플랫폼을 개발하고자 예의 노력한 결과, 표적화물질과 약물이 연결되어 있는 약물복합체에 결합기를 추가로 도입하는 경우 상기 결합기와 상호작용하는 결합기가 도입된 다른 약물복합체와 결합기 간의 상호작용을 유도할 수 있고, 각각의 약물복합체가 표적 세포에 결합하고 또한 체내에서 약물복합체 상호간의 가교 결합이 유도됨으로써 군집을 형성하여 내포작용을 활성화시키고 약물복합체에 포함된 약물의 세포내재화가 현저히 증가되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) PCT/KR2011/003801

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) Conner S.D. et al., Nature 2003; 422:37-44;

- (비특허문헌 0002) Marsh M. et al., Cell 2006;124: 729-40;
 (비특허문헌 0003) Smith A.E. et al., Science 2004; 304:237-42;
 (비특허문헌 0004) Wu Z. et al., J Nucl Med 2007; 48:1536-1544.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은 세포내재화가 현저히 증가되어 약물전달 효율이 증진된 신규한 약물복합체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 표적 세포에 특이적으로 결합하는 표적화물질과 약물이 연결되어 있는 약물복합체에, 다른 단위 약물복합체와 상호 결합할 수 있는 결합기가 추가로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 단위 약물복합체를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 단위 약물복합체 (제1 단위 약물 복합체); 및 상기 단위 약물 복합체와 결합기를 통해 상호 결합할 수 있는 다른 약물복합체 (제2 단위 약물 복합체)를 포함하는 약물복합체를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 약물복합체를 포함하는 다양한 질환 치료용 약학적 조성물, 바람직하게는 신생혈관 관련 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 약물복합체를 포함하는 다양한 질환 진단용 조성물, 바람직하게는 신생혈관 관련 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 약물복합체를 포함하는 다양한 질환 진단 및 치료용 약학적 조성물, 바람직하게는 신생혈관 관련 질환 진단 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 약물복합체는 표적 세포에 특이적으로 결합하는 표적화물질을 포함하고 있어 표적 세포에 대한 신속한 표적화가 가능하고, 이와 같은 표적 세포와 표적화물질 간의 상호 작용과 더불어, 각각의 약물복합체가 서로 상호 작용할 수 있는 결합기들이 추가로 도입되어 있어, 각각의 약물복합체를 순차적으로 주입하였을 때 체내에서 결합기가 상호 결합하며 결합체(표적 세포에 결합되어 있는 서로 다른 약물복합체) 간의 체내 가교 결합을 유도하여 약물복합체가 일종의 군집을 형성하게 된다. 이러한 약물복합체의 표적 세포 표면에서의 군집화는 내포작용에 의한 세포 내재화 효과를 인위적으로 강화시키는 바, 소량의 투여로도 극대화된 치료 및/또는 진단 효과를 발휘할 수 있고, 고용량 투여에 의한 부작용을 방지할 수 있다. 한편, 상이한 결합기와 함께 약물복합체에 도입되는 약물도 서로 상이하게 설계함으로써, 진단용 약물과 치료용 약물, 또는 시너지 효과를 보이는 복수의 약물의 병용 투여가 용이하다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1a는 본 발명의 단위 약물복합체의 구조를 나타내는 모식도이다.
- 도 1b는 본 발명의 작동 원리를 간략히 표현한 개략도이다
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 세포와 유사한 환경에서의 단위 약물복합체 간 가교 결합을 확인한 결과이다.
- 도 3a는 본 발명의 일실시예에 따른 결합체 간 가교 결합 생성에 의한 세포 내 유입 증진 효과를 확인한 형광 영상 결과이다.
- 도 3b는 본 발명의 일실시예에 따른 결합체 간 가교 결합 생성에 의한 세포 내 유입 증진 효과를 확인한 형광 영상 결과의 형광 강도에 대해 수치화한 결과이다.
- 도 3c는 본 발명의 일실시예에 따른 결합체 간 가교 결합 생성에 의한 세포 내 유입 증진 효과를 확인한 형광

영상의 Z-stack 분석 결과이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 약물복합체의 체외 생체 분포 (ex vivo biodistribution) 실험 결과이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 단위 약물복합체의 순차적 투여 용량에 따른 종양에서의 머무름의 차이를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 단위 약물복합체의 순차적 투여에 따른 종양에서의 머무름 증진 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0028] 본 발명에서는 표적화물질과 약물이 연결되어 있는 단위 약물복합체 상호 간 결합기의 체내 결합을 유도하는 경우, 표적 세포에 결합된 약물복합체(결합체)가 가교 결합으로 인해 군집화가 이루어지고, 이후 약물복합체의 내포작용이 촉진되어 세포 내재화가 강화됨으로써, 약물의 세포 내 농도 및 머무름이 증강되는 것을 확인하였다.
- [0030] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 표적 세포에 특이적으로 결합하는 표적화물질과 약물이 연결되어 있는 약물복합체에, 다른 단위 약물복합체와 상호 결합할 수 있는 결합기가 추가로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 단위 약물복합체에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 표적화물질은 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟과 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약물은 치료용 또는 진단용 약물인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 표적화물질과 약물은 링커에 의해 연결되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 표적화물질과 약물은 링커 없이 직접 연결될 수도 있을 것이다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 결합기는 상기 링커에 추가로 연결되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 약물 복합체의 다른 부위에 결합될 수도 있을 것이다. 본 발명에 있어서, 상기 결합기는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 단위 약물복합체 (제1 단위 약물복합체); 및 상기 단위 약물복합체와 결합기를 통해 상호 결합할 수 있는 다른 약물 복합체 (제2 단위 약물복합체)를 포함하는 약물복합체에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 제1 단위 약물복합체에 포함되는 결합기를 제1 결합기로 명명하고, 제2 단위 약물복합체에 포함되는 결합기를 제2 결합기로 명명하는 경우, 상기 제1 단위 약물 복합체와 제2 단위 약물복합체는 상기 제1 결합기와 상기 제2 결합기가 상호 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 제1 단위 약물복합체에 도입된 표적화물질과 제2 단위 약물복합체에 도입된 표적화물질은 서로 동일하거나 상이할 수 있으나, 상기 표적화물질은 모두 동일한 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟과 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 제1 단위 약물복합체에 도입된 약물과 제2 단위 약물복합체에 도입된 약물은 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한, 다수의 단위 약물복합체가 하나 이상의 결합기 쌍에 의해 다중 결합될 수 있는 다중 약물복합체일 수 있다.
- [0040] 본 발명은 또한, 상기 단위 약물복합체(제1 단위 약물복합체); 및 상기 제1 단위 약물복합체의 제1 결합기와 상호 결합할 수 있는 제2 결합기를 가지는 다른 약물복합체(제2 단위 약물복합체)를 포함하는 단위 약물복합체 쌍을 제공한다.
- [0041] 본 발명은 또한, 상기 단위 약물복합체(제1 단위 약물복합체); 및 상기 제1 단위 약물복합체의 제1 결합기와 상호 결합할 수 있는 제2 결합기를 가지는 다른 약물복합체(제2 단위 약물복합체)를 포함하는 다수의 단위 약물복합체를 제공한다.
- [0042] 상기 제2 단위 약물복합체는 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟과 특이적으로 결합하는 제2 표적화 물질과 치료용 또는 진단용 약물이 연결되어 있는 약물복합체에, 제1 단위 약물 복합체의 제1 결합기와

상호 결합할 수 있는 제2 결합기가 추가로 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.

- [0043] 또한 본 발명은 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟과 특이적으로 결합하는 제2 표적화 물질과 치료용 또는 진단용 약물이 연결되어 있는 약물복합체에, 제1 단위 약물복합체의 제1 결합기와 상호 결합할 수 있는 제2 결합기가 추가로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 제2 단위 약물복합체에 관한 것이다.
- [0044] 나아가 본 발명은 상기 제1 단위 약물복합체와 제2 단위 약물복합체가 제1 결합기와 제2 결합기의 결합에 의해 형성된 약물복합체에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명에 따른 제1 단위 약물복합체 및/또는 제2 단위 약물복합체를 이용할 경우, 표적 세포, 예를 들어 암 세포에 빠른 표적화 (targeting)가 가능하다. 즉, 기존 항암제는 종양 섭취 약동학이 느린 경우, 정상 세포를 저해하고 빠른 체내 대사로 인해 약물 효력 저하를 유발하기 때문에 고용량 투여가 불가피하지만, 본 발명에 따른 제1 단위 약물복합체 및/또는 제2 단위 약물복합체를 이용할 경우 혈액 내에서 안정하고 독성이 거의 없는 양으로 빠르고 선택적으로 종양의 세포막 단백질에 표적이 가능한 장점이 있다.
- [0047] 나아가, 본 발명에 따른 제1 단위 약물복합체 및/또는 제2 단위 약물복합체를 이용할 경우, 약물의 종양 세포 내재화 작용을 증진 시킬 수 있는 장점이 있다. 즉, 기존 항암제의 암 세포 내재화는 오로지 자연적인 세포 내 섭취 메커니즘에만 의존하지만, 본 발명에 따른 제1 단위 약물복합체 및/또는 제2 단위 약물복합체를 이용할 경우, 목적하는 표적 세포, 예를 들어 암의 표적 부위에서 빠르게 선택적으로 결합된 제1 단위 약물복합체 및/또는 제2 단위 약물복합체 간에서 체내 분자간 상호작용에 의한 가교 결합이 일어나면서 형성된 결합체(단백질과 표적화물질 간의 결합물)의 다수가 그룹화 되어, 군집 (cluster)이 구성되게 되는데, 이러한 군집이 세포작용을 가속화 시키고 결론적으로 약물의 세포 내재화를 증진시킨다. 이는 기존에 알려져 있는 자연적인 세포 내재화 작용을 인위적으로 증진할 수 있는 놀라운 효과를 나타낸다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 제1 단위 약물복합체에 도입된 표적화물질 (제1 표적화물질) 및 제2 단위 약물복합체에 도입된 표적화물질 (제2 표적화물질)은 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟 (target)에 특이적으로 결합할 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용가능하다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 표적 세포에서 특이적으로 발현된다는 것은 정상 세포에서는 발현되지 않고 표적 세포에서만 특이적으로 발현된다는 것을 의미하고, 표적세포에서 과발현된다는 것은 정상세포에 비해 표적세포에서 비정상적으로 많이 발현된다는 것을 의미한다.
- [0052] 상기 제1 표적화물질과 제2 표적화물질은 동일한 타겟을 표적하거나 상이한 타겟을 표적 할 수 있고, 동일한 타겟을 표적하는 경우라도 서로 상이한 물질일 수 있다.
- [0053] 예를 들어 암세포 표면에 특이적으로 발현되는 EGF 수용체 (Epidermal Growth Factor Receptor)를 타겟으로 하는 제1 표적화물질과 제2 표적화물질이 사용되는 경우, 제1 표적화물질과 제2 표적화물질이 모두 EGF 수용체에 대한 항체일 수도 있고, 제1 표적화물질은 EGF 수용체에 대한 항체이고, 제2 표적화물질은 EGF 수용체에 대한 리간드인 EGF 일수 있다.
- [0054] 나아가 제1 표적화물질과 제2 표적화물질이 모두 EGR 수용체에 대한 항체, (바람직하게는 모노클로날 항체)인 경우에도 CDR (complementarity-determining region) 또는 가변영역이 서로 상이한 항체일 수 있다.
- [0056] 상기 표적 세포에 특이적으로 발현되는 타겟 (target)에 특이적으로 결합할 수 있는 물질은 항체 (antibody), 앵타머 (aptamer), 리간드 (ligand)와 같은 펩타이드 (peptide), 탄수화물 및 저분자 화합물 (small molecules) 등에서 선택될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체 (antibody)"는 완전한 항체 (whole antibody) 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.
- [0058] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마 (γ), 뮤 (μ), 알파 (α), 델타 (δ) 및 엡실론 (ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1 ($\gamma 1$), 감마2 ($\gamma 2$), 감마3 ($\gamma 3$), 감마4 ($\gamma 4$), 알파1 ($\alpha 1$) 및 알파2 ($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파 (κ) 및 람다 (λ) 타입을 가진다.
- [0059] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역 (CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하

나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역 (hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각이다. 이중쇄 Fv (two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv (single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고 (예를 들어, 전체 항체를 펩타이드로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

[0060] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로 단단하게 사실상 공유적으로 연결된 이량체로 이루어진다.

[0061] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. F(ab')₂ 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.

[0062] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드쇄 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에 있어서 약물복합체의 표적화물질은 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟과 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 예시적으로 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 에 특이적으로 결합하는 RGD (arginine(R)-glycine(G)-aspartic acid(D)) 펩타이드, 전립선 특이 막항원 (prostate specific membrane antigen, PSMA)에 결합하는 글루타메이트-우레아-라이신 (glutamate-urea-lysine, GUL) 모티프, EGF 수용체에 결합하는 EGF, VEGF (vascular endothelial growth factor) 수용체에 결합하는 VEGF-A나 VEGF-B 등을 의미하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 상기 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟은 앞서 설명한 바와 같이 질병과 관련되어 특이적으로 발현되거나, 정상적인 상태에 비해서 과발현되는 단백질 등을 의미하며, 예를 들어 수용체나 종양 특이적 항원 등이 예시될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 상기 표적 세포에 특이적으로 발현되는 타겟은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 등의 인테그린, 전립선특이 막항원 (PSMA), CD3, CD4, CD6, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD40, CD52, CD62, CD79b, CD80, CGRP, OX-40, CTLA4, 4-1BB, PD-1, EGF 수용체, TNF(tumor necrosis factor)- α 등의 TNF 수용체, Fc수용체, 폴레이트 (folate) 수용체, GD2, HER2, Her2/neu, HER3, HER4, VEGF 수용체, 인터페론 수용체, IgE 수용체, IGF-1 수용체, 인터루킨2 수용체, 인터루킨5 수용체, 인터루킨6 수용체, 인터루킨17 수용체A, 인터루킨31 수용체, 인터루킨36 수용체, B7-H3 및 CCR4 등이 예시될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 예를 들어 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 에 특이적으로 결합하는 RGD (Arginine(R)-glycine(G)-aspartic acid(D)) 펩타이드, PSMA를 표적하는 글루타메이트-우레아-라이신 모티프나 항체, 앵타머, 저분자 화합물, 또는 종양 표적 펩타이드 등이 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명의 일 양태로서 사용하는 RGD 펩타이드는 종양의 신생혈관 형성과정에 연관되어 있는 막단백질인 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 에 특이적으로 결합하는 표적화물질로서, 아르기닌-글라이신-아스파르트산인 세 가지 아미노산을 기본 구조로 하며, 종양의 진단 또는 치료를 위한 표적화물질로 사용될 수 있다. 한편, 또 다른 양태로 활용 가능한 글루타메이트-우레아-라이신 모티프는 전립선암의 바이오 마커로 알려져 있는 PSMA를 표적하는 표적화물질일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 표적 세포는 질병, 바람직하게는 혈관신생 관련 질환의 진단이나 치료의 표적이 되는 세포 또는 전립선암의 진단이나 치료의 표적이 되는 세포로, 예를 들어 종양 세포, 측삭동맥경화 유발 세포, 심근경색 유발 세포 등일 수 있다

[0074] 본 발명에 있어서, 제1 단위 약물복합체와 제2 단위 약물복합체에 포함되는 약물은 동일한 약물일 수도 있고 상이한 약물일 수도 있다.

[0075] 상기 약물은 진단용 약물과 치료용 약물을 모두 포함하는 개념으로, 진단용 약물은 형광염료 (fluorescence dye) 또는 진단용 감마선/양전자 방출 방사성동위원소인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며,

치료용 약물은 광역학치료 (photodynamic therapy)에 사용되는 광감작제 (photosensitizer), 붕소중성자포획치료 (Boron neutron capture therapy)에 사용되는 동위원소 붕소 (^{10}B)가 포함되어 있는 분자, 핵의학치료에 사용되는 알파선/베타선 방출 치료용 방사성동위원소 및 항암 화학요법에 사용되는 항암제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 약물은 저분자화합물, 합성 의약품, 펩타이드, 단백질 또는 항체일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0076] 예시적으로 상기 약물은 마이탄시노이드, 오리스타틴, 아미노프테린, 악티노마이신, 블레오마이신, 탈리소마이신, 캄프토세신, N8-아세틸 스퍼미딘, 1-(2 클로로에틸)-1,2-다이메틸 술폰닐하이드라자이드, 에스페라마이신, 에토포사이드, 6-머캅토피린, 돌라스타틴, 트리코테센, 칼리케아미신, 탁솔 (taxol), 탁산, 파클리탁셀 (paclitaxel), 도세탁셀 (docetaxel), 메토포렉세이트, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 A, 미토마이신 C, 클로람부실, 듀오카마이신, L-아스파라기나제 (L-asparaginase), 머캅토피린 (mercaptopyrine), 티오구아닌 (thioguanine), 하이드록시우레아 (hydroxyurea), 시타라빈 (cytarabine), 사이클로포스파미드 (cyclophosphamide), 이포스파미드 (ifosfamide), 니트로소우레아 (nitrosourea), 시스플라틴 (cisplatin), 카보플라틴 (carboplatin), 미토마이신 (mitomycin), 다카바진 (dacarbazine), 프로카바진 (procabazine), 토포테칸 (topotecan), 질소 머스터드 (nitrogen mustard), 사이토산 (cytoxan), 에토포시드 (etoposide), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), CNU (bischloroethylnitrosourea), 이리노테칸 (irinotecan), 캄프토테신 (camptothecin), 블레오마이신 (bleomycin), 이다루비신 (idarubicin), 다우노루비신 (daunorubicin), 닥티노마이신 (dactinomycin), 플리카마이신 (plicamycin), 미토산트론 (mitoxantrone), 아스파라기나제 (asparaginase), 비노렐빈 (vinorelbine), 클로람부실 (chlorambucil), 멜팔란 (melphalan), 카르무스틴 (carmustine), 로무스틴 (lomustine), 부설판 (busulfan), 트레오설판 (treosulfan), 데카바진 (decabazine), 에토포시드 (etoposide), 테니포시드 (teniposide), 토포테칸 (topotecan), 9-아미노캄프토테신 (9-aminocamptothecin), 크리스나톨 (crisnatol), 미토마이신 C (mitomycin C), 트리메트렉세이트 (trimetrexate), 마이코페놀산 (mycophenolic acid), 티아조퓨린 (tiazofurin), 리바비린 (ribavirin), EICAR (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), 하이드록시우레아 (hydroxyurea), 데페록사민 (deferoxamine), 플록수리딘 (floxuridine), 독시플루리딘 (doxifluridine), 랄티트렉세드 (raltitrexed), 시타라빈 (cytarabine(ara C)), 시토신 아라비노시드 (cytosine arabinoside), 플루다라빈 (fludarabine), 타목시펜 (tamoxifen), 라록시펜 (raloxifene), 메게스트롤 (megestrol), 고세렐린 (goserelin), 류프롤리드 아세테이트 (leuprolide acetate), 플루타미드 (flutamide), 바이칼루타마이드 (bicalutamide), EB1089, CB1093, KH1060, 베르테포르핀 (verteporfin), 프탈로시아닌 (phthalocyanine), 광감작제 Pe4 (photosensitizer Pe4), 데메톡시-하이포크레린 A (demethoxy-hypocrellin A), 인터페론- α (Interferon- α), 인터페론- γ (Interferon- γ 종양 괴사 인자 (tumor necrosis factor), 겐사이타빈 (Gemcitabine), 벨케이드 (velcade), 레발미드 (revamid), 탈라미드 (thalamid), 로바스타틴 (lovastatin), 1-메틸-4-페닐피리디늄 이온 (1-methyl-4-phenylpyridiniumion), 스타우로스포르린 (staurosporine), 악티노마이신 D (actinomycin D), 닥티노마이신 (dactinomycin), 블레오마이신 A2 (bleomycin A2), 블레오마이신 B2 (bleomycinB2), 페플로마이신 (peplomycin), 에피루비신 (epirubicin), 피라루비신 (pirarubicin), 조루비신 (zorubicin), 마이토산트론 (mitoxantrone), 베라파밀 (verapamil) 및 탐시가르긴 (thapsigargin), 테모졸로마이드 (temozolomide), 핵산 분해 효소 및 세균이나 동식물 유래의 독소, 방사성 동위원소 및 형광염료로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 예시적으로 상기 방사성동위원소는 감마선 또는 양전자를 방출하여 진단 영상을 제공하거나 베타선 또는 알파선을 방출하여 치료 효능을 제공하는 동위원소일 수 있고, 예를 들어, ^{11}C , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{188}Re , $^{125/123/124/131}\text{I}$, ^{89}Zr , $^{64/67}\text{Cu}$, ^{68}Ga , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{225}Ac 또는 ^{211}At 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 예시적으로 상기 형광염료는 fluorescein isothiocyanate (FITC), Tetramethylrhodamine (TRITC), alexa fluor 계열 또는 cyanine (Cy) 계열 형광염료일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 본 발명에 따른 제1 단위 약물복합체 및 제2 단위 약물복합체에 포함되는 약물은 서로 상이한 것이 바람직하다. 이렇게 제1 단위 약물복합체 및 제2 단위 약물복합체에 포함되는 약물이 상이한 경우, 다약제 탑재 및 전달을 통해 병용 치료 (combination therapy)가 맞춤형으로 실행 가능하다는 장점이 있다. 즉, 기존 항암제에 대한 암의 내성 (resistance)은 항암제의 사용 주기를 단축시키고 결국은 환자의 치료 중단을 초래하는데, 제1 단위 약물복합체 및 제2 단위 약물복합체에 다양한 암 탐색 및 치료 목적의 약물을 도입함으로써 내성에 대응하는 맞춤형 치료 및 병용 치료가 가능하다.

- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 제1 결합기와 제2 결합기는 체내에서 결합될 수 있는 결합기라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 상기 결합기는 클릭 반응에 의한 결합기, 호스트-게스트 화학 작용에 의한 결합기 또는 아비딘-바이오틴 결합기 일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0083] 본 발명에 있어서, 상기 결합은 클릭 반응에 의한 결합, 호스트-게스트 상호 작용에 의한 결합 또는 아비딘-바이오틴 결합인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 둘 이상의 단위 약물복합체 간의 상호 작용을 유도하도록 체내 가교 결합이 일어날 수 있다면 제한 없이 사용 가능한 것임은 통상의 기술자에게 자명할 것이다.
- [0084] 구체적으로, 상기 결합기는 클릭 반응 (click reaction)을 사용하는 결합기가 있다. 클릭 반응의 여러 종류 중에서도 구리 촉매 없는 클릭 반응은 체내와 같은 수용액 환경 하에서도 짧은 시간 안에 결합이 이루어지는 반응으로 알려져 있다 (Jewett J.C. et al. Chem. Soc. Rev. 2010;39: 1272-1279.). 일부 양태로서 상기 클릭 반응에 의한 결합기는 azide-ADIBO (azadibenzocyclooctyne) 결합기, TCO (trans cyclooctene)-tetrazine 결합기 또는 alkynes-cyclopentadienones 결합기인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0085] 본 발명에 있어서, 상기 호스트-게스트 상호 작용은 호스트 화합물과 게스트 화합물 사이 비공유 결합 형태로 높은 결합력을 보여주는 상호 작용이다 (Yu G. et al., Theranostics. 2019;9:3047-3074.). 특히, 체내와 유사한 환경에서도 화합물 간의 높은 결합력을 보여주므로 본 발명에 적용 가능하다. 일 양태로서 cucurbituril-adamantane, cyclodextrin-amino acid 결합기인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0086] 상기 결합기는 아비딘-바이오틴 상호작용을 이용하는 것도 가능하다. 아비딘-바이오틴 상호작용은 자연계에 존재하는 강력한 비공유 결합 중 하나로 선택적인 결합이며 무엇보다 항체-항원 결합보다 강력한 결합력을 갖는 장점이 있다(Jain A. et al. J Control Release. 2017; 245: 27-40).
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 제1 단위 약물복합체에 포함된 제1 표적화물질과 약물 및/또는 제2 단위 약물복합체에 포함된 제2 표적화물질과 약물은 링커에 의해 연결되거나 링커 없이 직접 연결될 수 있다.
- [0089] 또한, 상기 제1 단위 약물복합체에 포함된 제1 표적화물질과 제1 결합기 및/또는 제2 단위 약물복합체에 포함된 제2 표적화물질과 제2 결합기는 링커에 의해 연결되거나 링커 없이 직접 연결될 수 있다
- [0090] 바람직한 예로, 제1 단위 약물복합체에 포함된 제1 표적화물질, 약물 및 제1 결합기는 도 1a에 도시된 바와 같이 3개 이상의 기능기 (functional group)를 가지는 링커(연결단)에 의해 결합된 형태일 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 제1 표적화 물질, 약물 및 제1 결합기는 각각 링커에 의해 연결될 수도 있고 직접 연결된 형태일 수도 있다.
- [0092] 본 발명에 있어서, 링커는 아미노산, 탄화수소 또는 PEG 사슬일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 즉, 상기 링커는 표적화물질과 약물을 연결시키고, 여기에 결합기를 추가로 연결시키기에 적합한 원자단이나 분자단 및 기타 기능기를 가지는 당업계에 공지된 물질이라면 제한없이 사용할 수 있을 것이다.
- [0094] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 단위 약물복합체(제1 단위 약물복합체) 및 상기 단위 약물복합체와 결합기들(제1 결합기와 제2 결합기)을 통해 상호 결합할 수 있는 다른 약물복합체(제2 단위 약물복합체)를 포함하는 약물복합체에 관한 것이다.
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 상호 결합은 클릭 반응에 의한 결합, 호스트-게스트 상호 작용에 의한 결합 또는 아비딘-바이오틴 결합인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0097] 본 발명에 있어서, 상기 클릭 반응에 의한 결합은 azide-ADIBO 결합, TCO-tetrazine 결합 또는 alkynes-cyclopentadienones 결합인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0098] 본 발명에 있어서, 상기 호스트-게스트 화학 작용에 의한 결합은 cucurbituril-adamantane 결합, cyclodextrin-amino acid 결합인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0100] 본 발명은 또 다른 관점에 있어서, 상기 단위 약물복합체를 포함하는 신생혈관 관련 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0101] 상기 약학적 조성물은 서로 상이한 둘 이상의 단위 약물복합체를 포함할 수 있다. 상기 상이한 둘 이상의 단위 약물복합체란 각 단위 약물 복합체를 구성하는 약물복합체가 상호 작용하도록 기능하는 결합기가 둘 이상의 단위 약물복합체에서 상이하다는 것을 의미할 수 있다. 또한, 둘 이상의 단위 약물복합체를 구성하는 복수의 단위

약물복합체에 결합된 각각의 약물이 서로 상이하다는 것을 의미할 수 있다.

- [0103] 본 발명에 있어서, 상기 제1 단위 약물복합체와 제2 단위 약물복합체는 동시에 투여할 수도 있으나, 바람직하게는 순차적으로 투여하는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 일 실시양태로서, 상기 제1 단위 약물복합체는 제2 단위 약물복합체에 선행하여 투여되고, 제1 단위 약물복합체가 표적 세포의 타겟에 도달하여 결합한 이후 제2 단위 약물복합체가 투여되는 것이 바람직하다.
- [0104] 일 실시예에서 상기 제2 단위 약물복합체는 제1 단위 약물복합체 투여 후 1 분 내지 600 분, 바람직하게는 5 분 내지 480 시간, 더욱 바람직하게는 10 분 내지 300 분, 가장 바람직하게는 30분 내지 240 분이 경과한 이후에 투여되는 것이 바람직하다.
- [0105] 상기 제2 단위 약물복합체는 제1 단위 약물복합체와 동일한 양이 사용될 수도 있다. 한편, 제1 단위 약물복합체당 하나 이상의 단위 약물복합체가 사용될 수 있는데, 예를 들어 제1 단위 약물복합체당 투여되는 단위 약물복합체가 1 내지 10 개의 종류, 바람직하게는 1 내지 5 개의 종류가 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0107] 본 발명에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 양성 종양, 악성 종양 (암), 당뇨병성 망막병증, 연령관련 황반변성, 류마티스성 관절염, 자궁내막증, 건선, 만성 염증, 관상 동맥 질환, 죽상동맥경화증, 뇌졸중, 궤양 및 심근 경색으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0109] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 단위 약물복합체를 포함하는 혈관신생 관련 질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0111] 본 발명에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 양성 종양, 악성 종양 (암), 당뇨병성 망막병증, 연령관련 황반변성, 류마티스성 관절염, 자궁내막증, 건선, 만성 염증, 관상 동맥 질환, 죽상동맥경화증, 뇌졸중, 궤양 및 심근 경색으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0112] 본 발명은 또 다른 관점에서, 진단과 치료를 동시에 병행할 수 있도록, 상기 단위 약물복합체를 포함하는 혈관신생 관련 질환 진단 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0114] 본 발명에 있어서, 상기 제1 단위 약물복합체는 제2 단위 약물복합체에 선행하여 투여되고, 상기 제1 단위 약물복합체에 포함되는 약물은 진단용 약물이며, 제2 단위 약물복합체에 포함되는 약물은 치료용 약물인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0115] 본 발명에 있어서, 상기 제1 단위 약물복합체는 제2 단위 약물복합체에 선행하여 투여되고, 상기 제1 단위 약물복합체에 포함되는 약물은 치료용 약물이며, 제2 단위 약물복합체에 포함되는 약물은 진단용 약물인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0117] 본 발명에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 양성 종양, 악성 종양 (암), 당뇨병성 망막병증, 연령관련 황반변성, 류마티스성 관절염, 자궁내막증, 건선, 만성 염증, 관상 동맥 질환, 죽상동맥경화증, 뇌졸중, 궤양 및 심근 경색으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0119] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 주사제, 경구투여용 제제, 패치제, 액제, 캡슐, 과립, 정제, 산제, 분무제, 연고제, 겔제, 점막투여제제 및 좌제로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 제형으로 제제화되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이들 제제는 당 분야에서 제제화에 사용되는 통상의 방법 또는 Remington's Pharmaceutical Science (최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 에 개시되어 있는 방법으로 제조될 수 있으며 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 다양한 제제로 제제화될 수 있다. 그러나, 상기 기재는 예시적인 것으로, 본 발명이 적용 가능한 제제는 상기 기재에 한정되지는 않는다.
- [0120] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 허용가능한 부형제 (excipients)를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 보조제는 예컨대 담체일 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 그러나, 상기 기재는 예시적인 것으로, 본 발명에서 사용 가능한 보조제나 담체는 상기 기재에 한정되지는 않는다.
- [0122] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 구강, (전문 용어)복강 내

또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 이 경우, 투여 용법 및 투여 용량은 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 다양할 것이다. 적합한 투여 용법 및 투여 용량은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 결정되어야 한다.

[0124] 단위 약물복합체의 구성은 도1a에 도시된 바와 같이 표적화물질, 결합기, 약물, 링커로 나누어지며 각 구성 요소들의 역할은 하기 정리된 바와 같다.

[0126] **표적화물질**

[0127] 표적화물질은 표적 세포에서 특이적으로 발현되거나 과발현되는 타겟과 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 예시적으로 종양신생에 관련하는 인테그린 수용체에 특이적으로 결합하는 리간드, PSMA에 관련하는 수용체에 결합하는 리간드, EGF 수용체에 결합하는 리간드, VEGF (vascular endothelial growth factor) 수용체에 결합하는 리간드 등을 의미하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0129] **결합기**

[0130] 결합기는 서로 다른 단위 약물복합체 간의 체내 가교 결합을 유도하는 작용기로서, 서로 근접하여 위치할 때 자발적 공유결합 또는 비공유 결합할 수 있으며, 그 예로는 클릭 반응에 의한 결합, 호스트-게스트 상호 작용에 의한 결합 또는 아비딘-바이오틴 결합이 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0131] 클릭 반응에 의한 결합에 사용되는 결합기는 azide-ADIBO, TCO-tetrazine, alkynes-cyclopentadienones인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0132] 호스트-게스트 화학 작용에 사용되는 결합기는 cucurbituril-adamantane, cyclodextrin-amino acid 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

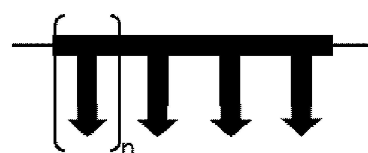
[0133] 아비딘-바이오틴 결합기는 아비딘-바이오틴인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 복수의 단위 약물 복합체가 결합기를 통해 상호 결합하는 양태는 매우 다양하며, 일부 양태를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0134] 본 발명에 따른 제1 단위 약물복합체에는 하나 또는 다수의 제2 단위 약물복합체가 결합할 수 있다.

[0135] 제1 단위 약물복합체에 하나의 제 2의 단위 약물복합체가 결합하는 경우, 체내 가교 결합을 위한 결합기 상호간에 클릭 반응에 의한 결합, 호스트-게스트 상호 작용에 의한 결합 또는 아비딘-바이오틴 결합이 사용될 수 있으며, 예시적으로 단위 약물복합체끼리 결합하기 위한 결합기를 각각 A와 a라고 표현할 때, 각각의 단위 약물복합체에 A와 a가 하나씩 포함될 수 있다. 제1 단위 약물복합체에 다수의 제2 단위 약물복합체가 결합하는 경우, 제 1 단위 약물복합체의 결합기 구조는 하나의 제2 단위 약물복합체가 결합하는 방식의 구조보다 다양할 수 있다. 상세히 설명하면, 체내 가교 결합을 위해 선택한 결합 방식에서 단위 약물복합체에 도입하는 결합기를 A와 a라고 표현할 수 있다. 이 때, 제 1단위 약물복합체는 결합기로 A를 하나 또는 그 이상 포함할 수 있고 이 단위 약물복합체는 a를 포함하는 다수의 제 2단위 약물복합체와 결합할 수 있다. 이 경우, 단위 약물복합체에 포함된 다수의 A는 다양한 형태로 단위 약물복합체에 연결될 수 있는데, 구체적으로는 하기에 도시된 바와 같이 선형, 고리형, 가지형 등의 형태로 연결될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이 때, A는 상기 설명된 결합기에서 설명된 바와 같이, 상호작용을 할 수 있는 결합기를 의미하며, 구체적인 예시로는 azide-ADIBO, TCO-tetrazine, alkynes-cyclopentadienones, cucurbituril-adamantane, cyclodextrin-amino acid, 아비딘-바이오틴 등이며,

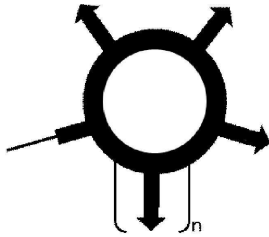
결합기는 1 내지 30 개일 수 있으며, 도 1a에 도시된 바와 같이 **T** 는 링커이며, **↓** 는 결합기이다. 하기는 일부, 선형, 고리형, 가지형의 구조를 예시적으로 표현한 것으로, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0137] 선형



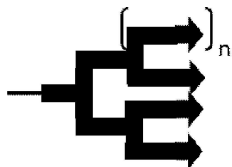
[0138]

[0140] 고리형



[0142]

[0144] 가지형



[0146]

[0148] 약물

[0149] 본 발명에 있어서, 약물은 진단용 약물과 치료용 약물을 모두 포함하는 개념이다. 진단용 약물은 형광염료 (fluorescence dye) 또는 진단용 감마선/양전자 방출 방사성동위원소인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 치료용 약물은 광역학치료 (photodynamic therapy)에 사용되는 광감작제 (photosensitizer), 붕소중성자포획치료 (boron neutron capture therapy)에 사용되는 동위원소 붕소 (^{10}B)가 포함되어 있는 분자, 핵의학치료에 사용되는 알파선/베타선 방출 치료용 방사성동위원소 및 항암 화학요법에 사용되는 항암제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0151] 링커

[0152] 링커는 표적화물질과 약물 그리고 결합기를 추가로 연결시키는 원자단이나 분자단 및 기타 기능기를 가진 물질을 의미한다. 상기 링커는 아미노산, 탄화수소 또는 PEG 사슬일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 구체적으로는, 각 구성을 연결하는 작용기로서 카복실산과 아민을 작용기로 가지는 아미노산, 최소 하나 또는 다수의 잔기에 아민 ($-\text{NH}_2$), 카복실산 ($-\text{COOH}$), 설펜산 ($-\text{SH}$), 알코올 ($-\text{OH}$), 할로젠족 ($-\text{Br}$, Cl , I 등)을 가지는 탄화수소 또는 PEG 사슬을 포함할 수 있다.

[0154] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 단위 약물복합체가 하나 또는 둘 이상 함유되어 있는 혈관신생 관련 질환 진단용 키트 또는 혈관신생 관련 질환 치료용 키트에 관한 것이다.

[0155] 본 발명은 또 다른 관점에서, 혈관신생 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 상기 약물복합체의 용도에 관한 것이다.

[0156] 본 발명은 또 다른 관점에서, 혈관신생 관련 질환의 치료를 위한 약제를 제조하기 위한 상기 약물복합체의 용도에 관한 것이다.

[0157] 본 발명의 또 다른 관점에서, 혈관신생 관련 질환의 진단에 사용하기 위한 상기 약물복합체의 용도에 관한 것이다.

[0158] 본 발명은 또 다른 관점에서, 혈관신생 관련 질환의 진단을 위한 시약을 제조하기 위한 상기 약물복합체의 용도에 관한 것이다.

[0159] 본 발명의 또 다른 관점에서, 혈관신생 관련 질환의 치료 및 진단에 사용하기 위한 상기 약물복합체의 용도에 관한 것이다.

[0160] 본 발명은 또 다른 관점에서, 혈관신생 관련 질환의 치료 및 진단을 위한 약제를 제조하기 위한 상기 약물복합체의 용도에 관한 것이다.

[0162] 본 발명에 따른 단위 약물복합체는 형광 영상 유도 수술 (fluorescence image-guided surgery), 핵의학 진단 (nuclear imaging), 광역학 치료 (photodynamic therapy, PDT), 붕소중성자포획치료 (boron neutron capture therapy, BNCT), 방사면역치료 (radioimmunotherapy), 표적항암치료와 같은 다양한 진단 및 치료 방법에 활용

될 수 있다.

[0164] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 다음 단계를 포함하는 혈관신생 관련 질환 치료방법에 관한 것이다:

[0165] (a) 혈관신생 관련 질환의 치료가 필요한 객체에 제1 단위 약물복합체를 투여하는 단계; 및

[0166] (b) 상기 객체에 제2 단위 약물복합체를 투여하는 단계.

[0168] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 다음 단계를 포함하는 혈관신생 관련 질환 진단 방법에 관한 것이다:

[0169] (a) 혈관신생 관련 질환의 진단이 필요한 객체에 제1 단위 약물복합체를 투여하는 단계; 및

[0170] (b) 상기 객체에 제2 단위 약물복합체를 투여하는 단계.

[0171] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 다음 단계를 포함하는 혈관신생 관련 질환 진단 및 치료방법에 관한 것이다:

[0172] (a) 혈관신생 관련 질환의 진단 및 치료가 필요한 객체에 제1 단위 약물복합체를 투여하는 단계; 및

[0173] (b) 상기 객체에 제2 단위 약물복합체를 투여하는 단계.

[0175] 종합하면, 본 발명에 따른 약물복합체는 다음과 같은 특징을 갖는다.

[0176] 첫째, 본 발명에 따른 단위 약물복합체는 상기 단위 약물복합체가 작용하는 세포를 신속하게 표적화 할 수 있다. 일반적으로 표적 세포에 특이적으로 결합하지 않거나, 표적 세포에 섭취되는 약동학이 느린 경우, 표적 세포 이외의 정상 세포의 기능을 억제하고, 체내 대사로 인한 약물 효력 저하를 유발하여 투여량을 증가시키게 되는 문제점이 발생한다. 그러나 본 발명에 따른 약물복합체는 표적 세포에 특이적으로 결합하는 표적화물질을 도입하여 적은 투여량으로 높은 치료 효과를 발휘하여 고용량 투여에 따른 독성이나 부작용을 방지할 수 있다.

[0177] 둘째, 본 발명에 따른 약물복합체는 세포 내재화를 강화시킨다. 종래 종양 세포 표적 치료제의 세포 내재화가 오직 자연적인 세포 내 섭취 메커니즘에 의존하는 것이라면, 본 발명에 따른 단위 약물복합체는 체내 가고 결합을 유도하는 결합기를 도입함으로써 체내에서 단위 약물복합체의 상호 결합을 유도하게 된다. 특히 이러한 결합기를 갖는 단위 약물복합체를 우선 투여하고 이후 상기 결합기에 상호 결합할 수 있는 다른 단위 약물복합체를 투여하는 순차적인 투여 방법은 각각의 단위 약물복합체가 표적 세포에 특이적으로 결합하는 표적화물질을 포함하고 있으므로 표적 세포 상의 타겟에 특이적으로 결합한다. 이들 표적 세포에 결합된 복수의 단위 약물복합체는 체내에서 가고 결합하고, 형성된 결합체 간의 유도된 복수의 체내 가고 결합에 의해 군집이 형성되며, 이러한 군집은 내포작용을 가속화시키고 약물의 세포 내재화를 촉진시켜 저용량 투여로도 효과적으로 약물이 표적 세포로 전달될 수 있다. 이는 자연발생적인 내포작용을 인위적으로 증진시키는 방법으로, 단위 약물복합체에 적용되는 결합기는 하나 이상의 서로 동일 또는 상이한 결합기를 도입할 수 있고 (예를 들어, 클릭 반응 결합기, 호스트-게스트 결합기 등), 서로 상이한 결합기가 도입된 단위 약물복합체가 각각 이에 상호작용하는 다른 단위 약물복합체와 결합함으로써 셋 이상의 서로 다른 단위 약물복합체 간 체내 가고 결합을 유도하여 군집을 형성할 수도 있어, 이에 포함되는 약물도 셋 이상의 서로 상이한 약물일 수 있을 것이다.

[0178] 마지막으로, 본 발명을 통해 다목적 치료 및 병용 치료를 맞춤형으로 실시할 수 있다. 복수의 단위 약물복합체는 결합기가 서로 상이할 뿐만 아니라 포함되어 있는 약물도 서로 상이할 수 있으며, 복수의 서로 상이한 단위 약물복합체는 그만큼 다양한 약물을 포함할 수 있으므로, 다목적 치료 및 병용 치료에 매우 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 본 발명의 하나의 단위 약물복합체에는 진단용 약물을 포함하고, 다른 단위 약물복합체에는 치료용 약물을 포함하는 경우 진단과 치료가 동시에 진행될 수도 있을 것이다.

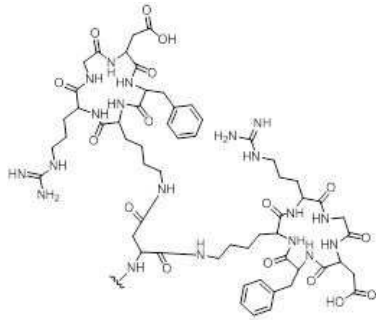
[0180] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0183] 실시예 1. 약물복합체의 제조

[0185] 1-1. 단위 약물복합체 제조

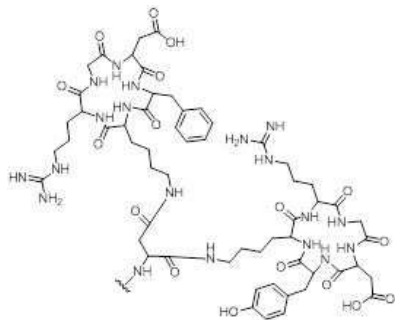
[0186] 본 발명의 일 실시예로서 선정된 표적화물질은 종양 혈관신생의 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 에 결합하는 RGD 펩타이드이며, 구조는 아래 화학식과 같다.

[0188] 펩타이드 A



[0189]

[0191] 펩타이드 B

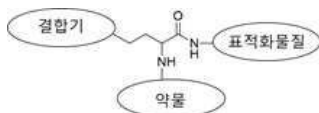


[0192]

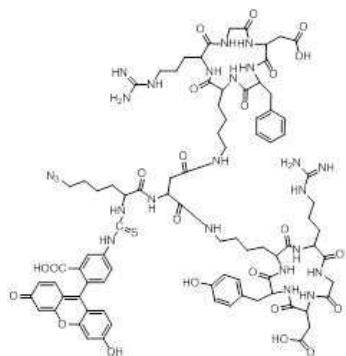
[0195] 구체적으로, 펩타이드 A는 두 개의 cyclicRGDFK를 aspartic acid (D)로 연결한 D-[c(RGDFK)]₂ 이며, 펩타이드 B는 cyclicRGDFK와 tyrosine이 들어있는 cyclicRGDYK를 aspartic acid (D)로 연결한 D-c(RGDyK)-c(RGDFK) 이다. 상기 표적화물질은 문헌 BC Lee et al., RSC Advances 2013; 3:782-792.을 기초로 합성하였다.

[0197] 본 발명에서 사용된 단위 약물복합체는 다음과 같다. 각각의 단위 약물복합체는 표적화물질, 약물, 결합기가 링커를 통해 연결되는 형태를 가지고 있으며, 링커로 각각의 구성요소를 연결하는 다양한 방법이 당업계에 널리 알려져 있으나, 본 실시예에서는 아마이드 결합 (amide bond)를 이용하여 각각의 약물복합체를 제조하였다.

[0199] 단위 약물복합체 1



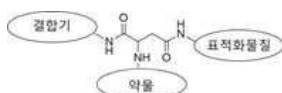
[0200]



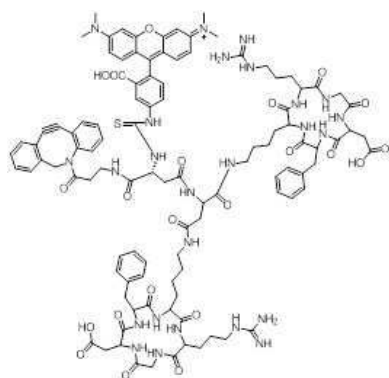
[0201]

[0202] 표적화물질 = 펩타이드 B, 약물 = FITC, 결합기 = azide

[0204] 단위 약물복합체 2



[0205]



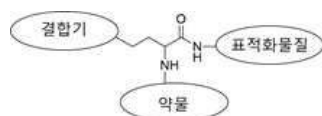
[0206]

[0207]

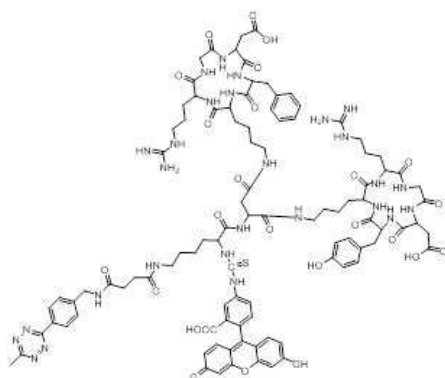
표적화물질 = 펩타이드 A, 약물 = TRITC, 결합기 = ADIBO

[0209]

단위 약물복합체 3



[0210]



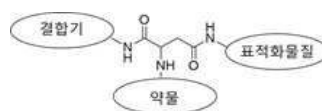
[0211]

[0212]

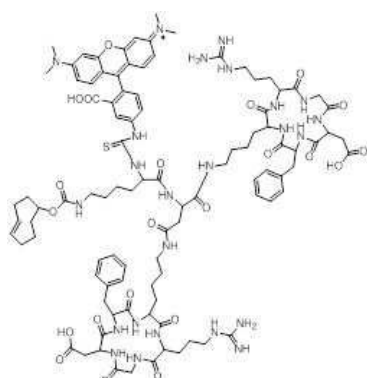
표적화물질 = 펩타이드 B, 약물 = FITC, 결합기 = tetrazine

[0214]

단위 약물복합체 4



[0215]

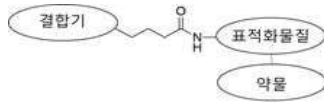


[0216]

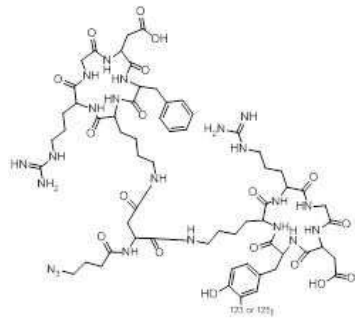
[0217]

표적화물질 = 펩타이드 A, 약물 = TRITC, 결합기 = TCO

[0219] 단위 약물복합체 5



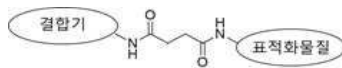
[0220]



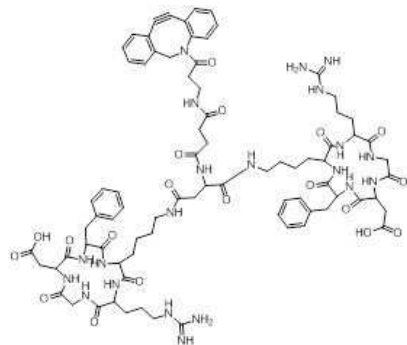
[0221]

[0222] 표적화물질 = RGD 펩타이드 A, 약물 = 방사성 동위원소 아이오딘 (^{123}I 또는 ^{125}I), 결합기 = azide

[0224] 단위 약물복합체 6



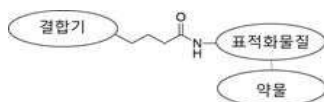
[0225]



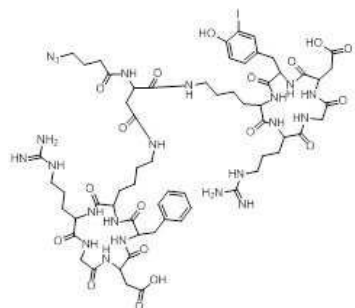
[0226]

[0227] 표적화물질 = RGD 펩타이드 B, 결합기 = ADIBO

[0229] 단위 약물복합체 7



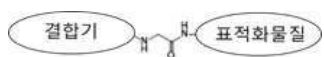
[0230]



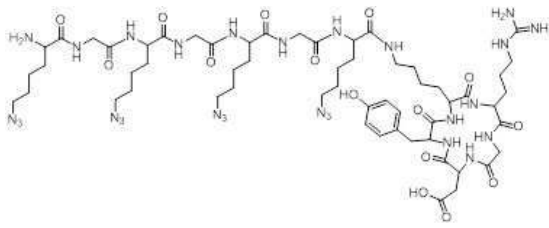
[0231]

[0232] 표적화물질 = RGD 펩타이드 A, 약물 = 아이오딘, 결합기 = azide

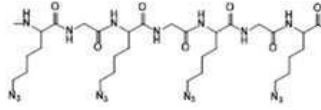
[0234] 단위 약물복합체 8



[0235]



[0236]



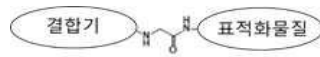
[0238]

표적화물질 = cyclicRGDyK, 결합기 =

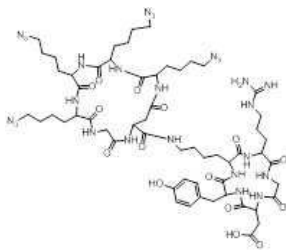
[0240]

단위 약물복합체 9

[0241]



[0242]

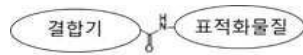


[0243]

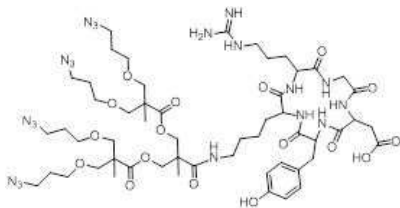
표적화물질 = cyclicRGDyK, 결합기 =

[0245]

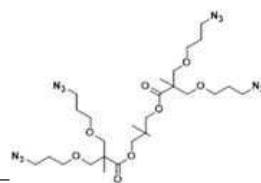
단위 약물복합체 10



[0246]



[0247]

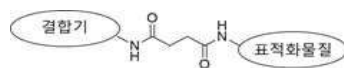


[0248]

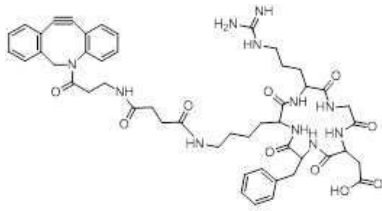
표적화물질 = cyclicRGDyK, 결합기 =

[0250]

단위 약물복합체 11



[0251]



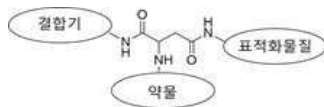
[0252]

[0254]

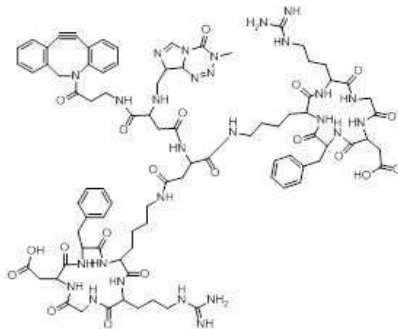
표적화물질 = cyclicRGDfK, 결합기 = ADIBO

[0256]

단위 약물복합체 12



[0257]



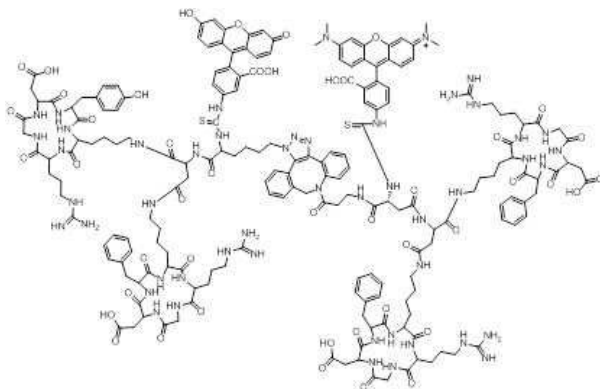
[0258]

[0259]

표적화물질 = 펩타이드 A, 약물 = temozolomide, 결합기 = ADIBO

[0262]

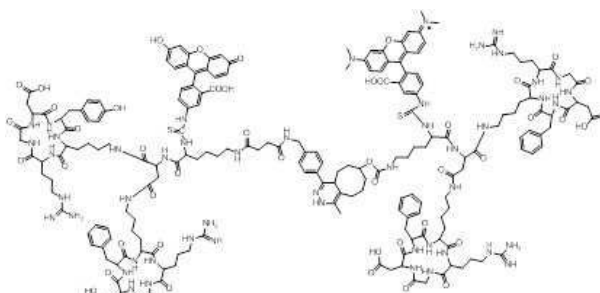
약물복합체 1-2 : 단위 약물복합체 1과 2의 결합



[0263]

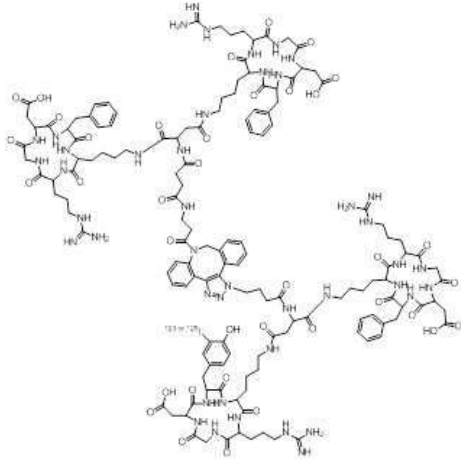
[0265]

약물복합체 3-4 : 단위 약물복합체 3과 4의 결합



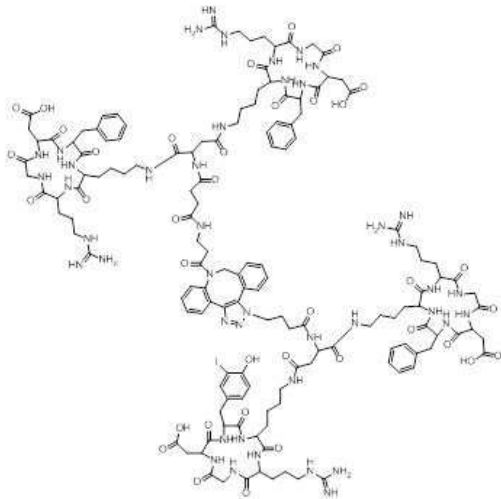
[0266]

[0268] 약물복합체 5-6 : 단위 약물복합체 5와 6의 결합



[0269]

[0271] 약물복합체 6-7 : 단위 약물복합체6과 7의 결합

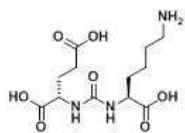


[0272]

[0274] 또 다른 실시예로서, PSMA를 표적하는 단위 약물복합체를 제조하였다.

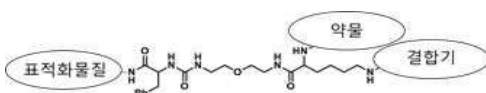
[0275] 선정된 표적화물질은 PSMA에 결합하는 GUL (glutamate-urea-lysine) 기반 모티프이며, 구조는 아래 화학식과 같다. 상기 표적화물질은 문헌 (Maresca K.P. et al., J Med Chem 2009;52:347-357.)을 기초로 합성하였다.

[0277] 펩타이드 C

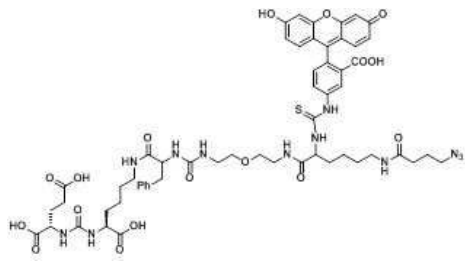


[0278]

[0280] 단위 약물복합체 13



[0281]



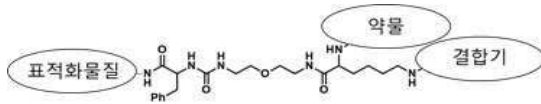
[0282]

[0283]

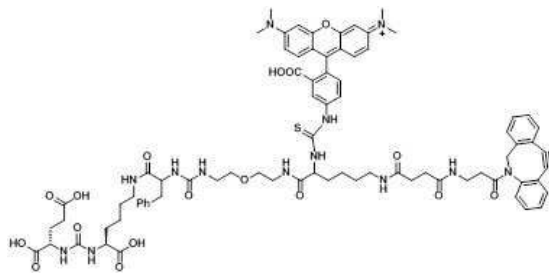
표적화물질 = 펩타이드 C, 약물 = FITC, 결합기 = azide

[0285]

단위 약물복합체 14



[0286]



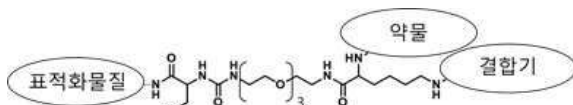
[0287]

[0288]

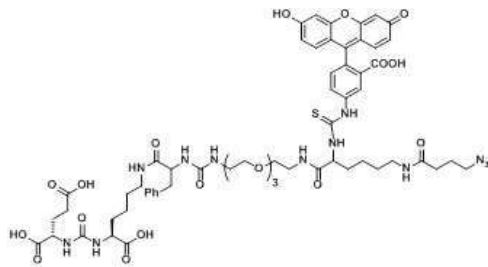
표적화물질 = 펩타이드 C, 약물 = TRITC, 결합기 = ADIBO

[0290]

단위 약물복합체 15



[0291]



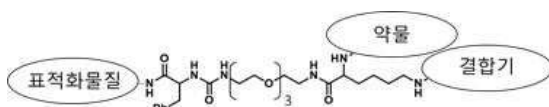
[0292]

[0294]

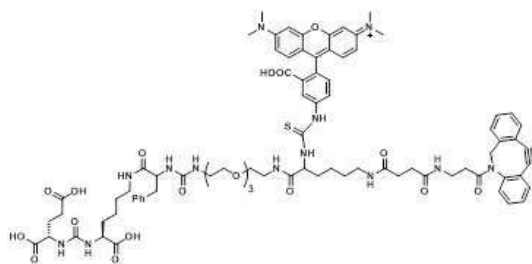
표적화물질 = 펩타이드 C, 약물 = FITC, 결합기 = azide

[0296]

단위 약물복합체 16



[0297]

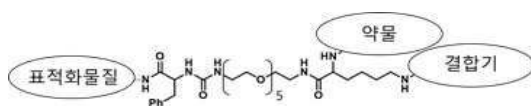


[0298]

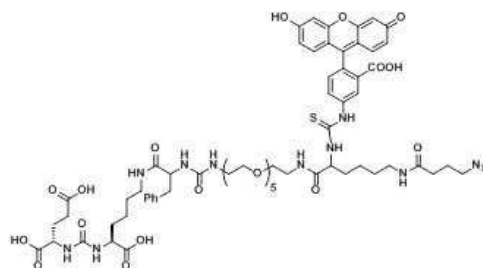
[0299] 표적화물질 = 펩타이드 C, 약물 = TRITC, 결합기 = ADIBO

[0301] 단위 약물복합체 17

[0302]



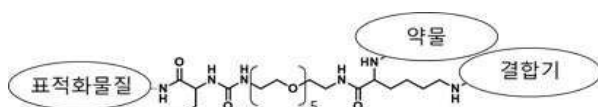
[0303]



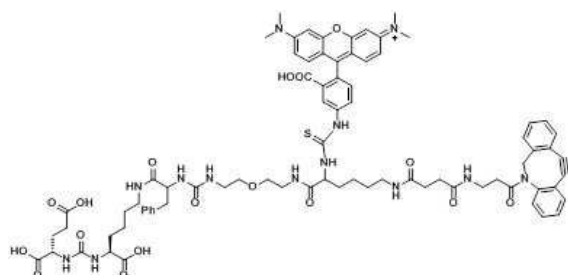
[0304] 표적화물질 = 펩타이드 C, 약물 = FITC, 결합기 = azide

[0306] 단위 약물복합체 18

[0307]



[0308]



[0309] 표적화물질 = 펩타이드 C, 약물 = TRITC, 결합기 = ADIBO

[0312] 실시예 2. 단위 약물복합체 간 가교 결합 검증

[0313] 체외 실험 조건에서 단위 약물복합체 간 가교 결합 및 결합이 완료되는 시간을 확인하고자 단위 약물복합체 1 내지 4를 실험에 사용하였다. 단위 약물복합체 1을 물과 PBS 버퍼 혼합 용액 (v/v = 1:1, 0.5 mL)에 녹인 후, 동일한 용액 (0.5 mL)에 녹인 단위 약물복합체 2를 첨가하여 상온에서 40 분간 반응하였다. 반응 시작 후 10분마다 반응 혼합액에서 소량 (0.1 mL)을 채취한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. 단위 약물복합체 3과 단위 약물복합체 4에 대해서도 동일하게 실험을 진행하였다.

[0314] 분석한 결과는 도 2에 나타내었으며, 단위 약물복합체 1과 2의 가교 결합에 따른 약물복합체 1-2는 반응 시작 후 10분부터 생성되면서 40분에 결합 반응이 완료됨을 확인하였고, 단위 약물복합체 3과 4의 가교 결합에 따른 약물복합체 3-4는 반응 시작 후 10분부터 생성되며 30분에 결합 반응이 완료됨을 확인하였다. 이를 통해, 본래 설계한 바와 같이 단위 약물복합체 간의 가교 결합이 체내와 유사한 조건의 체외에서 진행되는 것을 미리 실험적으로 입증함으로써, 이후 체내의 실험에서 본 발명을 증명하기에 무리가 없음을 확인하였다.

[0316] 실시예 3. 단위 약물복합체의 체내 결합능 및 세포 내재화 효과 검증

[0317] 형광공명에너지전달 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 방법은 1 ~ 10 nm 사이에서 일어나는 두 가지 형광염료 사이에 형광공명에너지를 측정하여 두 가지 화합물 간 상호작용을 확인할 수 있는 분석 방법으로, 본 발명에 따른 단위 약물 복합체 간 상호 결합 및 세포 내재화 효과를 측정하고자 FRET 방법을 사용하였다. 세포 내재화 효과를 비교 및 확인하기 위한 FRET 실험의 조건은 하기 표 1에 기재된 바와 같이 설계하였으며 본 실험에 사용된 단위 약물복합체는 각각 단위 약물복합체 1과 2 및 단위 약물복합체 3과 4이다.

[0318] 하기 표 1에 서술된 후접합 표적 (post-conjugation targeting)은 각 단위 약물복합체를 체내외 실험 전에 미리

가고 결합을 시킨 형태를 의미한다. 예를 들어, 표적화 전 이미 단위 약물복합체 1의 결합기인 azide와 단위 약물복합체 2의 결합기인 ADIBO 간의 결합이 완료된 약물복합체 1-2를 의미한다. 후표적 접합 (post-targeting conjugation)은 본 발명에 따른 기술을 의미하며, 단위 약물복합체 1과 2를 예를 들어 설명하면, 단위 약물복합체 1을 표적 세포에 표적화시켜 결합시킨 후, 동일 표적 세포에 단위 약물복합체 2를 표적화시켜 결합시키되, 이 때 단위 약물복합체 쌍인 단위 약물복합체 1과 단위 약물복합체 2가 각각의 결합기를 통해 가고 결합을 형성 되는 형태의 기술이다.

표 1

	실험예 1	실험예 2
1	단위 약물복합체 1 (50 μ M) 단독 처리	단위 약물복합체 3 (50 μ M) 단독 처리
2	단위 약물복합체 2 (50 μ M) 단독 처리	단위 약물복합체 4 (50 μ M) 단독 처리
3	단위 약물복합체 1 또는 2 (50 μ M) 와 표적 경쟁물질 (cyclic RGDyK, 300 μ M) 처리	단위 약물복합체3 또는 4 (50 μ M)와표적 경쟁물질 (cyclic RGDyK, 300 μ M) 처리
4	후접합 표적인 약물복합체 1-2 처리	후접합 표적인 약물복합체 3-4 처리
5	단위 약물복합체 1 및 단위 약물복합체 2 의 후 표적 접합 (post targeting conjugation)	단위 약물복합체 3 및 단위 약물복합체 4의 후표적 접합 (post targeting conjugation)

U-87MG 세포 (한국세포주은행)를 confocal dish (SPL Life science)에 1×10^6 개 분주하고 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포에 상기 표 1에 설계된 조건 1 내지 3에 따라 단위 약물복합체를 단독 또는 표적 경쟁 물질과 함께 처리한 후, 2 시간 동안 37 °C 에서 세포와의 결합을 유도하였다. 반응 후에는 2 mL의 PBS buffer 로 3 번 세척을 진행하였고 4%의 paraformaldehyde을 이용하여 상온에서 1 시간 동안 배양 접시에 고정시켰다.

형광 이미지는 공초점 레이저 주사현미경 (confocal microscopy, Nikon A1 Rsi)를 이용하여 분석을 진행하였으며 Z-stack 분석은 NIS Elements Imaging software (version 5.01, NIKON)을 사용하여 분석하였다.

표 1에서 기재된 실험 조건에 따른 형광 영상 결과는 도 3a와 3b에 도시되어 있으며 도 3a에는 형광 영상 사진 이 도시되어 있고 도 3b에는 형광 영상 결과의 형광 강도에 따라 수치화된 그래프로 도시하였다. 먼저 각각의 약물복합체의 종양 세포 섭취능을 확인할 수 있는 단위 약물복합체 1 또는 2 각각을 단독으로 처리한 결과는 단위 약물복합체 각각의 형광 염료 파장을 읽을 수 있는 FITC 채널과 TRITC 채널에서 표적 세포에 각각의 단위 약물복합체가 섭취되어 있음을 보인다. 단위 약물복합체의 선택적 결합력을 확인하고자, 단위 약물복합체 1에 표적 경쟁물질을 처리한 결과에서는 FITC 채널에서 형광 시그널을 확인할 수 없었으며, 이로써 단위 약물복합체 1 이 표적 세포에 선택적으로 결합함을 알 수 있었다. 동일하게, 단위 약물복합체 2에 표적 경쟁물질을 처리한 결과에서도 TRITC 채널에서 형광 시그널이 확인되지 않아, 단위 약물복합체 2가 표적 세포에 선택적으로 결합함을 알 수 있었다.

한편, 본 발명의 대조군으로 표적 세포에 처리하기 전에 미리 단위 약물복합체 1과 2를 에탄올과 물 (v/v = 1 : 1)에 녹여 상온에서 40분 동안 결합 반응을 진행하여 후접합 표적인 약물복합체 1-2를 합성 및 분리한 후, 이를 세포에 처리하였고, 실험군으로는 후표적 접합을 위하여 표적 세포에 단위 약물복합체 1과 2를 순차적으로 처리 하였다. 이 후, 단위 약물복합체 각각의 형광 염료 파장을 읽을 수 있는 FITC 채널과 TRITC 채널 그리고 단위 약물복합체 간의 결합 시 파장을 읽을 수 있는 FRET 채널에서 형광 파장 분석을 진행하였다.

분석 결과는 도 3a와 3b에 도시된 바와 같은데, 후접합 표적인 약물복합체 1-2의 경우, FRET 채널의 결과에서 형광의 세기가 상당히 낮게 측정된 반면, 단위 약물복합체 1을 투여한 후 단위 약물복합체 2를 순차적으로 투여 한 경우 (즉, 후표적 접합)에서는 약물복합체 1-2를 처리한 경우 (즉, 후접합 표적)보다 보다 형광 세기가 4배 이상 강한 것으로 확인되어 단위 약물복합체의 세포 내 유입은 서로 상호작용 할 수 있는 단위 약물복합체 각각 을 순차적으로 투여하는 경우 화합물의 세포내재화 효과가 현저히 개선될 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 형광 이미지를 3차원적으로 분석할 수 있는 Z-stack 분석을 통하여 단위 약물복합체를 순차적으로 처리한 후표적 접합 결과에서 단위 약물복합체가 세포 안인 세포질에 분포하고 있음을 확인하였다 (도 3c).

위의 실험 조건과 동일하게 표 1의 실험예 2에 따라 실험한 결과는 도 3b의 하단에 나타난 바와 같으며, 이는 실험예 1에서도 거의 유사한 결과를 확인한 바, 이는 본 발명에 따라 단위 약물복합체 각각을 순차적으로 투여 하는 경우 (즉, 후표적 접합)에서 화합물의 세포내재화 효과가 현저히 개선될 수 있음을 한번 더 확인할 수 있었다.

- [0329] 본 발명에서 단위 약물복합체를 순차적으로 세포 내로 유입시킴으로써 세포 내재화 효과를 극대화시키는 원리는 약물 복합체에 포함되는 약물을 서로 다른 종류로 적용 가능하다. 이 경우, 다양한 약물을 함께 투여하여야 하는 병용 치료 요법에 특히 유리하고, 주요 병증과 합병증 치료에 사용하는 각각의 약물을 함께 처리하며 세포 내 유입을 증가시킬 수 있어 다목적 치료에도 적용할 수 있다.
- [0331] **실시예 4. 단위 약물복합체의 표적 세포 결합능, 안정성 및 체내 세포 내재화 효능 검증**
- [0333] **4-1. 안정성 실험**
- [0334] 본 실험에 사용된 단위 약물복합체는 방사성 동위원소인 아이오딘이 표지된 단위 약물복합체 5와 방사성 동위원소가 표지되지 않은 단위 약물복합체 6 그리고 단위 약물복합체 5와 6을 결합 시킨 약물복합체 5-6이다.
- [0335] 단위 약물복합체 5과 약물복합체 5-6의 안정성 실험을 Radio-TLC를 이용하여 측정하였다. 사람의 혈액으로부터 3500 rpm에서 5 분간 원심분리 하여 얻은 혈청을 사용하였다. 방사성동위원소가 표지된 상기 화합물 단위 약물복합체 5과 약물복합체 5-6 (3.7 MBq)를 0.5 mL의 혈청에 처리하였다. 처리 후 4 시간 동안 10 분, 30 분, 60 분, 120 분, 240 분의 5 개의 시간 포인트에서 Radio-TLC (Bioscan) 를 이용하여 안정성을 측정한 결과 두 약물복합체 모두 4 시간 동안 90% 이상 안정한 것으로 나타나, 이후 체내 결합 실험에 이용 가능함을 확인하였다 (결과 미도시).
- [0337] **4-2. 표적 세포 결합능**
- [0338] 본 실험에 사용된 단위 약물복합체는 비방사성 아이오딘을 도입한 단위 약물복합체 7과 단위 약물복합체 6와 7을 결합 시킨 약물복합체 6-7이다.
- [0339] 단위 약물복합체 7과 약물복합체 6-7의 표적 세포 결합능은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 가 높게 발현되는 것으로 알려진 U-87MG 세포 (한국세포주은행) 를 이용하여 진행하였다. 상기 세포에 대한 경쟁적 저해제로 알려진 ^{125}I -c(RGDyV) (0.037 MBq)를 처리하고 단위 약물복합체 7과 약물복합체 6-7 각각을 농도별 (0 ~ 5 nM) 로 처리하여 1 시간 동안 배양하였다. 이후 원심분리기로 세포를 침전시키고 PBS로 3회 세척하여 결합되지 않은 약물복합체를 제거한 후 감마카운터를 이용하여 방사선량을 측정하였다.
- [0340] 측정된 결과에서 각각 약물복합체의 결합력(IC_{50})은 단위 약물 복합체 7은 1.08 ± 0.08 nM, 약물복합체 6-7은 0.52 ± 0.12 nM 임을 확인하였다. 두 분자 모두 나노 몰라 (nM) 수준의 결합력을 보여 단위 약물복합체 7과 약물복합체 6-7이 표적 세포에 결합능이 우수한 것을 확인하였다.
- [0342] **4-3. 종양 모델 마우스에서 생체 분포 실험**
- [0343] 본 실험에 사용된 단위 약물복합체는 방사성 동위원소인 아이오딘이 표지된 단위 약물복합체 5와 방사성 동위원소가 표지되지 않은 단위 약물복합체 6 그리고 단위 약물복합체 5와 6을 결합 시킨 약물복합체 5-6이다.
- [0344] 본 실험에서는 선천적 흉선 결손 생쥐 (7 주령, BLAB/c nude mice, OrientBio, male)에 U-87MG 세포 1×10^7 를 PBS에 부유시켜 피하 주사한 뒤 약 2 주간의 성장기간을 거쳐 0.4 ~ 0.5 cc 크기의 종양형성 모델을 선별하여 사용하였다.
- [0345] 준비된 누드 마우스 종양 모델에 단위 약물복합체 5 (18.5 MBq)와 약물복합체 5-6 (18.5 MBq)을 꼬리 정맥으로 주입하고 (각각 n = 3), 10 분, 30 분, 1 시간, 2시간에서 장기 (혈액, 뇌, 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 위, 근육, 대퇴부, 소장, 대장, 갑상선, 종양)을 적출하여 감마 카운터 (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) 를 이용하여 방사선량을 측정한 결과이다.
- [0346] 그 결과는 도 4에 도시된 바와 같으며, 단위 약물복합체 5와 약물복합체 5-6 모두 종양에서 15분 만에 높은 섭취를 보여주지만 2 시간 안에 종양에서 50% 이상이 배출되는 것으로 확인되었고 이는 주로 신장을 통해서 배출되며, 그 외에 다른 장기에서의 섭취는 높지 않음을 확인하였다.
- [0348] **4-4. 종양 모델 마우스에서 단위 약물복합체 투여양에 따른 종양 세포 내 머무름 증진 비교**
- [0349] 실시예 4-3에 기재된 바와 동일하게, 선천적 흉선 결손 생쥐 (7 주령, BLAB/c nude mice, OrientBio, male)에 U-87MG 세포 1×10^7 를 PBS에 부유시켜 피하 주사한 뒤 약 2 주간의 성장 기간을 거쳐 0.4 ~ 0.5 cc 크기의 종양형성 모델을 선별하여 실험에 사용하였다. 생체 내 영상 실험은 SPECT/CT (NanoSPECT/CT, Bioscan Inc.,

Washington DC)을 사용하여 영상을 촬영하였다.

[0350] 단위 약물복합체 5와 6, 약물복합체 5-6을 실험에 사용하였다. 대조군으로 약물복합체 5-6 (18.5 MBq)을 주사한 조건 ($n = 3$) 또는 단위 약물복합체 5(18.5 MBq)를 주사한 조건 ($n = 3$)과, 실험군으로 단위 약물복합체 5 (18.5 MBq)를 주사하고 15 분 후에 단위 약물 복합체 6의 투여량을 각각 18 mg/kg, 1.8 mg/kg, 0.18 mg/kg 로 주사한 조건 (각, $n = 3$)과 같이 총 5 가지 조건에서 실험을 진행하였고, 단위 약물복합체 투여 (순차적 투여의 경우는 최초 투여) 하고 2시간 경과 후 영상 촬영을 진행하였다.

[0351] 그 결과는 도 5에서와 같은데, 대조군인 약물복합체 5-6과 단위 약물복합체 5는 2 시간 동안 종양섭취가 절반 이하로 감소 하는 반면, 실험군인 단위 약물복합체 5와 6을 순차적으로 처리한 경우, 단위 약물 복합체 6의 투여양에 상관 없이 2 시간 동안 종양섭취가 60% 이상 남아있음을 확인했다. 특히, 가장 적은 양인 0.18mg/kg의 단위 약물 복합체 6을 순차적으로 처리한 경우에는 2 시간까지 95% 이상의 종양섭취가 유지되어 종양의 머무름 효과가 가장 두드러지게 나타났다.

[0352]

[0353] 4-5. 종양 모델 마우스에서 24 시간 동안 종양 세포 내 머무름 증진 효과 비교

[0354] 실시예 4-4에서 단위 약물복합체의 순차적 처리에 따른 짧은 시간 동안의 종양 내 머무름 증진 효과를 확인한 바, 이를 좀 더 긴 시간동안 관찰하고자 하였다. 이를 위하여 실시예 4-3에 기술된 종양 모델을 동일하게 제작 하고 단위 약물복합체 5 (18.5 MBq)를 U-87MG 세포가 주입된 누드 마우스 종양 모델의 꼬리 정맥에 투여하는 경우 ($n = 3$)와 단위 약물복합체 5 (18.5 MBq)와 단위 약물복합체 6 (0.18 mg/kg)을 15분 간격으로 순차적으로 투여하는 경우 ($n = 3$), 각각에 대하여 1시간 2시간, 4시간, 24 시간에서 종양 내 섭취량 유지 효과 및 반감기를 영상 촬영으로 비교하였다. 또한 단위 약물복합체 투여 후 10분과 24 시간에 종양을 적출하여 ex vivo에서도 종양 세포 내 머무름 증진 효과를 확인했다.

[0355] 그 결과, 도 6에서와 같이 단위 약물복합체 5를 단독으로 투여하는 경우는 4시간 이내에 이들의 초기 섭취량의 절반 이하로 감소하는 것으로 나타났으나, 단위 약물복합체 5와 6을 순차적으로 투여한 경우 종양 내 섭취는 24 시간까지 초기 섭취량의 약 60%를 유지하는 것으로 나타났다. 단위 약물복합체 5를 단독으로 투여하는 경우 반감기가 80.7분인데 반하여, 단위 약물복합체 5와 6을 순차적으로 투여하는 경우의 반감기가 213.4분으로 나타나, 순차적 투여의 경우 반감기가 3배 이상 높은 것으로 확인되었다.

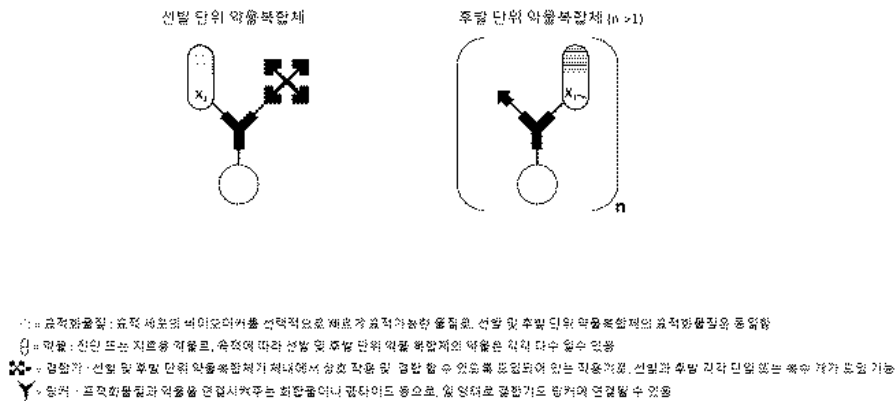
[0356] 한편, 약물복합체 투여 후 10분과 24 시간에 종양을 적출하여 확인한 결과에서도, 단위 약물복합체 5 (18.5 MBq, $n = 3$)를 단독으로 투여하는 경우 종양 내 섭취가 10% 유지되는 것에 비해 단위 약물복합체 5 (18.5 MBq, $n = 3$)와 단위 약물복합체 6 (0.18 mg/kg)을 순차적으로 투여한 경우, 24시간까지 초기 섭취량의 약 50% 이상을 유지하는 것이 확인되었다.

[0357] 상기 결과를 종합하면, 본 발명에 따른 약물 복합체는 종양 세포로의 세포 내재화 후 오랜 시간 동안 종양 세포에 작용할 수 있음을 알 수 있다.

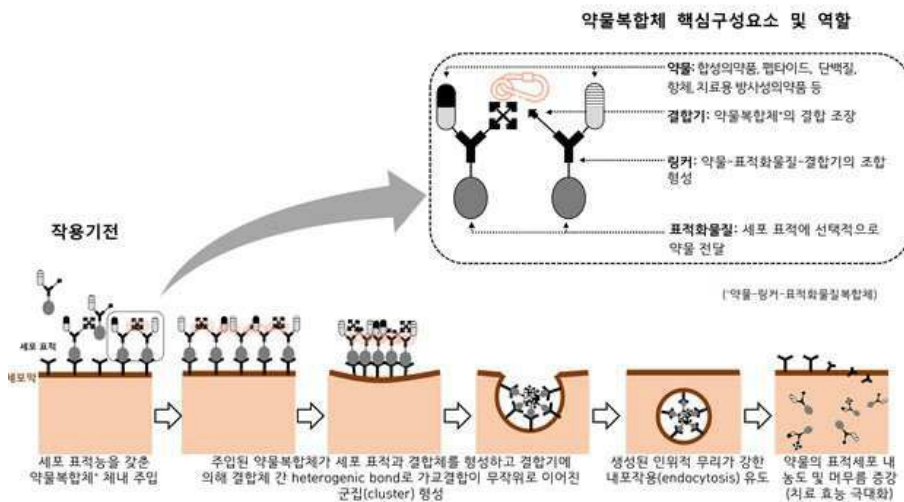
[0359] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 상세히 설명하였으나, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 자명하다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

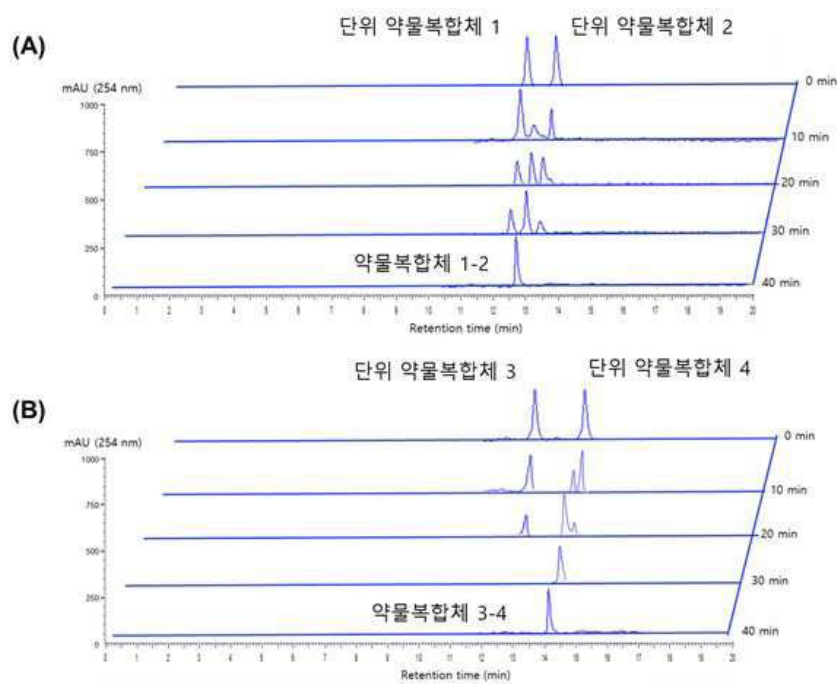
도면1a



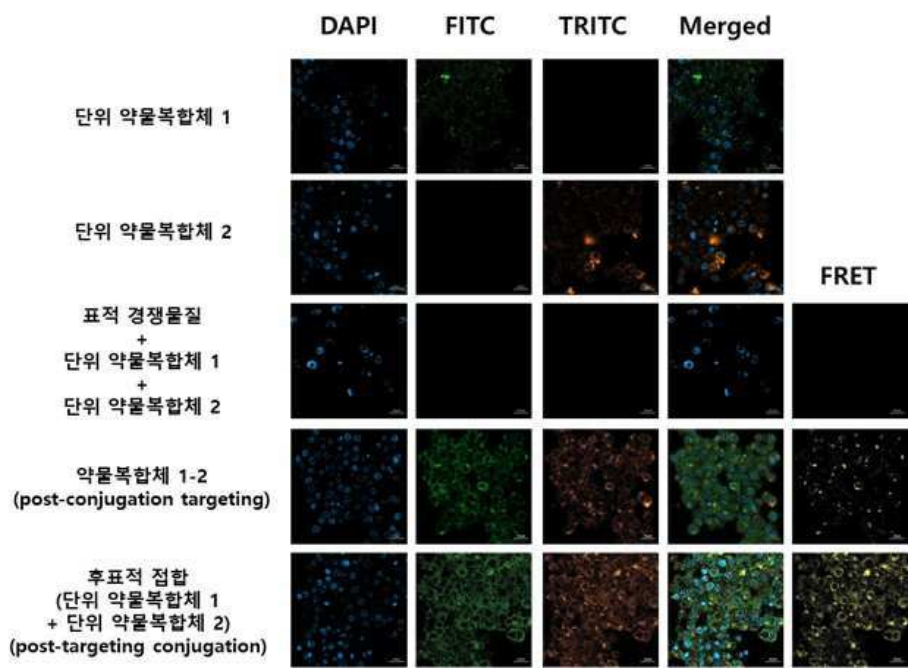
도면1b



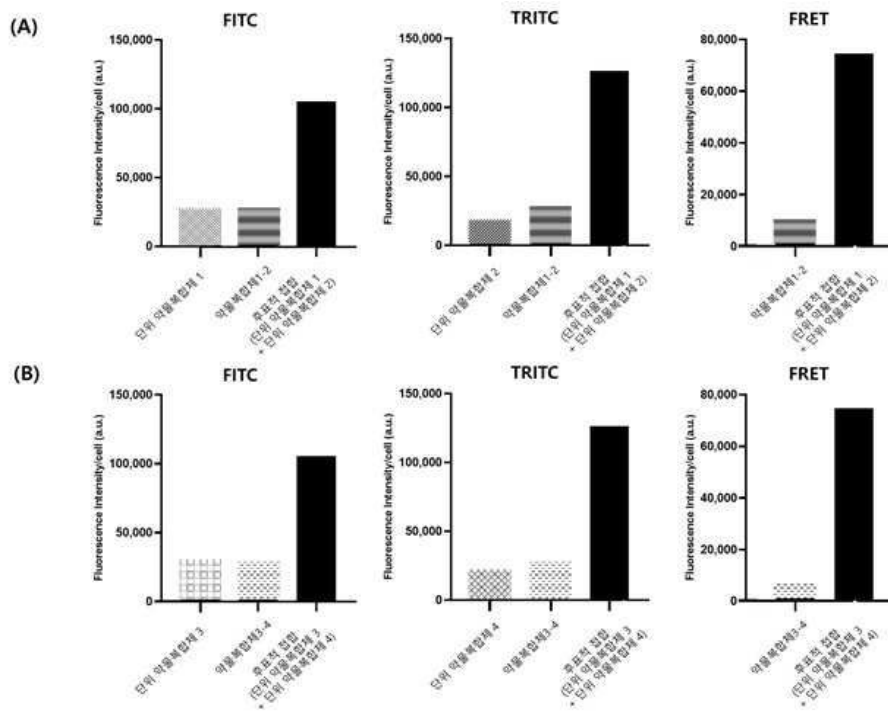
도면2



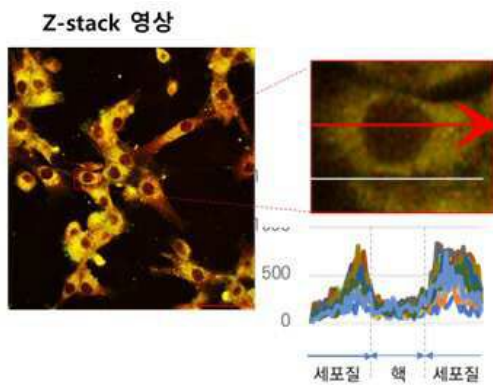
도면3a



도면3b

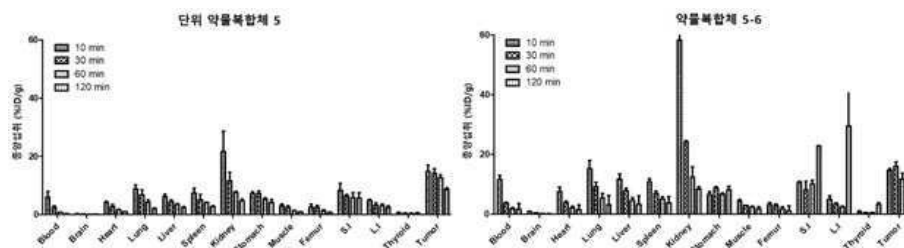


도면3c

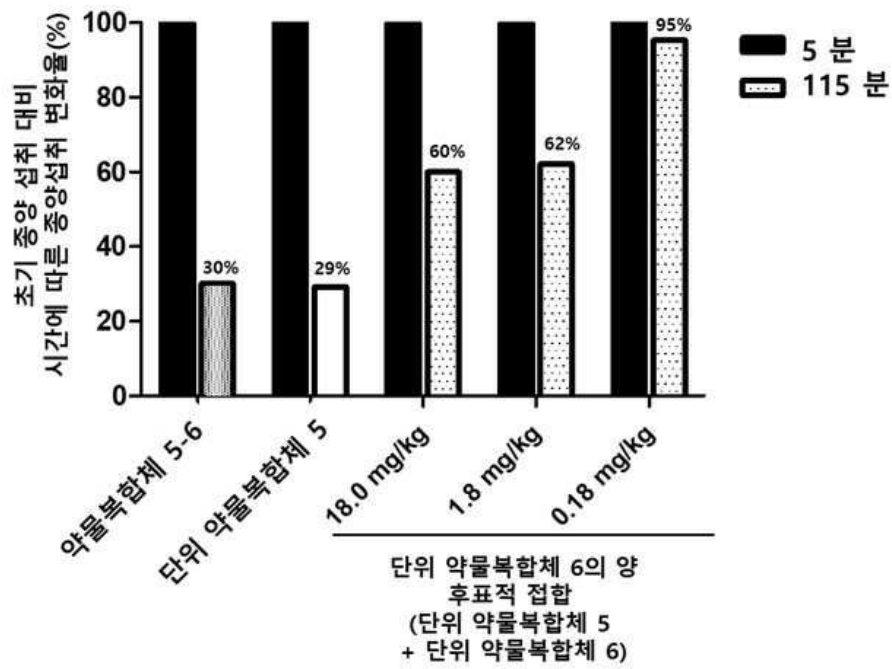


후표적 접합 (단위 약물복합체 1 + 단위 약물복합체 2)의 표적 세포 내(세포질)에 분포됨을 3D 이미징 및 분석

도면4



도면5



도면6

