

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0106197

(43) 공개일자 2021년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/68 (2017.01) A61K 31/519 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/6851 (2017.08)

A61K 31/519 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0021066

(22) 출원일자 2020년02월20일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정진현

경기도 고양시 일산동구 정발산로 95, 803동 104호 (마두동, 정발마을8단지청구빌라)

고윤우

서울특별시 종로구 송월길 99, 205동 1904호 (홍파동, 경희궁자이 2단지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

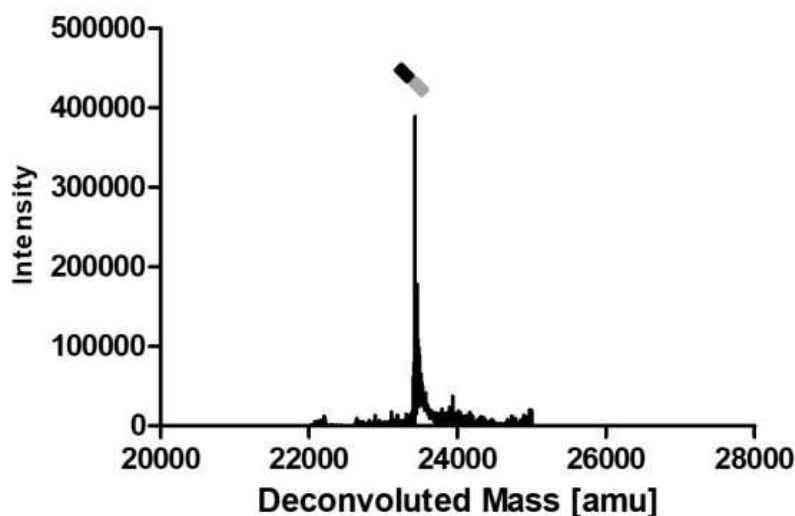
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 EGFR과 Her2 발현 암세포를 타겟으로 하는 항체-약물 중합체 개발

(57) 요약

본 발명은 Growth factor receptor인 EGFR와 Her2를 타겟으로 항체 의약품인 Cetuximab과 Trastuzumab에 각각 anti-cancer drug을 중합(conjugation)하여, 항체의 선택성을 가진 항암제를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2863 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

김정동

경기도 부천시 신흥로276번길 15, 105동 1203호 (중동, 래미안부천중동)

최용성

서울특별시 용산구 백범로79길 69, 201호 (효창동)

김승환

경기도 수원시 권선구 삼천병마로1566번길 30-26, 403호 (오목천동, 청산그린빌라)

서희정

서울특별시 송파구 올림픽로4길 15, 9동 804호 (잠실동, 아시아선수촌아파트)

안현준

경기도 용인시 기흥구 동백1로 42, 113호 (중동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C0179020019

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 [withKHIDI](2세부) 맞춤형 중앙 제어를 위한 다중표적 항체-약물 플랫폼 개발(4/4년)(2016.04.01.~2019.03.31.)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

항암제; 및 EGFR 억제제 또는 Her2 억제제가 컨쥬게이션되어 있는 암 치료용 항체-약물 중합체(antibody-drug conjugate).

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 EGFR과 Her2 발현 암세포를 타겟으로 하는 암 치료용 항체-약물 중합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Growth factor receptor인 EGFR와 Her2를 타겟으로 항체 의약품인 Cetuximab과 Trastuzumab이 개발되어 있다. 이 두 항체에 anti-cancer drug을 중합(conjugation)하여, 항체의 선택성을 가진 항암제를 개발하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명의 목적은 EGFR과 Her2 발현 암 세포를 타겟으로 하는 암 치료용 항체-약물 중합체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0004] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0005] 항암제; 및 EGFR 억제제 또는 Her2 억제제가 컨쥬게이션되어 있는 암 치료용 항체-약물 중합체(conjugate)을 제공한다.

[0006] 본 발명에 있어서, 항암제는 세포 주기에 관여하는 CDK4/6과 oncogene인 Rb의 인산화를 막아 암의 성장을 억제함으로써 항암 작용을 할 수 있는 약물을 의미한다. 상기 항암제는 팔보시클립(palbociclib)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항암제는 EMT(epithelial mesenchymal transition)로 인한 저항성 획득을 억제할 수 있다.

[0007] 본 발명에 있어서, EGFR 억제제는 EGFR을 억제함으로써 암에 대해 항암 효과를 갖는 것으로 알려진 임의의 항암제를 의미하며, 단일클론항체 또는 티로신키나제 억제제가 있다. 단일클론항체로서 세툽시매파(Cetuximab), 마투주매파(Matuzumab), 파니투무매파(Panitumumab) 등이 있고, 티로신키나제 억제제로서 제피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, 상기 EGFR 억제제는 단일클론항체로서 세툽시매파일 수 있다.

[0008] 본 발명에 있어서, Her2 억제제는 트라스트주매파(trastuzumab)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0009] 상기 항암제; 및 EGFR 억제제 또는 Her2 억제제는 항체-약물 중합체의 형태로 존재할 수 있다.

[0010] 이에, 본 발명은 상기 항체-약물 중합체를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 약학 조성물은 항체-약물 결합체의 형태인 항암제; 및 EGFR 억제제 및/또는 Her2 억제제를 포함하는, 상기 약물의 동시 투여를 위한 형태일 수 있다.

[0012] 본 발명에서, "항체-약물 중합체(Antibody-drug conjugate, ADC)"는 본 발명의 단일클론항체와 약물이 연결된 접합체를 의미하며, 면역 접합체로도 불릴 수 있다. 상기 항체-약물 결합체는 당업계에서 공지된 다양한 방법을 이용하여 제조할 수 있다.

[0013] 본 발명에서, "단일클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하

고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

- [0014] 본 발명에서, "약물"은 본 발명의 항체에 결합하여 치료 항체 자체의 효율을 증가시키거나, 항체의 혈중 내의 반감기를 증가시킬 수 있거나, 항체가 표적으로 하는 위치에 도달하여, 상기 표적 내의 암 등을 사멸시켜서 질병의 치료에 사용할 수 있는 물질을 제한없이 포함하며, 본 발명에 있어서 항암제가 바람직하다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 필요에 따라 약물의 제조, 사용 및 판매를 관장하는 정부 기관에 의해 지시된 형태로 포장과 연계된 지시서가 수반될 수 있으며, 상기 지시서는 조성물의 형태 또는 인간이나 동물 투여에 관하여 상기 기관의 승인을 나타내고 있고, 예를 들어, 약물의 처방에 대하여 미국 식품의약국에서 승인된 표지일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0017] 본 명세서에서, "유효량"은 목적하는 치료되어야 할 특정 질환의 발병 또는 진행을 지연하거나 전적으로 중지시키는 데 필요한 양을 의미한다. 본 발명에서 조성물은 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 적절한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다.
- [0018] 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 Growth factor receptor인 EGFR와 Her2를 타겟으로 항체 의약품인 Cetuximab과 Trastuzumab에 각각 anti-cancer drug을 중합(conjugation)하여, 항체의 선택성을 가진 항암제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1a는 세톡시맵 경쇄의 mass 분석 결과이고, 도 1b는 세톡시맵 중쇄의 mass 분석 결과이다.
- 도 2a는 ADC(Cetuximab-Palbociclib) 경쇄의 mass 분석 결과이고, 도 2b는 ADC(Cetuximab-Palbociclib) 중쇄의 mass 분석 결과이다.
- 도 3은 EGFR 발현이 많다고 알려진 MCF-7 세포주에 ADC(Cetuximab-Palbociclib)의 세포 독성 실험(CCK8 assay) 결과이다.
- 도 4는 EGFR 발현이 많다고 알려진 PC-3 세포주에 ADC(Cetuximab-Palbociclib)의 세포 독성 실험(CCK8 assay) 결과이다.
- 도 5a는 트라스트주맵 경쇄의 mass 분석 결과이고, 도 1b는 트라스트주맵 중쇄의 mass 분석 결과이다.
- 도 6a는 ADC(Trastuzumab-Palbociclib) 경쇄의 mass 분석 결과이고, 도 6b는 ADC(Trastuzumab-Palbociclib) 중쇄의 mass 분석 결과이다.
- 도 7은 합성한 SMCC-Palbociclib의 구조를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실험에 및 제조예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실험에 및 제조예에 한정되는 것이 아니라, 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

- [0023] 제조예 1. 항체-약물 중합체 제조

[0024] 5 mg/ml의 항체(Cetuximab)에 TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)을 10eq (당량) 처리하여 환원 시켰다. 남은 TCEP의 제거와 중합 (conjugation) 반응을 위해 ultrafiltration (amicon tube 사용하여 3 번 반복)을 하여 Borate buffer (pH 8)로 buffer exchange 하였다. Buffer exchange 후 남은 항체의 농도에 맞춰 10eq의 SMCC-Palbociclib (DMF에 녹여져 있음, 하기 도면 참고)을 첨가하였다. 소수성인 SMCC-Palbociclib과 친수성인 항체의 분자가 서로 만나 반응하기 쉽도록 10% v/v으로 DMF를 첨가하였다. Voltexing 후 37℃에서 2 시간동안 반응시켰다. 반응 후 ultrafiltration을 3번 반복하여 PBS (phosphate buffered saline)로 buffer exchange를 수행하였다. 이는 반응 후 남아있는 SMCC-Palbociclib과 DMF를 최대한 제거해 주고 실험에 적합한 버퍼 내에 존재하게 하기 위함이다.

[0025] 참고로, 제조예 1에서 사용한 항체(세톡시맵)과 본 제조예 2에서 사용한 항체(트라스트주맵)의 constant region 은 동일한 sequence를 가진다.

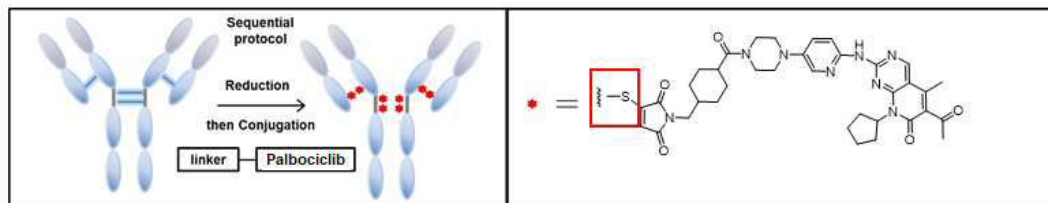
Cetuximab heavy chain
 QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYN
 TPFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAA
 STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSSTVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cetuximab light chain
 DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLIKYASESISGIPS
 RFGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0026]

[0027] 상기 서열에서 붉은 색의 시스테인(C)은 각각 다른 중쇄와 경쇄에 이황화 결합을 이루고 있으며, 이를 reduction(환원)시켜 -SH group으로 노출시킨 후 아래 도면과 같이 conjugation 시켰다.

SMCC linker - Palbociclib



[0028]

[0029] **실험예 1. 항체-약물 중합체의 특성 확인**

[0030] 1) 항체(세톡시맵) 및 항체-약물 중합체(세톡시맵-팔보시클립 중합체)의 Mass 분석

[0031] 항체와 항체-약물 중합체의 질량분석 결과를 도 1 및 2에 각각 나타내었다.

[0032] 2) 항체-약물 중합체의 암 세포에 대한 독성 확인(MCF-7 세포주)

[0033] Cetuximab과 conjugation 하여 만든 ADC의 암세포 독성 test 결과, Cetuximab에 비해 유의미하게 독성이 증가함을 확인하였다(도 3).

[0034] 3) 항체-약물 중합체의 암 세포에 대한 독성 확인(PC-3 세포주)

[0035] Cetuximab과 conjugation 하여 만든 ADC의 암세포 독성 test 결과, Cetuximab에 비해 유의미하게 독성이 증가함을 확인하였다(도 4).

[0037] **제조예 2. 항체-약물 중합체 제조**

[0038] 항체를 Trastuzumab으로 변경한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 항체-약물 중합체를 제조하였다.

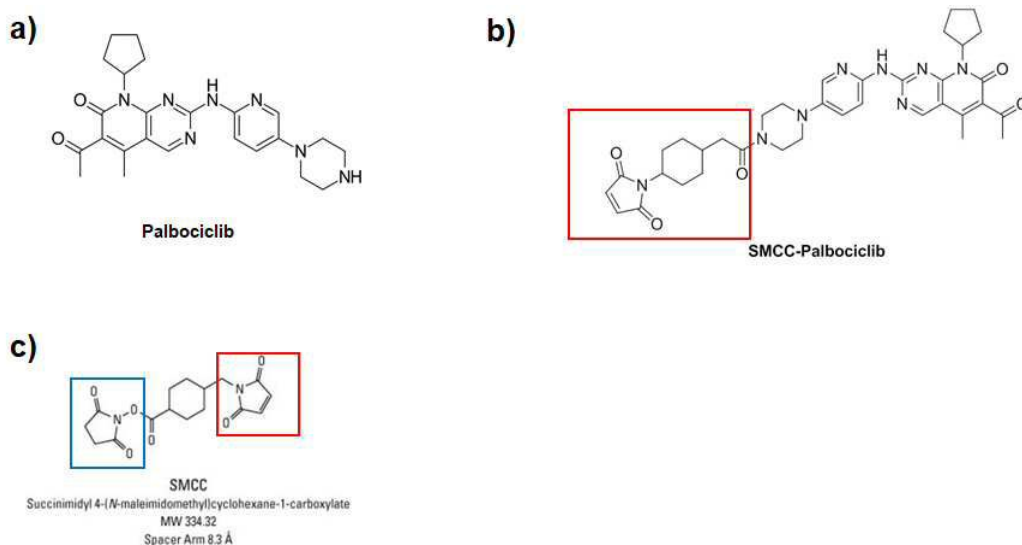
[0040] 실험예 2. 항체-약물 중합체의 특성 확인

[0041] 1) 항체(트라스투주맙) 및 항체-약물 중합체(트라스투주맙-팔보시클립 중합체)의 Mass 분석

[0042] 항체와 항체-약물 중합체의 질량분석 결과를 도 5 및 6에 각각 나타내었다.

[0044] 제조예 3. SMCC-Palbociclib 합성

[0045] SMCC-Palbociclib을 아래와 같이 합성하였다(도 7).



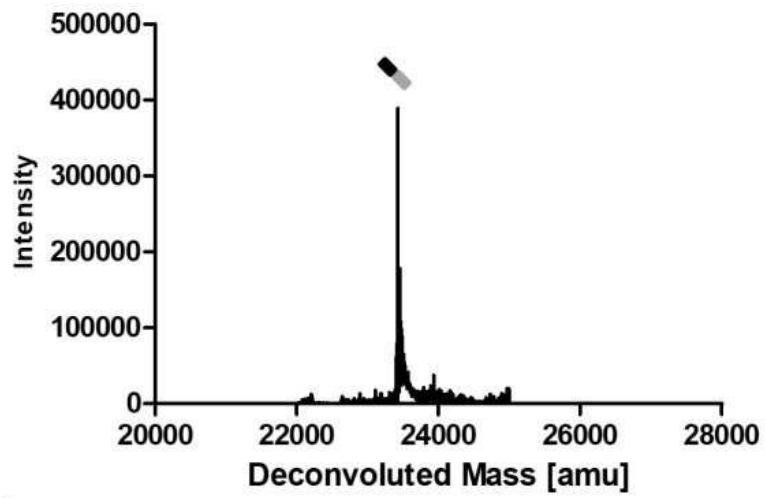
[0046] a) Palbociclib의 구조는 항체의 -SH group과 결합하기 힘든 구조이다. 이에, c)의 SMCC liner를 사용하여 SMCC의 한 쪽은 Palbociclib과 다른 한 쪽은 항체와 결합하기 위한 Linker로서 사용하기 위함이다. Maleimide (빨간 박스)는 항체와, Succinimide(파란 박스)는 Palbociclib과 결합시켰다.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.85 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.22 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.35 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 6.71 (s, 2H), 5.92 – 5.84 (m, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.40 (s, 1H), 3.39 (s, 1H), 3.17 (s, 2H), 3.14 (s, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.52 – 2.42 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.37 – 2.30 (m, 2H), 2.13 – 2.01 (m, 2H), 1.94 – 1.84 (m, 2H), 1.84 – 1.76 (m, 4H), 1.76 – 1.72 (m, 1H), 1.72 – 1.65 (m, 2H), 1.63 – 1.52 (m, 2H), 1.11 – 0.99 (m, 2H).

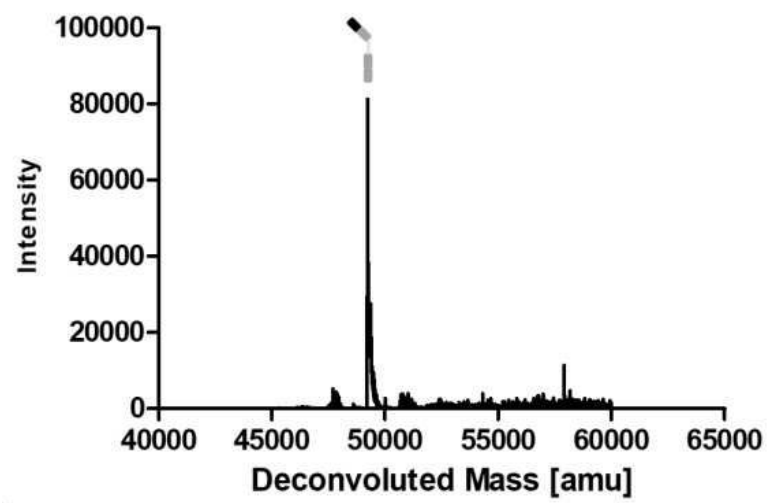
[0048]

도면

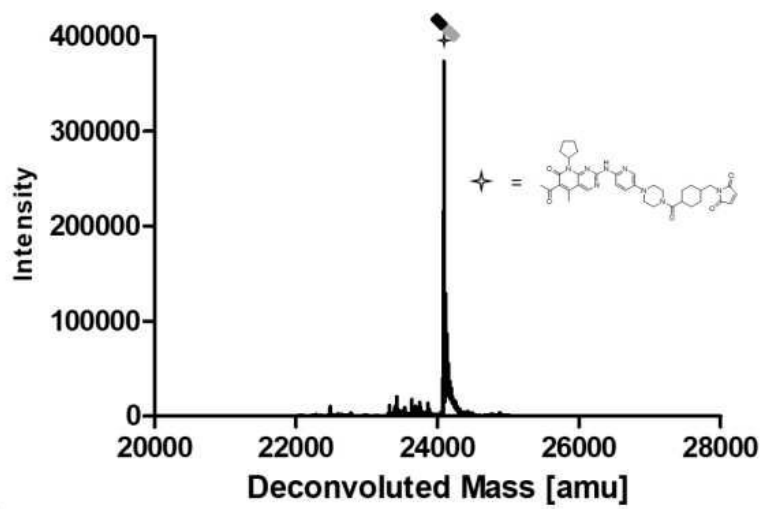
도면1a



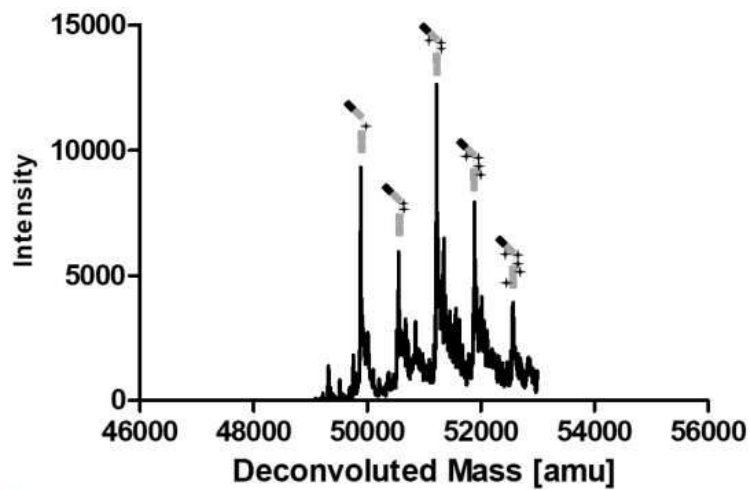
도면1b



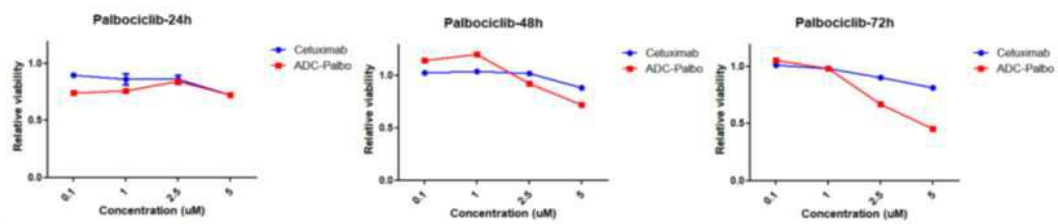
도면2a



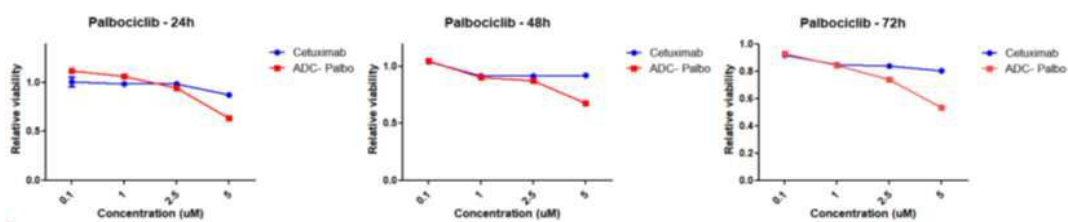
도면2b



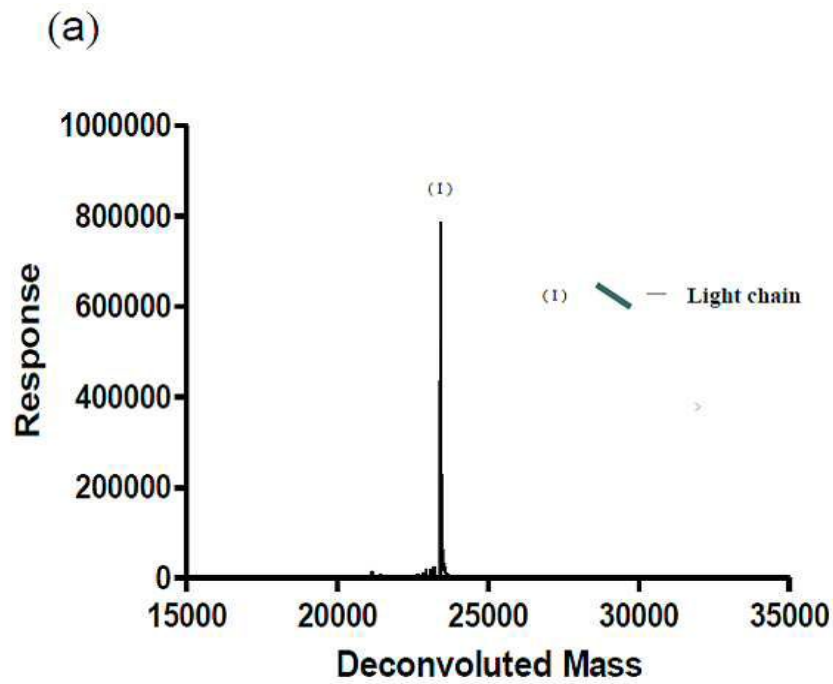
도면3



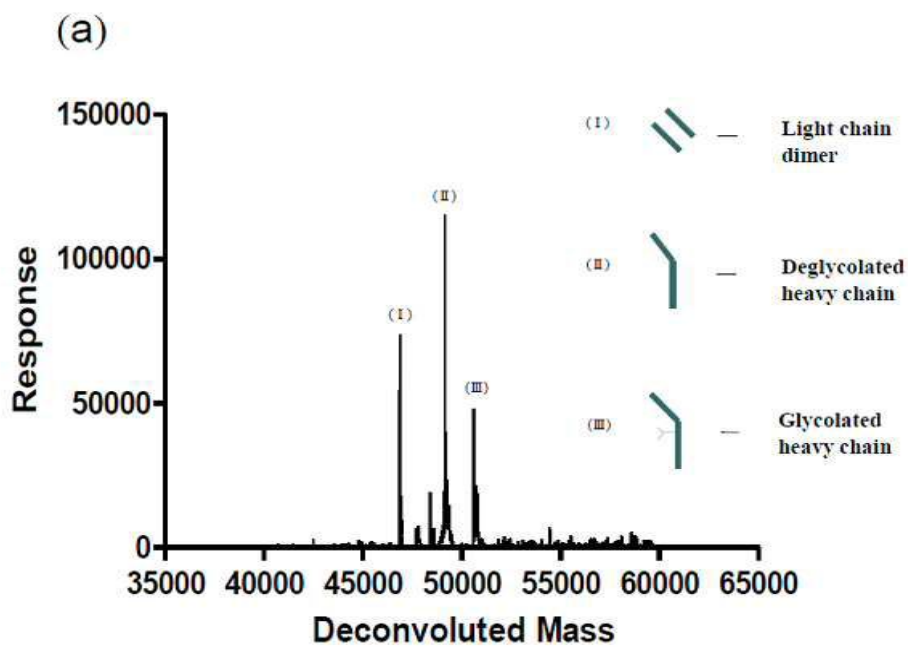
도면4



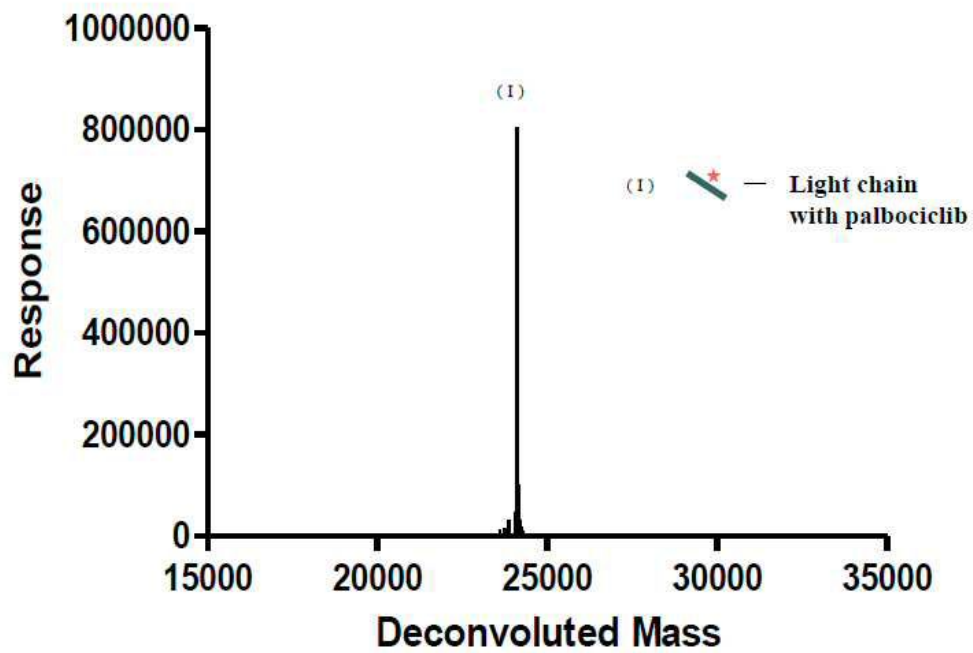
도면5a



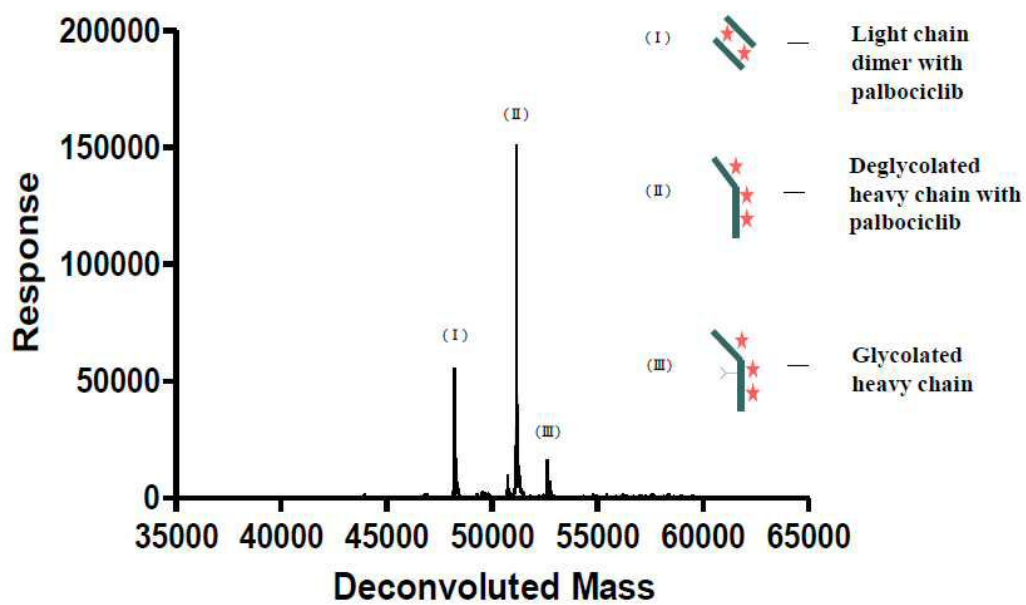
도면5b



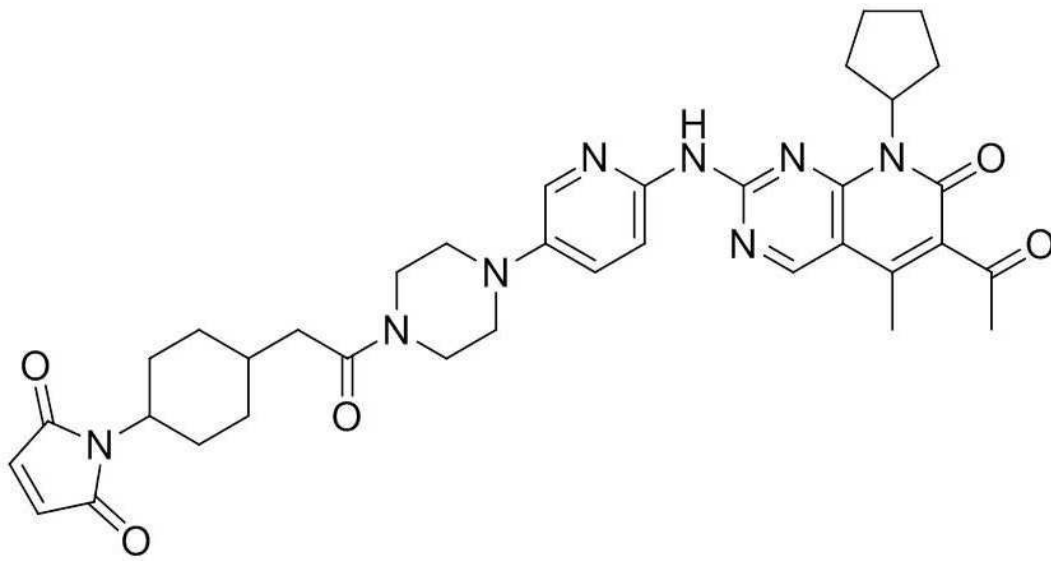
도면6a



도면6b



도면7



SMCC-Palbociclib