



(51) 국제특허분류:

A61K 38/08 (2006.01) A61K 51/00 (2006.01)
A61K 31/7042 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/001438

(22) 국제출원일: 2011년 3월 2일 (02.03.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국 과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1, 136-791 Seoul (KR).

(72) 발명자: 권

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 류주희 (RYU, Ju-Hee) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 상월곡동 동아아파트 102 동 1004 호, 136-784 Seoul (KR). 김광명 (KIM, Kwang-Meyung) [KR/KR]; 서울특별시 구로구 개봉 2 동 현대아파트 121 동 2201 호, 152-755 Seoul (KR). 권

익찬 (KWON, Ick-Chan) [KR/KR]; 서울특별시 노원구 중계동 신안아파트 101 동 306 호, 139-220 Seoul (KR). 최귀원 (CHOI, Kui-Won) [KR/KR]; 서울특별시 동대문구 회기동 신현대아파트 1 동 504 호, 130-792 Seoul (KR). 김상윤 (KIM, Sang-Yoon) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 잠실동 40 번지 갤러리아 팰리스 B 동 3002 호, 138-220 Seoul (KR). 이범석 (LEE, Beom-Suk) [KR/KR]; 서울특별시 중구 신당 6 동 현대아파트 3 동 702 호, 100-781 Seoul (KR). 지대윤 (CHI, Dae-Yoon) [KR/KR]; 서울특별시 용산구 이촌동 한가람아파트 215 동 804 호, 140-030 Seoul (KR). 김희섭 (KIL, Hee-Seup) [KR/KR]; 서울특별시 성동구 행당 2 동 한진타운아파트 104 동 305 호, 133-777 Seoul (KR). 성현주 (SUNG, Hyun-Ju) [KR/KR]; 서울특별시 광진구 구의 2 동 47-21 해성아파트 102 호, 143-817 Seoul (KR).

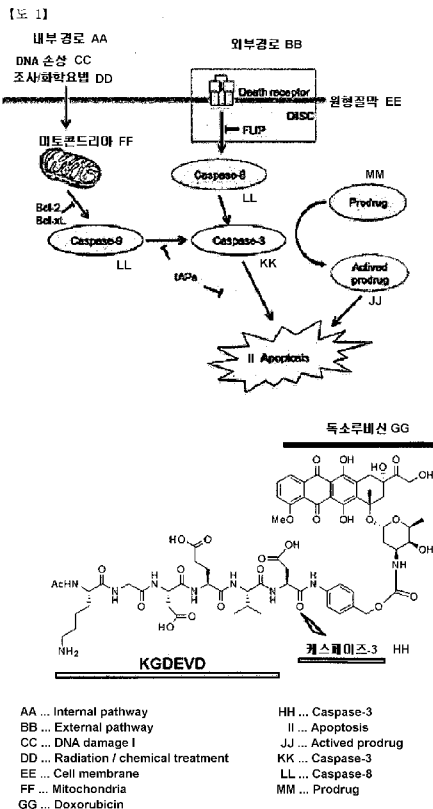
(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT & LAW FIRM); 서울특별시 강남구 역삼동 649-10 서림빌딩, 135-080 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTI-CANCER PRODRUG ACTIVATED BY RADIATION OR ULTRAVIOLET THERAPY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 방사선 또는 자외선 조사에 의해 활성화되는 항암제 전구체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an anti-cancer prodrug comprising a peptide having acetyl-sequence No. 1, a linker, and an anti-cancer prodrug. The anti-cancer drug effectively provides, as a prodrug, an anti-cancer drug with an unstable acid-base relationship like doxorubicin, and thus exists as a non-toxic anti-cancer prodrug in an inactive state when administered into the body but effectively releases the anti-cancer drug as an active ingredient from the target area under the presence of caspase activated by radiation or UV treatment after administered. Accordingly, the anti-cancer drug displays selective anti-cancer effects on cancer cells and as such, the effectiveness of the treatment is maximized and the adverse effects of the cancer treatment are minimized.

(57) 요약서: 본 발명은 아세틸-서열번호 1의 펩타이드-링커-항암제로 구성되는 항암제 전구체에 관한 것으로, 상기 항암제 전구체는 독소루비신과 같이 산과 염기에 불안정한 항암제를 효과적으로 전구체로 제공함으로써 체내 투여 시에는 비활성 상태의 항암제 전구체로 독성이 없는 상태로 존재하지만, 체내 투여 후 방사선 치료나 UV 치료 후 활성화되는 케스페이즈 존재 하에서 활성성분인 항암제가 표적부위에서 효과적으로 방출되므로 암세포에만 선택적으로 항암효과를 나타낼 수 있어 치료효과의 극대화 및 항암 치료의 부작용을 최소화할 수 있다.



AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

방사선 또는 자외선 조사에 의해 활성화되는 항암제 전구체 및 이의 용도

5 【기술분야】

본 발명은 방사선 또는 UV 조사에 의해 생체 내에서 활성화되는 케스페이즈에 의해 절단되어 활성성분인 항암제를 방출할 수 있는 항암제 전구체, 이의 제조방법, 및 이의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

10 암은 현재 국내에서 사망원인 1 위를 차지하는 질병으로서, 향후 환경문제, 수명의 연장, 식생활의 서구화 등으로 암환자 발생은 더욱 증가할 것이다. 암 치료에 있어서 흔히 사용하는 방법은 기존의 항암치료제를 방사선 치료법 (radiotherapy)과 함께 사용하는 것이다.

많은 항암치료제와 방사선 치료는 암 세포의 세포사멸(cell
15 apoptosis)을 유도하여 암을 치료하는 원리에 기반을 두고 있다. 또한 방사선 치료법에 기존의 화학요법에 사용되던 항암치료제를 병행하여 사용하면 보다 증가된 치료효과를 얻을 수 있다.

그러나 기존의 항암치료 및 방사선 치료요법은 암세포의 성장억제 및 사멸에 효과가 우수할지라도 높은 항암제 투여량 및 방사선 조사량에
20 기인하여 암조직 뿐 아니라 정상세포에도 높은 독성을 나타내어 심각한 부작용을 야기하는 문제점을 갖고 있다.

이에 최근 새롭게 부각되어 개발되고 있는 분야가 표적 항암
치료제(target therapies)로서 이는 기존의 화학요법제, 호르몬요법제와 다른
작용 메커니즘을 갖는 약물로, 정상세포에는 작용하지 않고 종양세포의
25 세포성장 신호전달, 수용체 및 유전적 변이를 표적으로 하므로 약물의
효능을 증가시키고, 독성을 최소화할 수 있는 최적의 항암치료제이다.

따라서, 정상세포의 피해를 최소화 할 수 있는 표적 항암 치료제를 개발하여 이용한다면 기존 항암제 치료 또는 방사선 치료 효과를 획기적으로 증진할 수 있다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 생체 내, 외에서 제공될 때에는 활성성분의 전구체 형태로 전혀 독성이 없으며, 치료 목적으로 방사선 또는 UV 가 생체 내 표적 부위에서 노출되었을 때 노출된 부위에서만 케스페이즈가 활성화되어 전구체가 절단되어 활성성분을 방출할 수 있는 항암제 전구체를 개발하고자 하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 전구체 형태에서는 독성이 없으나 방사선 치료나 UV 치료로 생체 내에서 케스페이즈를 활성화시킨 후 이러한 케스페이즈에 의해 전구체가 절단되어 활성성분인 항암제를 방출할 수 있는 아세틸-서열번호 1 의 펩타이드-링커-항암제로 구성되는 항암제 전구체를 제공하는 데에 있다.

【과제의 해결 수단】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포사멸(apoptosis)을 유발하는 펩타이드에 항암제를 결합시켜 항암제 전구체를 제조하고, 상기 펩타이드는 케스페이즈 절단부위를 포함하므로, 이에 의해 절단되어 활성성분인 항암제를 국소적으로 방출하여 항암제의 약효를 발휘하고자 하는 것을 목적으로 한다.

구체적으로, 본 발명은 또한 순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하며, 상기 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드는 활성 케스페이즈(caspase)에 의해 절단되는 것인, 전구약물(prodrug)조성물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하는 전구약물(prodrug)을 제조하는 방법으로서,

아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드에서 아스파르트산(Asp) 또는 글루탐산의 결사슬의 카르복시기의 수소는 알릴기(allyl group)으로 치환되고, 라이신(Lys) 결사슬의 아미노기의 수소는

알릴옥시카르보닐기(allyloxycarbony)로 치환된 변형 펩타이드(modified peptide)를 제조하고,

상기 변형 펩타이드의 C-말단에 링크를 연결하고,

상기 링크에 항암제를 화학적으로 결합시키고,

- 5 상기 변형 펩타이드의 알릴기 및 알릴옥시카르보닐기를 탈보호시키는 단계를 포함하는, 전구약물의 제조방법을 제공한다.

본 발명은 또한 순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하며, 상기 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드는 케스페이즈(caspase)에 의해 절단되는 전구약물 prodrug)조성물;

- 10 및 상기 전구약물 투여 대상에 방사선 또는 자외선을 조사하여, 종양세포에서 케스페이즈 활성화를 유도하는 방사선 또는 자외선 조사장치를 포함하는, 항암치료용 키트를 제공한다.

또한 본 발명은 순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하며, 상기 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드는 활성 케스페이즈(caspase)에 의해 절단되는 것인, 전구약물(prodrug)조성물을 상기 항암 치료가 필요한 대상에 투여하고, 상기 전구약물의 투여 대상에 방사선 또는 자외선을 조사하여, 종양세포에서 케스페이즈 활성화를 유도하는 방사선 또는 자외선 조사장치를 포함하는 부위 특이적 항암치료방법을 제공한다.

- 20 이하에서, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

본 발명은 아세틸-서열번호 1 의 펩타이드(KGDEV D)-링커-항암제로 구성되는 항암제 전구체를 제공한다.

- 본 발명에 따른 항암제 전구체는 케스페이즈 특히 케스페이즈-3 이 서열번호 1(KGDEV D)의 펩타이드 중 DEV D 아미노산 서열을 인식한 후, DEV D 아미노산 서열 부위를 절단시켜 활성성분인 항암제가 표적부위에서 방출할 수 있도록 제공된다.

본 발명에서 사용되는 링커는 파라 아미노벤질옥시카르보닐, 아미노에틸-N-메틸카르보닐, 아미노바이페닐메틸옥시카르보닐, 덴드리틱 링커 및 세파로스포린을 기반으로 한 링커로 이루어진 군에서 선택된 어느

하나일 수 있고, 바람직하게는 파라 아미노벤질옥시카르보닐을 사용할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 항암제는 독소루비신, 파클리탁셀, 아드리아마이신, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 마이토마이신, 클로모마이신, 5 블레오마이신, 폐플로마이신, 다우노루비신, 아클라루비신, 네오키치노스타틴, 에피루비신, 이다루비신 및 피라루비신으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 독소루비신을 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 항암제 전구체는 아세틸-서열번호 1 의 펩타이드-파라 아미노벤질옥시카르보닐-독소루비신으로 구성되는 것이 보다 바람직하다.

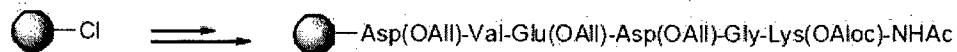
본 발명의 또 다른 구체예는, 순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하는 전구약물(prodrug)을 제조하는 방법으로서,

15 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드에서 아스파르트산(Asp) 또는 글루탐산의 결사슬의 카르복시기의 수소는 알릴기(allyl group)으로 치환되고, 라이신(Lys) 결사슬의 아미노기의 수소는 알릴옥시카르보닐기(allyloxycarbony)로 치환된 변형 펩타이드(modified peptide)를 제조하고,

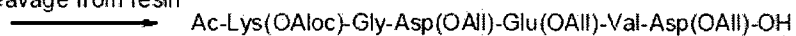
20 상기 변형 펩타이드의 C-말단에 링크를 연결하고, 상기 링크에 항암제를 화학적으로 결합시키고, 상기 변형 펩타이드의 알릴기 및 알릴옥시카르보닐기를 탈보호시키는 단계를 포함하는, 전구약물의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명자들은 독소루비신과 같은 산과 염기에 불안정한 항암제는 25 처음에는 산과 염기성 물질로 보호기를 탈보호화하지 않는 조건에서 수소화 반응을 시도하였다. 그러나, 하기 반응식 1 에 기재한 바와 같이, 화합물 6 까지 제조한 상태에서 수소화 반응으로 독소루비신이 환원되는 결과를 얻었다. 하기 반응식 1 은 본 발명 외의 다른 방법에 의한 항암제 전구체 제조공정을 나타낸 것이다.

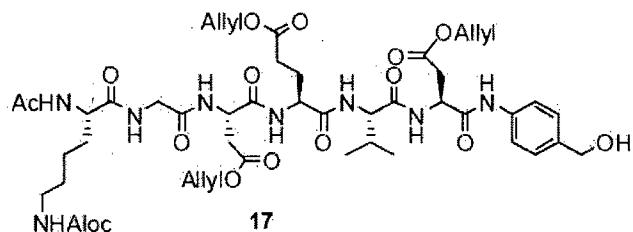
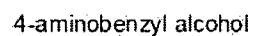
[반응식 1]



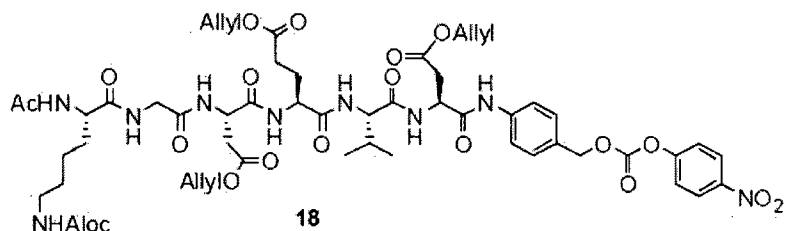
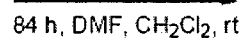
cleavage from resin



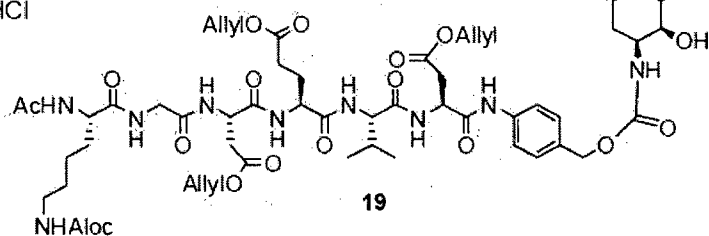
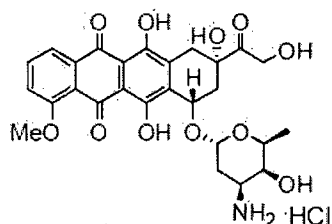
16



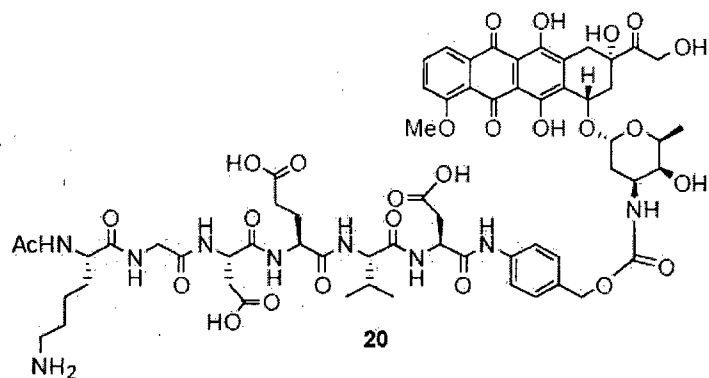
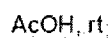
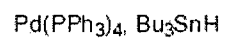
17



18



19



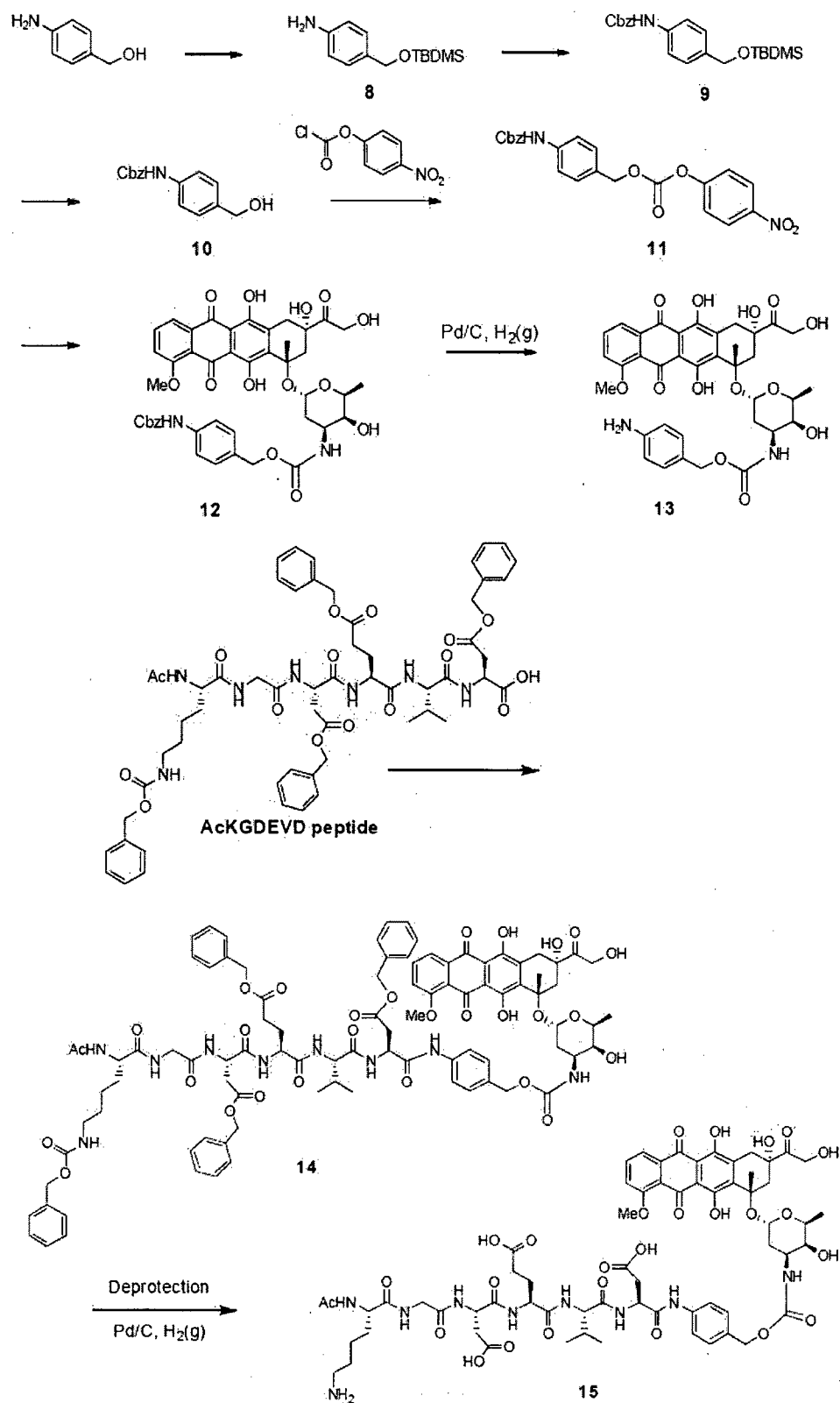
20

상기 반응식에서, 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), Dimethyl Formamide (DMF)이다. 그리고, 반응식 2 와 같이 카르보네이트 기를 미리 만들어 독소루비신과 먼저 반응 시키고 나중에 펩타이드와 커플링을 하여 전체 탈보호화 반응을 하려고
5 시도하였으나, 화합물 13 을 제조하기 위해 카르보벤질옥시(Carboxybenzyloxy; Cbz) 기를 탈보호화하는 과정에서 독소루비신이 분해되었다.

하기 반응식은 본 발명 외의 다른 방법에 의한 항암제 전구체 제조공정을 나타낸 것이다.

10

[반응식 2]

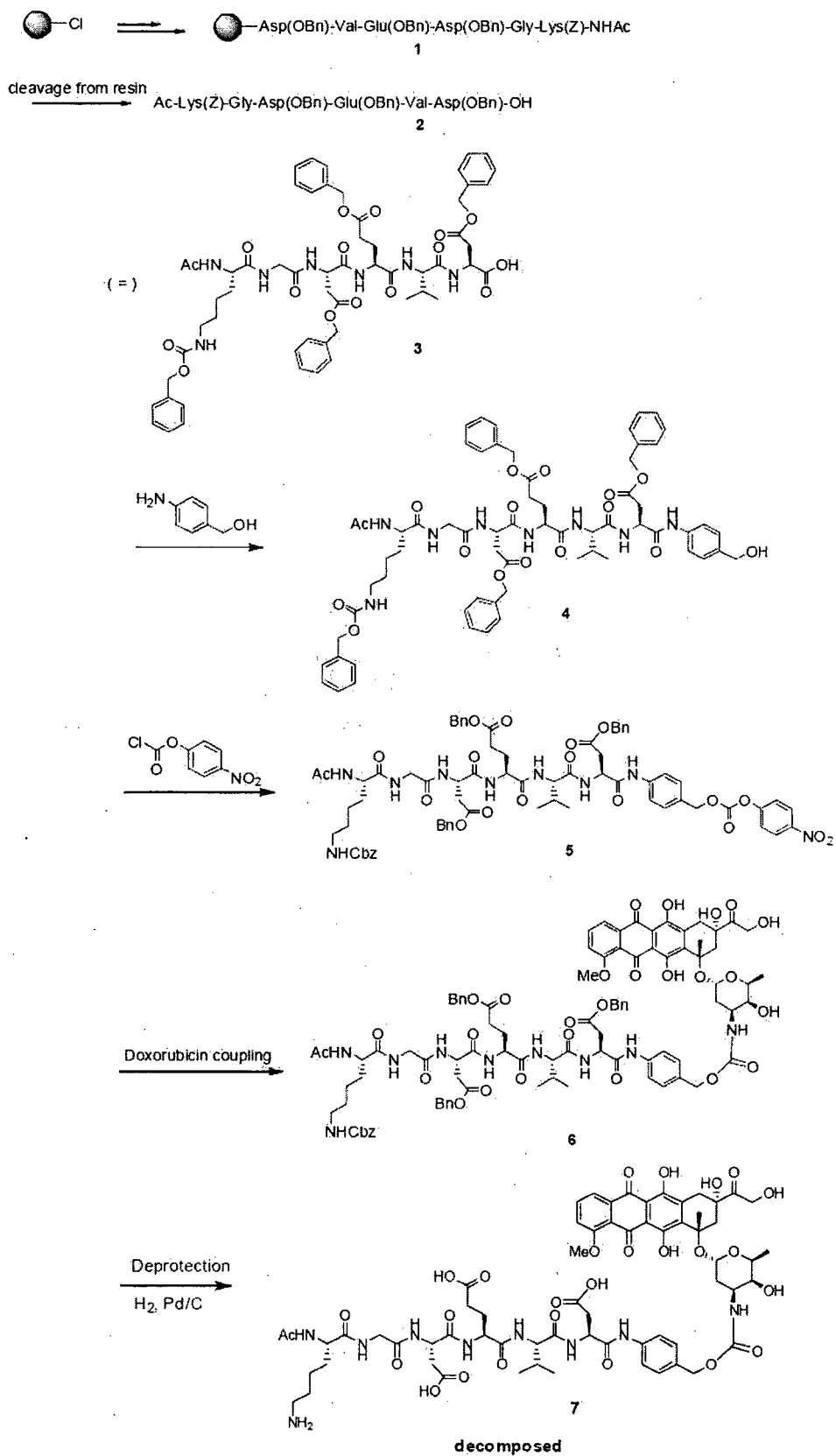


수소화 반응을 이용하지 않고 cbz 기를 제거하는 다른 방법인 Et₃SiH, PdCl₂ 를 사용하는 반응도 시도해 보았으나 문헌과 같이 환류 조건에서는 화합물이 안정하지 않아 상온에서 반응을 진행하였지만 원하는 화합물을 얻지 못하였으며, 또한 t-BuMe₂SiH, Pd(OAc)₂ 를 사용해서
5 상온에서 반응하는 방법도 시도해 보았으나 이 역시 반응이 진행되지 않음을 확인하였다.

한편, 본 발명자들은 펩타이드의 보호기를 변경시키는 방법을 고려해 다른 작용기를 건드리지 않는 비교적 안정한 조건으로 탈보호가 가능한 알릴(allyl)기와 알록(allyloxycarbonyl; alloc)기를 착안하게 되어 본 발명을
10 완성하였다.

본 발명의 항암제 전구체 제조의 구체적인 공정을 하기 반응식 3 에 도시하였으며, 이에 대한 자세한 설명을 기재하고자 한다. 하기 반응식 3 은 본 발명의 일실시예에 따른 항암제 전구체 제조공정을 나타낸 것이다.

[반응식 3]



본 발명에 따른 항암제 전구체의 제조를 위해, 상기 반응식 3 에 나타낸 바와 같이, 먼저 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-OH (16)을 제조하였다. 즉, 레진에 아미노산 붙이는 단계, 펩타이드를 합성하는 단계, 아민기를 아세틸화 하는 단계 및 레진으로부터

5 펩타이드를 이탈시키는 단계를 거쳐 화합물 16 을 제조하였다. 상기 화합물 16 에 실온에서 DMF(Dimethyl Fumarate) 존재 하에서 4-아미노벤질알코올 및 EEDQ (2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline)을 처리하여 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABOH (17)를 제조하였다. 상기 화합물 17 에 무수 염화에틸렌 존재

10 하에서 4-니트로페닐 클로로포르메이트 및 루티딘을 처리하여 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABC (18)을 제조하였다.

상기 화합물 18 에 암실 조건의 상온에서 독소루비신을 처리하여 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABC-DOX

15 (19)를 제조하였다. 상기 화합물 19 에 Pd(PPh₃)₄, Bu₃SnH 및 아세트산을 처리하여 본 발명에 따른 Ac-Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-PABC-DOX (20, AcKGDEV D-PABC-DOX)를 제조하였다.

전체 반응의 진행상태는 HPLC 의 C-18 역상분석컬럼을 이용하여 확인하였고, 화합물의 분리는 분취용 HPLC 컬럼을 사용하였고, 용매는

20 아세토니트릴과 0.1% TFA(trifluoroacetic acid)를 함유한 물을 사용하였다.

본 발명에 따른 항암제 전구체를 약학조성물로 제조할 경우, 약학조성물에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈,

25 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

상기 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 항암제 전구체를 약학조성물로 제조할 경우, 약학조성물에 함유된 항암제 전구체의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1 회 내지 수회 투여할 수 있다. 그리고 이의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

상기 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면,

경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

또한, 본 발명의 약학조성물은 종래 안전성 데이터가 확보된 항암제의 생체이용율을 높이기 위한 신규 제형에 관한 것이므로, 안전하게
5 사용가능하다.

본 발명의 또 다른 구체예는, 순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하며, 상기 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드는 활성 케스페이즈(caspase)에 의해 절단되는 것인, 전구약물 prodrug)조성물; 및

10 상기 전구약물 투여 대상에 방사선 또는 자외선을 조사하여, 종양세포에서 케스페이즈 활성화를 유도하는 방사선 또는 자외선 조사장치를 포함하는, 항암치료용 키트를 제공하는 것이다.

본 발명은 비활성 형태의 항암제 전구체를 투여하면, 표적부위에 축적된 후 방사선 조사에 의해 펩타이드가 분해되면서 활성형의 항암제를
15 표적부위에서 방출할 수 있기 때문에 정상세포의 파괴를 최소화하며 낮은 항암제의 투여 및 방사선량 조사로 높은 항암 치료효과를 얻을 수 있다.

본 발명에 따른 항암제 전구체 투여 후, 부작용을 나타내지 않으나 치료효과가 미비한 낮은 투여량의 항암 치료제를 투여 및 방사선을 조사하면 이는 암 조직 부위에서 미비한 세포 사멸효과를 유발하게 된다.

20 일반적인 상태에서 유발된 미비한 세포 사멸 효과로는 뚜렷한 항암 치료효과를 나타 낼 수 없으나, 암 조직 부위에 본 발명에 따른 항암제 전구체가 축적된 상태에서 유발된 세포 사멸효과는 비활성 항암 치료제를 활성 상태로 만든다. 이에 암 세포 부위에서 선택적 및 단계적으로 증폭된 활성화된 항암치료제는 높은 세포 독성을 나타내게 되고 궁극적으로 높은
25 표적 치료효율을 나타내게 된다.

이는 정상세포 파괴를 최소화 하며 획기적으로 낮은 항암 치료제 투여 및 방사선량 조사로 높은 항암 치료효과를 얻을 수 있어 기존의 대표적인 항암제 및 방사능 병행 치료의 부작용을 혁신적으로 낮출 수 있다. 또한 암세포 표적성을 가지며 세포 사멸 시에만 특이적으로 활성화 되어

암세포에 추가적인 독성을 나타내는 신개념의 항암치료제 개발로 기존의 방사능 치료와 병행되던 화학요법의 치료효과를 혁명적으로 높일 수 있는 새로운 치료기술이다.

- 본 발명에서 자외선 또는 방사선 조사장치는 통상의 항암치료 등에 사용되는 장치를 사용할 수 있으며 치료대상에 투여하여 세포사멸로 인한 케스페이즈 활성화를 유도할 수 있는 효과를 달성가능한 방사선 또는 자외선을 방출 및 조사가능한 장치이며, 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 적절한 방사선 조사량은 방사선 치료에 사용되고 있는 방사선 조사량 범위일 수 있다. 예컨대, dox-dox 를 함께 투여하지 않은 경우
- 10 1Gy 정도에서는 apoptosis 가 유도되지 않은 in vivo 결과를 확인할 수 있었음을 고려할 때, 방사선 조사량은 1Gy 이상일 수 있고, 5Gy 이상인 경우 apoptosis 는 유도되지만, 다른 조직에 damage 를 줄 수 있어서 이보다 강도가 큰 방사선 조사량은 실질적 의미가 없을 수 있으므로, 1Gy 내지 5Gy 정도인 것이 바람직할 수 있다. 또한, 자외선 조사량의 경우,
- 15 일반적으로 자외선 치료에 사용되는 범위일 수 있으며, 예컨대, 1 J/m² 내지 50 J/m²일 수 있다.

【발명의 효과】

- 본 발명에 따른 항암제 전구체는 독소루비신과 같이 산과 염기에 불안정한 항암제를 효과적으로 전구체로 제공함으로써 체내 투여 시에는 비활성 상태의 항암제 전구체로 존재하지만, 체내 투여 후 방사선 또는 자외선 치료에 의해 활성화된 케스페이즈 존재 하에서 활성성분인 항암제가 표적부위에서 효과적으로 방출되므로 암세포에만 선택적으로 항암효과를 나타낼 수 있어 치료효과의 극대화 및 방사선 또는 자외선 치료의 부작용을
- 25 최소화할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 는 본 발명의 일실시예에 따른 항암제 전구체의 모식도를 나타낸 것이고,

도 2 는 방사선 조사량 및 시간대 별 케스페이즈-3 의 발현량을 나타낸 것이고,

도 3a 내지 3c 는 방사선 조사량 및 시간대 별 케스페이즈-3 의 활성도를 나타낸 것이고,

5 도 4 은 방사선 조사량 및 시간대 별 세포사멸을 측정한 것이고,

도 5 은 방사선 조사량에 따른 종양의 치료효과를 나타낸 것이고,

도 6 는 방사선 조사량, 시간대 별 조직 내 세포사멸을 측정한 것이고,

10 도 7 은 방사선 조사 후 조직 내 케스페이즈-3 의 발현량 IHC 염색 결과를 나타낸 것이고,

도 8 은 방사선 조사 후 발현된 케스페이즈-3 에 의해 방출된 항암제의 종양 치료효과를 나타낸 것이고,

도 9a 내지 도 9f 는 본 발명에 따른 항암제 전구체의 MTT 분석 결과이고,

15 도 10a 및 도 10b 은 종래기술인 미국공개특허 제 2007-0104719 호에 개시된 AcDEVD-DOX 의 MTT 분석 결과이고,

도 11 는 독소루비신의 세포 업테이크 이미지이고,

도 12 는 본 발명에 따른 항암제 전구체의 세포 업테이크 이미지이고,

20 도 13 은 케스페이즈-3 으로 처리한 본 발명에 따른 항암제 전구체의 세포 업테이크 이미지이고,

도 14 은 방사선을 조사한 본 발명에 따른 항암제 전구체의 세포 업테이크 이미지이고,

도 15 은 UV 를 조사한 본 발명에 따른 항암제 전구체의 세포 업테이크 이미지 이고,

25 도 16 는 종래기술인 미국공개특허 제 2007-0104719 호에 개시된 AcDEVD-DOX 의 세포 업테이크 이미지이고,

도 17a 및 도 17b 는 낮은 방사선 조사량과 고농도의 본 발명에 따른 항암제 전구체를 주사하여 얻은 종양 치료효과를 나타낸 것이고,

도 18 은 낮은 방사선 조사량과 고농도의 본 발명에 따른 항암제 전구체를 주사하여 얻은 독성 결과를 나타낸 것이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

- 5 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 항암제 전구체인 AcKGDEVD-PABC-DOX 제조

1. Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-OH

10 (16)

1) 레진에 아미노산 붙이기

2-클로로트리틸클로라이드 수지(chlorotriptylchloride resin; TCP)를 40 분 동안 CH_2Cl_2 에서 팽윤시킨 후, CH_2Cl_2 에 녹인 Fmoc-Asp(OAll)-OH (1.3 eq)와 DIEA (Diisopropylethylamine, 3.3 eq)을 넣고 5 분 후에 다시 15 DIEA 를 더 첨가한 후 1 시간 동안 반응시켰다. 1 시간 후 메탄올을 넣어주고 20 분을 추가로 반응시킨 다음, CH_2Cl_2 와 DMF 로 수지를 5 분씩 각각 3 번, 2 번씩 씻어주었다. Fmoc-관능기를 제거하기 위해 20% 용액 피페리딘(20 ml)으로 5 분간 진탕한 후 반응물을 제거한 후 다시 DMF 와 CH_2Cl_2 으로 용액을 5 분씩 각각 3 번씩 씻어주었다.

20 2) 펩타이드 합성하기

펩타이드를 합성하기 위해서 먼저, Fmoc-Val-OH (3 eq)과 TBTU (3 eq), HOBT (3 eq)를 DMF 와 CH_2Cl_2 에 녹인 용액을 아스파르트산이 붙어있는 수지에 넣고 DIEA (8 eq)를 넣고 1 시간 동안 진탕하였다. Kaiser test 를 통해 반응 유무를 확인한 후 앞의 과정과 같이 Fmoc-관능기를 제거하기 25 위해 20% 용액 피페리딘으로 5 분 동안 진탕하였다. 동일한 방법으로 나머지 아미노산 Fmoc-Glu(OAll)-OH, Fmoc-Asp(OAll)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(OAloc)-OH 와 반응을 시키고 Fmoc-관능기를 떼어주었다.

3) 아민기의 아세틸화하기

자유로워진 아민기를 아세틸기로 보호하는 반응으로서, DMAP, Ac₂O 를 각각 3 eq 씩 사용하여 DMF 20 mL 에 녹인 후 1 시간 동안 교반하고 kaiser test 를 한 후 반응 종결을 확인한 후 DMF 와 CH₂Cl₂ 으로 용액을 5 분씩 각각 3 번씩 씻어주었다.

5 4) 수지로부터 펩타이드를 이탈시키기

수지를 제거하기 위해서 CH₂Cl₂ : AcOH : TFE = 6 : 3 : 1 혼합용매에 녹인 후 상온에서 2 시간 동안 교반시킨 후 용매를 제거하고 에테르로 결정화를 시켜 감압 하에 걸러 수지가 제거된 펩타이드를 얻었다. ESI-MS: [M - H⁺]=906.2

10

2.Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABOH (17)

Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-OH (344 mg, 0.38 mmol), 4-아미노벤질 알코올 (2 eq), EEDQ (2 eq)를 무수 DMF (11 mL)에 녹인 후 상온에서 24 시간 동안 교반하였다. 용매를 모두 제거한 후 에테르로 펩타이드 (322 mg, 84%)를 결정화시켜 화합물 17 을 얻었다.

ESI-MS: [M + Na⁺] = 1035.7

20 3. Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABC (18)

Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABOH (322 mg, 0.318 mmol)과 4-니트로페닐 클로로포메이트 (1.2 eq)를 무수 CH₂Cl₂ (10 mL)에 녹인 후 2,6-루티딘 (3 eq)을 가하여 상온에서 교반하였다. 2 시간 후 무수 DMF (2 mL)를 반응물질에 가하고 2,6-루티딘 (2 eq)을 가하였다. 24 시간과 27 시간 그리고 46 시간 후 2,6-루티딘 (4.75 eq), 4-니트로페닐 클로로포메이트 (1 eq)를 각각 가하여 상온에서 교반하고 84 시간이 지난 후에 소듐바이카보네이트 수용액을 가하여 반응을 종결시켰다.

반응물질은 에틸아세테이트로 세 번 추출하고 유기층은 0.5 M 구연산 수용액과 소듐바이카보네이트 수용액 그리고 소금물로 닦아주었다. 얻어진 유기층은 무수 소듐설페이트층을 통과시켜 남은 수분을 제거하고 용매는 감압 하에 제거한 후 에테르를 넣어 결정화 시켜 화합물 18 을 얻었다. prep. HPLC 로 분리한다. (77 mg, 20.5%)

[분리 조건 HPLC : C-18 reverse-phase 22 mm i.d. x 250 mm column; flow-rate 10 mL/min; 20 ~ 53 % (acetonitrile) in (water + 0.1% TFA) linear gradient elution over 30 min.; retention time 27 min], ESI-MS: $[M + Na^+] = 1200.54$

10

4. Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABC-DOX (19)

Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABC (77 mg, 0.065 mmol)과 독소루비신 염산염 (1.2 eq)을 무수 DMF (8 mL)에 녹인 후 DIEA (5.4 eq)을 가하고 플라스크를 호일로 감싸 빛을 차단시킨 후 16 시간 동안 상온에서 교반하였다. 감압 하에 용매를 제거한 후 prep. HPLC 로 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll) - PABC-DOX (오렌지-레드 비결정형 고체, 76 mg, 74%) 을 분리하여 화합물 19 를 얻었다.

[분리조건 HPLC : C-18 reverse-phase 22 mm i.d. x 250 mm column; flow-rate 10 mL/min; 20 ~ 100 % (acetonitrile) in (water + 0.1% TFA) linear gradient elution over 50 min.; retention time 34 min], ESI-MS: $[M + Na^+] = 1605.06$

5. Ac-Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-PABC-DOX (20, AcKGDEVDPABC-DOX)

Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OAll)-Glu(OAll)-Val-Asp(OAll)-PABC-DOX (76 mg, 0.048 mmol)과 $Pd(PPh_3)_4$ (0.2 eq)을 무수 DMF (7.6 mL)에 녹인 후 아세트산 (15 eq)과 트리부틸틴 하이드라이드 (tributyltin hydride,

13 eq)를 반응물에 가하였다. 상온에서 1 시간 동안 교반 후 용매를 감압 하에 제거하고 prep. HPLC 로 탈보호화된 Ac-Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-PABC-DOX (진한 오렌지-레드 비결정형 고체, 35 mg, 53%) 을 분리하여 얻었다. 본 실시예에 따른 세포사멸 감응성 항암제 전구체의
5 모식도는 도 1 과 같다.

[분리 조건 HPLC : C-18 reverse-phase 22 mm i.d. x 250 mm column; flow-rate 10 mL/min; 20 ~ 100 % (acetonitrile) in (water + 0.1% TFA) linear gradient elution over 60 min.; retention time 21 min], ESI-MS: $[M + H^+] = 1378.4$

10

실시예 2: 방사선 조사량과 시간

암세포에 방사선 조사 후 세포사멸이 유도된 세포의 시간에 따른 케스페이즈-3 발현량 및 활성도를 정량분석하여 그 결과를 도 2 과 도 3a 내지 도 3c 에 나타냈으며, 방사선 조사 후 암세포에서 유도된 세포사멸의
15 정도를 조사하여 도 4 에 나타냈고, 암세포가 이식된 종양동물모델에서의 방사선 조사 후 종양 성장과 체중을 측정하여 도 5 에 종양억제효과를 나타냈으며, 방사선 조사 후 일정시간간격으로 종양 조직을 적출하여 조직 내 세포사멸을 TUNEL 분석으로 확인하여 도 6 에 나타냈으며, 조직 내 케스페이즈-3 의 발현량을 IHC 로 염색하여 도 7 에 나타냈다.

20

1.방사선이 조사된 암세포에서 케스페이즈-3 발현량 및 활성도 정량 분석

방사선 조사 후 암세포 내에서 세포사멸의 신호전달과정을 통해 활성화된 케스페이즈-3 을 웨스턴 블롯 분석법을 실시하여 발현정도를
25 확인하였다.

즉, SCC(Squamous cell carcinoma) 7 세포를 3×10^5 로 준비하여 1Gy, 5Gy, 10Gy 씩 방사선을 조사하여 세포사멸을 유도하였다. 각 시간별(2h, 6h, 12h, 24h, 48h)로 단백질을 샘플링하고, 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 단백질을 분리하고 전이시킨 후 PBS 로

2 회 세정하고, 10% 탈지유로 멤브레인을 40 분간 블로킹 하였다. 제 1 항체 (케스페이즈-3 1:400, β -액틴 1:10000)를 4℃에서 밤새도록 처리하였고, 제 2 항체 (항-래빗 또는 항-마우스 IgG HRP 컨쥬게이트 1:2000)를 상온에서 1 시간 동안 처리하였다. ECL 키트와 X-선 필름을 이용하여
5 케스페이즈-3 의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과, 도 2 와 같이 암세포에 방사선 조사 후 세포사멸이 유도된 세포는 시간 의존적으로, 그리고 방사선 조사량 의존적으로 케스페이즈-3 의 발현을 증가시켰다.

방사선 조사 후 암세포 내에서 세포사멸의 신호전달과정을 통해 활성화된 케스페이즈-3 의 활성도를 확인하였다. 즉, SCC 7 세포를
10 3×10^5 로 준비하여 1Gy, 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy 씩 방사선을 조사하여 세포사멸을 유도하였다. 각 시간별(2h, 6h, 12h, 24h)로 단백질을 샘플링하였고, 96-well plate 에 샘플링한 단백질과 케스페이즈-3 분석 키트를 사용하여 ELISA reader 로 측정하였다.

그 결과, 도 3a 내지 도 3c 와 같이 암세포에 방사선 조사 후
15 세포사멸이 유도된 세포는 다양한 방사선 조사량에서 시간 의존적으로 케스페이즈-3 의 활성을 증가시켰다.

2.2 방사선이 조사된 암세포의 세포사멸

방사선 조사 후 암세포에서 유도된 세포사멸의 정도를 Flow
20 cytometer (FACScan)을 이용하여 측정하였다.

즉, SCC 7 세포를 5×10^4 로 준비하여 1Gy, 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy 씩 방사선을 조사하여 세포사멸을 유도하였다. 각 시간별(12h, 24h, 48h, 72h)에 따른 샘플링하였고, PBS 로 세정한 후 70% 에탄올로 고정하였다. PBS 가 포함된 프로피디움 아이오다이드 (propidium iodide,
25 50 $\mu\text{g/ml}$)와 RNaseA (100 $\mu\text{g/ml}$)를 실온에서 30 분 동안 처리한 후 flow cytometer 로 세포사멸을 측정하였고, 그 결과는 도 4 과 같다.

2.3. 종양동물모델에서의 종양치료효과 및 세포사멸

암세포가 이식된 종양동물모델에서의 방사선 조사 후 종양의 치료효과와 세포사멸 효과를 측정하였다.

즉, SCC 7 세포주가 이식된 종양모델 마우스를 감마 나이프를 이용하여 방사선 조사량(1Gy, 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy, 25Gy)을 다르게
5 조사하였다. 방사선 조사 후 종양의 억제 효과를 알아보기 위해 매일 종양 성장과 체중을 측정하였고, 그 결과는 도 5 과 같다.

그리고, 방사선 조사 후 12h, 24h, 48h, 72h 에 종양 조직을 적출하여 조직 내 세포사멸을 TUNEL 분석으로 확인하였고, 그 결과는 도 6 와
10 같으며, 방사선 조사 후 12h, 24h, 48h, 72h 에 종양 조직을 적출하여 조직 내 케스페이즈-3 의 발현량을 IHC 로 염색하여 확인하였다(도 7 참조).

<실시예 3> 항암제 전구체의 종양 치료효과 분석

실시예 1 에서 제조된 항암제 전구체(KGDEV-D-DOX)를 주사하고, 방사선 조사량 5Gy 을 5 분 조건으로 조사하여, 약물의 종양 치료효과를
15 확인하였다.

구체적으로, SCC 7 세포주가 이식된 종양모델 마우스를 감마 나이프를 이용하여 방사선(5Gy)을 조사하였다. 방사선 조사 24 시간 후
실시예 1 의 항암제 전구체 3 mg/kg 를 동물에게 정맥으로 주사하였다. 2 일 뒤 동일량(3 mg/kg)의 항암제 전구체를 동물에게
20 주사하였다. 방사선 조사 후 실험 종료 시까지 매일 종양 성장과 체중을 측정하였다.

그 결과, 도 8 과 같이 방사선 조사와 함께 본 실시예에 따른 항암제 전구체를 투여한 경우 방사선 조사와 함께 독소루비신을 투여한 경우와 유사하게 종양의 크기를 감소시켰다.

25

<실시예 4> 항암제 전구체의 세포독성 분석

In vitro 세포 MTT 실험을 통해 세포독성을 확인하였다.

구체적으로, SCC 7 세포를 1Gy, 5Gy, 10Gy 방사선 조사 후 2h, 6h, 12h, 24h, 48h 후 배지를 제거하고, 배지 100 μ l 당 MTT 용액 20 μ l를

처리한 후, 30℃에서 1 시간 동안 빛을 차단하여 반응시켰다. 그 후, PBS 로 3 회 세정하고, 배지를 제거하며, DMSO 100 μ l를 첨가하여 MTT formazan 을 용해시켜 ELASA (측정 파장: 570nm) 분석하였다.

즉, 총 6 가지 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 9a 내지 도 9f 에 나타냈다.

a) 세포에 1Gy, 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy 조사량으로 방사선을 조사한 후 MTT 분석을 수행함(radiation MTT assay),

b) 세포에 독소루비신을 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 및 5 μ M 농도로 처리한 후 MTT 분석을 수행함(Doxorubicin MTT assay)

10 c) 세포에 실시예 1 에서 제조된 항암제 전구체(KGDEVD-DOX)를 처리한 후 MTT 분석을 수행함(KGDEVD-DOX MTT assay),

d) 세포에 케스페이즈-3 를 처리한 실시예 1 에서 제조된 항암제 전구체 (KGDEVD-DOX)를 처리한 후 MTT 분석을 수행함(Cleaved Dox by Caspase-3 MTT assay),

15 e) 세포에 독소루비신과 방사선을 함께 처리한 후 MTT 분석을 수행함(Doxorubicin + RT MTT assay)

f) 세포에 항암제 전구체 (KGDEVD-DOX)를 처리한 후 독소루비신을 처리하여 MTT 분석을 수행함(KGDEVD-DOX + RT MTT assay)

20 또한, 비교예로서, 미국공개특허 제 2007-0104719 호(출원인: 제넨텍)에 개시된 AcDEVD-DOX 를 이용하여 상기 방법과 같이 MTT 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 10a 및 도 10b 에 나타냈다.

따라서, 본원 발명에 따른 실시예 1 에서 제조된 항암제 전구체(KGDEVD-DOX)는 비교예인 AcDEVD-DOX 의 MTT 결과보다
25 신속하면서도 효과적인 암세포 사멸능력을 나타내었고, 케스페이즈-3 가 발현되지 않았을 때에는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

<실시예 5> 항암제 전구체의 In vitro 세포 업테이크 분석

In vitro 세포 업테이크 실험을 통해 세포내 기전을 영상으로 확인하였다.

5.1 실시예 1의 항암제 전구체(KGDEVD-Dox) 처리

SCC 7 세포에 실시예 1에서 제조한 KGDEVD-Dox를 처리하고, 5 처리후 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h 경과후 배지를 제거하였고, PBS로 3회 세정하였으며, 고정액으로 세포 고정 후 형광현미경으로 세포 업테이크 영상을 얻었으며, 그 결과를 도 12에 나타냈다.

또한, SCC 7 세포에 실시예 1의 KGDEVD-Dox를 5 μ M 처리하고 24시간 후에 1Gy, 5Gy, 10Gy의 조사량으로 방사선을 조사하였고, 방사선 10 조사 후 3시간 뒤 배지를 제거하였고, PBS로 3회 세정하였으며, 고정액으로 세포 고정 후 형광현미경으로 세포 업테이크 영상을 얻었으며, 그 결과를 도 14에 나타냈다.

이후, SCC 7 세포에 KGDEVD-Dox를 5 μ M 처리하고 24시간 후 UV(254nm)를 조사하였고, UV 조사 후 3시간 뒤 배지를 제거하였고, 15 PBS로 3회 세정하였으며, 고정액으로 세포 고정 후 형광현미경으로 세포 업테이크 영상을 얻었으며, 그 결과를 도 18에 나타냈다.

도 12, 도 14 및 도 18은 실시예 1의 KGDEVD-Dox가 세포 업테이크를 나타내는 사진으로서, 구체적으로 도 12에는 SCC 7 세포에 실시예 1에서 제조한 KGDEVD-Dox를 처리하였으나 자외선 또는 방사선을 20 처리하지 않는 형광 현미경으로 관찰한 결과이고, 도 14는 KGDEVD-Dox 처리 및 방사선 조사후 세포 업테이크 영상이고, 도 18은 KGDEVD-Dox 처리 및 방사선 조사후 세포 업테이크 영상이다.

5.2. 비교관찰

25 독소루비신 처리후 관찰한 결과를 도 11에 나타냈으며, 독소루비신 처리 및 케스페이즈-3 처리후 관찰한 결과를 도 13에 나타냈고, 비교예로서 AcDEVD-PABC-DOX 나타낸 형광 현미경 사진을 도 16에 나타냈다. 도 16을 보면, AcDEVD-PABC-DOX은 세포에 업테이크 되지 않으나 본 발명에 따른 KGDEVD-Dox는 세포의 사이토졸에 업테이크되는

것을 확인할 수 있고, 세포의 사이토졸에 업테이크되었던 DEVD-Dox 가 케스페이즈-3 을 처리하거나 방사선을 조사하여 세포 내에서 케스페이즈-3 가 발현되었을 때에는 DEVD 와 Dox 의 링커 부분이 잘려 Dox 가 세포 핵으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다.

- 5 그 결과, 도 11 내지 도 14, 및 도 15 과 같이 방사선 또는 UV 조사 전의 KGDEV-Dox 는 세포핵이 아닌 세포질에 위치하고 있으며, 방사선 또는 UV 조사 후 케스페이즈-3 가 발현됨에 따라 KGDEV-Dox 와 독소루비신이 분해되면서 독소루비신이 세포핵으로 이동하여 암세포에 영향을 주는 것을 영상을 통해 확인할 수 있었다.

10

<실시예 6> 항암제 전구체의 최적 효과 검토

- 앞서 실험한 In vitro MTT 실험과 세포 업테이크 실험을 통해 확인한 결과를 바탕으로 낮은 방사선 조사량과 고농도의 항암제 전구체를 주사하여 약물의 종양 치료효과와 적은 약물 부작용을 다음과 같이
15 확인하였다.

- 즉, SCC 7 세포주가 이식된 종양 모델 마우스를 감마 나이프를 이용하여 방사선(5Gy)을 조사하였고, 방사선 조사 후 24 시간 뒤 케스페이즈-3 감응성 항암제 전구체를 동물에게 정맥으로 주사하였다(10mg/kg). 이때, 매일 3 일간 동일량의 약물을 동물에게
20 주사하였고, 방사선 조사 후 실험 종료 시까지 매일 종양의 성장과 생존율을 측정하였으며, 실험 종료 후 각 실험군의 장기를 적출하여 약물의 독성을 검사하였다.

- 그 결과, 도 17a, 도 17b 및 도 18 과 같이 낮은 방사선 조사량과 고농도의 항암제 전구체를 주사하여 약물의 종양 치료효과가 증대되며 적은
25 약물 부작용을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

 앞선 결과를 종합하면, 본 발명은 방사선을 이용하여 목표종양만 선택적으로 항암 치료가 가능한 암 세포 인식 및 세포사멸 감응형 나노입자를 개발하여, 기존 방사선과 항암제 이용에 의한 인체 내 부작용을 최소화하고, 암 세포를 효과적으로 사멸시키는 혁신 신약을 개발한 것이며,

특히 종래기술보다 활성성분의 종양세포 내 업테이크가 잘 되며, 케스페이즈-3 이 발현되지 않을 경우에는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및
항암제를 포함하며, 상기 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드는 활성
5 케스페이즈(caspase)에 의해 절단되는 것인, 전구약물(prodrug)조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 전구약물은 방사선 또는 자외선 조사에 의해
활성화된 케스페이즈에 의해 분해되어, 방사선 또는 자외선 조사 부위에서
10 상기 항암제를 방출하는 것인 전구약물 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 케스페이즈는 케스페이즈-3 인 전구약물
조성물.
15

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 링커는 파라 아미노벤질옥시카르보닐,
아미노에틸-N-메틸카르보닐, 아미노바이페닐메틸옥시카르보닐, 텐드리틱
링커 및 세파로스포린을 기반으로 한 링커로 이루어진 군에서 선택된 것인
20 전구약물 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신, 파클리탁셀,
아드리아마이신, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 마이토마이신, 클로모마이신,
25 블레오마이신, 페플로마이신, 다우노루비신, 아클라루비신,
네오키차노스타틴, 에피루비신, 이다루비신 및 피라루비신으로 이루어진
군에서 선택되는 것인 전구약물 조성물.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신이고, 링커는 파라아미노벤질옥시카르보닐-독소루비신인 전구약물 조성물.

5 【청구항 7】

순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하는 전구약물(prodrug)을 제조하는 방법으로서,

아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드에서 아스파르트산(Asp) 또는 글루탐산의 결사슬의 카르복시기의 수소는 알릴기(allyl group)으로 치환되고,
 10 라이신(Lys) 결사슬의 아미노기의 수소는 알릴옥시카르보닐기(allyloxycarbony)로 치환된 변형 펩타이드(modified peptide)를 제조하고,

상기 변형 펩타이드의 C-말단에 링크를 연결하고,

상기 링크에 항암제를 화학적으로 결합시키고,

15 상기 변형 펩타이드의 알릴기 및 알릴옥시카르보닐기를 탈보호시키는 단계를 포함하는, 전구약물의 제조방법.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 변형 펩타이드를 제조하는 단계는, 글리신,
 20 발린, 결사슬의 카르복시기의 수소가 알릴기(allyl group)으로 치환된 아스파르트산(Asp), 결사슬의 카르복시기의 수소가 알릴기(allyl group)으로 치환된 글루탐산(Glu), 및 결사슬의 아미노기의 수소는 알릴옥시카르보닐기(allyloxycarbony)로 치환된 라이신(Lys)으로 서열번호 1 을 갖는 펩타이드를 제조하고, N-말단 아민기를 아세틸기로 보호화하는
 25 단계를 포함하는 것인, 전구약물의 제조방법.

【청구항 9】

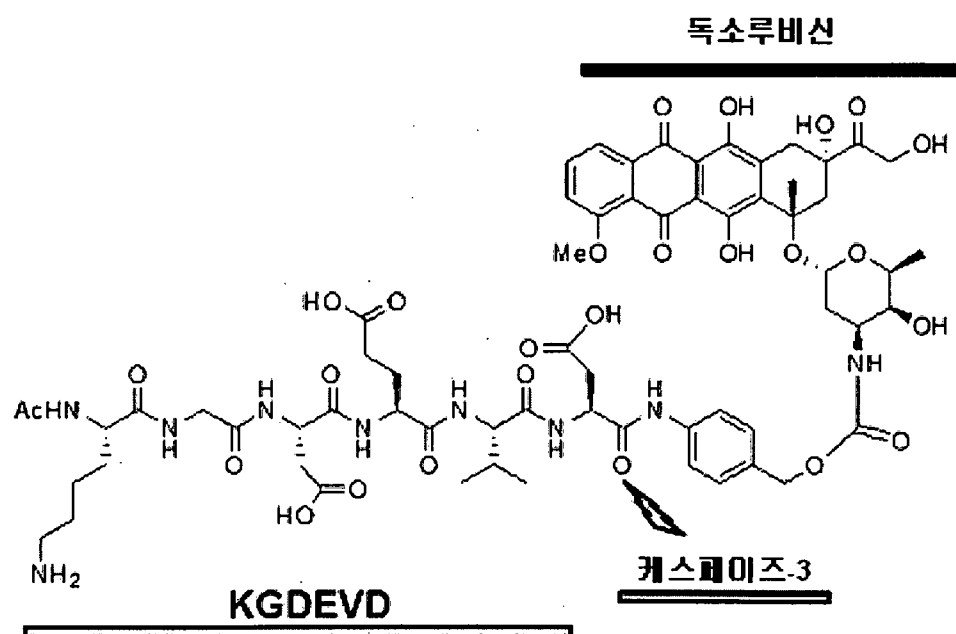
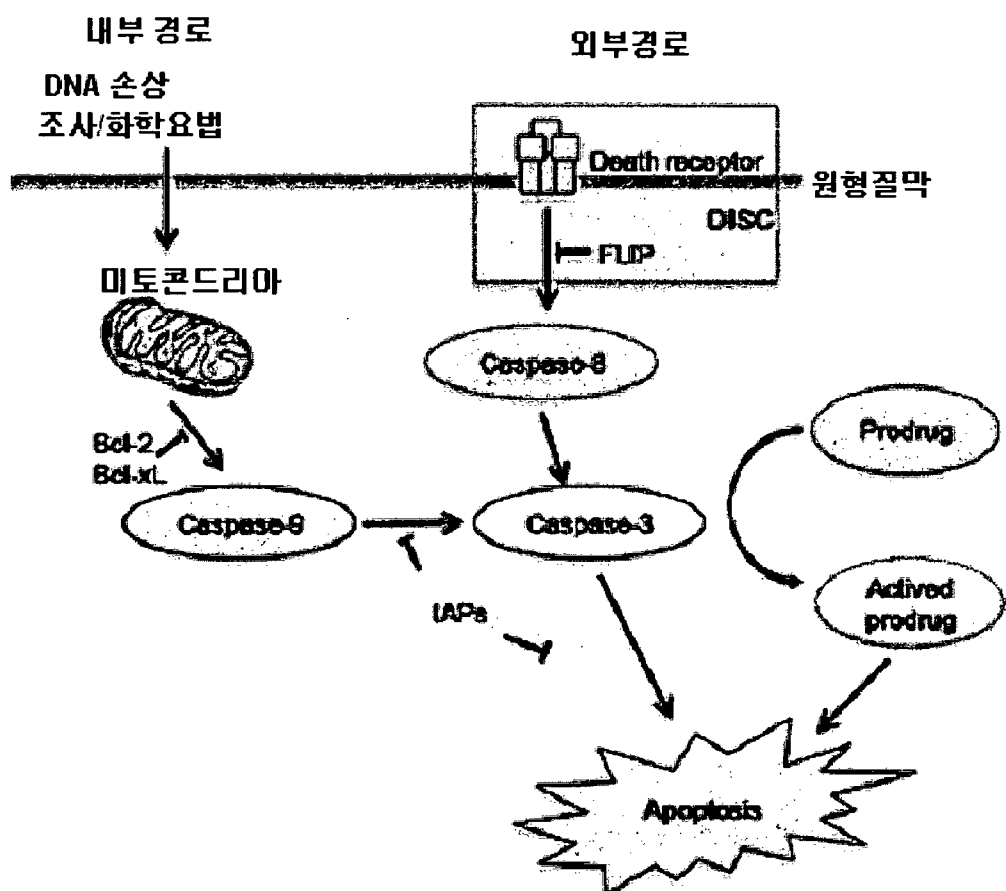
- 순차적으로 연결된, 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드, 링커, 및 항암제를 포함하며, 상기 아세틸-서열번호 1 을 갖는 펩타이드는 활성화 케스페이즈(caspase)에 의해 절단되는 것인, 전구약물 (prodrug) 조성물; 및
- 5 상기 전구약물 투여 대상에 방사선 또는 자외선을 조사하여, 종양세포에서 케스페이즈 활성화를 유도하는 방사선 또는 자외선 조사장치를 포함하는, 항암치료용 키트.

【청구항 10】

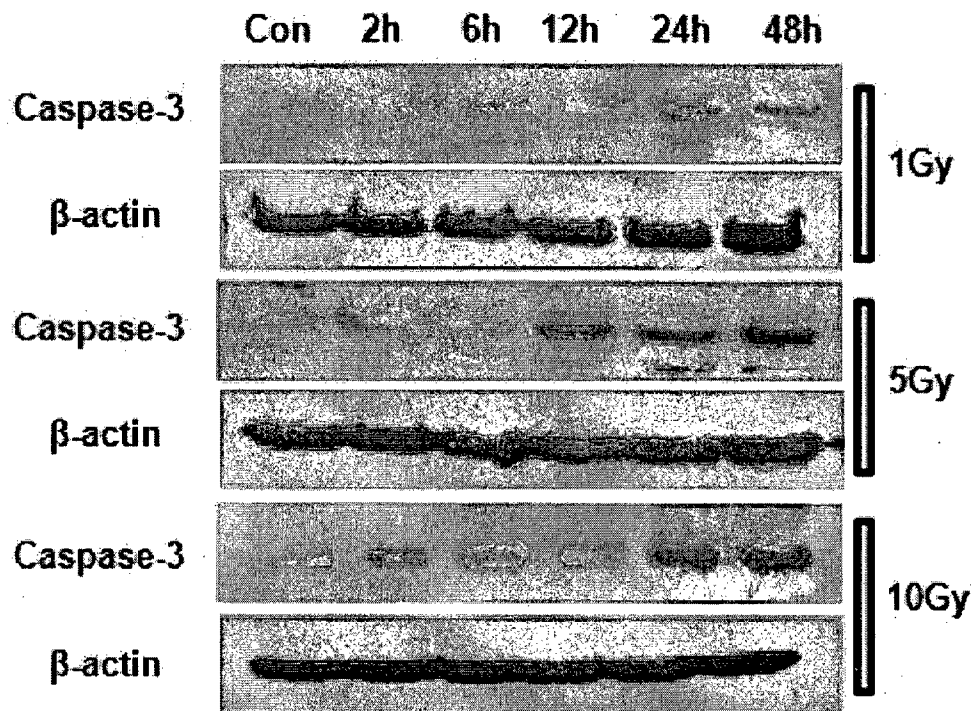
- 10 제 9 항에 있어서, 상기 방사선 조사량은 1Gy 내지 5Gy 범위이고, 상기 자외선 조사량은 1 J/m^2 내지 50 J/m^2 인 항암 치료용 키트.

【도면】

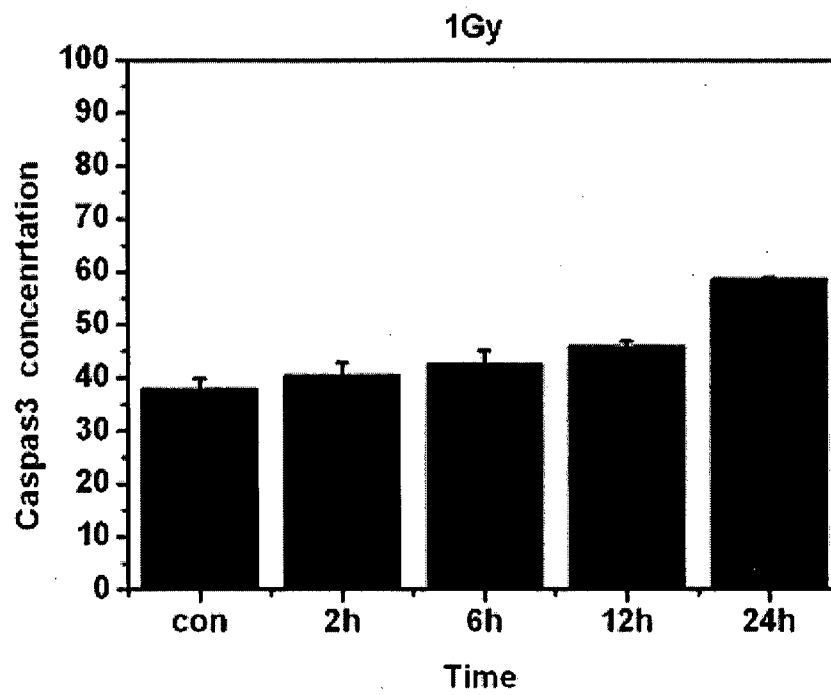
【도 1】



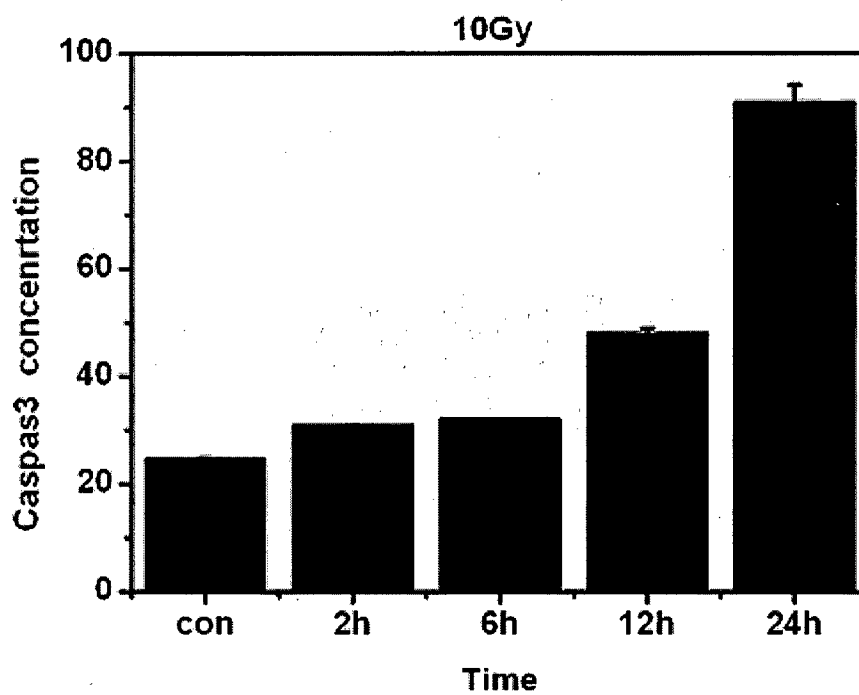
【도 2】

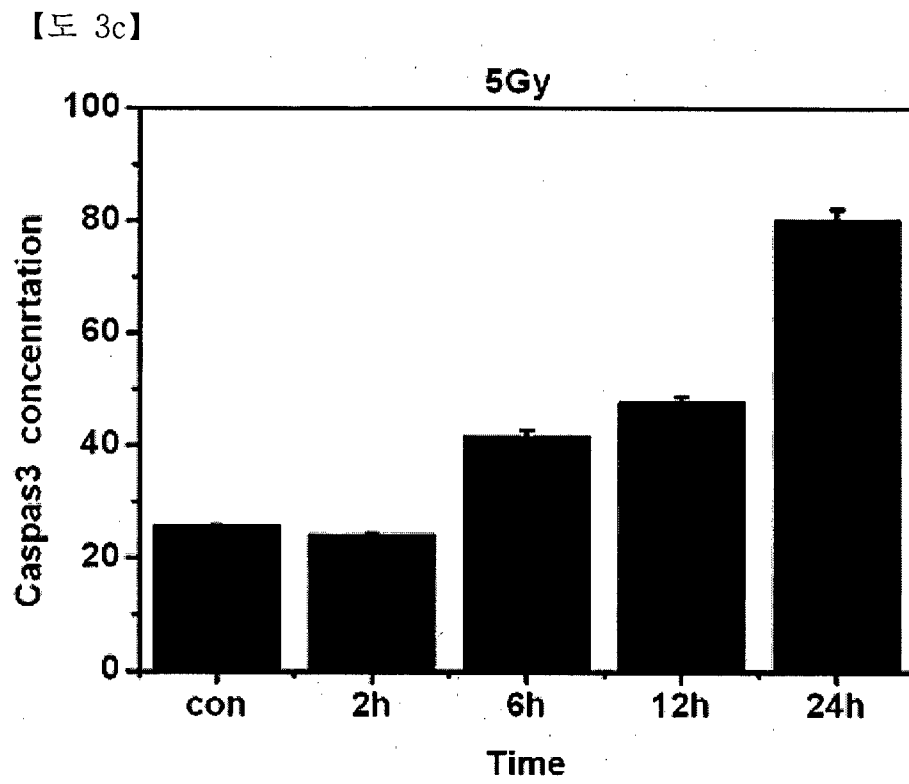


【도 3a】

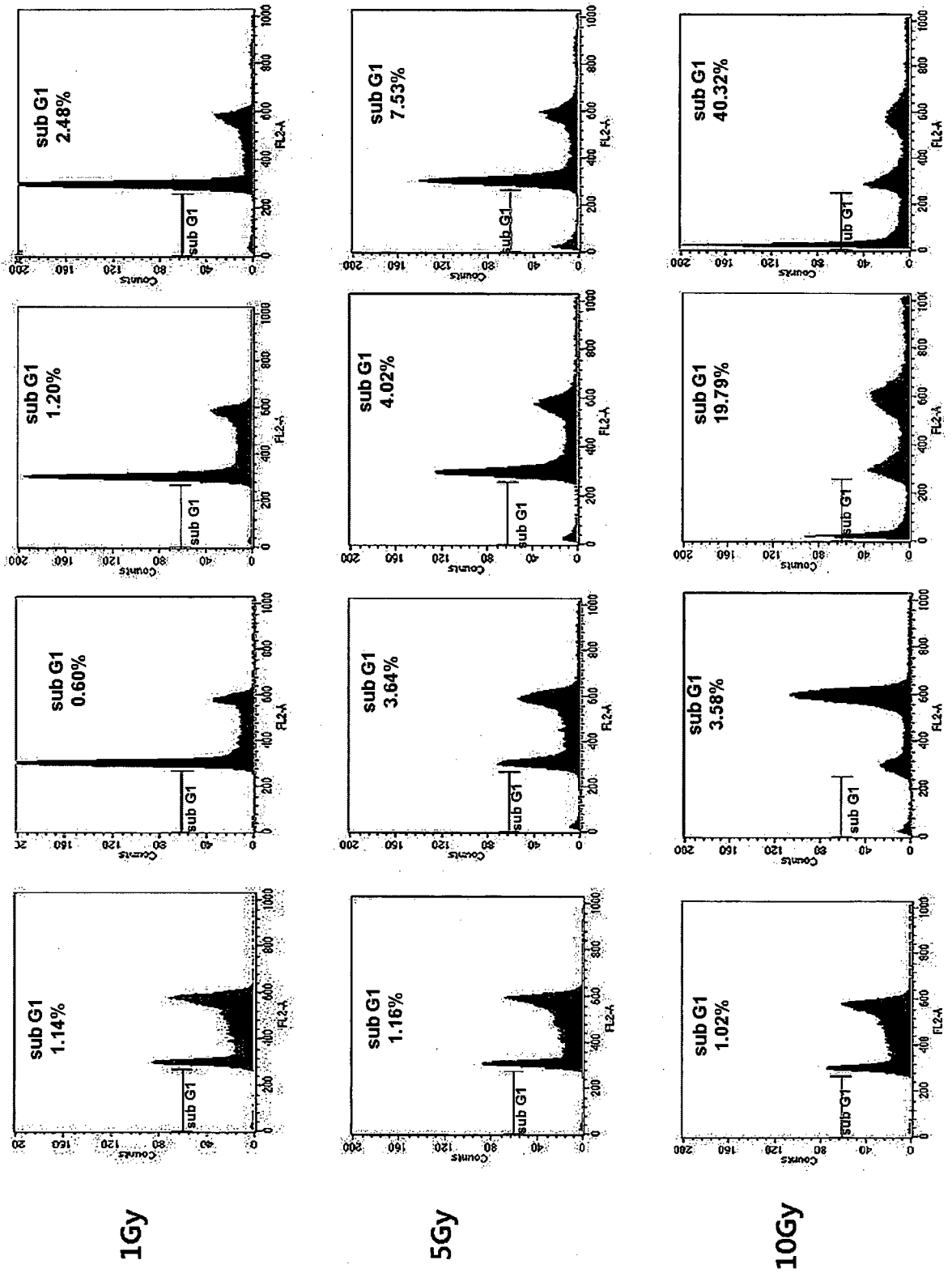


【도 3b】

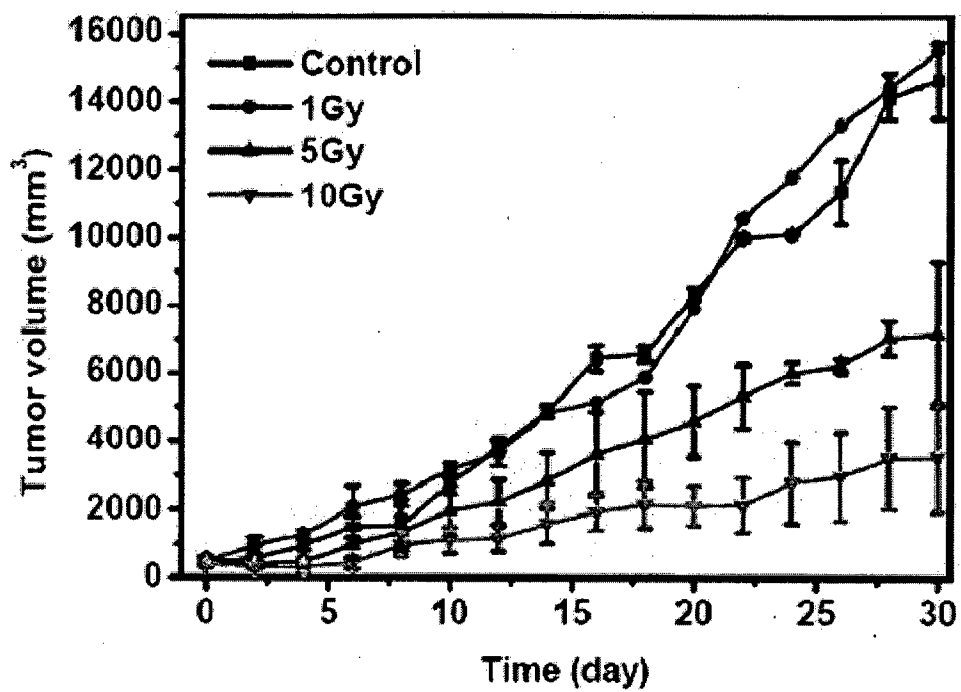




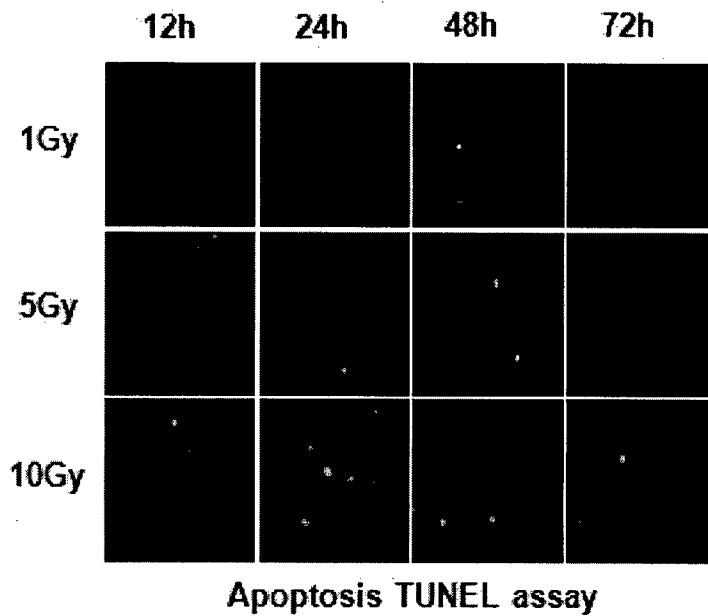
【도 4】



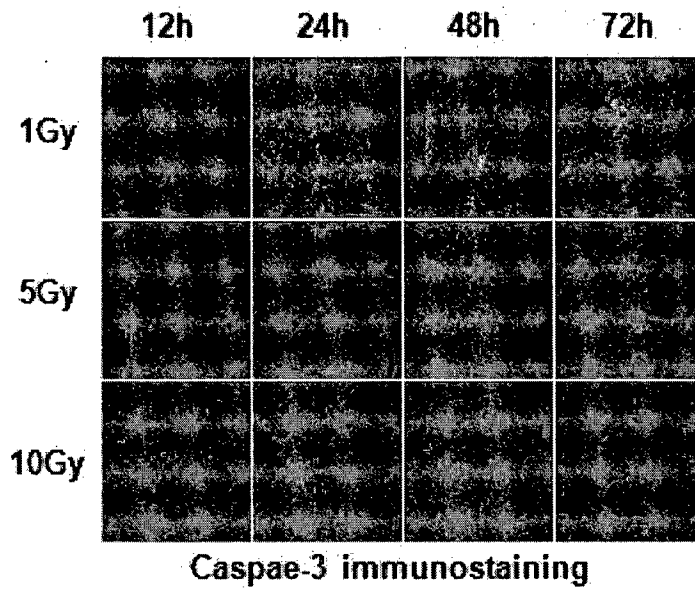
【도 5】



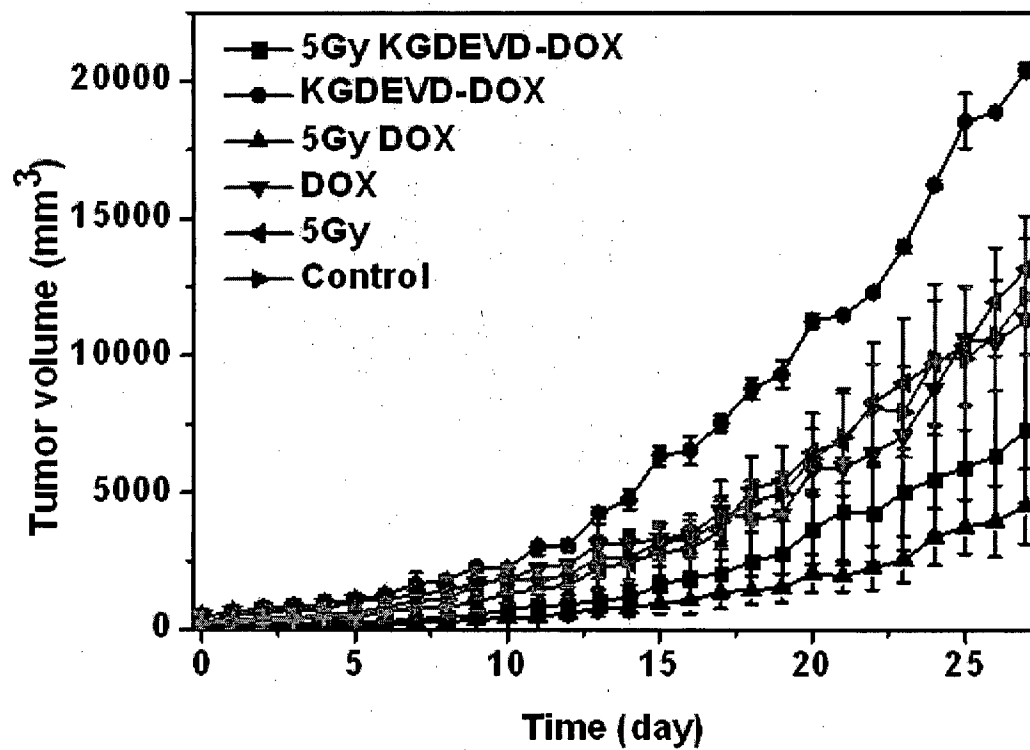
【도 6】



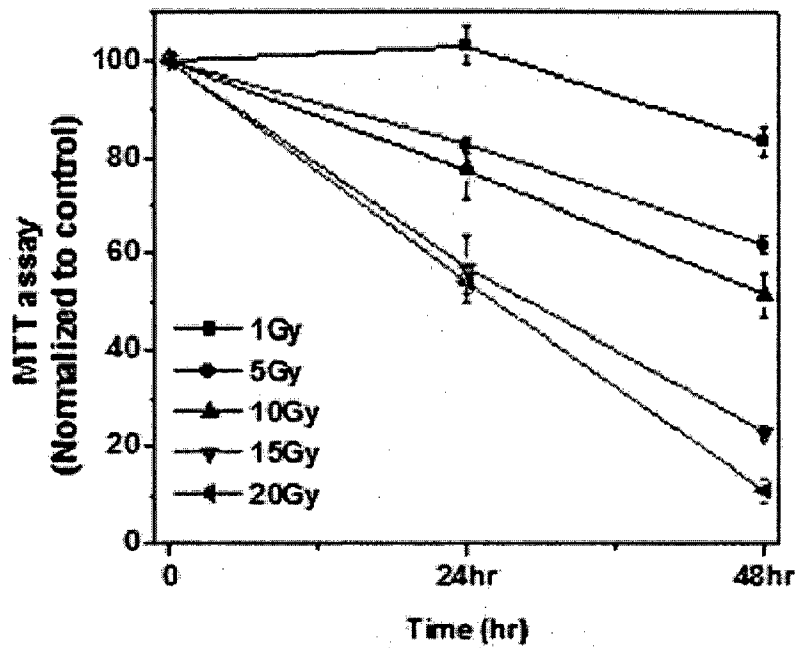
【도 7】



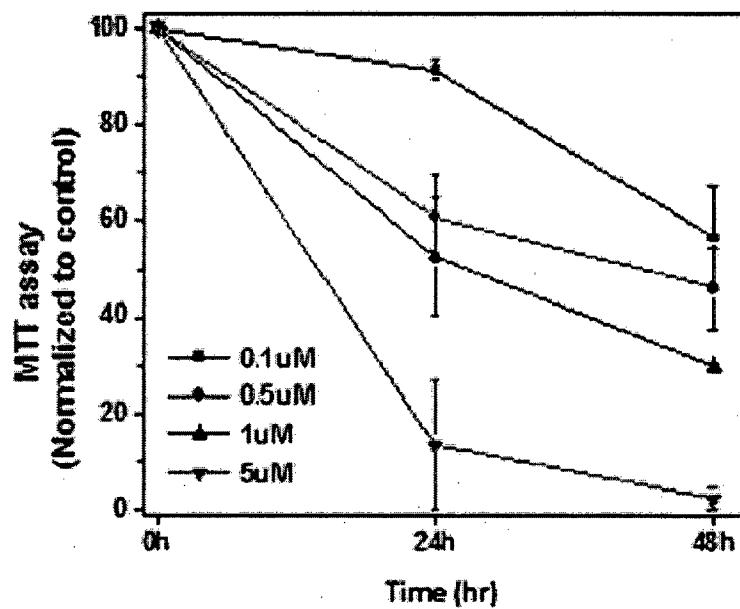
【도 8】



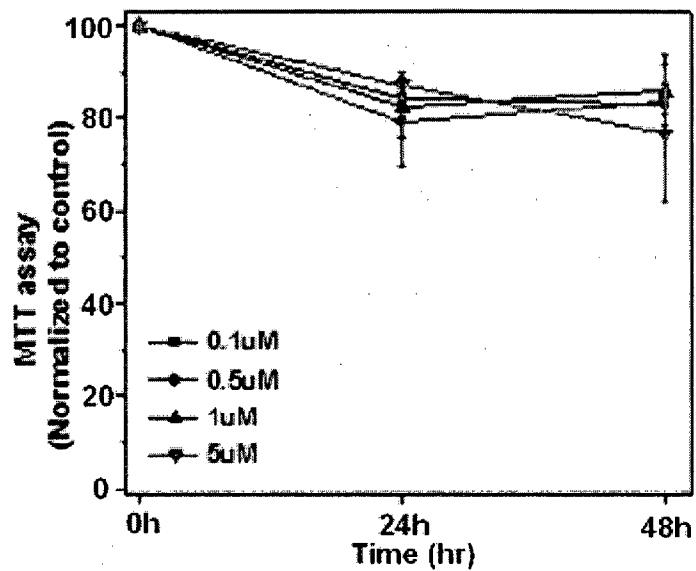
【도 9a】

Radiation MTT assay

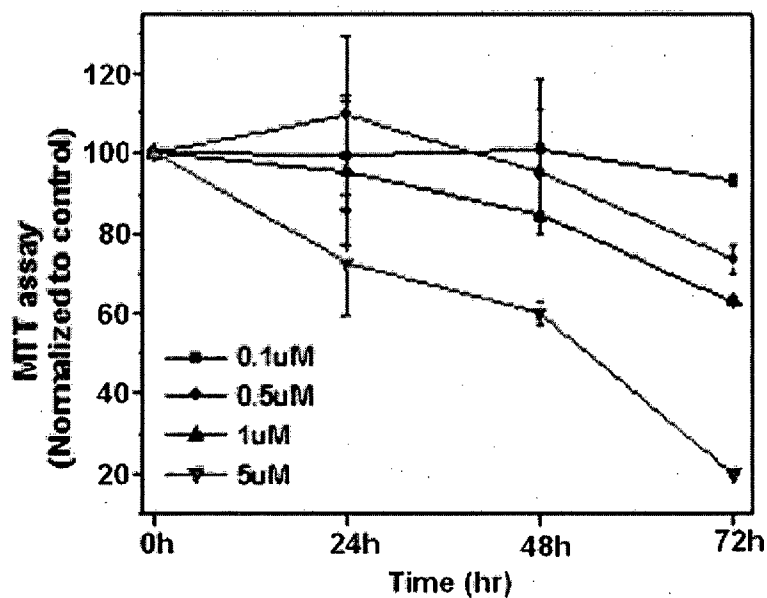
【도 9b】

Doxorubicin MTT assay

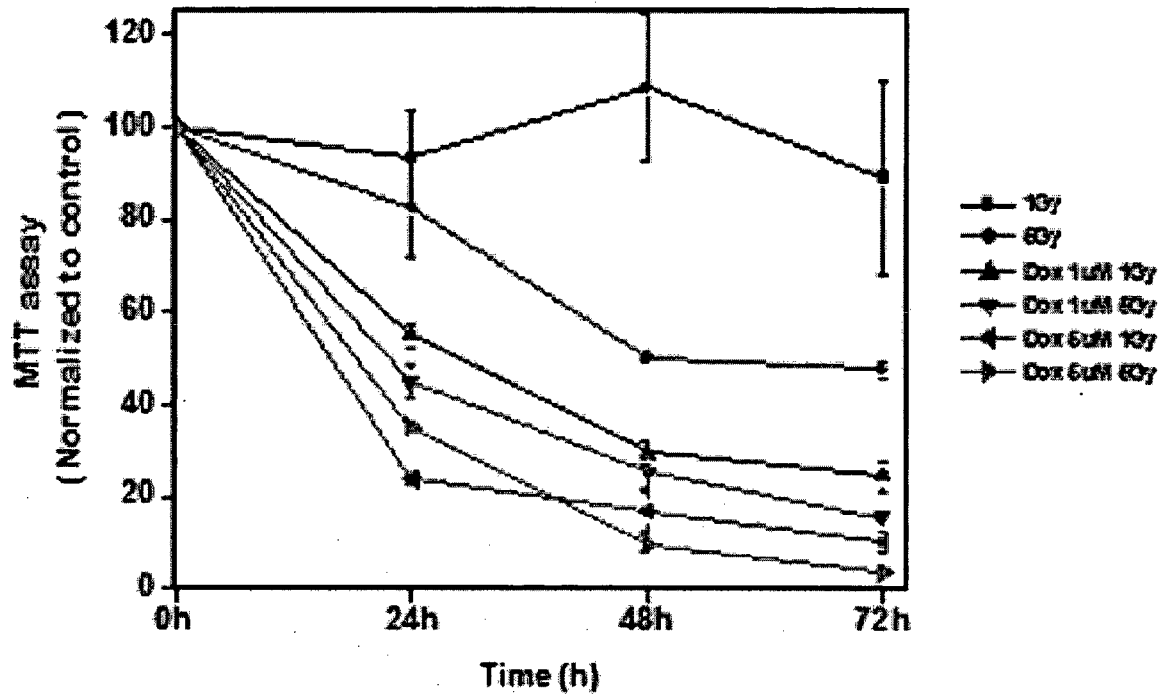
【도 9c】

KGDEVD-DOX MTT assay

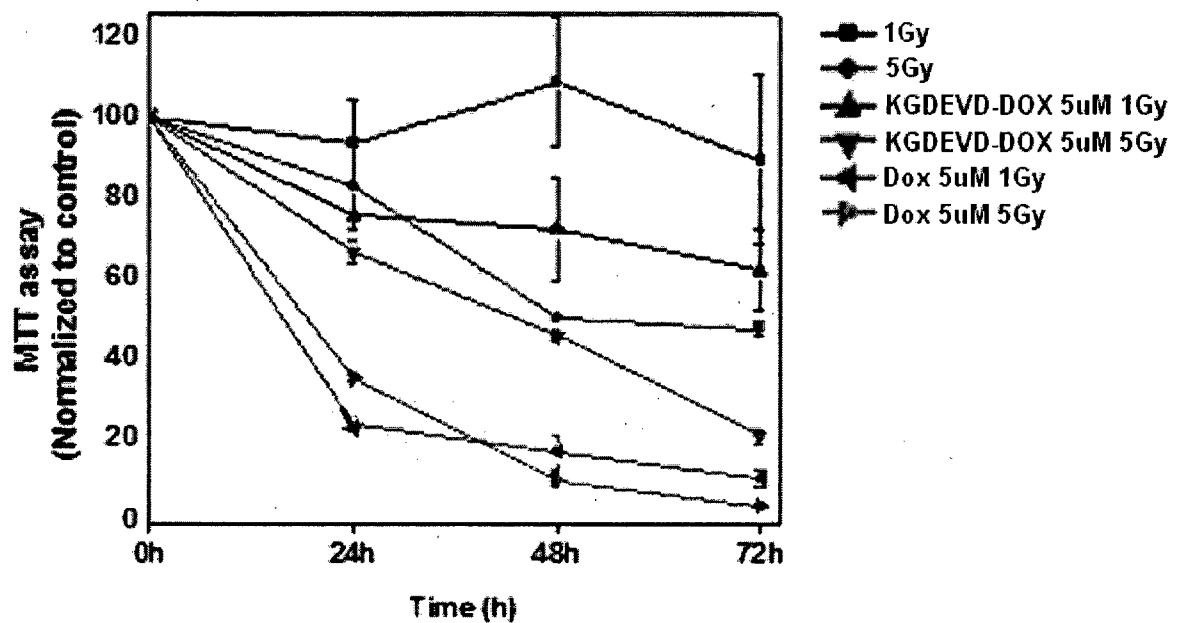
【도 9d】

Cleaved Dox by Caspase-3

【도 9e】

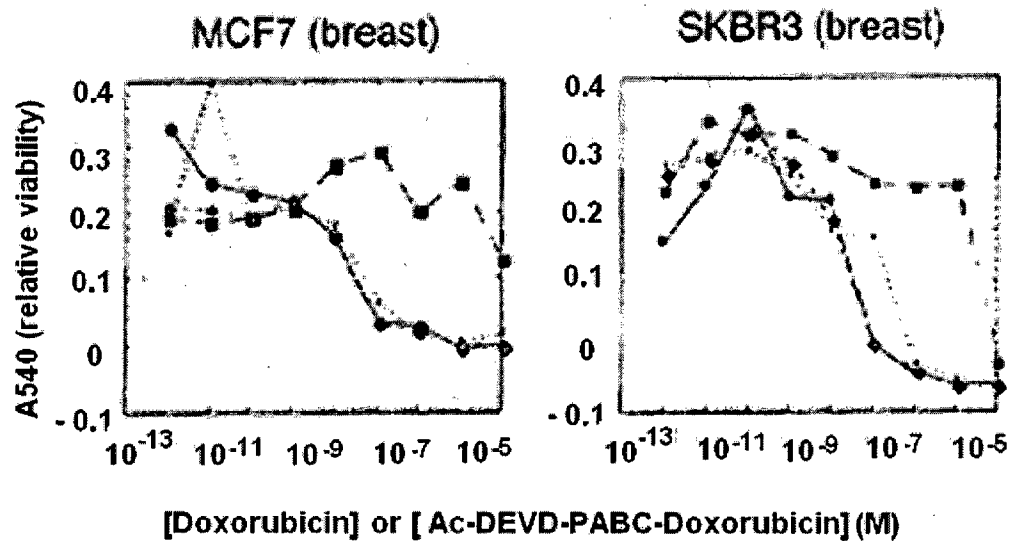
Doxorubicin + RT MTT assay

【도 9f】

KGDEVD-DOX + RT MTT assay

【도 10a】

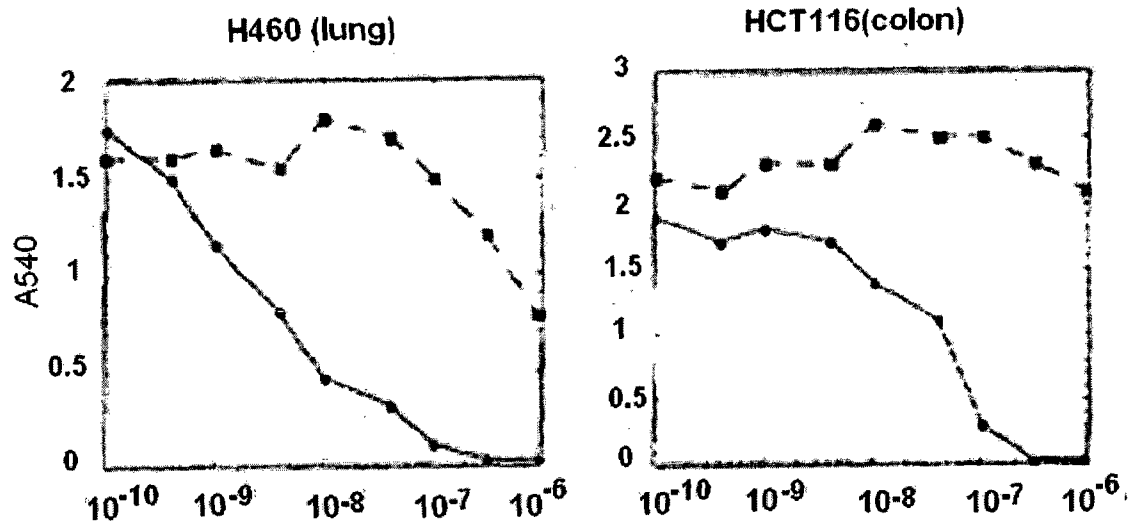
***In vitro* Cytotoxicity of Ac-DEVD-PABC-Doxorubicin**
120h (5day)



- Doxorubicin
- ▲ Doxorubicin + Caspase 3
- Ac-DEVD-PABC-Doxorubicin
- ✱ Ac-DEVD-PABC-Doxorubicin + Caspase 3

【도 10b】

Ac-DEVD-PABC-독소루비신의 생체외 (In vitro) 세포독성
72 h (3 day)

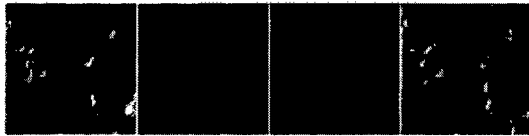
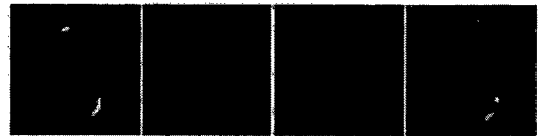
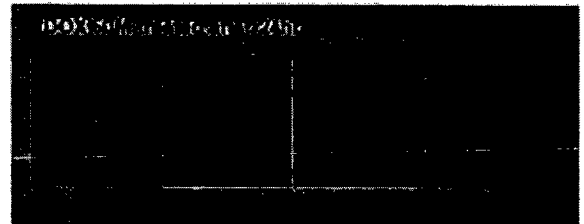
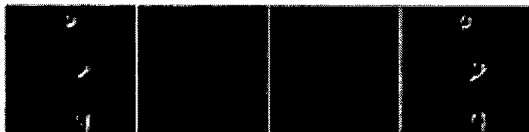


[독소루비신] or [Ac-DEVD-PABC-독소루비신] (M)

● 독소루비신

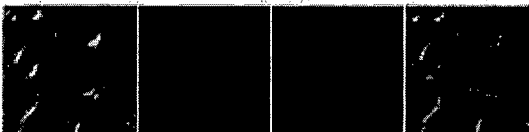
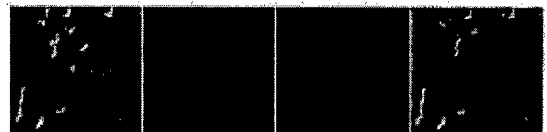
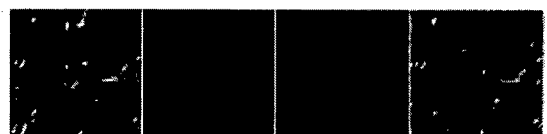
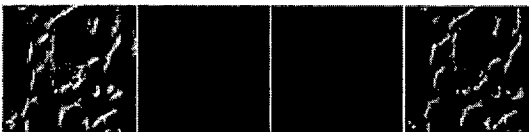
■ Ac-DEVD-PABC-독소루비신

【도 11】

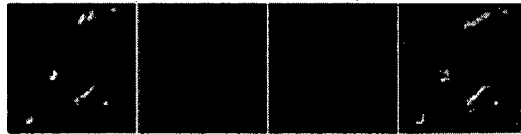
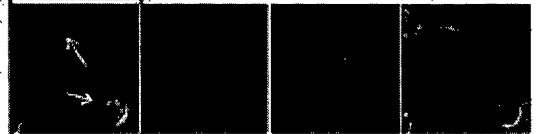
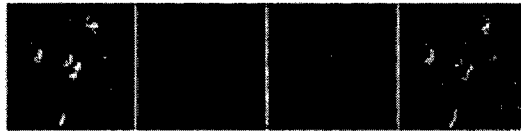
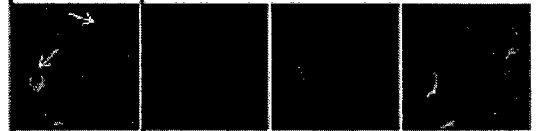
DOX 5 μ M 처리 1시간 후DOX 5 μ M 처리 12시간 후DOX 5 μ M 처리 3시간 후DOX 5 μ M 처리 24시간 후DOX 5 μ M 처리 6시간 후

90% < cell death

【도 12】

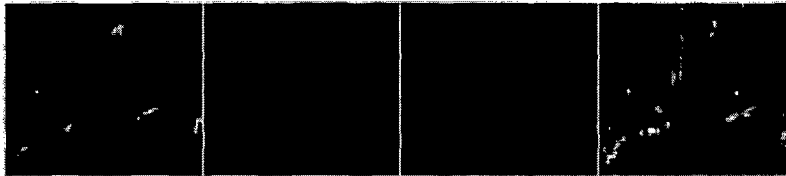
KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 3시간 후KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 24시간 후KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 6시간 후KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 48시간 후KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 12시간 후KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 72시간 후

【도 13】

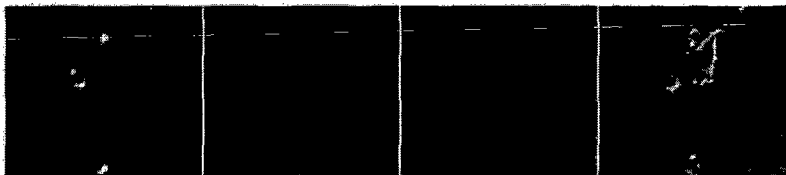
케스파미즈-3으로 절단된 Dox 5 μ M 처리 3시간 후케스파미즈-3으로 절단된 Dox 5 μ M 처리 24시간 후케스파미즈-3으로 절단된 Dox 5 μ M 처리 6시간 후케스파미즈-3으로 절단된 Dox 5 μ M 처리 48시간 후케스파미즈-3으로 절단된 Dox 5 μ M 처리 12시간 후케스파미즈-3으로 절단된 Dox 5 μ M 처리 72시간 후

【도 14】

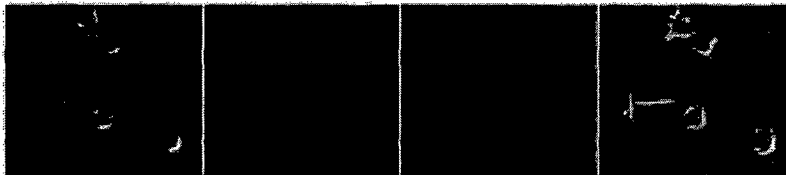
KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 24시간 후
및 5Gy 조사 3시간 후



KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 24시간 후
및 5Gy 조사 6시간 후



KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 24시간 후
및 5Gy 조사 12시간 후



KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 24시간 후
및 5Gy 조사 24시간 후



KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 24시간 후
및 5Gy 조사 48시간 후

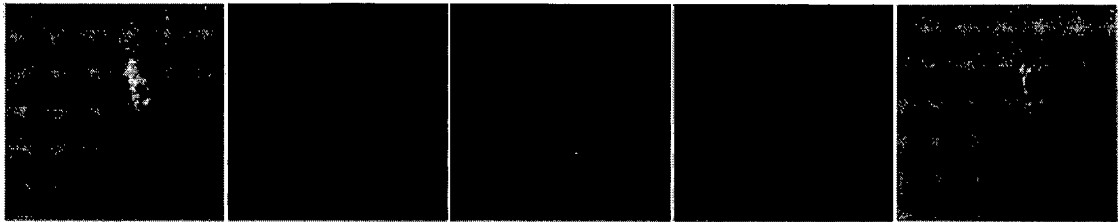


KGDEVD-DOX 5 μ M 처리 24시간 후
및 5Gy 조사 72시간 후

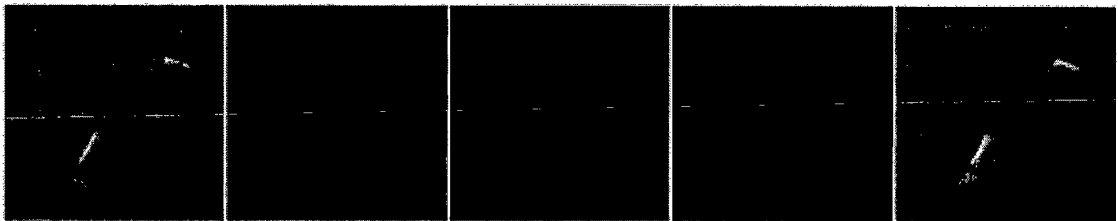


【도 15】

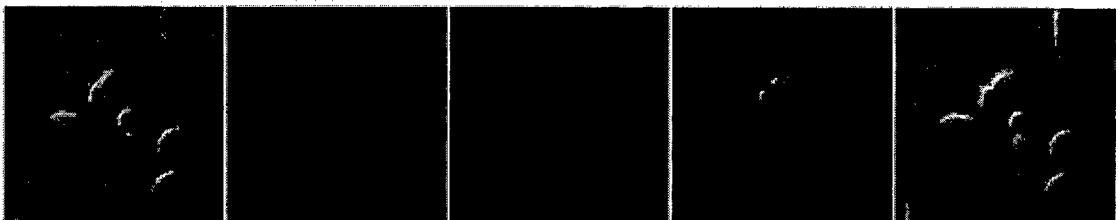
KGDEVD-DOX 5uM 처리 24시간 후 + 자외선 무처리



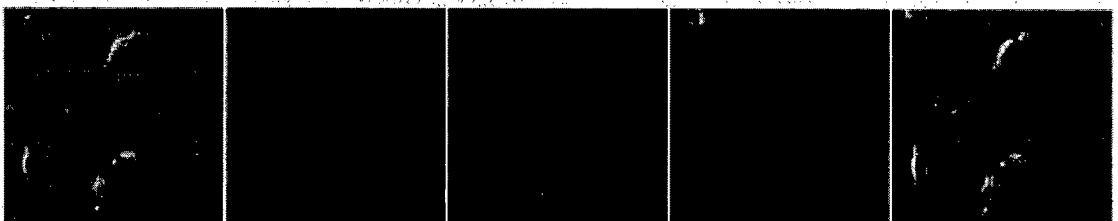
KGDEVD-DOX 5uM 처리 24시간 후 + 자외선 처리 3시간 후



KGDEVD-DOX 5uM 처리 24시간 후 + 자외선 처리 6시간 후



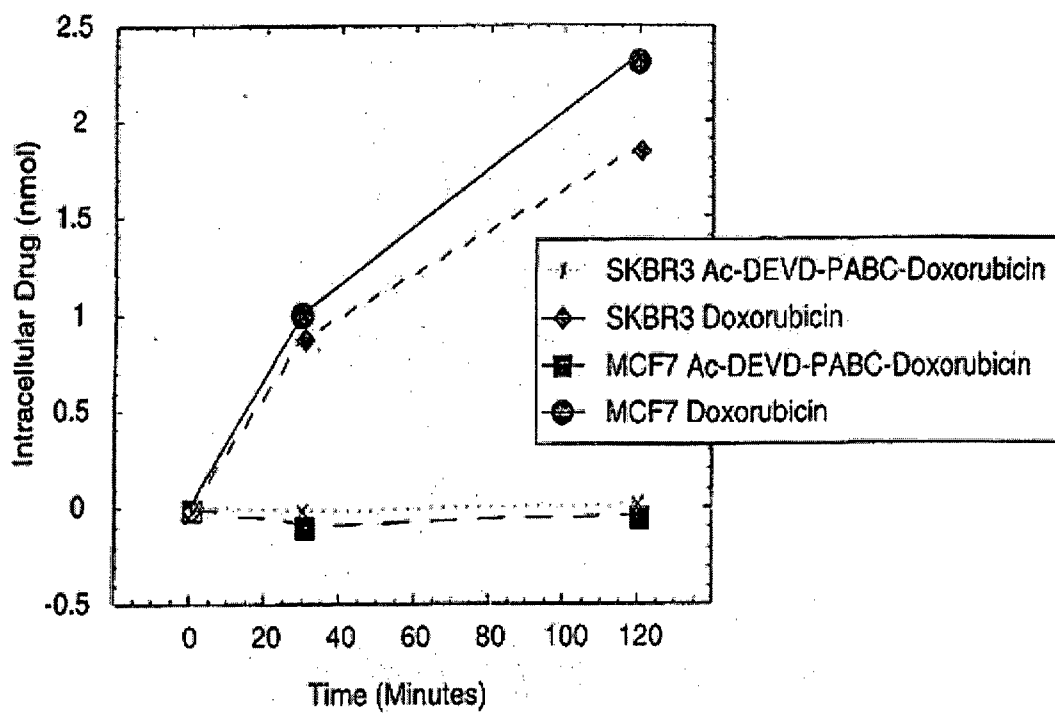
KGDEVD-DOX 5uM 처리 24시간 후 + 자외선 처리 12시간 후



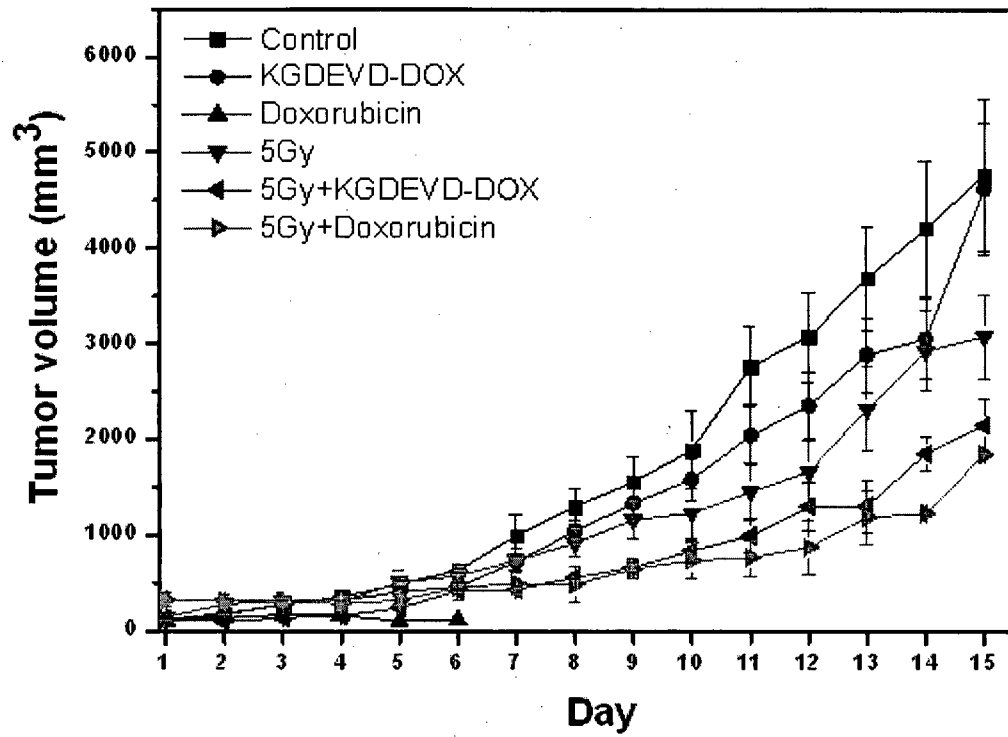
KGDEVD-DOX 5uM 처리 24시간 후 + 자외선 처리 24시간 후



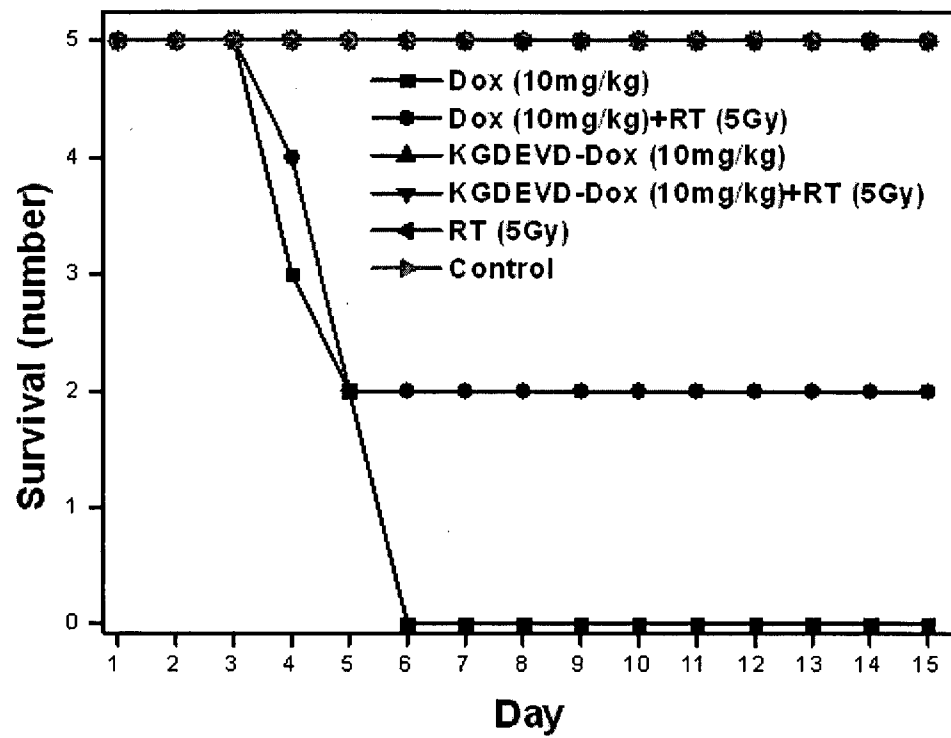
【도 16】

Cellular Accumulation of Ac-DEVD-PABC-Doxorubicin

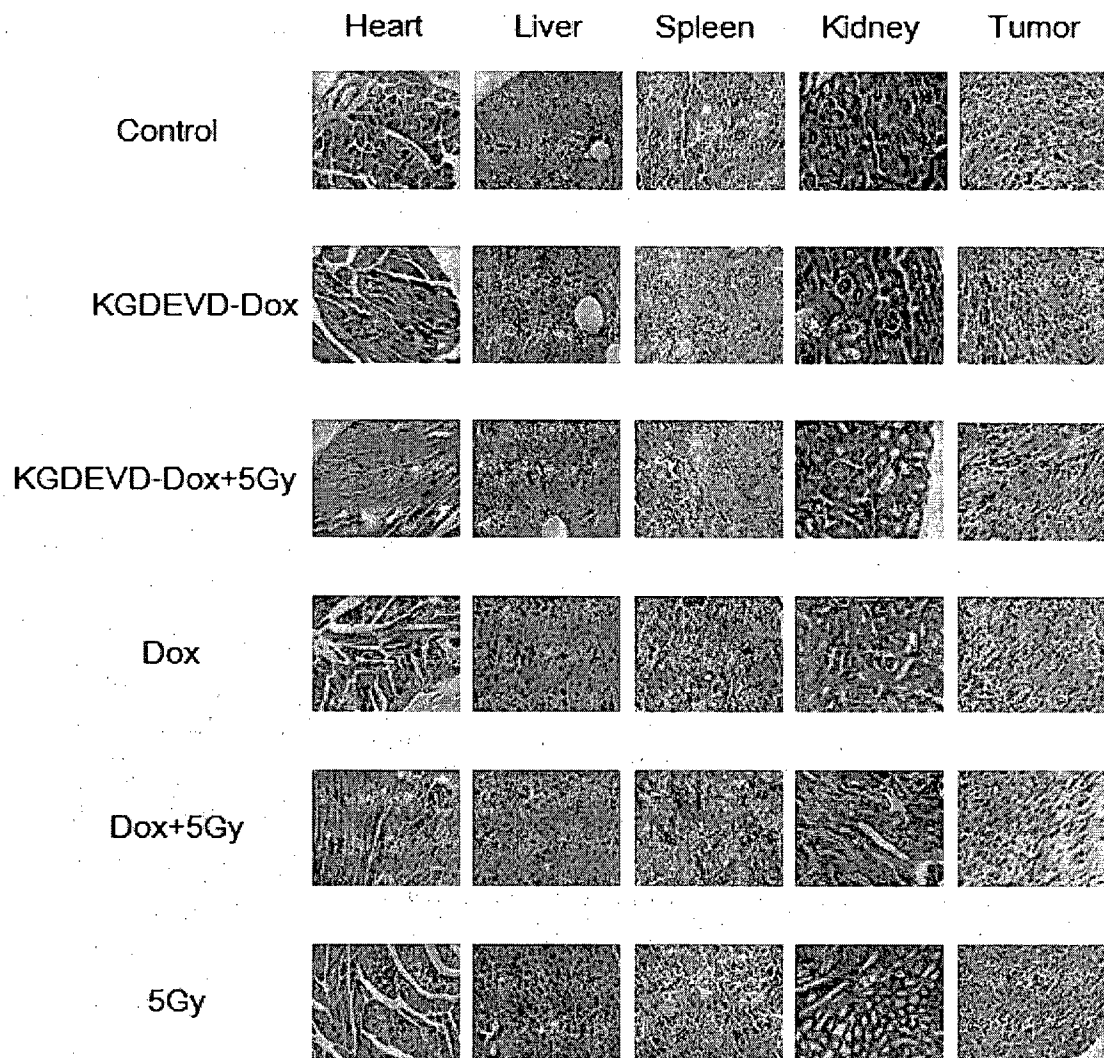
【도 17a】



【도 17b】



【도 18】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/001438**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 38/08(2006.01)i, A61K 31/7042(2006.01)i, A61K 31/337(2006.01)i, A61K 51/00(2006.01)i, A61K 51/08(2006.01)i
A61P 35/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: caspase, doxorubicin, anticancer drug, prodrug, KGDEV, acetylation, linker, radiation, ultraviolet rays

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAW, B. & TUNG, C. H., BIOCONJUGATE CHEMISTRY (2009) VOL.20, NO.9, pages 1685-1695 See abstract; tables 1,2; figures 1-12.	1-10
A	STEFFLOVA, K. et al., MOLECULAR IMAGING (2006) VOL.5, NO.4, pages 520-532 See abstract; figures 1,2.	1-10
A	RAI, P. et al., ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS (2010) VOL.62, pages 1094-1124 See the entire document.	1-10
A	WOJTYK, J. T. C. et al., MEDICAL LASER APPLICATION (2006) VOL.21, pages 225-238 See the entire document.	1-10
A	KIM, S. et al., EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS (2009) VOL. 71, pages 420-430 See the entire document.	1-10
A	TAMM, I. et al., CANCER RESEARCH (1998) VOL. 58, pages 5315-5320 See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 DECEMBER 2011 (20.12.2011)

Date of mailing of the international search report

21 DECEMBER 2011 (21.12.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/001438

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/08(2006.01)i, A61K 31/7042(2006.01)i, A61K 31/337(2006.01)i, A61K 51/00(2006.01)i, A61K 51/08(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/08 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 케스케이즈, 독소루비신, 항암제, 전구약물, KGDEVD, 아세틸화, 링커, 방사선, 자외선		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LAW, B. & TUNG, C. H., BIOCONJUGATE CHEMISTRY (2009) VOL.20, NO.9, pages 1683-1695 초록; 표 1,2; 그림 1-12 참조.	1-10
A	STEFFLOVA, K. 외 2명, MOLECULAR IMAGING (2006) VOL.5, NO.4, pages 520-532 초록; 그림 1,2 참조.	1-10
A	RAI, P. 외 7명, ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS (2010) VOL.62, pages 1094-1124 전문 참조.	1-10
A	WOJTYK, J. T. C. 외 3명, MEDICAL LASER APPLICATION (2006) VOL.21, pages 225-238 전문 참조.	1-10
A	KIM, S. 외 4명, EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS (2009) VOL.71, pages 420-430 전문 참조.	1-10
A	TAMM, I. 외 6명, CANCER RESEARCH (1998) VOL.58, pages 5315-5320 전문 참조.	1-10
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2011년 12월 20일 (20.12.2011)		국제조사보고서 발송일 2011년 12월 21일 (21.12.2011)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 정재철 전 화번호 82-42-481-8403 

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음