(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 11 월 21 일 (21.11.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/237414 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 47/54 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01) *C07D 495/14* (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/020713

(22) 국제출원일: 2023 년 12 월 15 일 (15.12.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0063234 2023 년 5 월 16 일 (16.05.2023) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김광명 (**KIM, Kwangmeyung**); 02715 서울특별시 성북구 길음로 119, 228동 1501호, Seoul (KR). 전성익 (**JEON, Seong Ik**); 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR). 조한희 (**CHO, Hanhee**); 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

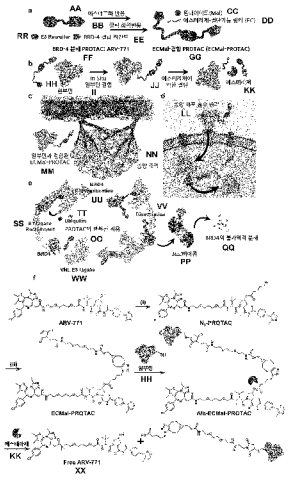
(74) 대리인: 특허법인 충현 (**CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM**); 06779 서울특별시 서초구 동산로 23 베델회관 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** CANCER TARGETING COMPLEX, AND COMPOSITION COMPRISING SAME FOR PREVENTING OR TREATING CANCER

(54) **발명의 명칭:** 암 표적용 복합체, 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물



(57) **Abstract:** As a cancer targeting complex according to the present invention, immediately binds to albumin, when administered in vivo, and exists in a stable and inactive state, the cancer targeting complex may provide enhanced cancer treatment, prevention, and amelioration effects specific to cancer tissue without exhibiting toxicity to normal tissue.

(57) **요약서:** 본 발명은 암 표적용 복합체는 생체내에 투여되면, 그 즉시 알부민과 결합하여 안정되고 비활성화된 상태로 존재하므로, 정상조직에 대해서는 독성을 나타내지 않으면서, 암 조직에 특이적인 향상된 암 치료, 예방 및 개선 효과를 제공할 수 있다.

WO 2024/237414 A1

[다음 쪽 계속]

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 암 표적용 복합체, 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 암 표적용 복합체에 관한 것으로, 보다 구체적으로 암을 표적하고, 암세포에 효율적으로 흡수되어 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 복합체 및 이를 포함하는 암 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 세계보건기구 산하 국제암연구소의 통계에 따르면, 우리나라의 대장암 발생률은 세계 1위로 나타났으며, 인구고령화 및 비만, 변화된 식습관 등으로 인해 한국인의 발병 암 중에 상위에 자리하고 있다. 암 치료를 위해 다양한 화학 치료제, 면역 치료제, 표적 치료제가 개발되었으며 그 중 표적 치료제의 경우 암세포를 특이적으로 표적하여 세포 성장억제나 사멸에 우수한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 하지만 표적 치료제의 경우 환자의 유전적 특성에 따라 치료 반응성 매우 다르게 나타나는 문제점이 있다. 실제로, 세툭시맙(Cetuximab, 얼비툭스®)과 같은 항-EGFR 약제는 암에 대한 효과적인 1순위 치료법으로 알려져 있지만 일부 환자만이 항-EGFR 치료제에 대해 반응성이 있다. 더욱이 항-EGFR 치료에는 상당한 비용이 들지만, 약물 반응성을 예측하기가 어려워서 임상에서 많은 환자들에게 항-EGFR 약제가 투여되지만, 실제 소수의 환자(20%)에게만 효과가 나타나는 문제가 있다.

[3] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 프로탁(PROTAC)이 개발되었다. 이들은 POI들의 활성화 부위 접근이 요구되지 않으므로 '개발하기 어려운(undruggable)' 단백질의 처리에 효과적이였다. 그러나 PROTAC은 작은 분자 구조 및 소수성 때문에 항암제로써 효능이 너무 낮아, 임상에서 충분한 효과를 얻지 못하고 있는 실정이다. PROTAC의 단점을 개선하기 위하여 마이셀, 리포좀 및 나노입자를 포함하는 나노물질들이 개발되었으나, 담체로 사용된 나노물질에 의한 부작용 문제가 확인되었다.

[4] 따라서 PROTAC의 문제를 해결하면서도, 우수한 항암 효과를 얻을 수 있는 새로운 플랫폼 형태의 항암제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[5] 특허문헌 1. 대한민국 등록특허공보 제10-1930399 호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명은 생체 내에서 알부민과 결합하여 안정화 및 비활성화 상태로 존재하는 암 표적용 복합체 및 이의 용도를 제공하고자 하는 것이다.

[7] 본 발명의 다른 목적은 암세포에 특이적으로 침투할 수 있는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

[8] 본 발명의 다른 목적은 상기와 같은 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, (i) 말레이미드(maleimide) 기능기; (ii) 상기 기능기에 연결된 esterase에 의해 절단 가능한 링커; 및 (iii) 상기 링커에 연결되는 프로탁(PROTAC);을 포함하는 암 표적용 복합체를 제공한다.

[10] 상기 링커는 G, GG 및 GGG로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 링커, PABC(p-aminocarbamate), MBA(N,N'-mythylenebisacrylamide), 알킬렌 링커, 아릴렌 링커, 폴리알킬렌 옥사이드 링커(예컨대, PEG), NHS 에스테르 링커, Triazene 링커, 하이드라존 링커, 다이설파이드 링커, 글루쿠로나이드-MABC 링커, Y-S-Z 링커 및 디알콕시디페닐실란 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커이며, 상기 Y는 아지드(N3), 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N)이고, 상기 Z는 테트라진, 트랜스-시클로옥텐 및 시클로옥텐으로부터 선택되는 어느 하나이고, 상기 S는 올리고 또는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 덱스트란 및 탄소수 1 내지 10의 알킬로부터 선택되는 어느 하나이다.

[11] 상기 프로탁(PROTAC)은 CDK9(Cyclin-dependent kinase 9)/CDK family, BRD4(Bromodomain-containing protein 4)/BET(Bromodomain and extra-terminal) family, SHP-2(Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2), AR(Androgen receptor), ER(Estrogen receptor), RAR(Retinoic acid receptor), ERRα(Estrogen-related receptor alpha), BTK(Bruton's tyrosine kinase), ALK(Anaplastic lymphoma kinase), RIPK(Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase), c-Met(MET proto-oncogene/receptor tyrosine kinase), FAK(Focal adhesion kinase), IRAK4(Interleukin-1 receptor-associated kinase 4), p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinases), SGK(Serum and glucocorticoid-regulated kinase), TBK1(TANK-binding kinase 1), KRAS(Kirsten rat sarcoma virus protein), B-Raf(B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase), β-catenin, FKBP(FK506 binding protein), IDO(Indoleamine 2,3-dioxygenase), PD-1/PD-L1(Programmed death protein 1/programmed death-ligand 1), PARP1(Poly [ADP-ribose] polymerase 1), PRC2(Polycomb repressive complex 2), EGFR(Epidermal growth factor receptor), Sirt2(NAD-dependent deacetylase sirtuin 2), HER2/ERBB2(Human epidermal growth factor receptor 2), FRS2(Fibroblast growth factor receptor substrate 2), BCL-XL(B-cell lymphoma-extra large), SMARCA(SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A), HDM2(Human double minute

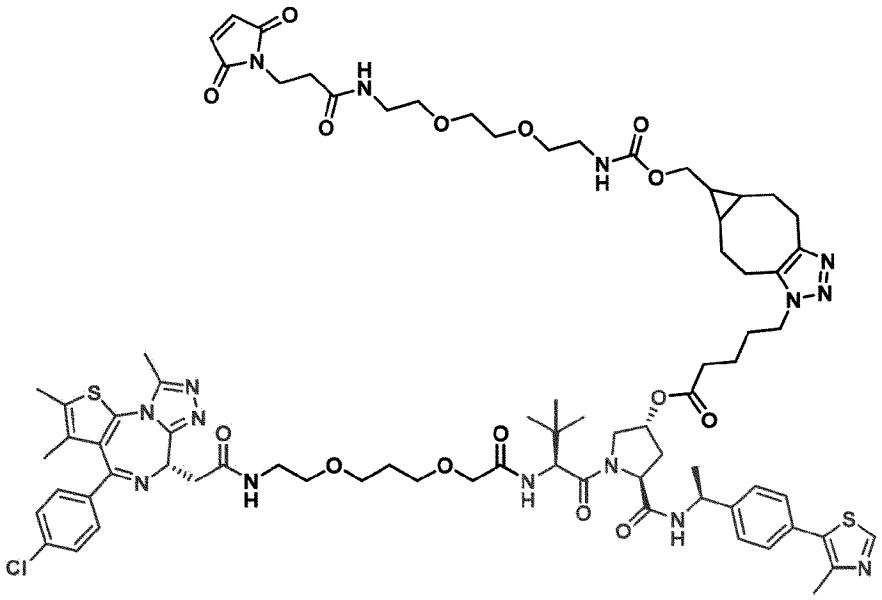
2 homolog), HDAC(Histone deacetylase) family, BCR-ABL(Breakpoint cluster region protein- Tyrosine-protein kinase ABL1), MCL1(Modulator Of VRAC Current 1), FLT-3(Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3), STAT3(Transcription factor STAT3), Myc family 및 BAF complex(Brg/Brahma-associated factors)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 타겟으로 하는 것일 수 있다.

[12] 상기 링커는 Y-S-Z(Y는 아자이드(N3)기 또는 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N, 여기서 R'는 탄소수 1 내지 6의 알킬기)이고, Z는 트랜스-시클로옥텐 또는 시클로옥텐이며, S는 폴리(에틸렌 글리콜))이거나, 1 내지 3개의 글리신(G)으로 이루어진 펩타이드 링커와 폴리(에틸렌 글리콜)의 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커일 수 있다.

[13] 상기 암 표적용 항암제는 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 것일 수 있다.

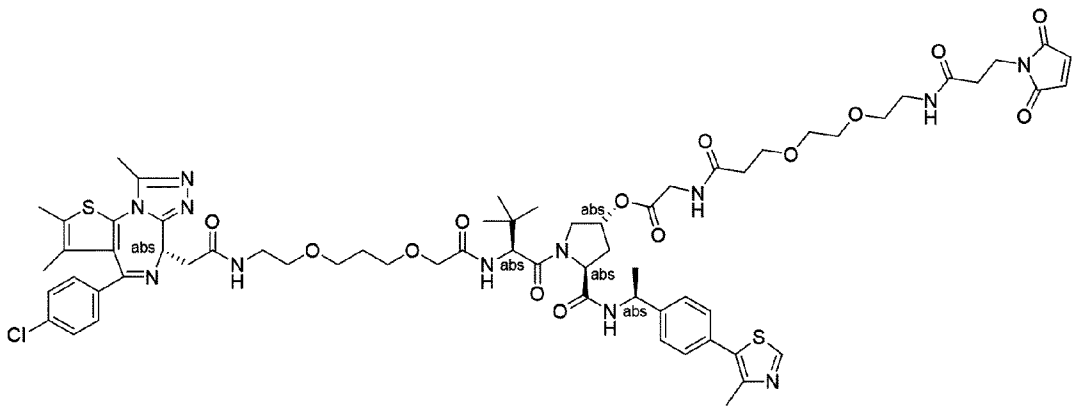
[14] [화학식 1]

[15]



[16] [화학식 2]

[17]



[18] 상기 암 표적용 복합체는 생체 내에 존재하는 알부민과 결합하여, 안정화 및 비활성화된 형태로 형성되는 것일 수 있다.

[19] 상기 암 표적용 복합체는 암 세포로 침투하여, 암 세포 내에 존재하는 esterase에 의해 절단되어 PROTAC을 방출하는 것일 수 있다.

[20] 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여, 본 발명은 암 표적용 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[21] 상기 암 표적용 복합체는 생체 내에 존재하는 알부민과 결합하여, 안정화 및 비활성화된 형태로 형성되는 것일 수 있다.

[22] 상기 암은 뇌종양, 두경부암, 유방암, 폐암, 식도암, 위암, 십이지장암, 충수암, 대장암, 직장암, 간암, 췌장암, 담낭암, 담관암, 항문암, 신암, 수뇨관암, 방광암, 전립선암, 음경암, 정소암, 자궁암, 난소암, 외음암, 질암 및 피부암으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[23] 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여, 본 발명은 암 표적용 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[24] 또한, 본 발명은 암 표적용 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[25] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 암 표적용 복합체의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[26] 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 생체 내에 투여되면, 그 즉시 알부민과 결합하여 안정되고 비활성화된 상태로 존재하므로, 정상조직에 대해서는 독성을 나타내지 않으면서, 암 조직에 특이적인 향상된 암 치료, 예방 및 개선 효과를 제공할 수 있다.

[27] 특히, 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 혈관 근처에 위치하는 암 조직뿐만 아니라, 암 조직의 중심에 위치하는 암 세포에 까지 깊게 침투하므로 동량의 항암제에 비해 항암 효과가 월등히 높다.

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 본 발명에 따른 암 표적용 복합체의 구조와, 이의 약동학 과정을 개략적으로 도시한 도면이다. 도 1a는 본 발명에 따른 알부민-결합 esterase 절단가능한 BRD4-분해 PROTAC(ECMal-PROTAC)의 합성과정을 도시한 것이다. 도 1b는 본 발명에 따른 ECMal-PROTAC가 혈관내에서 혈장 알부민과 티올-말레이티드 반응을 통해 특이적으로 결합하고 분해되는 과정을 도시한 것이다. 도 1c는 ECMal-PROTAC가 알부민과 결합된 후, EPR 효과를 통해 암조직에 선택적으로 축적되는 과정을 도시한 것이다. 도 1d는 알부민 결합 ECMal-PROTAC가 선택적으로 암세포 내에 용이하게 유입되고, 암세포 내에서 절단되어 유리 ARV-771을 방출하는 과정을 도시한 것이다. 도 1e는 PROTAC의 암세포 내에서 작용하는 기전을 도시한 것으로, 유리 ARV-771은 BRD4와 VHL E3 리가아제 모두에 동시에 결합하여 BRD4의 폴리유비퀴틴화를 유도한다. 이후 BRD4/ARV-771/E3 리가아제 복합체는 해리되고 폴리유비퀴틴화된 BRD4는 프로테아좀(proteasome)에 의해 인신

되어 올리고펩티드로 분해된다. 해리된 ARV-771은 재활용되어 다른 BRD4의 분해에 참여한다.

[29] 도 1f는 본 발명에 따른 암 표적용 복합체의 합성과정과 암 세포 내에서의 약리기전을 도시한 것이다.

[30] 도 2는 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 화학적 구조를 도시한 것이다.

[31] 도 3a는 ARV-771, N3-PROTAC 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 HPLC 스펙트럼이다.

[32] 도 3b는 실시예 1로부터 제조된 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 LC-MS 스펙트럼이다($[M] + H^+ = 1586.7$ m/z).

[33] 도 3c, 도 3d는 실시예 2로부터 제조된 ECMal-PROTAC의 HPLC와 LC-MS 스펙트럼이다.

[34] 도 4는 BSA 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물의 HPLC 스펙트럼이다.

[35] 도 5는 BSA(Alb) 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물에 대한 LC-MS 스펙트럼이다.

[36] 도 6은 BSA와 ARV-771 혼합물, 티올기가 블록된 BSA(thiol-blocked BSA)와 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물, 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 및 BSA에 대한 HPLC 스펙트럼이다.

[37] 도 7은 도 4 및 도 6으로부터 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)와 연관된 HPLC 피크영역 감소를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[38] 도 8은 알부민(BSA, albumin)과 결합하기 전과 후의 실시예 1에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)에 대한 DLS 분석 결과이다.

[39] 도 9는 Albumin-ECMal-PROTAC에 esterase(15 unit)으로 처리한 후, 시간에 따라 HPLC로 분석한 결과이다.

[40] 도 10은 Cy5.5-ARV-771 또는 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC로 처리한 4T1 암세포를 공초점 현미경으로 촬영한 사진이고, 도 11은 Cy5.5-ARV-771 또는 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC로 처리한 4T1 암세포에서 세포 내 형광강도를 정량화하여 도시한 그래프이다.

[41] 도 12는 ARV-771 또는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 4T1 암세포에 처리한 후, 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

[42] 도 13은 ARV-771 또는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 처리한 4T1 암세포에서 c-Myc(a) 및 Bcl-2(b)의 상대적인 발현 수준을 정량화한 그래프이다.

[43] 도 14는 ARV-771 또는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 농도에 따른 BRD4 발현 수준을 정량화한 그래프이다.

[44] 도 15는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)(a), 실시예 2의 암 표적용 복합체(Mal-PROTAC)(b)를 4T1 암세포 또는 MDA-MB231에 처리한 후, 생존율을 분석한 그래프이다.

[45] 도 16은 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)에서 투여 시간에 따른 혈장내 농도를 분석한 약동학 프로파일이다.

[46] 도 17은 시간별 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)에 대한 NIRF(non-invasive near-infrared fluorescence) 사진이다.

[47] 도 18은 도 17의 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)의 결과로부터 암 조직의 형광신호만을 정량화한 그래프(**** $p < 0.0001$)이다.

[48] 도 19는 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 주요 장기(간, 폐, 비장, 신장, 심장) 및 암 조직을 채취하고, 이의 생체외 형광 이미지(a)와 정량화된 형광강도 그래프(b)이다.

[49] 도 20은 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 채취한 암 조직의 형광 이미지(상), 정량화된 형광강도 그래프(하)이다(*** $p < 0.001$).

[50] 도 21은 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 적출한 암 조직에 대한 확대된 형광 이미지이다.

[51] 도 22는 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 적출한 암 조직을 DAPI와 CD31 마커로 염색한 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 촬영한 이미지이다.

[52] 도 23은 시료 대신 식염수를 투여한 대조군(Saline, control)의 암 조직을 DAPI와 CD31 마커로 염색한 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 촬영한 이미지이다.

[53] 도 24는 대조군(control, Saline), 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 적출된 암 조직의 단면에 대한 형광신호를 도형화한 그래프이다.

[54] 도 25는 시간별 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 측정된 암 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다(유의차를 나타내지 않으면 ns로 표기하였다. **** $p < 0.0001$).

[55] 도 26은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출한 암 조직에 대한 광학 이미지이다.

[56] 도 27은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출한 암 조직을 TUNEL 염색한 후, 촬영한 공초점 레이저 스캐닝 이미지이다.

[57] 도 28은 대조군, 비교군 및 실험군의 체중 변화를 분석하여 나타낸 그래프이다.

[58] 도 29는 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 장기 조직(간, 폐, 비장, 신장, 심장) 및 암 조직에 대한 조직학적 분석 결과이다.

[59] 도 30은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 간 조직에 대한 TUNEL 분석 결과이다,

[60] 도 31은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 암 조직을 웨스턴 블롯으로 BRD4, c-Myc, Bcl-2의 발현수준을 분석한 결과이다.

[61] 도 32는 도 31의 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다(** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

[62] 도 33은 대조군(Control, Saline), 비교군(ARV-771, 정맥투여) 및 실험군(ECMal-PROTAC, 정맥투여)으로부터 적출된 암조직을 DAPI, 항-BRD4, 항-c-Myc로 염색한 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 촬영한 사진이다.

[63] 도 34는 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 암 조직을 DAB로 염색한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[64] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[65]

[66] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[67] 본 명세서에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라, 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[68] 본 발명의 일 측면은 (i) 말레이미드(maleimide) 기능기; (ii) 상기 기능기에 연결된 esterase에 의해 절단 가능한 링커; 및 (iii) 상기 링커에 연결되는 프로탁(PROTAC);을 포함하는 암 표적용 복합체에 관한 것이다.

[69] 상기 링커는 G, GG 및 GGG로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 링커, PABC(p-aminocarbamate), MBA(N,N'-mythylenebisacrylamide), 알킬렌 링커, 아릴렌 링커, 폴리알킬렌 옥사이드 링커(예컨대, PEG), NHS 에스테르 링커, Triazene 링커, 하이드라존 링커, 다이설파이드 링커, 글루쿠로나이드-MABC 링커, Y-S-Z 링커 및 디알콕시디페닐실란 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커이며, 상기 Y는 아지드(N3), 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N)이고, 상기 Z는 테트라진, 트랜스-시클로옥텐 및 시클로옥텐으로부터 선택되는 어느 하나이고, 상기 S는 올리고 또는 폴리(에틸렌글리콜)(PEG), 덱스트란 및 탄소수 1 내지 10의 알킬로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[70] 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는, 생체 주입시 생체 내 혈관에 존재하는 내생 알부민과 티올-말레이미드 반응을 통해 결합한다. 이러한 구조적 특징으로 인하

여 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 종래 PROTAC이 갖고 있던 낮은 생체이용율, 종양 조직에 대한 낮은 표적 및 축적율 문제를 개선할 뿐만 아니라, 암 치료, 예방 및 개선 효과가 현저히 우수하다.

[71] 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 알부민이 결합된 복합체로 존재하여, 암 세포에 엔도사이토시스(endocytosis)를 통해 암세포 내에 용이하게 축적되고, 암세포 내에 존재하는 에스테라제에 의해 PROTAC을 방출하며, BRD4 분해활성을 회복함으로써, 암세포 특이적 사멸 효과를 가질 수 있다.

[72] 도 1은 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 구조와 약동학적 기전에 대해 개략적으로 도시한 것이다. 이를 참조하여 본 발명에 따른 암 표적용 복합체를 설명하면, 본 발명의 암 표적용 복합체는 알부민과 결합 가능한 말레이미드 기능기(ECMal)가 프로탁(PROTAC)과 결합하여 형성된 복합체로, 상기 말레이미드 기능기와 프로탁은 직접 결합하거나 링커를 통해 결합될 수 있다.

[73] 상기 사용가능한 링커로는 에스테라제 특이적으로 절단가능한 링커라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 G, GG 및 GGG로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 링커, PABC(p-aminocarbamate), MBA(N,N'-mythylenebisacrylamide), 알킬렌 링커, 아릴렌 링커, 폴리알킬렌 옥사이드 링커(예컨대, PEG), NHS 에스테르 링커, Triazene 링커, 하이드라존 링커, 다이설파이드 링커, 글루쿠로나이드-MABC 링커, Y-S-Z 링커 및 디알콕시디페닐실란 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커이며, 상기 Y는 아지드(N3), 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N)이고, 상기 Z는 테트라진, 트랜스-시클로옥텐 및 시클로옥텐으로부터 선택되는 어느 하나이고, 상기 S는 올리고 또는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 덱스트란 및 탄소수 1 내지 10의 알킬로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[74] 본 발명에서 펩타이드 링커란, 펩타이드 잔기로만 이루어진 링커로, 암세포 내에 특이적으로 과량 존재하는 esterase 효소에 의해 절단가능하다면 특별히 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 G, GG, GGG 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[75] 본 발명에서 비펩타이드 링커란, 펩타이드가 아닌 화합물로 이루어진 링커로, 암세포 내에 특이적으로 과량 존재하는 esterase 효소에 의해 절단가능하다면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 PABC(p-aminocarbamate), MBA(N,N'-mythylenebisacrylamide), 알킬렌 링커, 아릴렌 링커, 폴리알킬렌 옥사이드 링커(예컨대, PEG), NHS 에스테르 링커, Merrifield 링커, Wang 링커, Sasrin 링커, Tritiyl 링커, RINK-amide 링커, Kenner 링커, Silyl 링커, Triazene 링커, 하이드라존 링커, 다이설파이드 링커, 글루쿠로나이드-MABC 링커, Y-S-Z 링커 및 디알콕시디페닐실란 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 Y는 아지드(N3), 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N)이고, 상기 Z는 테트라진, 트랜스-시클로옥텐 및 시클로옥텐으로부터 선택되는 어느 하나이고,

상기 S는 올리고 또는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 덱스트란 및 탄소수 1 내지 10의 알킬로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 폴리알킬렌 옥사이드 링커(예컨대, PEG) 또는 Y-S-Z 링커일 수 있다.

[76] 본 발명에서 알킬렌 링커는 탄소수 2 내지 20의 알킬렌 링커, 바람직하게는 탄소수 2 내지 8의 알킬렌 링커일 수 있다. 상기 아릴렌 링커는 탄소수 6 내지 탄소수 30의 아릴렌기로 이루어진 링커일 수 있다.

[77] 상기 알킬아자이드는 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드로, -R'=N=N=N으로 표시될 수 있으며, 상기 R'는 탄소수 1 내지 6의 알킬기일 수 있다.

[78] 상기 사이클로옥텐은 다이벤질사이클로옥틴(DBCO), 다이플루오로사이클로옥틴(DIFO), 바이사이클로노닌(BCN), 다이벤조아자사이클로옥틴(DIBAC), 다이벤조사이클로옥티놀(DIBO) 및 아자다이벤조사이클로옥틴(ADIBO)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[79] 본 발명에서 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커란, 펩타이드 링커와 비펩타이드 링커가 결합되어 형성된 형태의 링커를 의미하며, 결합 순서는 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 펩타이드 링커-비펩타이드 링커 순으로 결합된 것일 수 있다. 상기 펩타이드 링커와 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커의 바람직한 일 예로는 G-(PEG)m(m=1~5), GG-(PEG)m(m=1~5) 또는 GGG-(PEG)m(m=1~5)일 수 있다.

[80] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 링커(ii)는 Y-S-Z(Y는 아자이드(N3)기 또는 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N, 여기서 R'는 탄소수 1 내지 6의 알킬기)이고, Z는 트랜스-시클로옥텐 또는 시클로옥텐이며, S는 폴리(에틸렌 글리콜))이거나, 1 내지 3개의 글리신(G)으로 이루어진 펩타이드 링커와 폴리(에틸렌 글리콜)의 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커일 수 있다.

[81] 본 발명의 암 표적용 복합체는 암 세포 내에 존재하는 esterase에 의해 프로탁(PROTAC)과 링커간의 결합이 절단되어, 프로탁(PROTAC)을 방출하게 된다. 이때, 프로탁(PROTAC)의 일 말단에 링커 화합물이 조금이라도 남아있거나, 프로탁(PROTAC)의 구조에 유실 또는 손상이 발생할 경우 활성이 크게 저하되는 문제가 발생한다. 이러한 점을 고려하여 본 발명에서 다양한 링커에 대해 실험을 수행한 결과, esterase에 의해 절단가능한 링커가 사용되는 것이 바람직함을 확인하여, 본 발명의 암 표적용 복합체를 완성하게 되었다.

[82] 본 발명에서 상기 링커는 암세포에 존재하는 esterase에 의해 프로탁(PROTAC)의 손상이나 잔존없이 완전히 절단되므로 PROTAC의 약효를 그대로 유지할 수 있다는 장점을 갖는다.

[83] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로탁(proteolysis-targeting chimera, PROTAC)"은 E3 ligase 결합 모듈-연결체표적 단백질 결합 모듈로 구성된 플랫폼 기술로서, 질병 유발 표적단백질의 유비퀴틴화를 통해 생체 내 분해를 유도할 수 있으며, 기존의 약물 개발 방식으로부터 유래된 활성지향성(active site-directed) 약물로는 저해하기 어려운 대부분의 질병 유발 단백질을 분해함으로써 저해할 수 있다.

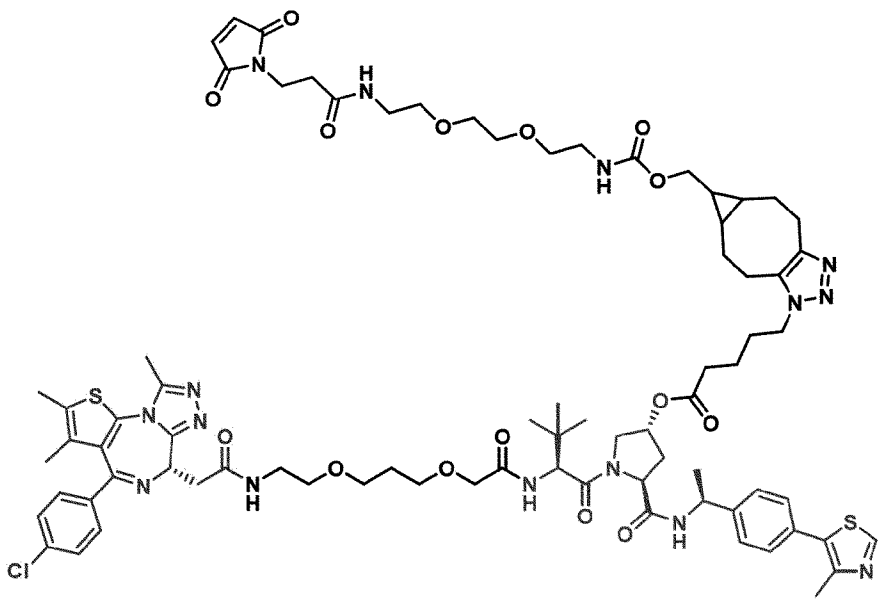
[84] 상기 프로탁(PROTAC)은 CDK9(Cyclin-dependent kinase 9)/CDK family, BRD4(Bromodomain-containing protein 4)/BET(Bromodomain and extra-terminal) family, SHP-2(Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2), AR(Androgen receptor), ER(Estrogen receptor), RAR(Retinoic acid receptor), ERRα(Estrogen-related receptor alpha), BTK(Bruton's tyrosine kinase), ALK(Anaplastic lymphoma kinase), RIPK(Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase), c-Met(MET proto-oncogene/receptor tyrosine kinase), FAK(Focal adhesion kinase), IRAK4(Interleukin-1 receptor-associated kinase 4), p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinases), SGK(Serum and glucocorticoid-regulated kinase), TBK1(TANK-binding kinase 1), KRAS(Kirsten rat sarcoma virus protein), B-Raf(B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase), β-catenin, FKBP(FK506 binding protein), IDO(Indoleamine 2,3-dioxygenase), PD-1/PD-L1(Programmed death protein 1/programmed death-ligand 1), PARP1(Poly [ADP-ribose] polymerase 1), PRC2(Polycomb repressive complex 2), EGFR(Epidermal growth factor receptor), Sirt2(NAD-dependent deacetylase sirtuin 2), HER2/ERBB2(Human epidermal growth factor receptor 2), FRS2(Fibroblast growth factor receptor substrate 2), BCL-XL(B-cell lymphoma-extra large), SMARCA(SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A), HDM2(Human double minute 2 homolog), HDAC(Histone deacetylase) family, BCR-ABL(Breakpoint cluster region protein- Tyrosine-protein kinase ABL1), MCL1(Modulator Of VRAC Current 1), FLT-3(Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3), STAT3(Transcription factor STAT3), Myc family 및 BAF complex(Brg/Brahma-associated factors)로 구성되는 군에서 선택되는 어 하나 이상의 단백질을 타겟으로 하는 것일 수 있다.

[85] 상기 프로탁이 작동하는 E3 리가아제(ligase)는 CRBN(Cereblon), VHL(Von Hippel-Lindau tumor suppressor), cIAP(Cellular inhibitor of apoptosis protein), Keap1(Kelch-like ECHassociated protein 1), HDM2(Human double minute 2 homolog), βTRCP(Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase), CHIP(Carboxyl terminus of HSC70-interacting protein) 및 UHRF1(ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1)로 구성되는 군에서 선택되는 E3 리가아제를 통해 단백질 분해 효과를 나타내는 것일 수 있다. 구체적으로, CRBN(Cereblon) 및 VHL(Von Hippel-Lindau tumor suppressor)로 구성되는 군에서 선택되는 E3 리가아제를 통해 단백질 분해 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[86] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 것일 수 있다.

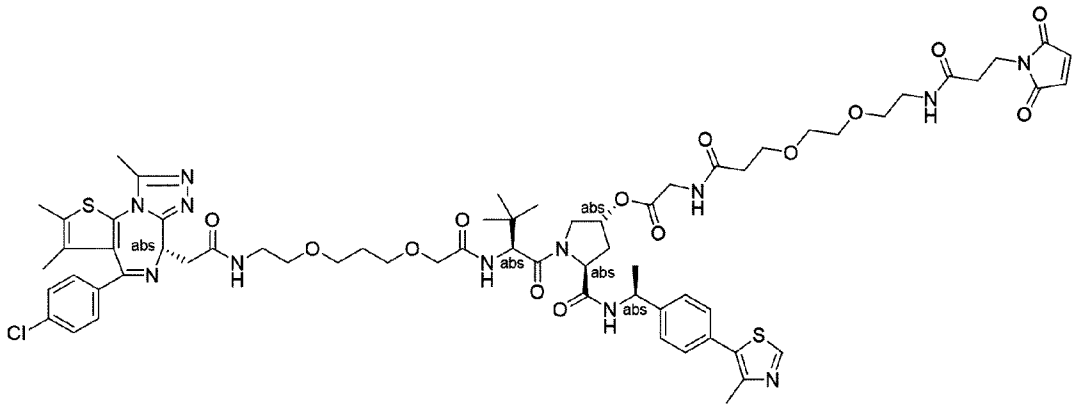
[87] [화학식 1]

[88] /



[89] [화학식 2]

[90]



[91] 상기 암 표적용 복합체는 생체 내에 존재하는 알부민과 결합하여, 안정화 및 비활성화된 형태로 형성되므로, 생체 내에 다량 존재하더라도 암 조직이 아닌 정상 세포에서는 독성을 나타내지 않는다.

[92] 상기 암 표적용 복합체는 암 세포로 침투하여, 암 세포 내에 존재하는 esterase에 의해 절단되어 PROTAC을 방출하여, 우수한 항암 효과를 갖는다.

[93] 상기 암 표적용 복합체의 분자량은 15 kDa 내지 25 kDa일 수 있다. 상기 분자량을 초과할 경우, 응집현상이 발생하여 효과적으로 암세포 내에 효과적으로 유입될 수 없으며, 미만일 경우 신장을 통해 쉽게 제거되어 체내 체류시간이 감소하는 문제가 있다.

[94] 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 esterse에 의해 절단되는 것을 특징으로 한다. esterase는 외부 자극없이도 암세포에 과량으로 존재하므로, 본 발명의 구조적 특성에 적합한 타겟물질이다. 종래 프로드러그 항암제들은 대부분 카스파제를 타겟물질로 하는데, 본 발명의 구조 특성상 카스파제를 타겟물질로 삼을 경우, 암 세포에 항암제 등에 의한 자극이 선행되어 카스파제 농도가 높아지지 않는 한, PROTAC의 방출이 용이하게 이루어지지 않는 문제가 발생할 수 있다.

[95] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 프로탁(PROTAC)은 ARV-771일 수 있다. ARV-771은 BRD4(bromodomain 4) 억제제(JQ1), VHL(Von Hippel-Lindau) E3 리가아제를 위한 리간드로 구성되며, BET(bromodomain and extra-terminal domain) 단백질과 bromodomain을 분해하여 암을 치료하는 BRD4-분해 RPOTAC의 하나이다. BET 단백질은 암세포에 과발현되는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 PROTAC에 알부민과 결합을 형성하는 말레이미드기와 연결되는 링커를 통해 결합되다. 이러한 구조적 특징으로 인해 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 생체 내에 투여될 경우, 생체 내에 존재하는 알부민과 결합을 형성하여 우수한 종양 특이적 축적 및 세포 흡수율을 얻을 수 있다.

[96]

[97] 본 발명에 따른 암 표적용 복합체의 합성과정과 암 세포에 대한 약리기전을 도 1에 도시하였다. 본 발명의 일 실시예에서는 PROTAC를 Steglich 에스테르화를 통해 5-azidovaleric acid와 결합시켜 아지드기를 갖는 ARV-771(N3-PROTAC)을 제조하고, 다음으로 N3-PROTAC과 BCN-PEG2-Mal 사이의 무구리(copper-free) 알킨-아지드 클릭 반응을 통해 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 합성하였다. 상술한 과정을 통해 제조된 암 표적용 복합체의 순도를 높이기 위해, 정제 단계를 더 포함할 수 있고, 바람직하게는 컬럼크로마토그래피을 사용할 수 있다.

[98]

[99] 본 발명의 다른 측면은 암 표적용 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[100] 상기 암 표적용 복합체는 생체 내에 존재하는 알부민과 결합하여, 안정화 및 비활성화된 형태로 형성되며, 암 세포에 특이적으로 축적되어 암 세포에 존재하는 esterase에 의해 특이적으로 분해되어 프로탁(PROTAC)을 방출함으로써, 암세포에 대한 세포 사멸을 유발한다.

[101] 본 발명에서 사용되는 용어 "암"이란 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭한다.

[102] 본 발명에 있어서, 상기 암은 그 종류에 있어서 특별히 한정된 것은 아니며, 뇌종양, 두경부암, 유방암, 폐암, 식도암, 위암, 십이지장암, 충수암, 대장암, 직장암, 간암, 췌장암, 담낭암, 담관암, 항문암, 신암, 수뇨관암, 방광암, 전립선암, 음경암, 정소암, 자궁암, 난소암, 외음암, 질암 또는 피부암일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 자궁암, 전립선암 세포주에서 IU1 계열 화합물 및 프로탁의 병용투여에 의한 항암 효과를 확인하였으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[103] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[104] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[105] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 프로탁의 체내 잔류시간과 암 세포 유입율, 항암 효과를 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[106] 본 발명의 일 실시예에서는, 암 표적용 복합체는 프로탁(PROTAC)을 단독으로 처리하는 경우에 비해, 암의 증식을 5~6배 감소시키고, 정상 세포에 대해서는 손상을 전혀 야기하지 않으며 암 세포에 대해서만 세포 사멸을 통한 손상을 야기한다는 것을 확인한 바, 항암 효과를 현저하게 증진시키는 것을 확인할 수 있었다.

[107] 본 발명자들은 하기 다양한 실험예들을 통해 본 발명의 암 표적용 복합체를 투여하는 경우, 암 특이적 선택성, 암 세포내 흡수율, 암세포에 대한 광범위한 분포, 프로탁의 타겟 단백질에 대한 분해 효과 및 항암 효과를 현저하게 증진시킬 수 있기에, 암 치료 분야에서 폭넓게 활용될 수 있다는 사실을 확인하였다.

[108] 상기 "암 표적용 복합체" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[109] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구투여 경로의 예로는 피하, 복강 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 정맥 내 또는 동맥 내가 포함될 수 있고, 바람직하게는 정맥 투여일 수 있다.

[110] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 혼합하여 조제될 수 있다.

[111] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[112] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 암을 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준

은 개체 종류 및 중증도, 연령, 체중, 식이, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[113] 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수 있고, 격일에 한 번 투여되는 것일 수도 있으며, 일주일에 한 번 투여되는 것일 수도 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은 0.001 내지 1000 mg/kg/day로, 보다 구체적으로 0.1 내지 100 ㎎/kg/day로 투여될 수 있다.

[114] 또한 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 다른 치료제와 병용하여 투여되는 경우, 본 발명의 조성물과 다른 치료제는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 다른 치료제는 암 퇴행을 촉진하거나 또는 추가로 암 증식 또는 성장을 방지하는 화합물, 단백질 등의 약물일 수 있으며, 또한 방사선 치료 등 약물 요법 이외의 기타 항암 요법을 모두 포함한다.

[115]

[116] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 암 표적용 복합체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[117] 상기 "암 표적용 복합체", "프로탁", "암", "예방" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[118] 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선 효과가 우수하다.

[119] 상기 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다. 이때, 상기 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질병의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.

[120] 상기 식품 조성물에서, 유효성분은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 상기 식품 조성물은 원료에 대하여 구체적으로 약 15 중량% 이하, 보다 구체적으로 약 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.

[121] 상기 식품 조성물은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 일 양상에 따른 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다.

[122] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이

트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[123] 상기 식품 조성물은 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 특별한 제한없이 다른 성분들을 필수 성분으로서 함유할 수 있다. 예를 들어, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당,및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[124] 상기 외에도, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[125] 상기 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품으로 사용될 수 있다.

[126] 상기 식품 조성물은 종래에 알려져 있는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 또는 새롭게 개발되는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품과 혼합되어 제공될 수 있다.

[127] 상기 건강기능식품이 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 더 포함하는 경우, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양이 혼합되는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[128]

[129] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 암 표적용 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[130] 상기 "암 표적용 복합체", "프로탁", "투여", "암", "예방", "치료" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[131] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 암이 발병될 가능성이 있거나, 또는 발병된 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 암을 완화 또는 치료할 수 있다.

[132] 상기 방법은 암의 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 조성물 또는 다른 약학 조성물과 병행하여 투여하는 것일 수 있고, 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여하는 것일 수 있으며, 단일 또는 다중 투여하는 것일 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[133]

[134] 본 발명의 또 다른 측면은 암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 암 표적용 복합체의 용도를 제공한다.

[135] 상기 "암", "예방", "치료", "암 표적용 복합체", "프로탁" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[136]

[137] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[138] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

[139]

[140] **실험재료**

[141] 본 실험에서 ARV-771(99.02%)은 Chemscene(Monmouth Junction, NJ, USA)에서 입수하였다. DMF(N,N-dimethylformamide; 99.8%), EDC-HCl(N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride), DMAP(4-dimethylaminopyridine; 99%), 돼지 간(porcine liver)에서 얻은 에스테라아제(esterase) 및 TEA(triethylamine; 99.5%)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 5-아지도발레르산(5-Azidovaleric acid; 98%), 4-말레이미도부티르산(4-maleimidobutyric acid; 98%) 및 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol; 98%)은 Tokyo Chemical Industry(TCI; Toshima, Tokyo, Japan)에서 상업적으로 입수하여 사용하였다. BCN-PEG_2-Mal(Bicyclononyne-polyethylene glycol-maleimide; 95%)은 Axispharm(San Diego, CA, USA)에서, 아세토니트릴(ACN)은 Honeywell(Charlotte, NC, USA)에서 구입하였다. DMSO(Dimethyl sulfoxide; 99%), BSA(bovine serum albumin; 98%), TWEEN 20은 Biosesang(Ansan, Gyeonggi, Republic of Korea)에서 구입하였다. Cy5.5-NHS(Cyanine 5.5-N-hydroxysuccinimide ester)와 Cy5.5-COOH(cyanine 5.5-carboxylic acid)는 Lumiprobe(Hunt Valley, MD, USA)에서 구입하였고, anti-BRD4, anti-c-Myc, anti-Bcl-2 및 anti-β-actin는 Abcam(Discovery Drive, Cambridge, United Kingdom)에서 구입하였다.

CCK-8(Cell counting kit-8)은 Vitascientific(Beltsville, MD, USA)에서 구입하였고, RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin은 WELGENE Inc(Daegu, Republic of Korea)에서 하였다. 4T1(마우스 유방암 세포; mouse breast cancer cells) 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 모든 시약들은 받은 그대로를 사용하였다.

[142]

[143] **실험장비**

[144] 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC; 1200 series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)는 C18 column(Eclipse XDB-C18, 4.6 × 150 mm, particle size = 5 μm, Agilent Technologies)이 구비된 것을 사용하였다. 모든 합성 절차에서 생성물의 몰 질량 및 그들의 m/z(mass-to-charge ratios)는 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LC-MS; Q-TOF 5600, AB SCIEX, Framingham, MA, USA)으로 확인하였다, 알부민의 유체역학적 크기는 동적 광산란(DLS, dynamic light scattering; Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK)을 통해 측정하였다. ARV-771 또는 BSA에 대한 FITC 또는 Cy 5.5 염료의 화학적 접합은 형광 분광광도계(FL, fluorescence spectrophotomete; Hitachi F-7000, Hitachi High-Tech, Hitachinaka, Ibaraki, Japan)로 검증하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM, confocal laser scanning microscop; Leica TCS SP8, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 및 마이크로플레이트 판독기(VERSAmaxTM, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 관찰하였다. 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 생체 내 및 생체 외 생체 분포를 조사하기 위해 IVIS Lumina Series III 시스템(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)을 Living Image 소프트웨어(PerkinElmer)와 함께 사용하였다.

[145]

[146] **통계 분석**

[147] 본 발명의 모든 통계 데이터는 최소 3번의 독립적인 시험에서 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시하였다. 두 그룹 간의 통계 분석은 Student's t-test로 수행하였다. 두 개 이상의 그룹을 비교하기 위해서는 일원 분산 분석(ANOVA) 테스트를 사용하였으며, 다중 비교에 대한 통계적 유의성을 Tukey-Kramer 로 검정하였다. 각 통계자료의 p값은 별표(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)로 수치로 나타내었다.

[148]

[149] **제조예 1. BSA와 ARV-771결합된 Cy5.5 제조**

[150] Alb-ECMal-PROTAC와 ARV-771의 생체 외에서 세포내 도입, 생체 내에서의 약동학 특성 및 생체분포를 실험하기 위해 Cy5.5-결합된 ARV-771와 BSA를 합성하였다. 구체적으로 ARV-771(5 mg, 5.07 μmol), Cy5.5-COOH(5.8 mg, 7.60 μmol) 및 DMAP(3.1 mg, 25.34 μmol)를 4 mL 유리병(vial)에 넣고, 1 mL

무수 DMF(anhydrous DMF)를 첨가하여 용해하였다. 상기 EDC-HCl(3.9 mg, 25.34 μmol)를 바이알에 첨가하였다. 이는 Cy5.5-COOH의 카르복실산 작용기(carboxylic acid group)를 활성화한다. 12시간동안 상온에서 반응시켜 조생성물(crude product)을 얻었다. 상기 조생성물을 ACN/H2O (40/60)를 용리액으로 사용하는 C18 column에 통과시켜 순수 Cy5.5-결합 ARV-771(Cy5.5-ARV-771)를 회수하였다.

[151] Cy5.5로 라벨링된 BSA(Cy5.5-Alb)를 얻기 위해서, 라벨링되지 않은(unlabeled) BSA(66.5 mg, 1.00 μmol)와 Cy5.5-NHS(0.1 mg, 0.10 μmol)를 혼합하고, 10 mL 무수 DMF(anhydrous DMF)로 용해하였다. 12시간 상온에서 반응시켜 반응물을 얻었다. 반응이 완료된 후, 반응물을 회수하고, 이를 H_2O로 희석하고, 투석막(MWCO = 10,000 Da)을 사용하여 투석하고 동결건조하여, Cy5.5와 BSA의 1:10 몰랄비(molar ratio)인 Cy5.5-Alb를 제조하였다.

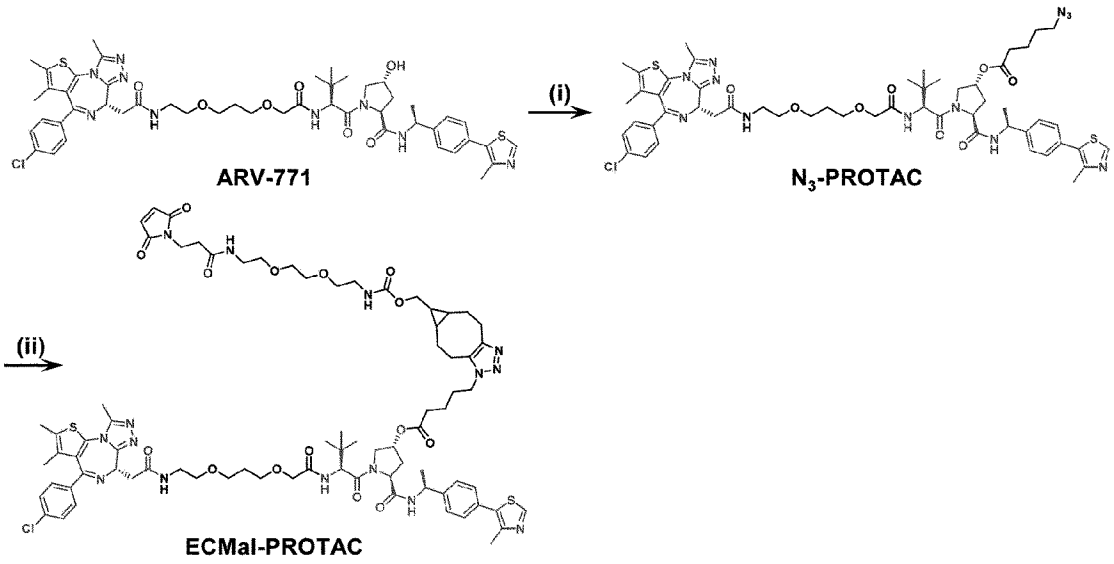
[152] Cy5.5-ARV-771와 Cy5.5-Alb의 형광 강도를 FL로 정량화하고, Cy5.5-ARV-771를 천연(native) ARV-771와 더 블렌딩하여 Cy5.5 및 ARV-771의 몰랄비가 1:10이 되도록 하였다.

[153]

[154] **실시예 1. ECMal-PROTAC 합성**

[155] [반응식 1]

[156]



[157] ARV-771(20.0 mg, 20.27 μmol)을 magnetic stirrer bar가 구비된 3 ml 1-목(neck) 둥근반닥 플라스크에 넣고, 0.5 ml 무수 DMF을 첨가하여 용해하였다.

[158] 5-azidovaleric acid(7.25 mg, 50.68 μmol), DMAP(12.38 mg, 101.35 μmol), 및 EDC-HCl(15.73 mg, 101.35 μmol)을 플라스크에 성공적으로 첨가한 뒤, 상기 혼합물을 상온에서 서서히 혼합하며 12시간 동안 반응시켰다. 그 결과 crude를 강압조건에서 농축하고, N3-PROTAC을 얻기 위해 eluent of ACN/H2O(70/30, v/v)을 사용해 C18 column chromatography (Sep-Pak® C18 cartridges 5 g; Waters Corporation,

Milford, MA, USA)을 통해 분리하였다. 회수한 N3-PROTAC을 잔류 용매를 제거하기 위해 동결건조하였다.

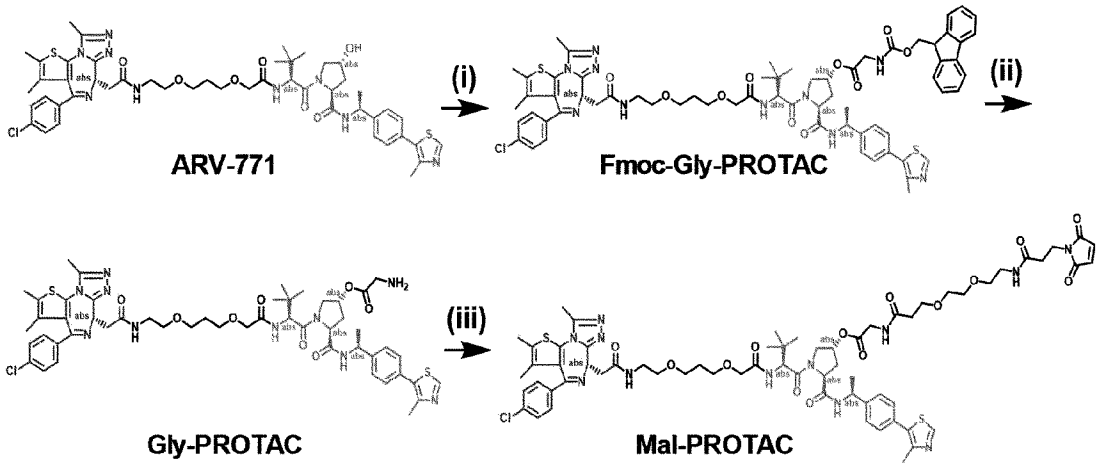
[159] ECMal-PROTAC의 합성을 위해 N3-PROTAC(20.0 mg, 17.99 μmol)을 3 ml 1목(neck) 둥근바닥 플라스에 넣고, 0.5 ml DMSO로 용해하였다. 상기 용액에 BCN-PEG2-Mal(12.8 mg, 26.98 μmol)을 첨가하고, 상온에서 2 시간동안 반응시켰다. Crude product를 RP-HPLC의 C18 preparative column을 통과시켰다. 이때 a gradient elution of ACN/H2O from 20/80 to 80/20(v/v)을 사용하였고, 순수 ECMal-PROTAC 분말을 분리하기 위해 동결건조하였다. 각 단계별 얻은 생성물은 RP-HPLC와 LC-MS 분석을 통해 확인하였다. RP-HPLC와 LC-MS 분석 결과 ECMal-PROTAC의 고순도 합성에 성공(N3-PROTAC: 수율 88.7%, 순도 98.9%, ECmal-PROTAC: 62.9% 수율 및 98.2% 순도)하였다는 것을 확인하였다(도 3a, 3b). 도 3a를 살펴보면 각 스펙트럼은 반응마다 해당 피크의 전체 이동을 나타내어 화학적 접합이 유의한 부작용없이 완전히 성공적으로 수행된다는 것을 나타낸다. 도 3b를 살펴보면 LC-MS 스펙트럼을 통해 측정된 분자량이 이론값과 유사함을 알 수 있었다(m/z = 1586.7, [M] + 1H+).

[160]

[161] **실시예 2. Mal-PROTAC 합성**

[162] [반응식 2]

[163]



[164] ARV-771(20.0 mg, 20.27 μmol)을 magnetic stirrer bar가 구비된 3 ml 1-목(neck) 둥근바닥 플라스크에 넣고, 0.5 ml 무수 DMF을 첨가하여 용해하였다. Fmoc-Gly-OH(12.1 mg, 40.54 μmol), DMAP(7.43 mg, 60.81 μmol), 및 EDC-HCl(9.44 mg, 60.81 μmol)을 플라스크에 성공적으로 첨가한 뒤, 상기 혼합물을 상온에서 서서히 혼합하며 12시간 동안 반응시켰다. 그 결과 crude를 강압조건에서 농축하고, Fmoc-Gly-PROTAC을 얻기 위해 eluent of ACN/H2O(70/30, v/v)을 사용해 C18 column chromatography (Sep-Pak® C18 cartridges 5 g; Waters Corporation, Milford, MA, USA)을 통해 분리하였다. 회수한 Fmoc-Gly-PROTAC을 잔류 용매를 제거하기 위해 동결건조하였다.

[165] Fmoc 보호기의 제거를 위해 Fmoc-Gly-PROTAC(20.0 mg, 15.80 μmol)을 magnetic stirrer bar가 구비된 3 ml 1목(neck) 둥근바닥 플라스에 넣고, 20 %(v/v) piperidine/DMF 혼합용액 0.5 ml를 첨가하여 용해시킨 후 상온에서 15분동안 반응시켰다. 그 결과 crude를 강압조건에서 농축하고, Gly-PROTAC을 얻기 위해 eluent of ACN/H2O(50/50, v/v)을 사용해 C18 column chromatograpy (Sep-Pak® C18 cartridges 5 g; Waters Corporation, Milford, MA, USA)을 통해 분리하였다. 회수한 Fmoc-Gly-PROTAC을 잔류 용매를 제거하기 위해 동결건조하였다.

[166] Mal-PROTAC을 합성하기 위해 Gly-PROTAC(15.0 mg, 14.37 μmol)을 magnetic stirrer bar가 구비된 3 ml 1-목(neck) 둥근바닥 플라스크에 넣고, 0.5 ml 무수 DMF을 첨가하여 용해하였다. 상기 용액에 Maleimide-PEG2-NHS Ester(12.23 mg, 28.74 μmol), DIPEA(7.51 μl, 43.12 μmol)를 성공적으로 첨가한 뒤 상온에서 12시간동안 반응시켰다. 그 결과 crude를 강압조건에서 농축하고 RP-HPLC의 C18 preparative column을 통과시켰다. 이때 a gradient elution of ACN/H2O from 20/80 to 80/20(v/v)을 사용하였고, 순수 Mal-PROTAC 분말을 분리하기 위해 동결건조하였다.

[167]

[168] **실험예 1. 생체 외에서(*In vitro*) 실시예 1로부터 제조된 ECMal-PROTAC과 알부민의 결합율**

[169] 실시예 1의 ECMal-PROTAC과 알부민의 결합율은 RP-HPLC를 통해 확인하였다. 구체적으로 PBS로 희석한 BSA 용액(200 μM)을 실시예 1의 ECMal-PROTAC 수용액(140 μM)과 1:1 부피비로 혼합하여 공배양(co-incubate)하였다. 상기 배양물은 0 분, 5분, 30분, 60분의 배양시간마다 회수하고, 메르캅토에탄올(mercaptoethanol)로 퀀칭(quenched)하고, 용리액의 농도구배(ACN/H_2O, 20/80 내지 80/20 (v/v), 30 분)를 통해 각각의 시료에 대한 HPLC 스펙트럼을 획득하였다.

[170] 상기 실시예 1의 ECMal-PROTAC의 알부민 결합능력의 검증을 위해, BSA 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물을 LC-MS 스펙트럼으로 분석하고, 이를 유리 BSA(free BSA)의 LC-MS 스펙트럼과 비교하였다.

[171] BSA와 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 혼합한 혼합물에는 티올-말레이미드 반응을 통해 BSA-결합 ECMal-PROTAC(Alb-ECMal-PROTAC)이 형성되며, 거의 모든 암 표적용 복합체가 알부민과 결합하여 Alb-ECMal-PROTAC을 형성하므로, 일부 실험예에서는 BSA 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물과 Alb-ECMal-PROTAC를 혼용하여 사용할 수 있다.

[172]

[173] 도 4는 BSA 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물의 HPLC 스펙트럼으로, 이에 따르면 BSA와 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 티올-말레이미드 클릭 화학반응을 통해 빠르게 결합한다는 것을 알 수 있다. 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 알부민 결합능력을 확인하기 위하여 인간혈청알부민(HSA)과 유사한 구조를 갖는 소혈청알부민(BSA)를 사용하여 분석하였다. 실

시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 BSA와 혼합하고 RP-HPLC로 시간에 따라 분석한 결과, 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 피크는 급격히 감소하고 BSA의 피크는 점차 넓게 퍼지는 것을 확인할 수 있다.

[174]

[175] 도 5는 BSA 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물에 대한 LC-MS 스펙트럼이다. BSA와 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 단독에 대해서도 LC-MS로 분석하고 도 5에 나타내었다.

[176] 도 5에 따르면, 실시예 1에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)와 Alb-ECMal-PROTAC의 분자량의 변화는 1,587 Da인 것으로 확인되었다. 이는 실시예 1에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 분자량 변화와 일치하는 것을 확인할 수 있다. 즉 실시예 1에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 알부민과 화학적, 물리적 변화없이 안전하게 결합된다는 것을 알 수 있다.

[177]

[178] **실험예 2. 생체 외에서(*In vitro*) 실시예 1로부터 제조된 ECMal-PROTAC과 알부민의 선택적 결합 특성**

[179] 실시예 1의 ECMal-PROTAC과 알부민의 결합이 특이적인지 확인하기 위하여, 티올기가 블록된 BSA를 사용하였다. 구체적으로 cyc34 차단제로 4-maleimidobutyric acid와 BSA를 혼합하여 티올기가 차단된 BSA를 제조하였다. 상기 티올기가 차단된 BSA를 PBS로 희석하여 용액(200 μM)으로 제조하고, 이를 실시예 1의 ECMal-PROTAC 수용액(140 μM)과 1:1 부피비로 혼합하여 공배양(co-incubate)하였다. 상기 배양물은 0 분, 5분, 30분, 60분의 배양시간마다 회수하고, 메르캅토에탄올(mercaptoethanol)로 퀀칭(quenched)하고, 용리액의 농도구배(ACN/H_2O, 20/80 내지 80/20 (v/v), 30 분)를 통해 각각의 시료에 대한 HPLC 스펙트럼을 획득하였다.

[180] 이때, 비교예로 ARV-771(140 μM)과 BSA 용액(200 μM)을 1:1 부피비로 혼합하여 공배양한 것과, 아무것도 처리하지 않은 실시예 1의 ECMal-PROTAC 용액과 BSA 용액 단독에 대해서도 HPLC 스펙트럼을 분석하였다.

[181] 실험예 1에서의 BSA 및 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물과 실험예 2에서의 티올기가 블록된 BSA와 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물에 대한 HPLC 결과로부터, 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)와 연관된 HPLC 피크 영역 감소를 정량화하였다. 이는 피크의 통합도 변화(changes in integrities)를 통해 계산하여 도 7에 나타내었다.

[182]

[183] 도 6은 BSA와 ARV-771 혼합물, 티올기가 블록된 BSA와 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물, 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 및 BSA에 대한 HPLC 스펙트럼이다. 도 7은 도 4 및 도 6으로부터 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)와 연관된 HPLC 피크영역 감소를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[184] 도 6에 따르면, ARV-771은 BSA와 60분 이상 혼합하여도 상호작용을 형성하지 않는 것을 확인할 수 있다. 또한 티올기가 블록된 BSA와 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 혼합물 역시 상호작용을 형성하지 않는 것을 확인하였다. 즉 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)와 BSA는 부위 특이적 반응을 한다는 것을 알 수 있다.

[185] 도 7에 따르면, 3분 안에 BSA와 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 티올-말레이미드 반응이 75% 이상 완료되며, 10분 이내에 100% 반응이 완료되는 것을 확인하였다.

[186]

[187] **실험예 3. Alb-ECMal-PROTAC의 입도 분석**

[188] PBS로 희석한 BSA 용액(200 μM)을 실시예 1의 ECMal-PROTAC 수용액(140 μM)과 1:1 부피비로 혼합하여 공배양(co-incubate)하였다. 상기 배양물을 30분 후에 회수하여, Alb-ECMal-PROTAC를 얻었다. Alb-ECMal-PROTAC와 BSA의 입도를 DLS를 통해 측정하였다.

[189] 도 8은 알부민(BSA)과 결합하기 전과 후의 실시예 1에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)에 대한 DLS 분석 결과로, 이에 따르면 ECMal-PROTAC은 알부민과 결합시 유의미한 입도 변화가 관찰되지 않았다. 천연 BSA 및 Alb-ECMal-PROTAC의 평균 입도는 각각 5.43 ± 1.42 및 6.99 ± 1.38 nm였고, 이는 알부민과 ECMal-PROTAC의 결합이 분해 또는 응집을 유도하지 않는다는 것을 알 수 있다.

[190]

[191] **실험예 4. 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 알부민과 결합한 후, esteras 조건 하에서 분해되는지 확인**

[192] PBS로 희석한 BSA 용액(200 μM)을 실시예 1의 ECMal-PROTAC 수용액(140 μM)과 1:1 부피비로 혼합하여 공배양(co-incubate)하였다. 상기 배양물을 pH 8.0 조건에서 30분 동안 반응시킨 후, 회수하여 Alb-ECMal-PROTAC를 얻었다. Alb-ECMal-PROTAC 수용액 0.2 ㎖에 15 unit esterase를 첨가하고, 상기 혼합물을 0시간, 3시간, 6시간 및 9시간의 반응시간에 회수하여 RP-HPLC로 분석하였다. 이의 대조군으로 유리 ARV-771를 사용하였다.

[193] 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 생리학적 조건에서 알부민 결합형태로 암세포에 내재화되므로, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 아닌 Alb-ECMal-PROTAC을 사용하였다.

[194]

[195] 도 9는 Alb-ECMal-PROTAC에 esterase(15 unit)으로 처리한 후, 시간에 따라 HPLC로 분석한 결과이다. 도 9에 따르면 Alb-ECMal-PROTAC는 esterase에 의해 에스테르 결합이 절단되어, ARV-771의 점진적인 방출이 발생하는 것을 확인하였다. Alb-ECMal-PROTAC는 48 시간 이내에 63.2% ARV-771을 방출하는 것을 확인하였다. 본 실험은 생체 외에서 실험된 것으로, 생체 내에서는 산성 pH에 의해 분해속도가 가속화될 것으로 여겨진다. 또한 포유류 혈장에서 유래하는 BSA

와 HSA는 구조적으로 매우 유사하므로 HSA에서도 우수한 결합 및 분해 효과를 가질 것으로 여겨진다.

[196]

[197] **실험예 5. 생체 외에서(*in vitro*), 실시예 1의 ECMal-PROTAC의 세포 흡수율 분석**

[198] 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 현저히 향상된 endocytosis를 통해 세포내 흡수율이 향상되었다. 이를 확인하기 위하여, PBS로 희석한 Cy5.5-BSA 용액(Cy5.5-Alb, 제조예 1, 200 μM)을 실시예 1의 ECMal-PROTAC 수용액(140 μM)과 1:1 부피비로 혼합하여 공배양(co-incubate)하였다. 상기 배양물을 pH 8.0 조건에서 30분 동안 반응시킨 후, 회수하여 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC를 얻었다. 대조군으로 제조예 1의 Cy5.5-ARV-771를 사용하였다.

[199] 4T1 마우스(mouse) 유방암(breast cancer) 세포주(cell line)를 준비하고, 1×10^5 4T1 세포를 유리바닥 공초점 접시(glass-bottom confocal dish)(직경 35 mm)에 분주한 다음, RPMI 배지로 24 시간 배양하였다. 안정화(stabilization) 후, 상기 세포에 Cy5.5-ARV-771(5 μM) 또는 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC(5 μM)를 처리하고, 1시간, 3시간, 6시간 및 12시간 동안 37 ℃에서 배양하였다. PBS로 3회 세척하고, 4% 포름알데히드(formaldehyde) 수용액으로 15분 동안 처리한 다음 세포의 핵을 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)로 10 분 동안 염색하였다. 상기 4T1 세포에서의 DAPI와 Cy5.5 형광 신호는 CLSM으로 측정하여 분석하였다. 분석결과를 통해 ARV-771과 Alb-ECMal-PROTAC의 시간에 따른 세포 흡수율(cellular uptake)을 평가하였다. FITC의 상대적인 세포내 형광강도는 Image-Pro software(Media Cybernetics, Rockville, MD, USA)를 사용하여 계산하였고, 그 변화는 시간의 함수로 표시하였다.

[200]

[201] 도 10은 Cy5.5-ARV-771 또는 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC로 처리한 4T1 암세포를 공초점 현미경으로 촬영한 사진이고, 도 11은 Cy5.5-ARV-771 또는 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC로 처리한 4T1 암세포에서 세포 내 형광강도를 정량화하여 도시한 그래프이다.

[202] 도 10에 따르면, Cy5.5-ARV-771 및 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC은 둘 다 12 시간 이내에 4T1 세포 내로 점진적으로 흡수되었음을 알 수 있다. 세포내 흡수된 Cy5.5-ARV-771과 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC의 농도도 유사한 것으로 확인되었다(각각 0.61 ± 0.11 및 0.61 ± 0.06의 상대 형광강도). 다만 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC의 세포 흡수 속도가 Cy5.5-ARV-711보다 약간 더 빠른 것으로 확인되었다. 이를 통해 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 생체 내에서 알부민과 결합되며, 이러한 구조적 특징으로 인해 암 세포 내로 적극적으로 흡수되는 경향이 있음을 알 수 있다.

[203]

[204] **실험예 6. 생체 외에서(*in vitro*), 실시예 1의 ECMal-PROTAC의 치료 효과**

[205] BRD4는 유전자의 전사를 조절하는 단백질로, 암 관련 유전자의 전사에 BRD4가 크게 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 암세포에서 BRD4의 침묵이 발생하면 암 유전자 전사를 억제하여 세포사멸이 유도된다.

[206] 이에 암세포에 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 처리하였을 때, BRD4 및 기타 관련 단백질(예: c-Myc 및 Bcl-2)의 제거 유무를 평가하여 암 치료능을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 시료로 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)과 ARV-771을 준비하였다.

[207] 우선, 1×10^5개의 4T1 세포를 6-웰 배양 플레이트의 각 웰에 분주하고, 37 ℃ 및 5% 이산화탄소 분위기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포 배양액에 다양한 농도의 ARV-771(0 내지 10μM) 또는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)(0 내지 10μM)를 첨가하여 37 ℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후, 상기 세포를 PBS로 3회 세척하고, 1% protease를 함유하는 용해액(lysis buffer)으로 용해하였다. 회수한 용해물의 세포 파편(cell debris)을 25분 동안 12,000rpm에서 원심분리하여 제거하고, 상등액(supernatant)을 회수한 후, BCA 키트를 사용하여 단백질량을 측정하였다. 상등액을 10% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔에 로딩하고, 전기영동(SDS-PAGE)을 수행한 다음, 폴리비닐리덴디플루오라이드(PVDF) 막에 블롯팅하였다. 블롯팅 후, IgG(immunoglobulin G)의 무차별적인 결합을 억제하기 위해 PVDF 막을 0.1% Tween 20(TBS-T)을 포함하는 5% BSA 함유 tris 완충 식염수(BSA-containing tris buffered saline)로 2시간 동안 처리하고, 바로 토끼 항-마우스 1차 항체에 노출시켰다(1,000:1). 4 ℃에서 24시간 동안 처리하고, PVDF 막을 TBS-T로 3회 세척한 다음 HRP-컨쥬게이션된 마우스 항-토끼 IgG 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 추가로 배양하였다. PVDF 막의 면역 반응성 밴드는 ECL(enhanced chemiluminescence) 시스템을 통해 분석하였다.

[208]

[209] 도 12는 ARV-771 또는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 4T1 암세포에 처리한 후, 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 도 13은 ARV-771 또는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 처리한 4T1 암세포에서 c-Myc(a) 및 Bcl-2(b)의 상대적인 발현 수준을 정량화한 그래프이다. 도 14는 ARV-771 또는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 농도에 따른 BRD4 발현 수준을 정량화한 그래프이다.

[210] 도 12 내지 14에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 세포 배양 배지에서 MSA(mouse serum albumin)과 결합하여, 4T1 세포에 효율적으로 내재화되고, 과발현된 BRD4 단백질을 농도 의존적으로 분해한다는 것을 확인하였다. 따라서 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 암 세포내에 존재하는 esterase에 의해 성공적으로 분해되어 ARV-771을 방출한다는 것을 알 수 있다.

[211] 도 13에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 C-Myc 및 Bcl-2와 같은 다른 단백질의 수준도 감소시키는 것을 확인하였다. C-Myc와 Bcl-2는 BRD4의 mRNA 전사에 중요한 역할을 하는 것으로, BRD4 분해에 효과적으로 관여한다는 것을 나타낸다.

[212] 도 14에 따르면, BRD4의 밴드를 정량화한 결과, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 DC_{50}(half-maximal degradation concentration)는 1.81 μM인 것으로 확인되었다. 이는 ARV-771(DC_{50}=3.38μM)과 유사한 수준이다. 상술한 결과를 종합하면 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 암세포에 endocytosis를 통해 성공적으로 흡수되며, 암 세포 내에 존재하는 esterase에 의해 ECmal 링커가 절단되어 PROTAC을 효율적으로 방출하며, 이로 인해 암세포의 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

[213]

[214] **실험예 7. 생체 외에서, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 암세포 치료 효과**

[215] ARV-771와 ECMal-PROTAC의 암세포에 대한 독성은 CCK-8(cell counting kit-8) 분석법으로 분석하였다. 4T1 세포를 96-웰 배양 플레이트에 각 웰당 3×10^3 cells로 분주하고, 37 ℃, 5% 이산화탄소 분위기(carbon dioxide atmosphere)에서 24시간동안 배양하였다. 상기 세포에 서로 다른 농도의 ARV-771(0.01 to 100 μM)와 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)(0.01 to 100 μM), 실시예 2의 암 표적용 복합체(Mal-PROTAC)(0.01 to 100 μM)를 각각 처리하고 48 시간동안 배양하였다. 각 웰을 10% CCK-8-containing culture media에 30분 동안 노출시킨 후, ARV-771로 처리된 4T1 세포 또는 ECMal-PROTAC 또는 Mal-PROTAC로 처리된 4T1 세포의 생존력을 마이크로플레이트 판독기로 분석하였다. 상기 ARV-771 또는 ECMal-PROTAC 또는 Mal-PROTAC의 농도에 따른 세포 생존력 변화는 GraphPad Prism 8 software(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 피팅하여 IC_{50}(haf-maximal inhibitory concentration) 수치를 계산하였다.

[216]

[217] 도 15는 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)(a), 실시예 2의 암 표적용 복합체(Mal-PROTAC)(b)를 4T1 암세포에 처리한 후, 생존율을 분석한 그래프이다.

[218] 도 15에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 암세포에 대해 7.780 μM의 IC_{50}를 갖는 것으로 확인되었다. 즉 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 BRD4가 풍부한 암세포에 대해 주목할만한 항증식 특성을 갖는다.

[219] 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)와 실시예 2의 암 표적용 복합체(Mal-PROTAC)가 세포내 이입되면 BRD4의 결핍과 BRD4의 다운스트림 이펙터인 c-Myc 및 Bcl-2의 발현 감소를 유도하며, 이를 통해 암 세포의 세포자멸사를 촉진하게 된다. 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)와 실시예 2의 암

표적용 복합체(Mal-PROTAC)는 생체 내 알부민과 결합하여 비활성화된 상태로 생체 내에 존재하는데, 이로 인해 천연(native) ARV-771(IC_{50} = 6.375 μM)에 비해 IC_{50}이 약간 증가하는 것으로 여겨지나, 여전히 항암치료를 위해서는 현저한 효과라 할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC, Mal-PROTAC)는 BRD4 분해를 촉진하고, VHL E3 경로를 성공적으로 모집하여 뛰어난 암세포 사멸을 유도하므로, 항암제로 용이하게 활용될 수 있음을 알 수 있다.

[220]

[221] **실험예 8. 생체 내에서(*in vivo*), 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 생체 분포 및 암 표적 가능성 분석**

[222] ARV-771 및 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 생체내 약동학적 특성 및 생체분포를 확인하고자 하였다.

[223] 암 동물모델

[224] NaraBio, Inc(Seoul, Republic of Korea)에서 5주령 암컷 Balb/c 및 Balb/c nu/nu 마우스를 구입하였다. 실험전 마우스는 2주간 순화과정을 거쳤다. 마우스는 실험 동안 온도 22 ± 2 ℃, 습도는 40-60%로 유지되는 사육실에서 자유식이로 사육되었으며, 명암 주기(Light and dark cycle)는 12시간 간격으로 조절하였다. 모든 실험은 KIST 동물실험실적관리위원회(IACUC; 승인번호: 2021-143)의 관계법령 및 제도적 지침을 준수하여 수행하였다.

[225] 마우스의 왼쪽 넓적다리에 1×10^6개의 4T1 세포를 접종하고, 암 부피가 150 - 200 mm^3에 도달할 때까지 사육하여 암 동물모델을 제조하였다.

[226] 시료의 제조

[227] 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 생체 내 치료효과를 분석하기 위하여 다음과 같이 시료를 제조하였다. PBS로 희석한 Cy5.5-BSA 용액(Cy5.5-Alb, 제조예 1, 200 μM)을 실시예 1의 ECMal-PROTAC 수용액(140 μM)과 1:1 부피비로 혼합하여 공배양(co-incubate)하였다. 상기 배양물을 pH 8.0 조건에서 30분 동안 반응시킨 후, 회수하여 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC를 얻었다. 대조군으로 제조예 1의 Cy5.5-ARV-771를 사용하였다.

[228] 시료의 투여

[229] 대조군 및 실험군의 제조를 위해 마우스는 무작위로 3마리씩 그룹을 나누어 진행하였다.

[230] 비교군은 Cy5.5-ARV-771(3 mg/kg, equiv. to ARV-771)를 시료로 사용하였고, 실험군은 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC(3 mg/kg, equiv. to ARV-771)를 시료로 사용하였다. 대조군은 식염수(Saline) 3 mg/kg을 시료로 사용하였다. 상기 Cy5.5-ARV-771과 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC는 꼬리 정맥을 통해 투여하였다.

[231] 분석

[232] 상기 각 군으로부터 혈액 순환 수준의 시간에 따른 변화를 조사하기 위해, 특정 시점(0~96시간)에 전혈을 채취하였다. 채취한 혈액 샘플은 IVIS Lumina Series

III 시스템을 사용하여 형광 강도에 대해 분석되었고 데이터는 GraphPad Prism 8 소프트웨어로 시간의 함수로 표현되어 혈액 반감기 및 AUC(the area under the curve)을 계산하였다.

[233] 또한 암 축적정도를 분석하기 위하여, 상기 대조군과 실험군은 시료를 투여하고 0, 1, 3, 6, 12, 24시간마다 IVIS Lumina Series III 시스템을 통해 전신 형광 이미지를 촬영하였다.

[234] 상기 대조군과 실험군은 투여 24시간이 지난 후, 안락사하여 주요 장기(심장, 간, 폐, 비장 및 신장) 및 암 조직을 적출하였다. 적출된 각 조직들은 시료의 생체분포와 조직학적 분석을 다음과 같이 수행하였다.

[235] 상기 적출된 암 조직에서 시료의 분포를 분석하기 위해, 적출된 주요 장기와 암 조직을 IVIS Lumina Series III 시스템(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)으로 촬영하고, Living Image 소프트웨어(PerkinElmer)로 분석하였다.

[236] 상기 적출된 암 조직의 조직학적 분석을 위해, 분리된 암 조직을 4% 포름알데히드 용액에 침지하고, 4 ℃로 고정한 다음, 1-2 mm^3의 크기로 잘라 절편을 만들었다. 상기 각각의 절편은 3% BSA를 포함하는 TBST로 3시간동안 진탕배양한 후, FITC 결합된 항-CD31 1차 항체(Biolegend, USA)를 첨가하고 밤새 4 ℃에서 배양하여 염색시켰다. TBST로 3회 세척하고 DAPI mounting 배지에 넣어 유리 커버 슬라이드 위에 올려둔 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM, confocal laser scanning microscop; Leica TCS SP8, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)으로 촬영하였다. 촬영한 이미지로부터 마이크로플레이트 판독기(VERSAmaxTM, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 정량화하였다.

[237] 결과분석

[238] 도 16은 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)에서 투여 시간에 따른 혈장내 농도를 분석한 약동학 프로파일로, 이에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 알부민과 결합을 통해 형성된 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC인 경우, 혈액 반감기가 유의하게 증가한다는 것을 확인하였다. 구체적으로 비교군과 실험군의 혈장으로부터 Cy5.5-ARV-771과 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC의 형광강도를 관찰한 결과, Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC는 12시간까지 혈장 내에 남아 있었고, Cy5.5-ARV-771는 1시간 후에 완전히 제거되는 것을 확인하였다. 즉 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC의 반감기는 0.59 시간으로 Cy5.5-ARV-771보다 3.5배 더 증가한 것을 확인할 수 있다. 또한 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC의 AUC는 Cy5.5-ARV-771보다 12배 더 큰 것으로 확인된 바, 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 혈장 체류시간이 종래 항암제보다 유의적으로 긴 것으로 확인된다. 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 생체 내 알부민 결합을 통해 PROTAC 분자가 가지고 있던 문제(소수성 및 낮은 수용해도)를 개선하였다.

[239] 도 16을 비롯한 그래프 상에서의 '시'는 시간을 의미하며, 이는 시간의 단위(period of time)이다. 따라서 1 시 혹은 1 시간은 '60분'을 의미하는 hour로 주로 사용되나, 일부 명세서 내에서 시와 시간은 서로 혼용하여 사용할 수 있으며, 이 경우에는 문맥에 따라 의미를 파악할 수 있다.

[240]

[241] 도 17은 시간별 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)에 대한 NIRF(non-invasive near-infrared fluorescence) 사진이다.

[242] 도 17에 따르면, 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)은 암 조직에 특이적으로 축적되었으며, 이는 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)보다 유의적으로 현저히 높은 농도인 것을 확인하였다.

[243]

[244] 도 18은 도 17의 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)의 결과로부터 암 조직의 형광신호만을 정량화한 것으로 (**** $p < 0.0001$), 이에 따르면 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC은 투여하고 12시간이 지났을 때, 가장 높은 수준에 도달하는 것으로 확인되었다. 형광 강도는 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC이 Cy5.5-ARV-771보다 12.6배 더 높았다.

[245]

[246] 도 19는 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 주요 장기(간, 폐, 비장, 신장, 심장) 및 암 조직을 채취하고, 이의 생체외 형광 이미지(a)와 정량화된 형광강도 그래프(b)이다. 도 20은 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 채취한 암 조직의 형광 이미지(상), 정량화된 형광강도 그래프(하)이다(*** $p < 0.001$).

[247] 도 19 및 도 20에 따르면, Cy5.5-ARV-771이 투여된 비교군은 신장 조직에서 매우 강한 형광신호를 가지며, 암조직과 다른 장기 조직에서는 매우 약한 형광 신호를 갖는 것으로 확인된 바, Cy5.5-ARV-771은 상당부분이 신장을 통해 즉시 제거된다는 것을 알 수 있다.

[248] 반면, Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC가 투여된 실험군은 간 조직과 암 조직에서 강한 형광신호를 나타내었고, 특히 암 조직의 형광강도를 살펴보면 Cy5.5-ARV-771 대비 16.3배 이상 높은 것을 확인하였다. 즉 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 종래 PROTAC에 비해 생체 내 잔류기간이 높을 뿐만 아니라, 안정성이 높아 신장 배설 유발 가능성이 매우 낮으며, 암 조직 표적화 능력도 매우 우수한 것을 알 수 있다.

[249]

[250] 도 21은 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 적출한 암 조직에 대한 확대된 형광 이미지이다.

[251] 도 21에 따르면, 실험군의 암 조직은 조직 전체에 균일하고 많은 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC가 분포하는 것으로 확인되었다. 반면 비교군은 Cy5.5-ARV-771가 암 조직 전체에 골고루 분포되지 못하며, 특히 암 조직의 내부에는 형광이 거의 관찰되지 않는 것으로 확인되었다. 즉 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 암의 중심 조직에도 많은 양이 충분히 침투하여 암 조직 전체에 항암효과를 유발하는 것을 알 수 있다. 종래 항암제들은 밀도 높은 암 조직의 내부까지 약효가 전달되지 못해 암의 완전한 사멸, 치료에 과도한 용량 혹은 과도한 치료기간이 필요하였다. 그러나 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 동일용량을 사용하더라도 암 조직의 중심까지 용이하게 전달되므로, 종래 항암제보다 예측할 수 없던 현저한 약리효과를 달성할 수 있다.

[252]

[253] 도 22는 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 적출한 암 조직을 DAPI와 CD31 마커로 염색한 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 촬영한 이미지이고, 도 23은 시료 대신 식염수를 투여한 대조군(Saline, control)의 암 조직을 DAPI와 CD31 마커로 염색한 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 촬영한 이미지이다.

[254] 도 22 및 도 23에 따르면, Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC가 투여된 실험군의 암 조직은 더 많은 양의 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC가 암에 전달되며, 전달된 약물들은 혈관 주변에 존재하는 암 뿐만 아니라 내부에 존재하는 암 조직까지 완전히 침투된다는 것을 확인하였다. 또한 Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC는 세포 내로도 많은 양이 흡수 및 축적되어 있는 것을 확인하였다.

[255] 즉, 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 혈관 주위에 존재하는 암 뿐만 아니라 암 조직 내부에 존재하는 세포에 까지 깊숙이 전달되므로, 종래 항암제에서는 얻을 수 없던 예측하지 못한 유의적으로 현저한 항암 효과를 나타낼 것임을 알 수 있다.

[256]

[257] 도 24는 대조군(control, Saline), 비교군(Cy5.5-ARV-771 정맥 투여)과 실험군(Cy5.5-Alb-ECMal-PROTAC 정맥투여)으로부터 적출된 암 조직의 단면에 대한 형광신호를 도형화한 그래프이다.

[258] 도 24에 따르면, 실험군의 암 조직은 Cy5.5와 CD31 신호 사이에 유의적 차이가 나타났고, 대조군과 비교군의 암 조직에서는 Cy5.5와 CD31 신호 사이에 유의적 차이가 확인되지 않았다. 즉 본 발명에 따른 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 긴 혈액 잔류 시간을 가지며, 암 조직에 특이적으로 축적되며, 혈관 조직 외에 암 조직에도 광범위하고 균일하게 약물이 침투한다는 것을 확인하였다. 이는 종래 항암제에 비해 유의적이고 현저한 차이이다.

[259]

[260] **실험예 9. 암 동물모델에 대한 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 항암 효능 분석**

[261] ARV-771 및 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)의 생체 내 암치료 효능을 조사하고자 하였다.

[262] 암 동물모델

[263] NaraBio, Inc(Seoul, Republic of Korea)에서 5주령 암컷 Balb/c 및 Balb/c nu/nu 마우스를 구입하였다. 실험전 마우스는 2주간 순화과정을 거쳤다. 마우스는 실험 동안 온도 22 ± 2 ℃, 습도는 40-60%로 유지되는 사육실에서 자유식이로 사육되었으며, 명암 주기(Light and dark cycle)는 12시간 간격으로 조절하였다. 모든 실험은 KIST 동물실험실적관리위원회(IACUC; 승인번호: 2021-143)의 관계법령 및 제도적 지침을 준수하여 수행하였다.

[264] 마우스의 왼쪽 넓적다리에 1×10^6개의 4T1 세포를 접종하고, 암 부피가 50-80 mm^3에 도달할 때까지 사육하여 암 동물모델을 제조하였다.

[265] 시료의 투여

[266] 대조군, 비교군 및 실험군의 제조를 위해 마우스는 무작위로 5마리씩 그룹을 나누어 진행하였다.

[267] 대조군은 생리식염수(Saline) 10 mg/kg를 3일마다 1회씩 15일 동안 꼬리 정맥을 통해 투여하였다(총 4회 투여). 비교군은 ARV-771 10 mg/kg을 3일마다 1회씩 15일 동안 꼬리 정맥을 통해 투여하였다(총 4회 투여). 실험군은 실시예 1의 ECMal-PROTAC 10 mg/kg(wquiv. to ARV-771)을 3일에 1회씩 15일 동안 꼬리 정맥을 통해 투여하였다(총 4회 투여).

[268] 분석

[269] 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 이틀에 한번씩 암의 크기와 체중을 측정하였다.

[270] 대조군, 비교군 및 실험군은 15일이 지나면, 안락사시켜 주요 장기(심장, 간, 폐, 비장, 신장)와 암 조직을 적출하였다.

[271] 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 생체 내에서 암 특이적으로 BRD4 분해 활성을 나타내는지를 확인하기 위해, 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 암 조직을 적출하고, 이로부터 웨스턴 블롯으로 BRD4 관련 유전자 발현을 분석하였다.

[272] 또한, 암 세포 사멸화를 분석하기 위해 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 암 조직으로부터 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 분석을 수행하였다. 다음, 상기 적출된 각 군의 주요 장기 조직과 암 조직을 H&E(hematoxylin & eosin)으로 염색하여 조직학적 분석을 수행하였다.

[273] 분석결과

[274] 도 25는 시간별 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 측정된 암 크기를 측정하여 나타낸 그래프이다(유의차를 나타내지 않으면 ns로 표기하였다. **** $p < 0.0001$).

[275] 도 25에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 투여된 실험군의 암 크기가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 대조군과 비교군은 0일차부터 15.8배 및 14.8배로 암의 크기가 증가하였으며, 양 그룹은 유의적 차이를 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 반면 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 투여한 실험군은 암 크기 증가폭이 유의미하게 감소되었다. 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)를 투여한 실험군에서 암의 부피는 투여 15일 후, $176.13 \pm 81.62\ mm^3$로 확인되었다. 이는 대조군 및 비교군보다 각각 6.1배와 5.3배 더 작은 것으로 확인되었다.

[276] ARV-771과 ECMal-PROTAC은 생체 외(in vitro) 실험에서 암 세포에 대해 유사한 정도의 독성을 나타내었으나, 실제 생체 내에서는 ARV-771보다 ECMal-PROTAC가 5~6배 이상 높은 항종양 효능을 갖는 것으로 확인되었다.

[277]

[278] 도 26은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출한 암 조직에 대한 광학 이미지이다. 도 27은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출한 암 조직을 TUNEL 염색한 후, 촬영한 공초점 레이저 스캐닝 이미지이다.

[279] 도 26 및 도 27에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 투여된 실험군은 다른 군에비해 훨씬 작은 암 크기를 갖는 것을 확인할 수 있다. 또한, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 투여된 실험군은 암 조직 전체적으로 암 세포의 세포사멸이 유발되었음을 확인하였다.

[280]

[281] 도 28은 대조군, 비교군 및 실험군의 체중 변화를 분석하여 나타낸 그래프이고, 이에 따르면 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC) 또는 ARV-771가 투여된 실험군과 비교군은 모두 심각한 전신 부작용을 나타내지 않았으며, 유의미한 체중감소가 관찰되지 않았다. 즉 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)과 ARV-771은 생체 내에서 부작용을 야기하지 않는 안전한 물질임을 알 수 있다.

[282]

[283] 도 29는 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 장기 조직(간, 폐, 비장, 신장, 심장) 및 암 조직에 대한 조직학적 분석 결과이다.

[284] 도 29에 따르면, 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 15일이 지난 후, 주요 장기 조직과 암조직을 적출하였다. 상기 적출된 장기 조직과 암조직은 H&E(hematoxylin & eosin)으로 염색한 후, BX51 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan) 및 TCS SP8 공초점 레이저 현미경을 사용하여, H&E 염색 조직을 관찰하였다.

[285] 도 29에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 처리된 실험군의 암 조직에서는 강한 손상이 확인되었고, 암조직을 제외한 장기 조직에서는 유의미한 손상이 확인되지 않았다. ARV-771이 투여된 비교군에서는 암조직 뿐만 아니라 장기 조직에서도 심각한 손상이 관찰되지 않았더. 즉 ARV-771의 투여

는 정상 조직에 해를 미치지 않으나, 암 조직에도 해를 미치지 않는 것으로 확인되었다(항암 효능이 좋지 않음).

[286] 특히 주목할 만한 점은, 앞선 생체분포 실험에서, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 상당한 부분이 암조직뿐만 아니라 간 조직으로 전달되는 것으로 확인되었음에도 불구하고, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 간 조직에 대해서는 손상을 야기하지 않는다는 것이다. 즉 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 정상 조직에 축적이 되더라도 암 조직이 아니면 세포 사멸을 야기하지 않으며, 암 조직에 대해서만 특이적으로 손상 및 세포 사멸을 야기한다는 것을 알 수 있다.

[287]

[288] 도 30은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 간 조직에 대한 TUNEL 분석 결과이다,

[289] 도 30 에 따르면 실험군로부터 적출된 간 조직은 대조군의 간 조직보다 세포 사멸율에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 통해 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 생체 내에 투여될 경우, 간 조직에 많은 농도가 축적되나, 정상 세포에 대해서는 독성을 거의 나타내지 않으며, 암 세포에 대해서만 특이적 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

[290] 종래 ARV-771를 단독으로 처리하는 경우(비교군), 정상 조직과 암조직 모두에 영향을 나타내는 것으로 확인되었다.

[291]

[292] 도 31은 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 암 조직을 웨스턴 블롯으로 BRD4, c-Myc, Bcl-2의 발현수준을 분석한 결과이다. 도 32는 도 31의 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다(** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

[293] 도 31에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 투여된 실험군의 암 조직은 대조군의 암 조직 보다 BRD4, c-Myc 및 Bcl-2의 수준이 훨씬 더 낮은 것으로 확인되었다. 반면 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 투여된 실험군의 암 조직은 비교군의 암 조직과 BRD4, c-Myc 및 Bcl-2의 수준에 유의적 차이가 관찰되지 않았다.

[294] 도 32에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 투여된 실험군의 암 조직에서 BRD4, c-Myc 및 Bcl-2의 상대적인 발현 수준은 대조군보다 각각 7.5배, 2.2배 및 2.3배 더 낮은 것으로 확인되었다.

[295]

[296] 도 33은 대조군(Control, Saline), 비교군(ARV-771, 정맥투여) 및 실험군(ECMal-PROTAC, 정맥투여)으로부터 적출된 암조직을 DAPI, 항-BRD4, 항-c-Myc로 염색한 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 촬영한 사진이다.

[297] 도 33에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 처리된 실험군은 비교군 및 대조군에 비해 c-Myc와 BRD4과 관련된 형광 신호가 약한 것으로 확인되었다. ARV-771가 투여된 비교군의 암 조직에서는 BRD4 분해가 암 조직

의 세포 사멸을 유도하기에는 충분하지 않은 것으로 확인되었고, 이로 인해 비교군에서는 충분한 항암효과가 나타나지 않았음을 알 수 있다.

[298]

[299] 도 34는 대조군, 비교군 및 실험군으로부터 적출된 암 조직을 DAB로 염색한 결과로, 이에 따르면, 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)가 투여된 실험군의 암 조직에서 BRD4 결핍이 나타나는 것으로 확인되었다.

[300] 즉 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 생체 내에서 암 조직의 BRD4를 성공적으로 분해하고, 감소시키는 것을 확인하였다. BRD4 결핍 관련 암세포 사멸의 일반적인 메커니즘은 도 35에 나타내었다.

[301] BRD4 결핍 관련 암세포 사멸 과정은 다음과 같다. c-Myc 단백질은 암세포의 성장과 증식에 중요한 역할을 하며, Bcl-2는 세포사멸 억제 효과를 유발한다. 따라서 암 조직에서 BRD4 분해를 유발하면, BRD4가 부족해지고, 암 세포 내 c-Myc 및 Bcl-2 생산을 효율적으로 억제하여 세포 사멸을 초래하게 되는 것이다. 실시예 1의 암 표적용 복합체(ECMal-PROTAC)는 생체 내에 투여시, 혈관 내에 존재하는 혈장 알부민과 그 자리에서 바로(in situ) 결합을 형성하고, 이로 인해 전신 독성이 낮으면서도 암에 대한 특이적 선생성이 높으며, 암 세포 내에 흡수율이 높을 뿐만 아니라 암 조직의 중심 부위까지 넓고 깊숙하게 침투하며, 암 세포 내에서 BRD4 분해 경로를 통해 c-Myc와 Bcl-2 단백질 생산을 억제하여 세포 사멸을 유도함으로써 암 세포의 증식을 억제하고 사멸을 유발하여 항암 효과를 나타낸다.

청구범위

[청구항 1] (i) 말레이미드(maleimide) 기능기;
(ii) 상기 기능기에 연결된 esterase에 의해 절단 가능한 링커; 및
(iii) 상기 링커에 연결되는 프로탁(PROTAC);을 포함하는 암 표적용 복합체로,
상기 링커는 G, GG 및 GGG로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 링커, PABC(p-aminocarbamate), MBA(N,N'-mythylenebisacrylamide), 알킬렌 링커, 아릴렌 링커, 폴리알킬렌 옥사이드 링커(예컨대, PEG), NHS 에스테르 링커, Triazene 링커, 하이드라존 링커, 다이설파이드 링커, 글루쿠로나이드-MABC 링커, Y-S-Z 링커 및 디알콕시디페닐실란 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커이며,
상기 Y는 아지드(N3), 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N)이고,
상기 Z는 테트라진, 트랜스-시클로옥텐 및 시클로옥텐으로부터 선택되는 어느 하나이고, 상기 S는 올리고 또는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 덱스트란 및 탄소수 1 내지 10의 알킬로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암 표적용 복합체.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 프로탁(PROTAC)은 CDK9(Cyclin-dependent kinase 9)/CDK family, BRD4(Bromodomain-containing protein 4)/BET(Bromodomain and extra-terminal) family, SHP-2(Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2), AR(Androgen receptor), ER(Estrogen receptor), RAR(Retinoic acid receptor), ERRα(Estrogen-related receptor alpha), BTK(Bruton's tyrosine kinase), ALK(Anaplastic lymphoma kinase), RIPK(Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase), c-Met(MET proto-oncogene/receptor tyrosine kinase), FAK(Focal adhesion kinase), IRAK4(Interleukin-1 receptor-associated kinase 4), p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinases), SGK(Serum and glucocorticoid-regulated kinase), TBK1(TANK-binding kinase 1), KRAS(Kirsten rat sarcoma virus protein), B-Raf(B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase), β-catenin, FKBP(FK506 binding protein), IDO(Indoleamine 2,3-dioxygenase), PD-1/PD-L1(Programmed death protein 1/programmed death-ligand 1), PARP1(Poly [ADP-ribose] polymerase 1), PRC2(Polycomb repressive complex 2), EGFR(Epidermal growth factor receptor), Sirt2(NAD-dependent deacetylase sirtuin 2), HER2/ERBB2(Human epidermal growth factor receptor 2), FRS2(Fibroblast growth factor receptor substrate 2), BCL-XL(B-cell

lymphoma-extra large), SMARCA(SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A), HDM2(Human double minute 2 homolog), HDAC(Histone deacetylase) family, BCR-ABL(Breakpoint cluster region protein- Tyrosine-protein kinase ABL1), MCL1(Modulator Of VRAC Current 1), FLT-3(Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3), STAT3(Transcription factor STAT3), Myc family 및 BAF complex(Brg/ Brahma-associated factors)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 타겟으로 하는 것을 특징으로 하는, 암 표적용 복합체.

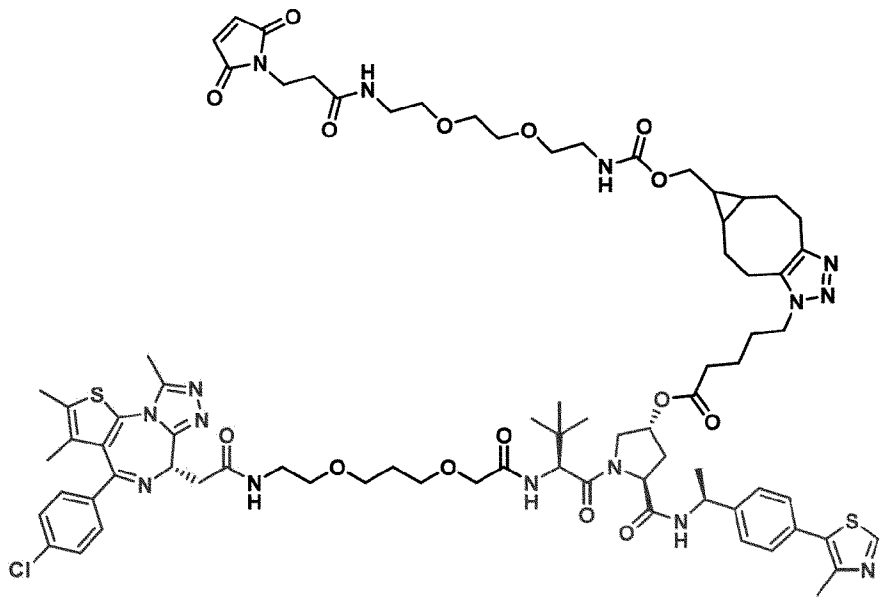
[청구항 3] 제1항에 있어서,

상기 링커는 Y-S-Z(Y는 아자이드(N3)기 또는 탄소수 1 내지 6의 알킬아자이드(-R'-N=N=N, 여기서 R'는 탄소수 1 내지 6의 알킬기)이고, Z는 트랜스-시클로옥텐 또는 시클로옥텐이며, S는 폴리(에틸렌 글리콜))이거나, 1 내지 3개의 글리신(G)으로 이루어진 펩타이드 링커와 폴리(에틸렌 글리콜)의 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커인 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 암 표적용 복합체.

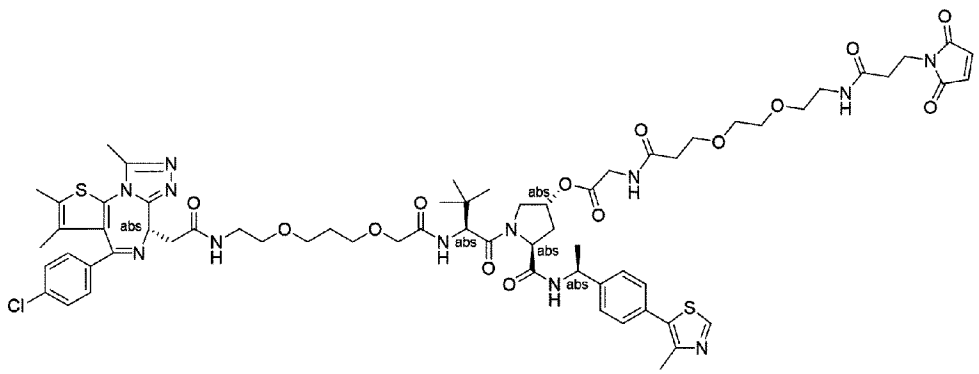
[청구항 4] 제1항에 있어서,

상기 암 표적용 항암제는 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 암 표적용 복합체.

[화학식 1]



[화학식 2]



[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 암 표적용 복합체는 생체 내에 존재하는 알부민과 결합하여, 안정화 및 비활성화된 형태로 형성되는 것을 특징으로 하는 암 표적용 복합체.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 암 표적용 복합체는 암 세포로 침투하여, 암 세포 내에 존재하는 esterase에 의해 절단되어 PROTAC을 방출하는 것을 특징으로 하는 암 표적용 복합체.

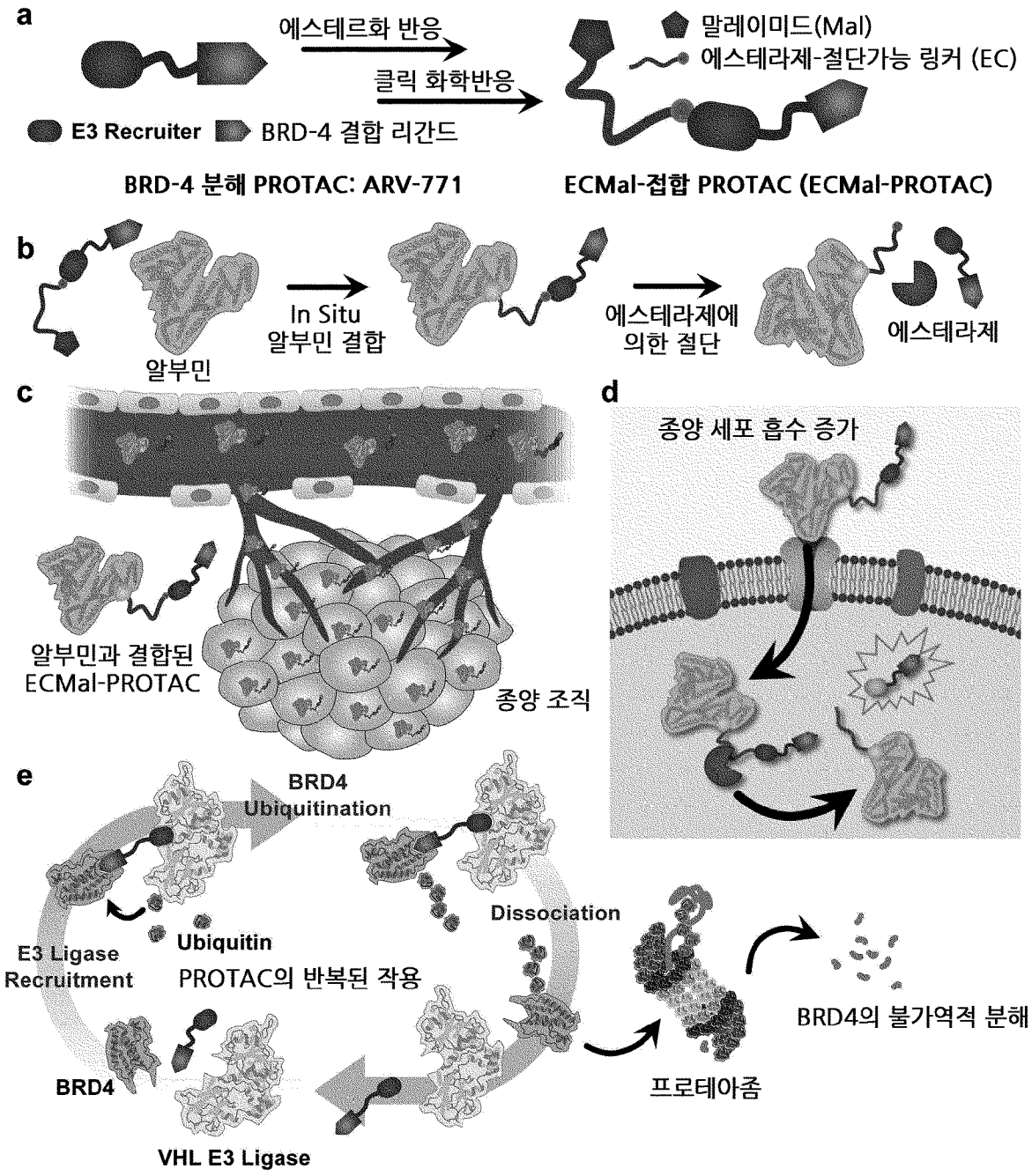
[청구항 7] 제1항에 따른 암 표적용 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 암 표적용 복합체는 생체 내에 존재하는 알부민과 결합하여, 안정화 및 비활성화된 형태로 형성되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

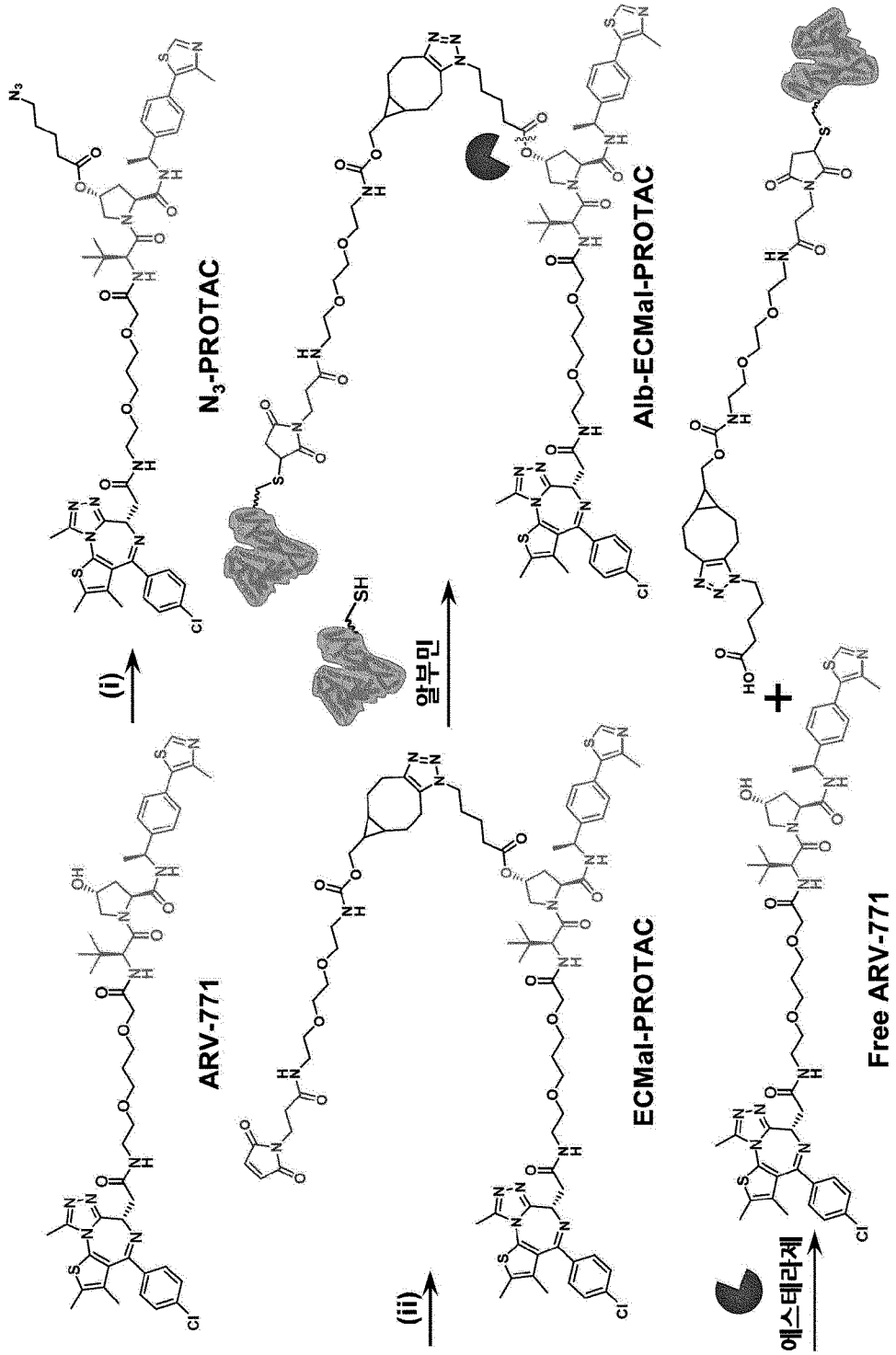
[청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 암은 뇌종양, 두경부암, 유방암, 폐암, 식도암, 위암, 십이지장암, 충수암, 대장암, 직장암, 간암, 췌장암, 담낭암, 담관암, 항문암, 신암, 수뇨관암, 방광암, 전립선암, 음경암, 정소암, 자궁암, 난소암, 외음암, 질암 및 피부암으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 10] 제1항에 따른 암 표적용 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

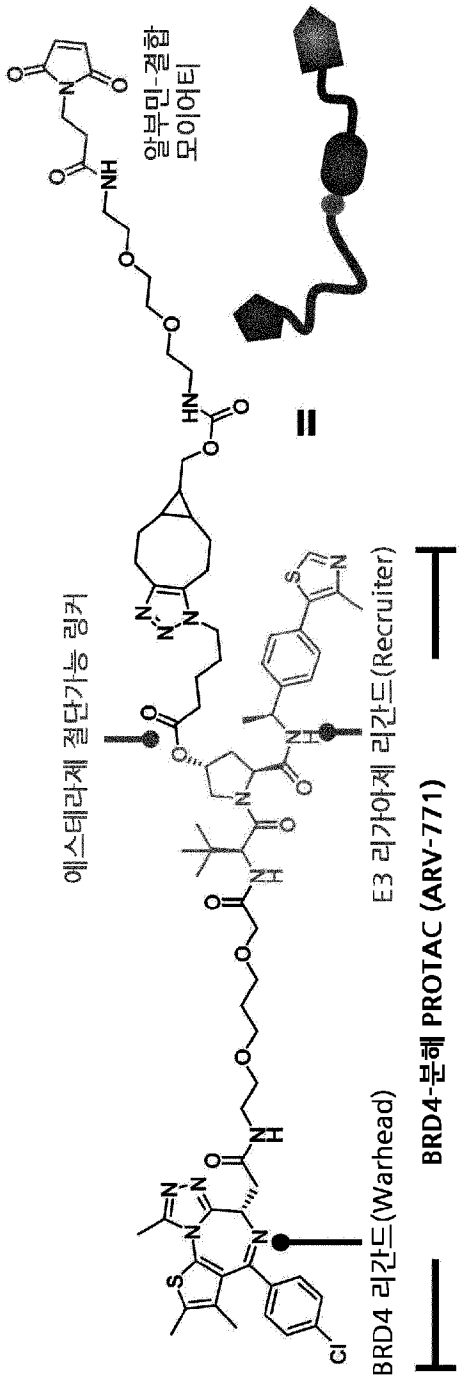
[도1]


a
에스테르화 반응
클릭 화학반응
말레이미드(Mal)
에스테라제-절단가능 링커 (EC)
E3 Recruiter
BRD-4 결합 리간드
BRD-4 분해 PROTAC: ARV-771
ECMal-접합 PROTAC (ECMal-PROTAC)
b
In Situ
알부민 결합
에스테라제에
의한 절단
에스테라제
알부민
c
알부민과 결합된
ECMal-PROTAC
종양 조직
d
종양 세포 흡수 증가
e
BRD4
Ubiquitination
Dissociation
E3 Ligase
Recruitment
Ubiquitin
PROTAC의 반복된 작용
BRD4의 불가역적 분해
BRD4
프로테아좀
VHL E3 Ligase

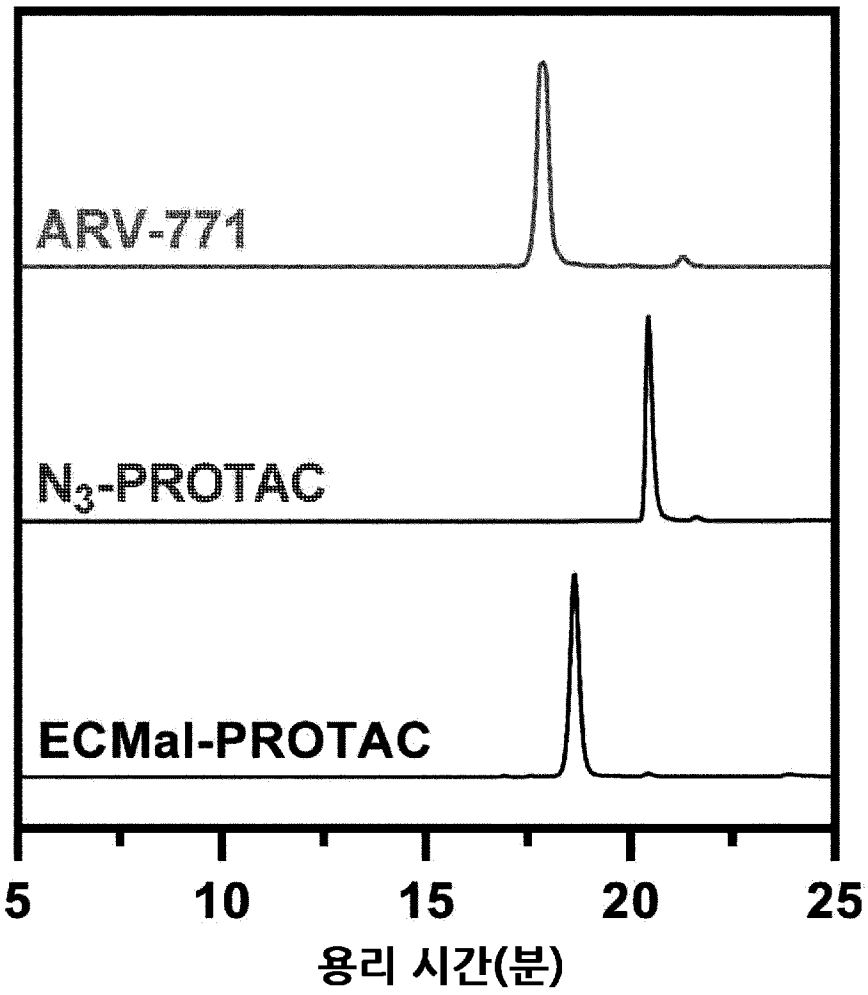
[도1f]


N3-PROTAC
(i)
ARV-771
알부민
Alb-ECMal-PROTAC
(ii)
ECMal-PROTAC
에스테라제
Free ARV-771

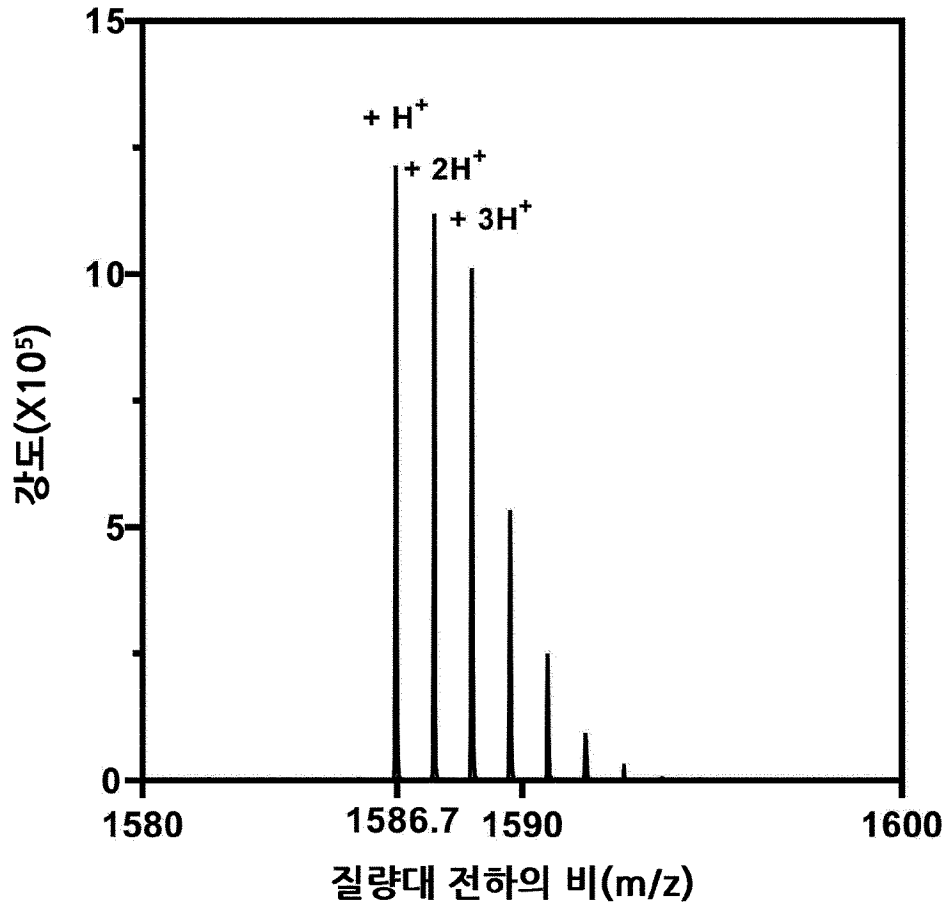
[도2]


알부민-결합 모이어티
에스테라제 절단가능 링커
E3 리가아제 리간드(Recruiter)
BRD4 리간드(Warhead)
BRD4-분해 PROTAC (ARV-771)

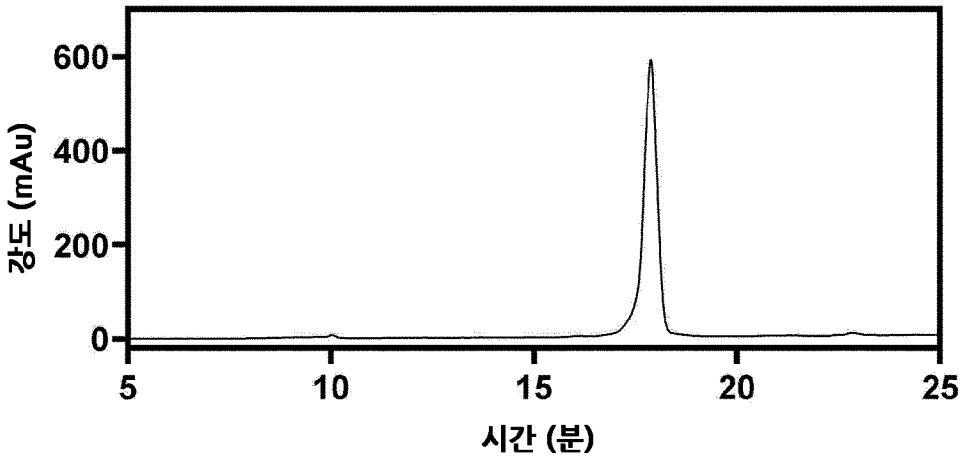
[도3a]



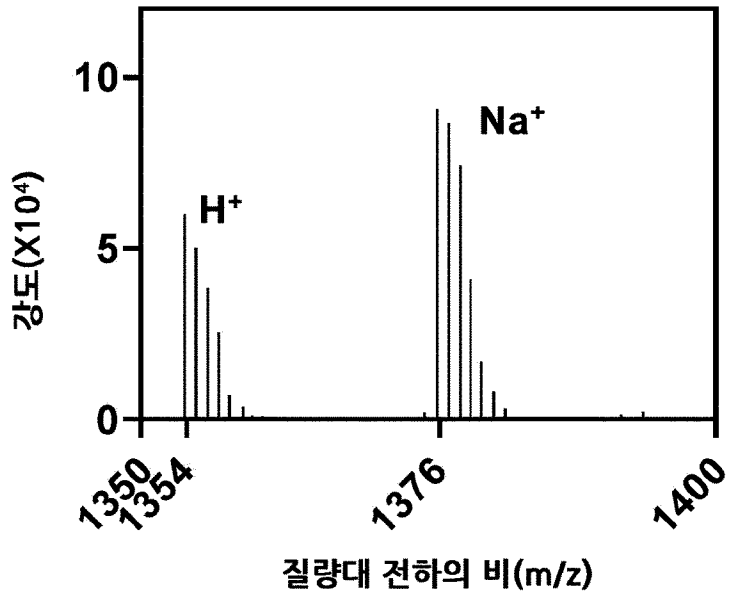
[도3b]


15
10
5
0
+ H+
+ 2H+
+ 3H+
강도(X10^5)
1580
1586.7
1590
1600
질량대 전하의 비(m/z)

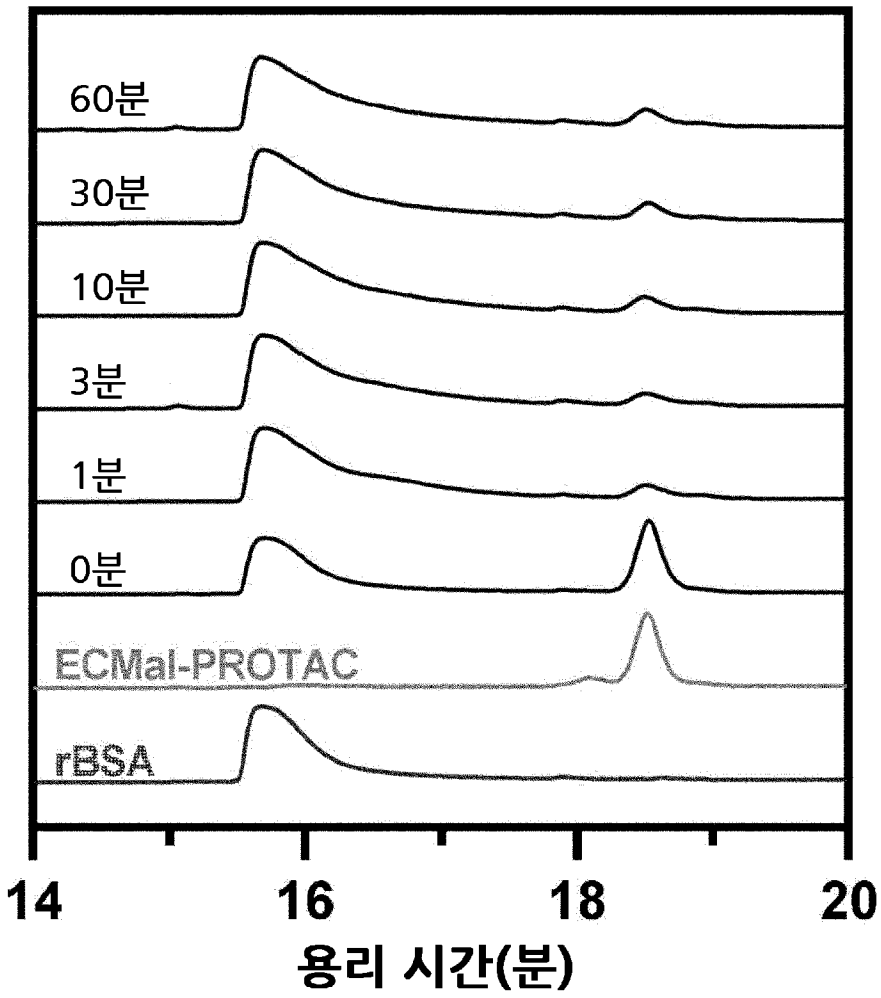
[도3c]


600
400
200
0
강도 (mAu)
5
10
15
20
25
시간 (분)

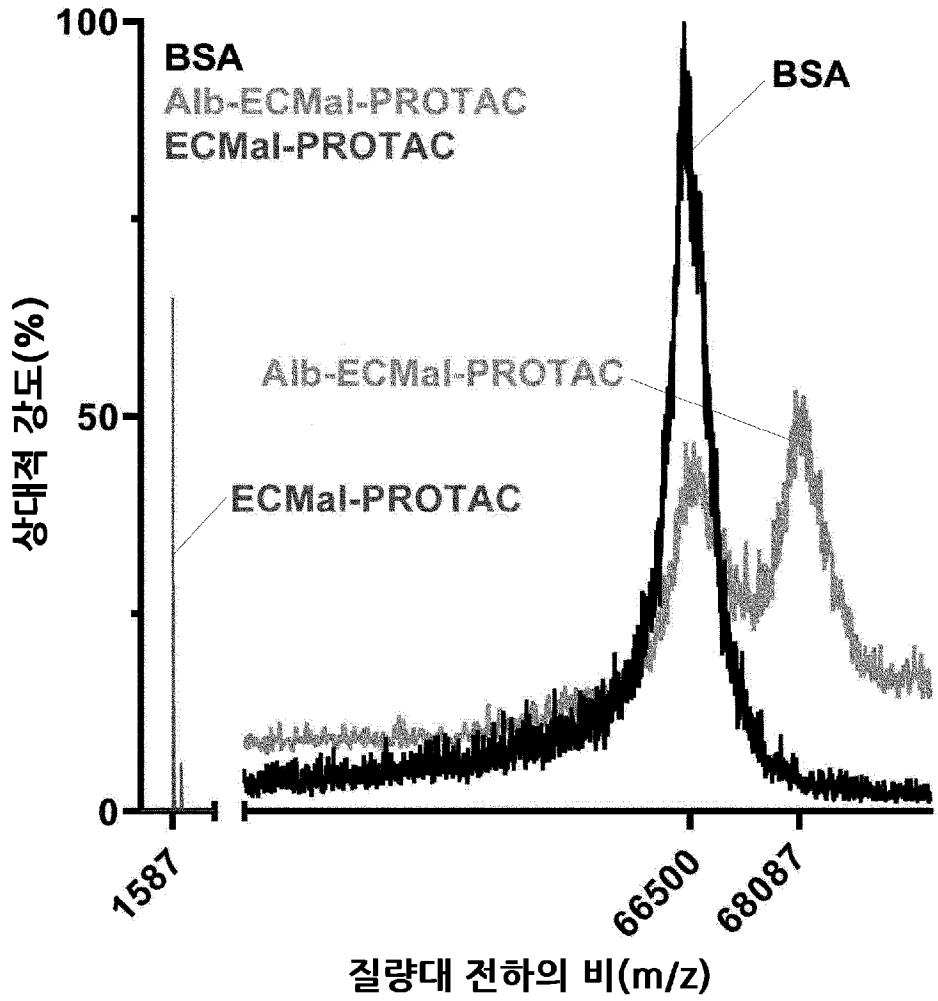
[도3d]


10
5
0
강도(X10⁴)
H⁺
Na⁺
1350
1354
1376
1400
질량대 전하의 비(m/z)

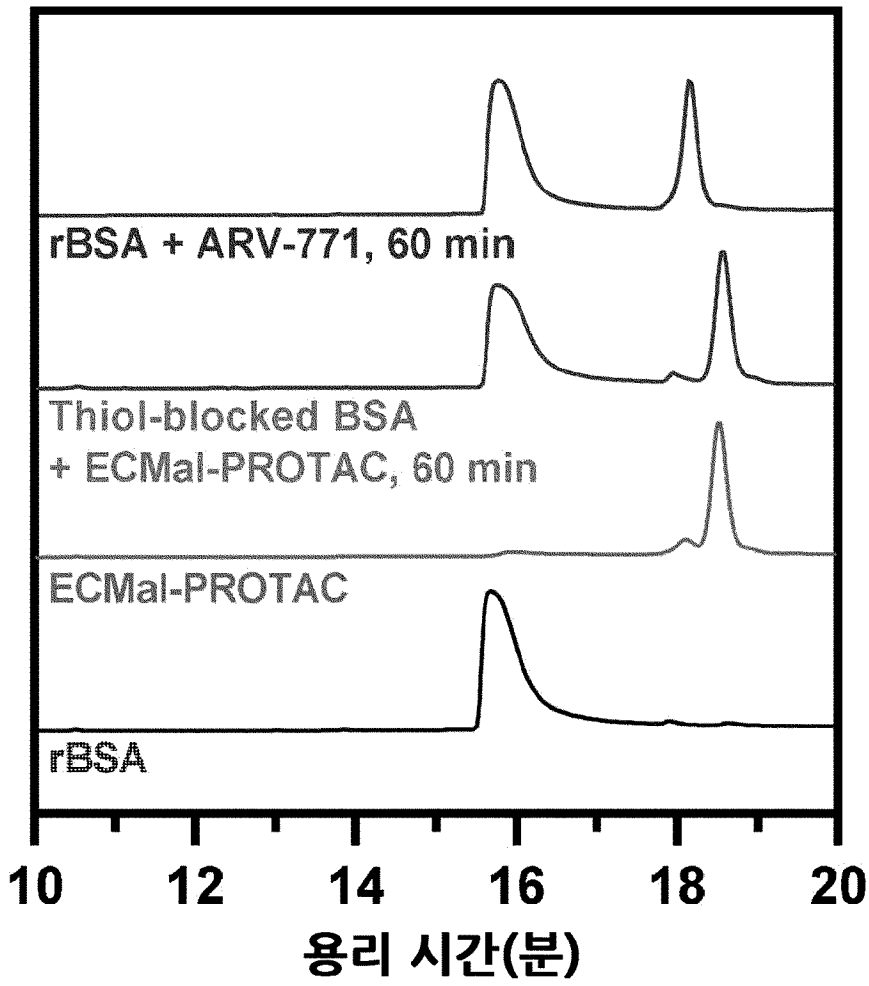
[도4]


60분
30분
10분
3분
1분
0분
ECMal-PROTAC
rBSA
14
16
18
20
용리 시간(분)

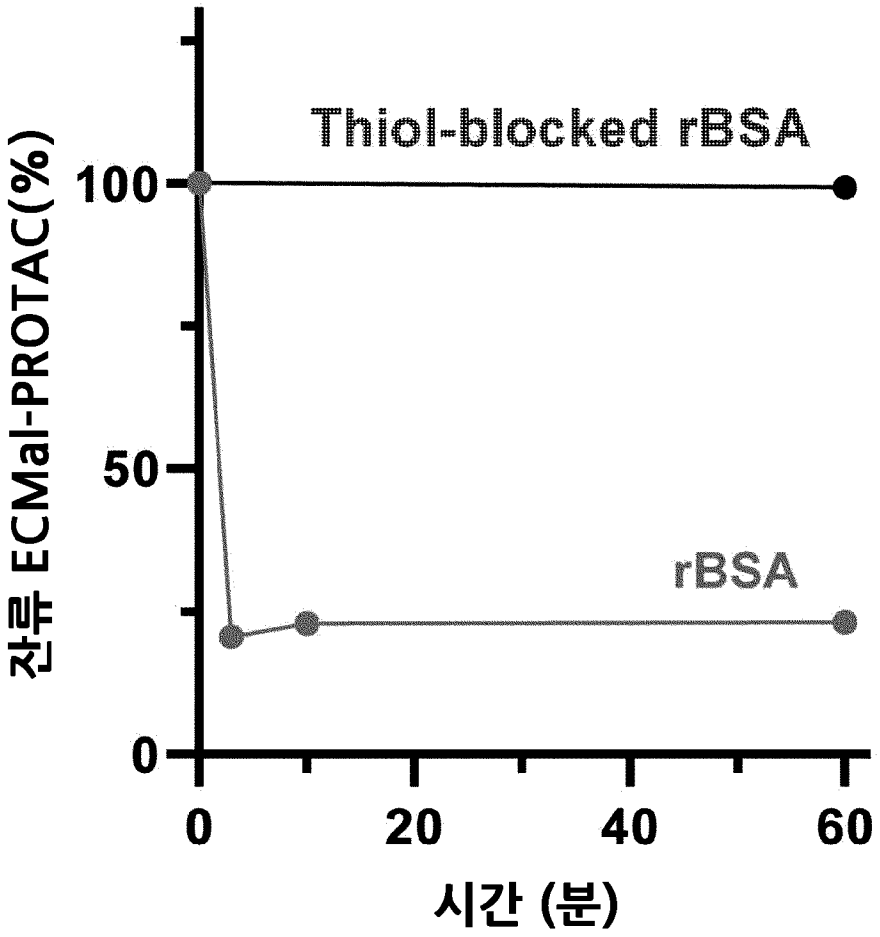
[도5]


100
50
0
상대적 강도(%)
BSA
Alb-ECMal-PROTAC
ECMal-PROTAC
BSA
Alb-ECMal-PROTAC
ECMal-PROTAC
1587
66500
68087
질량대 전하의 비(m/z)

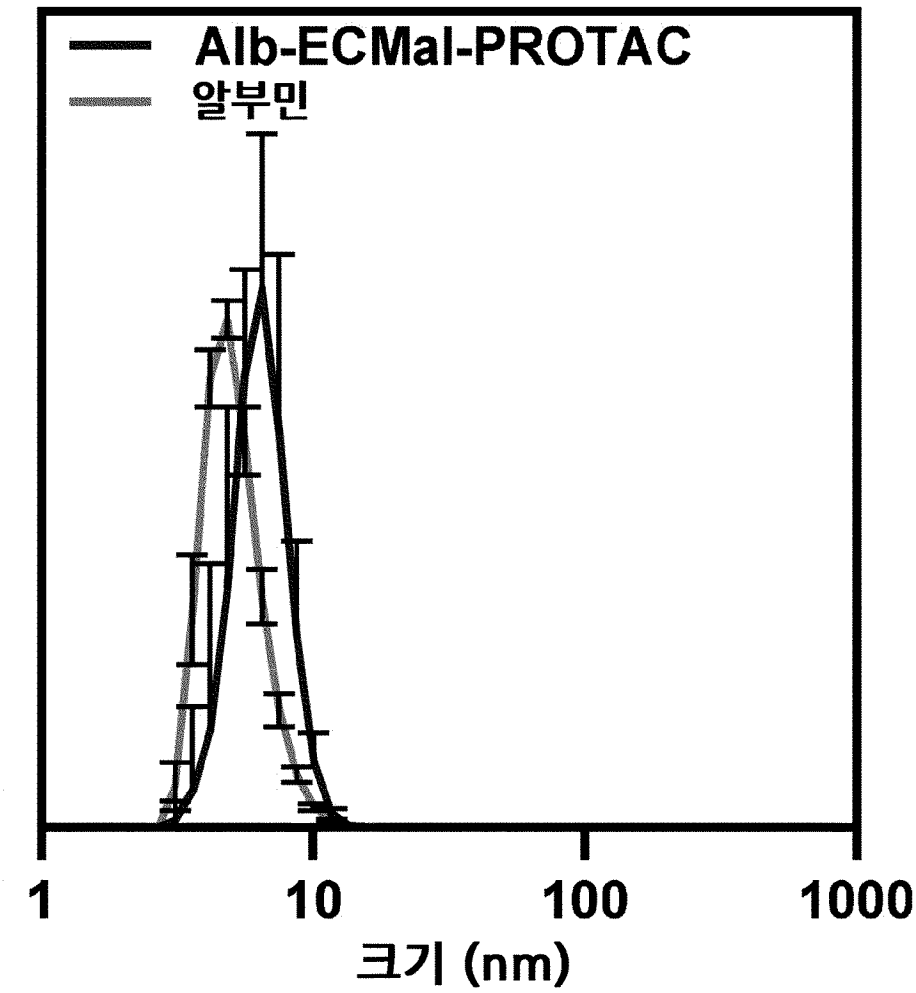
[도6]


rBSA + ARV-771, 60 min
Thiol-blocked BSA
+ ECMal-PROTAC, 60 min
ECMal-PROTAC
rBSA
10
12
14
16
18
20
용리 시간(분)

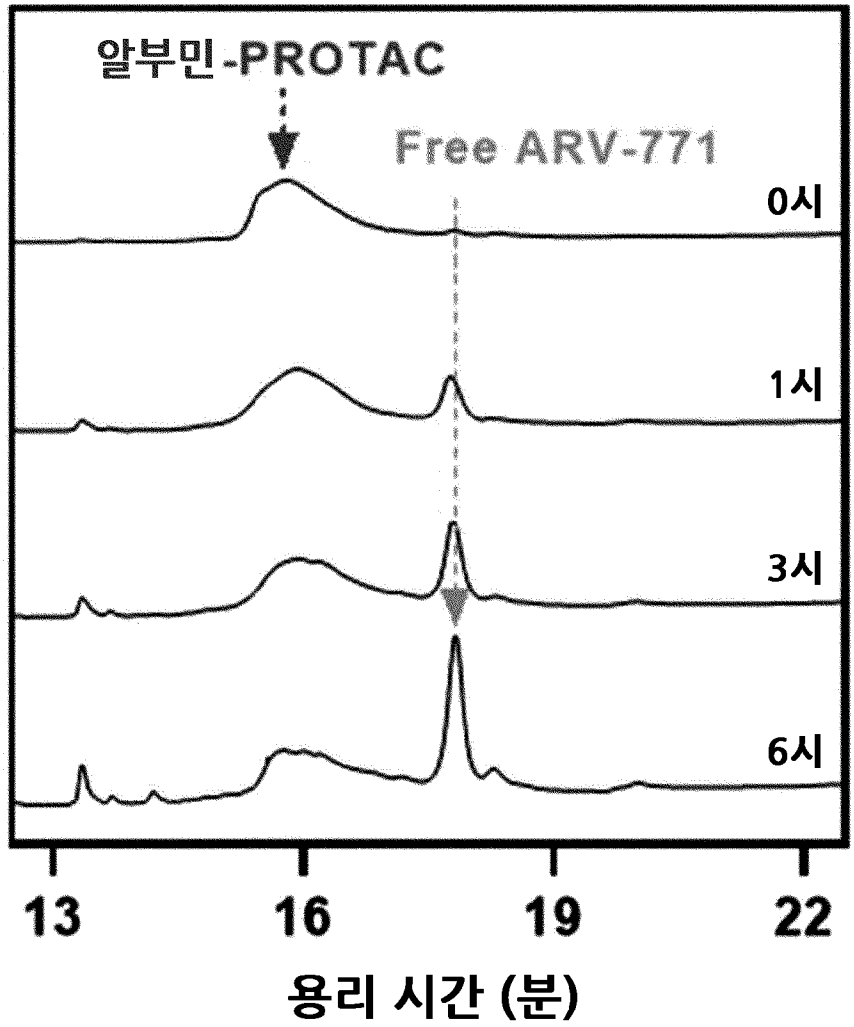
[도7]



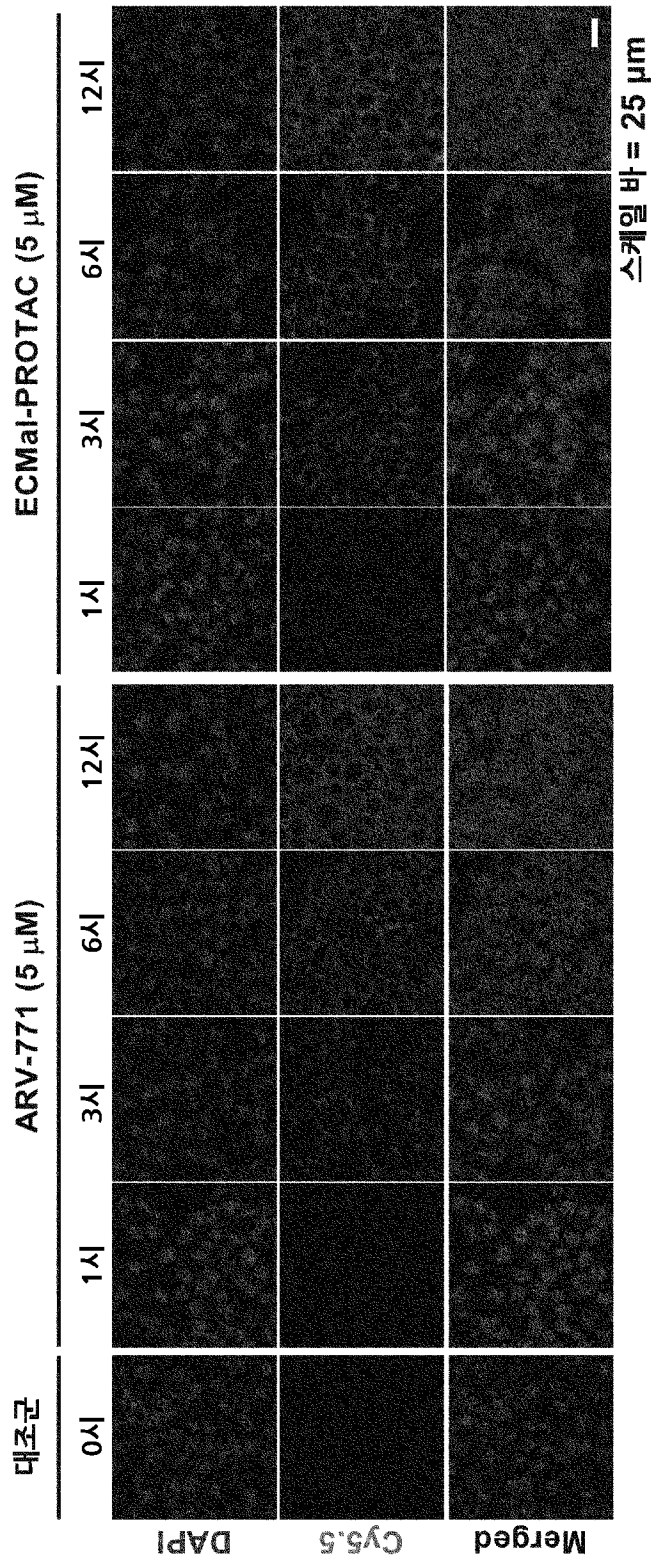
[도8]



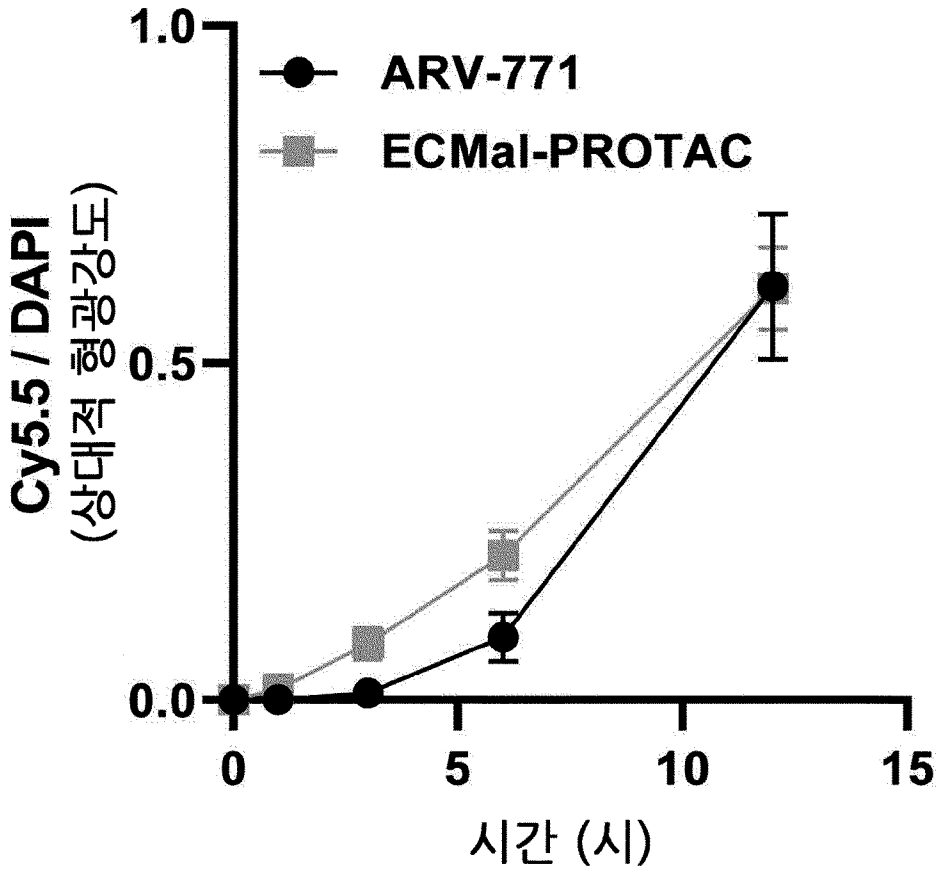
[도9]



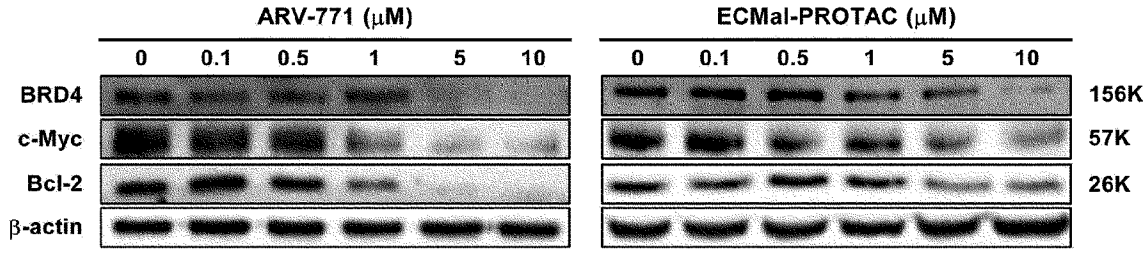
[도10]


대조군
ARV-771 (5 μM)
ECMal-PROTAC (5 μM)
0시
1시
3시
6시
12시
1시
3시
6시
12시
DAPI
Cy5.5
Merged
스케일 바 = 25 μm

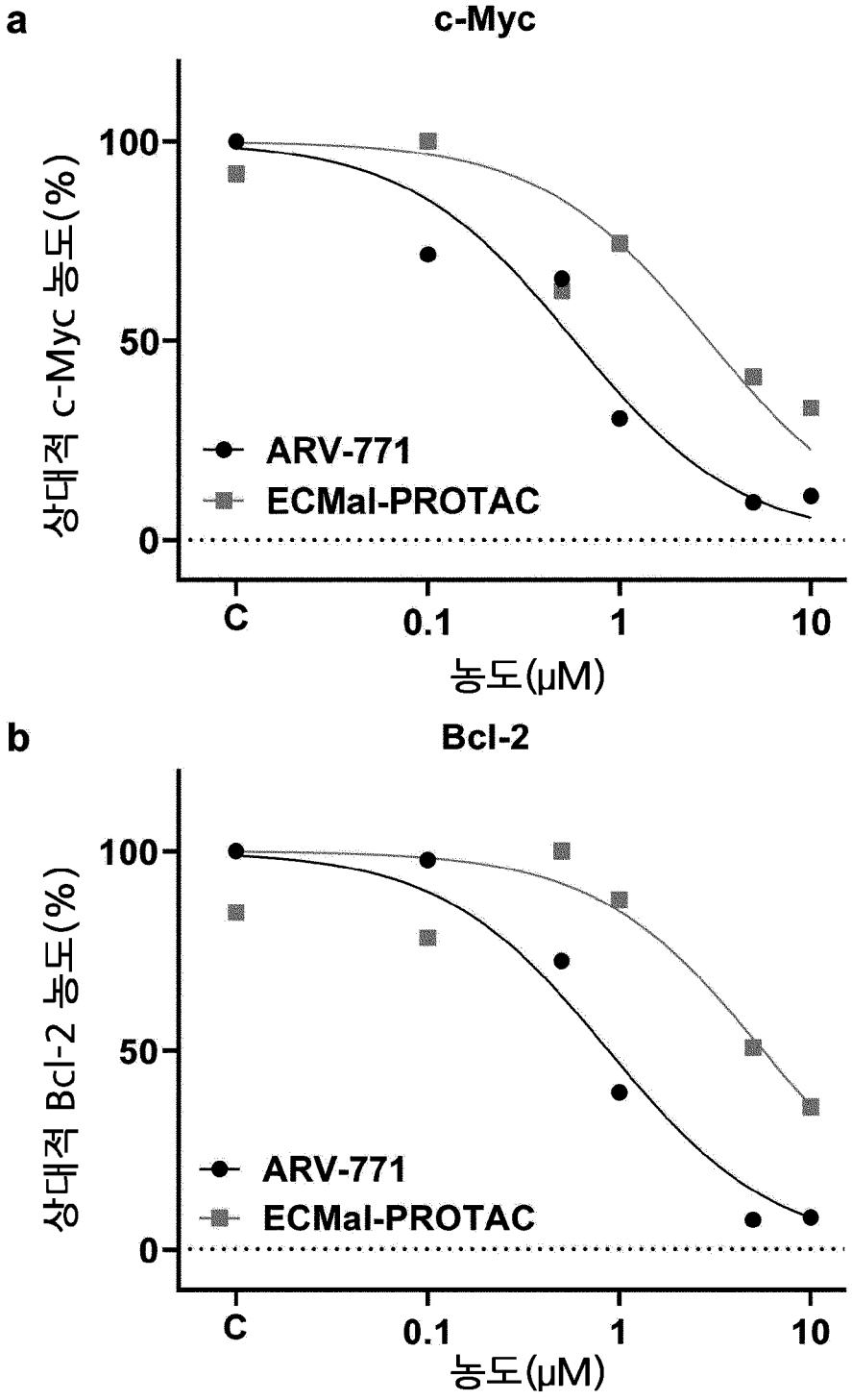
[도11]


1.0
0.5
0.0
ARV-771
ECMal-PROTAC
Cy5.5 / DAPI
(상대적 형광강도)
0
5
10
15
시간 (시)

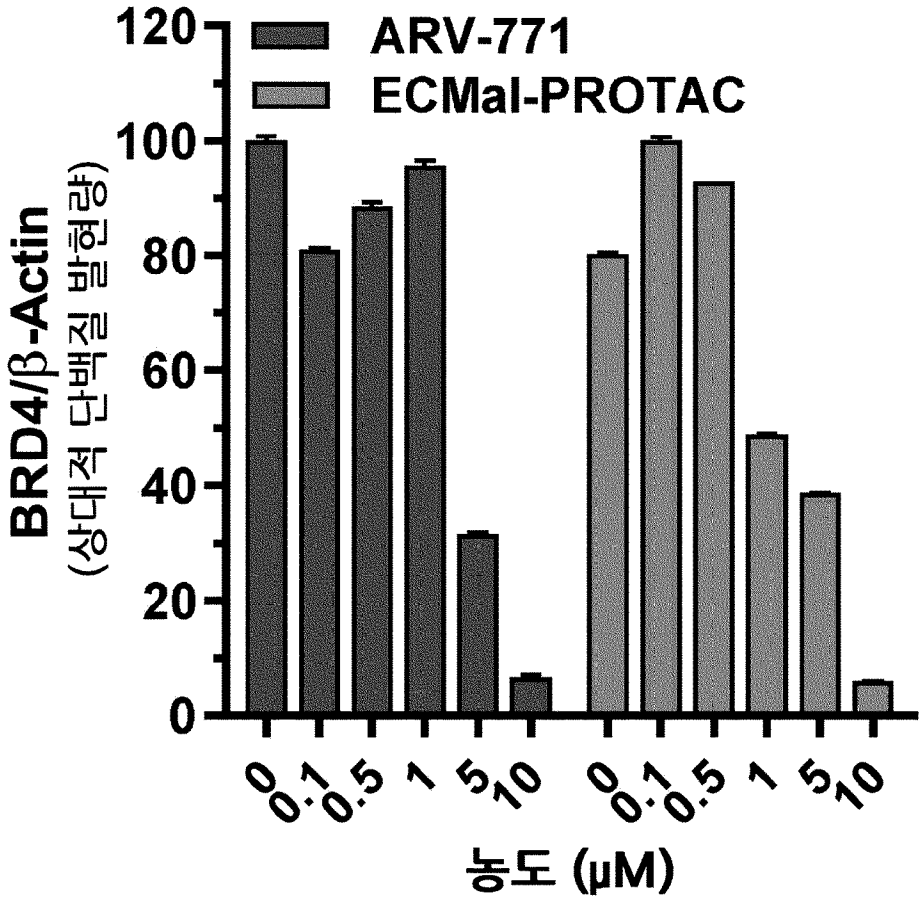
[도12]


ARV-771 (μM)
ECMal-PROTAC (μM)
0
0.1
0.5
1
5
10
BRD4
c-Myc
Bcl-2
β-actin
156K
57K
26K

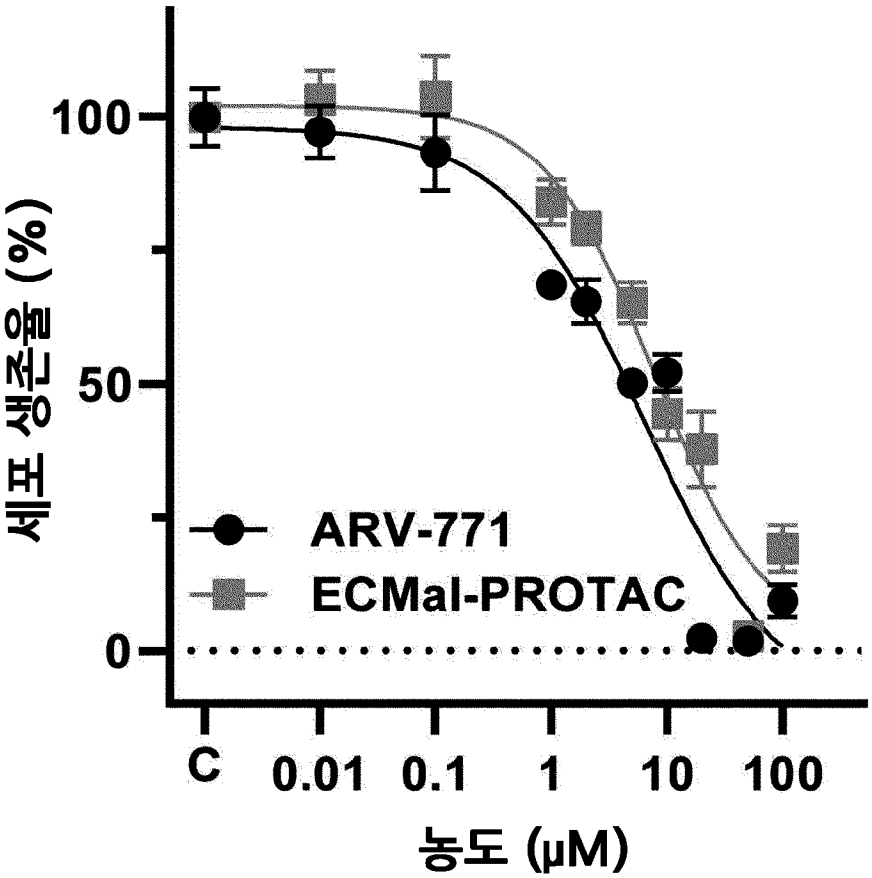
[도13]


a
c-Myc
상대적 c-Myc 농도(%)
100
50
0
ARV-771
ECMal-PROTAC
C
0.1
1
10
농도(μM)
b
Bcl-2
상대적 Bcl-2 농도(%)
100
50
0
ARV-771
ECMal-PROTAC
C
0.1
1
10
농도(μM)

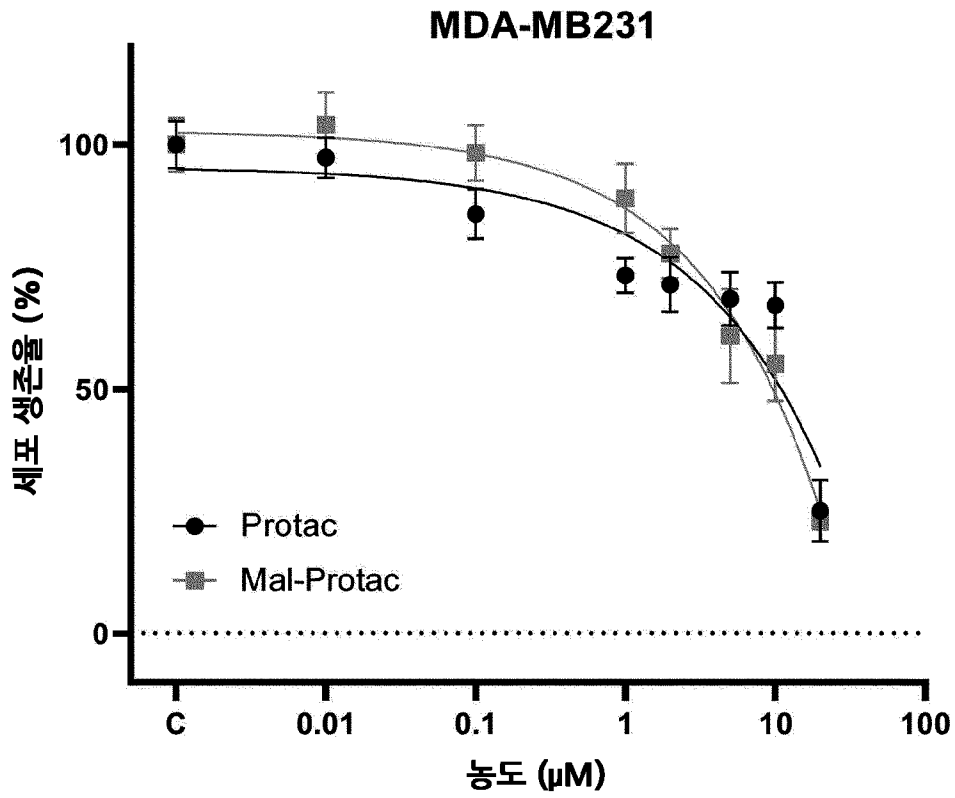
[도14]


ARV-771
ECMaI-PROTAC
BRD4/β-Actin
(상대적 단백질 발현량)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.1
0.5
1
5
10
0
0.1
0.5
1
5
10
농도 (μM)

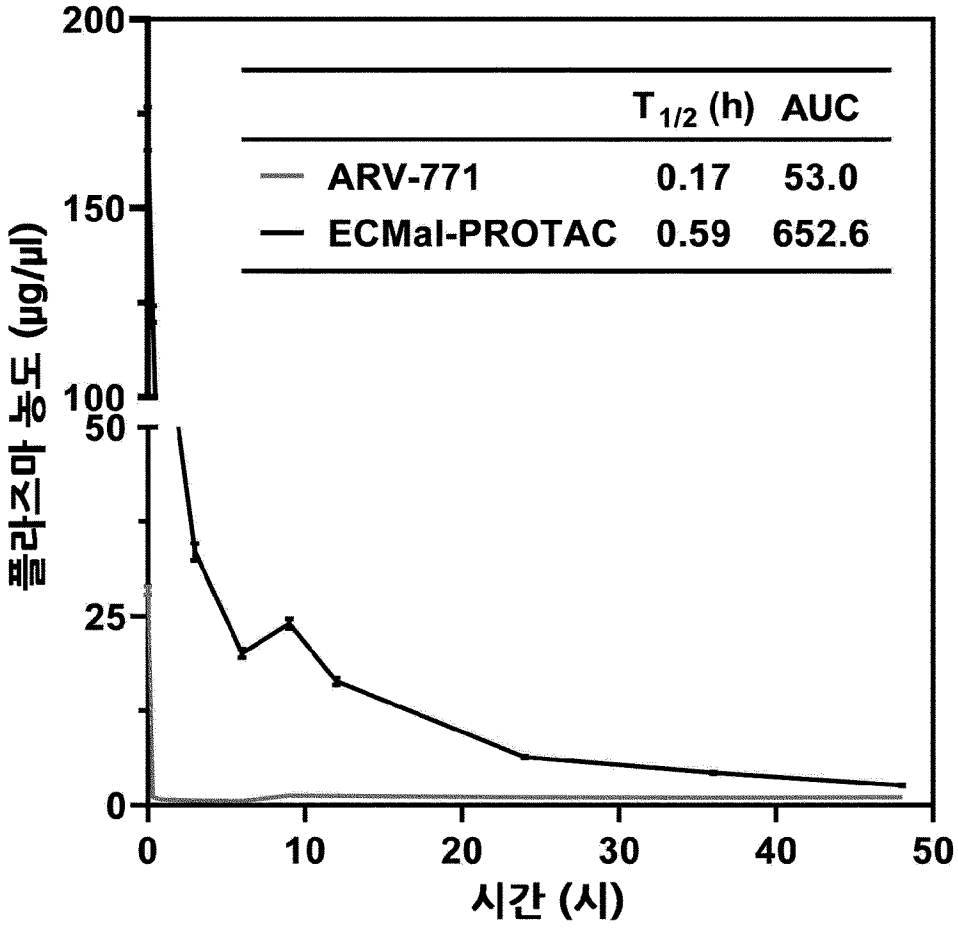
[도15a]


100
50
0
세포 생존율 (%)
ARV-771
ECMaI-PROTAC
C
0.01
0.1
1
10
100
농도 (μM)

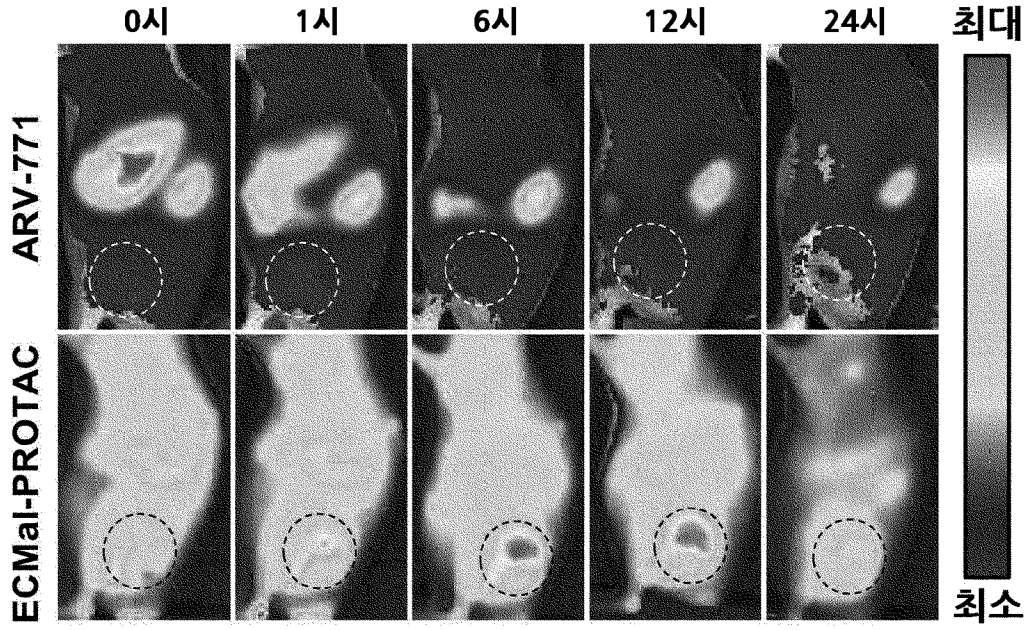
[도15b]


MDA-MB231
세포 생존율 (%)
100
50
0
Protac
Mal-Protac
C
0.01
0.1
1
10
100
농도 (μM)

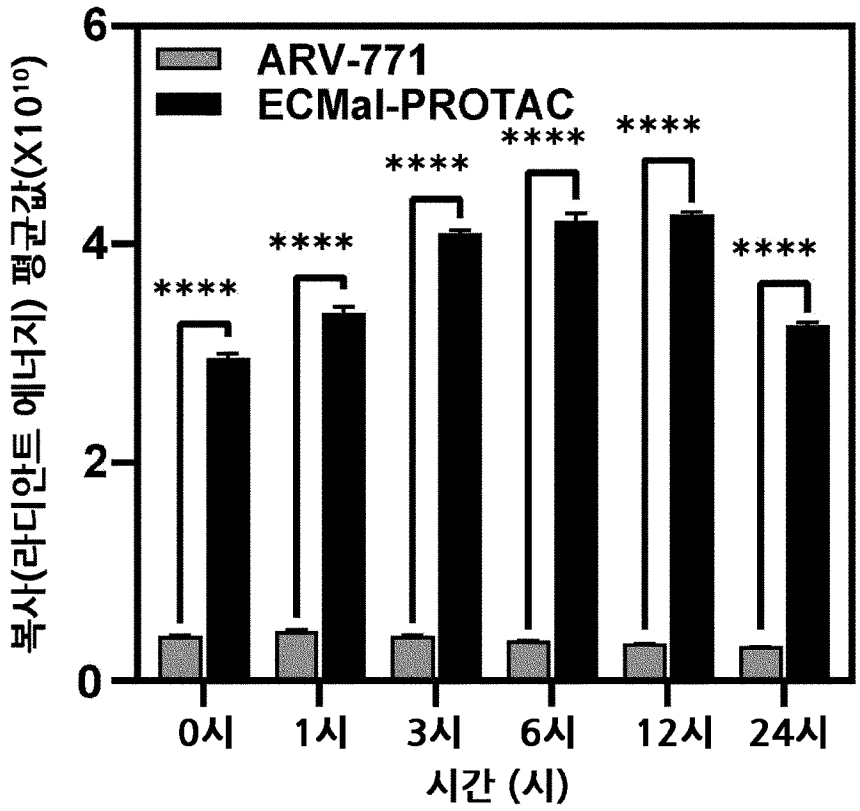
[도16]


T1/2 (h) AUC
ARV-771 0.17 53.0
ECMal-PROTAC 0.59 652.6
플라즈마 농도 (μg/μl)
200
150
100
50
25
0
0
10
20
30
40
50
시간 (시)

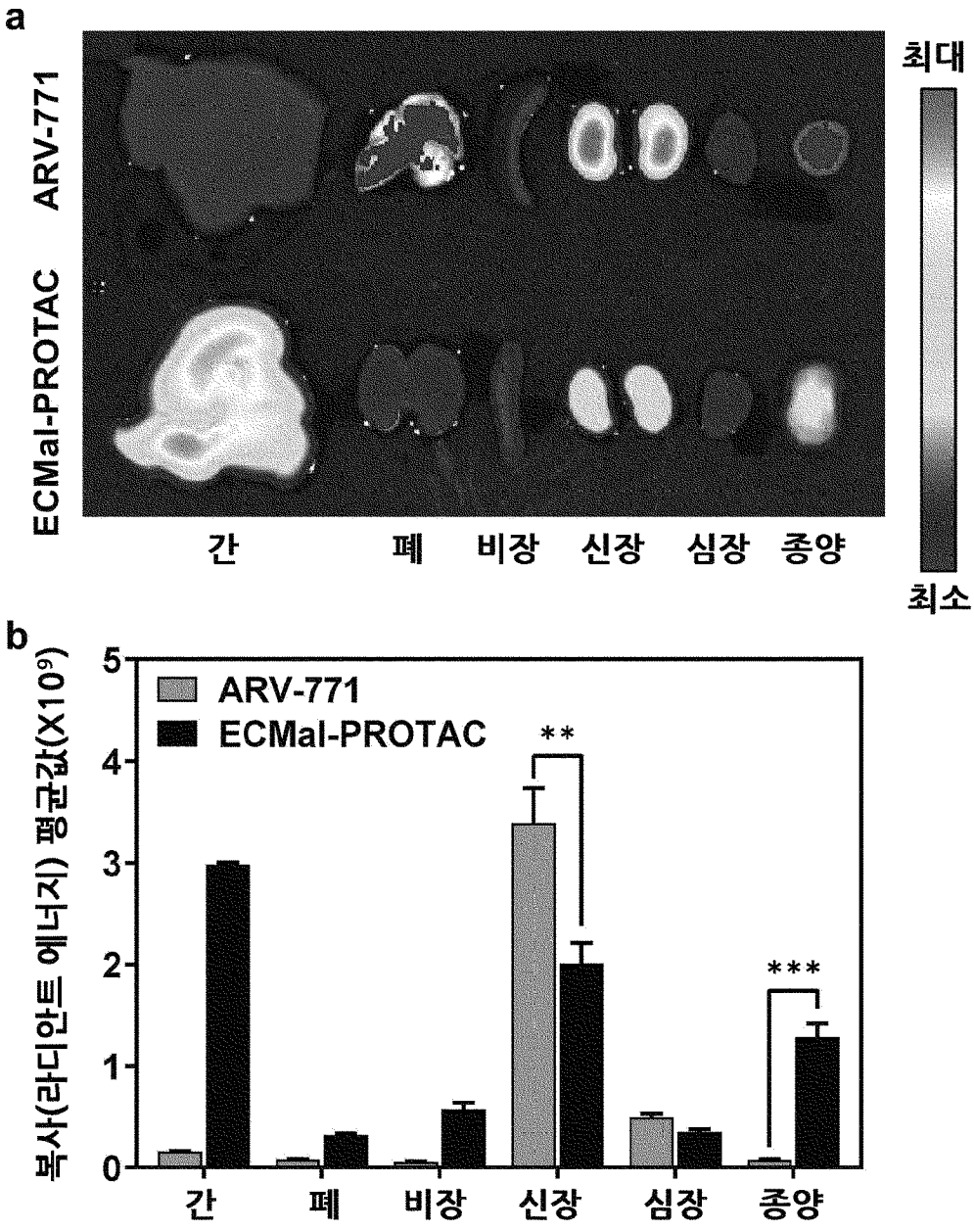
[도17]


0시
1시
6시
12시
24시
최대
최소
ARV-771
ECMal-PROTAC

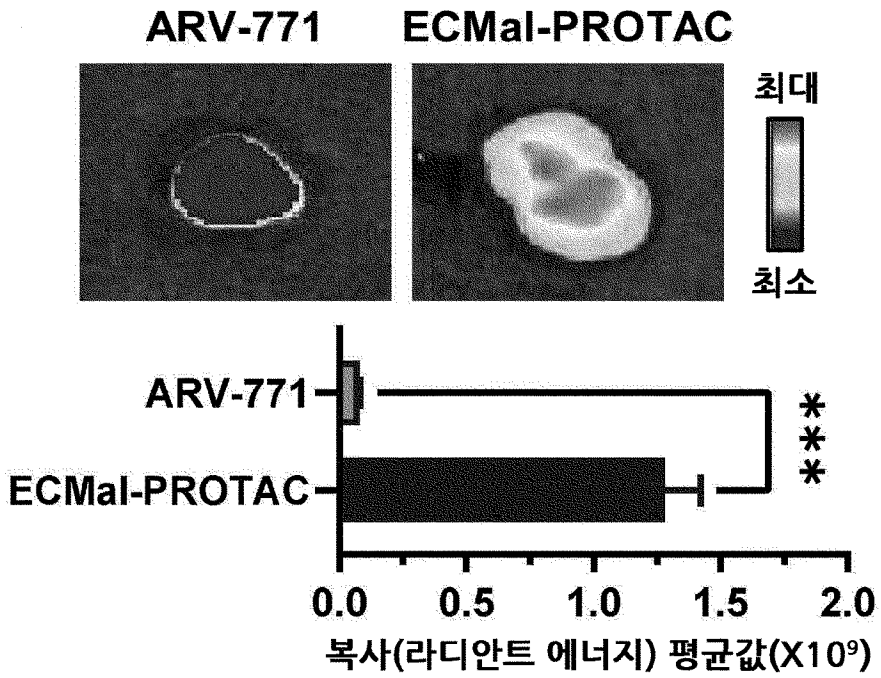
[도18]


ARV-771
ECMal-PROTAC
복사(라디안트 에너지) 평균값(X10¹⁰)
0
2
4
6
****
0시
1시
3시
6시
12시
24시
시간 (시)

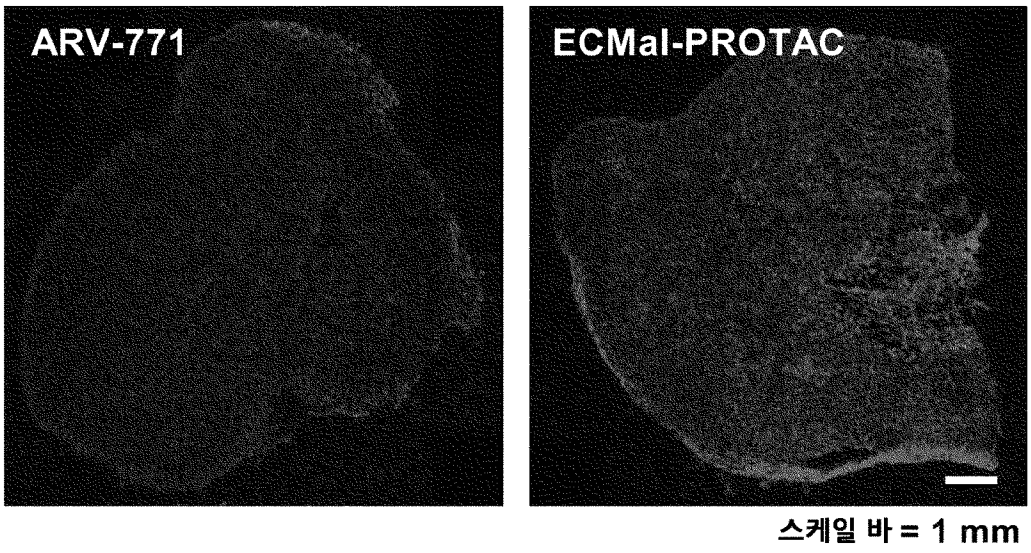
[도19]


a
ARV-771
ECMal-PROTAC
최대
최소
간
폐
비장
신장
심장
종양
b
복사(라디안트 에너지) 평균값(X10⁹)
ARV-771
ECMal-PROTAC
**
***
0
1
2
3
4
5
간
폐
비장
신장
심장
종양

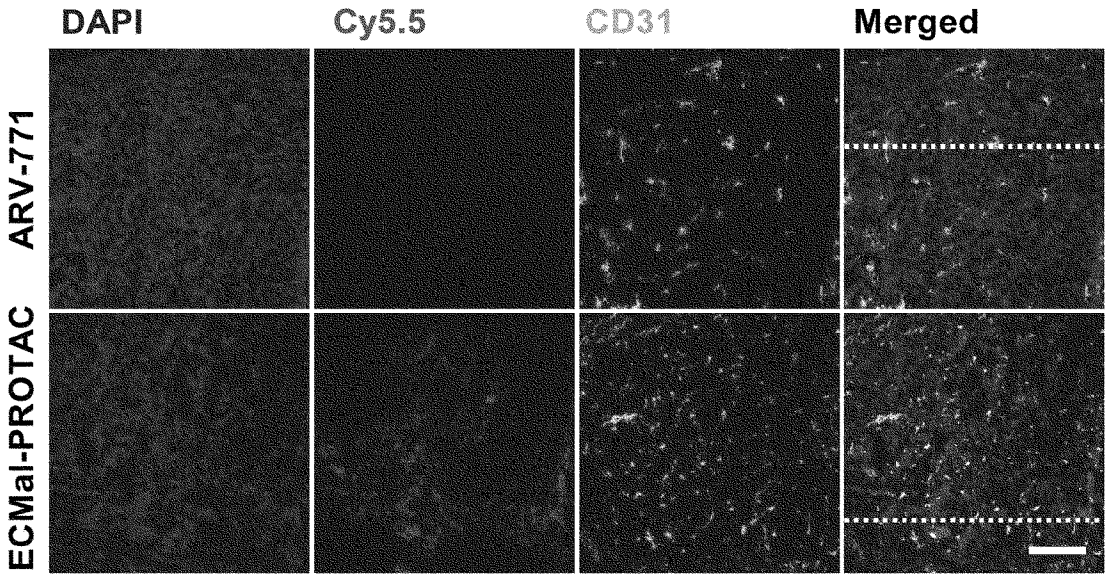
[도20]


ARV-771
ECMal-PROTAC
최대
최소
ARV-771
ECMal-PROTAC
***
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
복사(라디안트 에너지) 평균값(X10⁹)

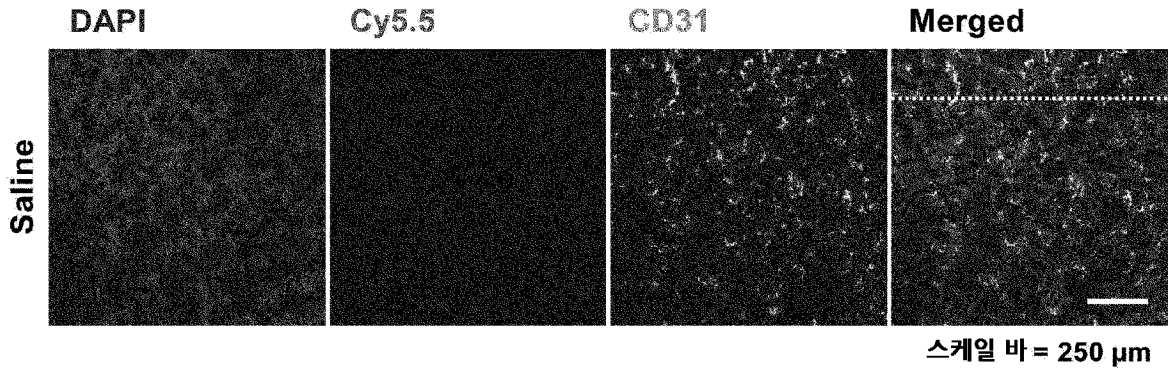
[도21]


ARV-771
ECMal-PROTAC
스케일 바 = 1 mm

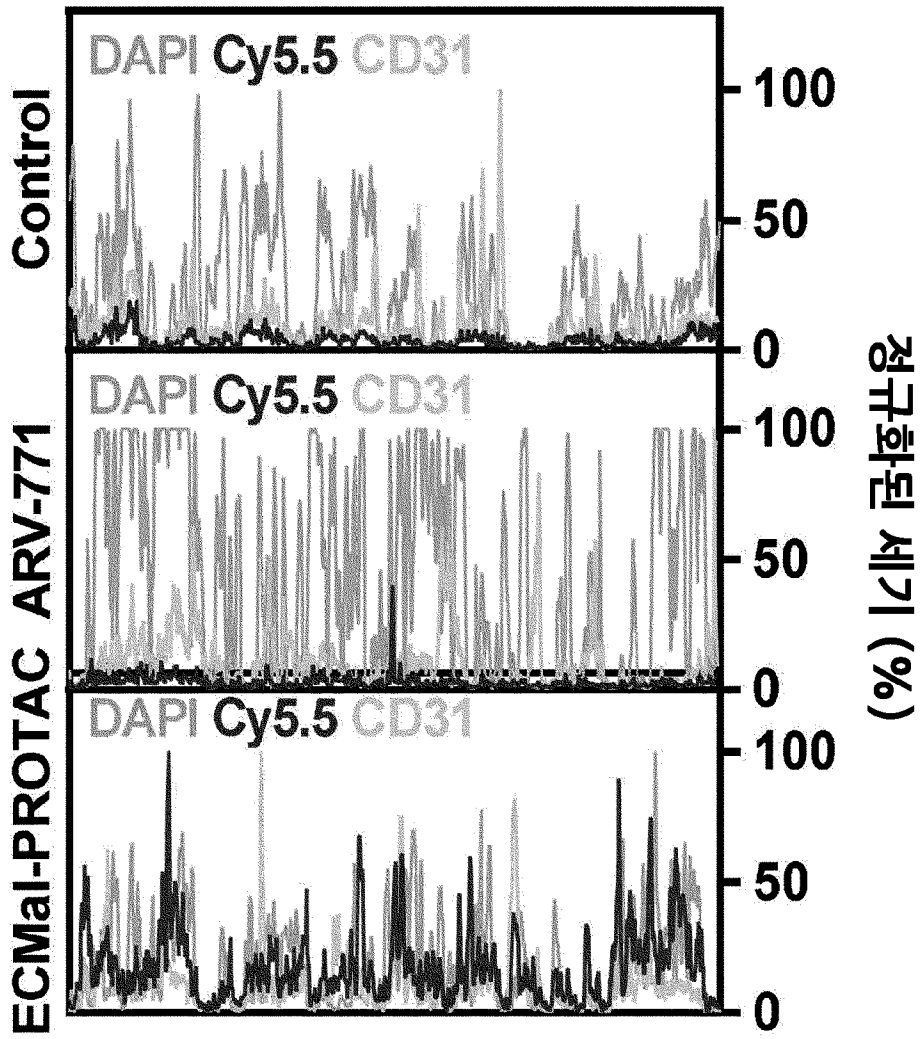
[도22]


DAPI
Cy5.5
CD31
Merged
ARV-771
ECMal-PROTAC
스케일 바 = 250 μm

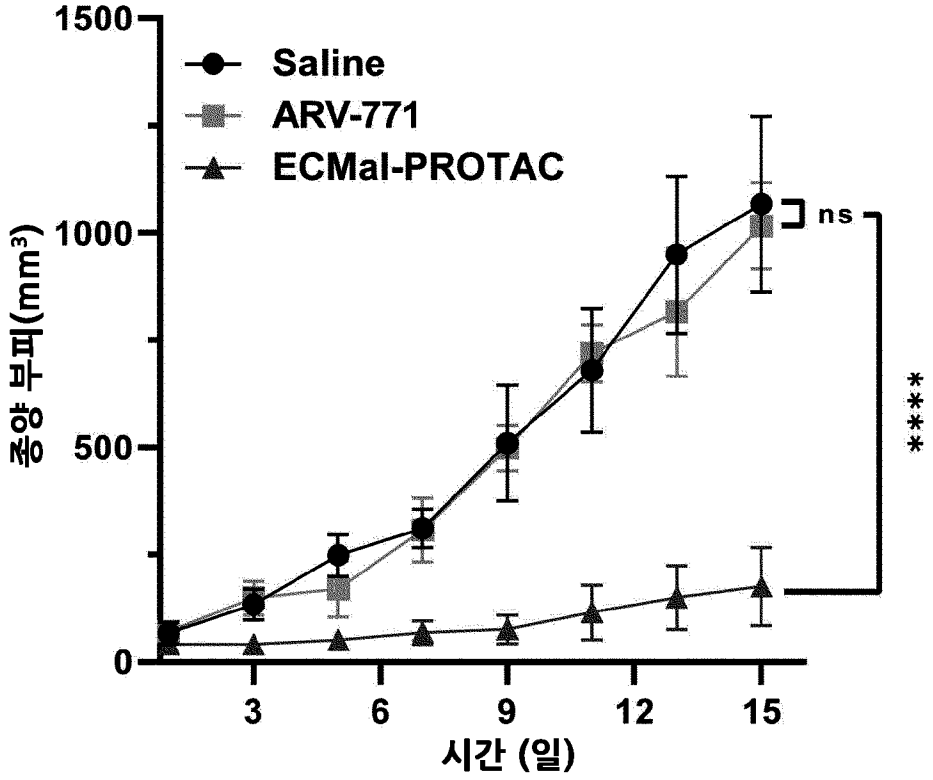
[도23]


DAPI
Cy5.5
CD31
Merged
Saline
스케일 바 = 250 μm

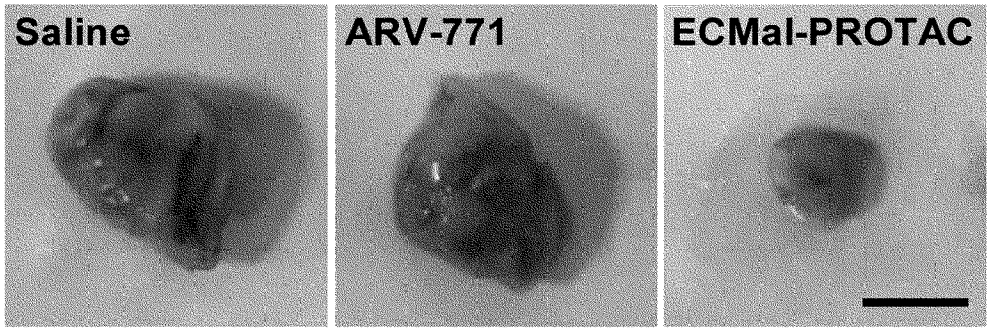
[도24]


DAPI Cy5.5 CD31
Control
ECMal-PROTAC ARV-771
100
50
0
정규화된 세기 (%)

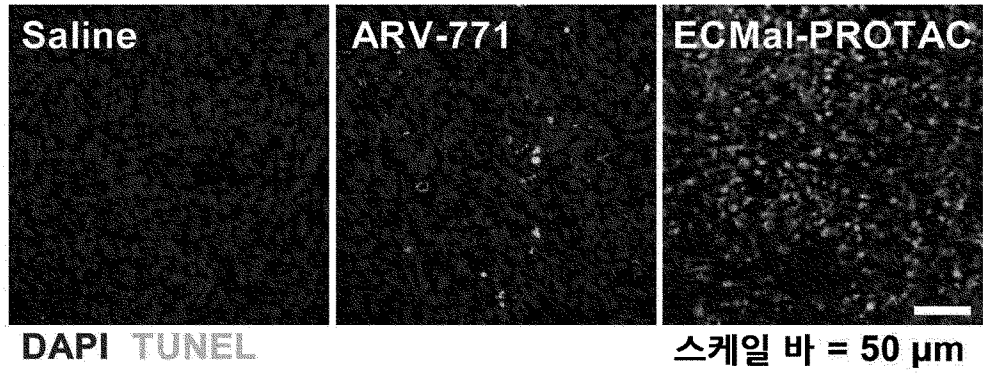
[도25]


Saline
ARV-771
ECMal-PROTAC
종양 부피(mm³)
1500
1000
500
0
3
6
9
12
15
시간 (일)
ns
****

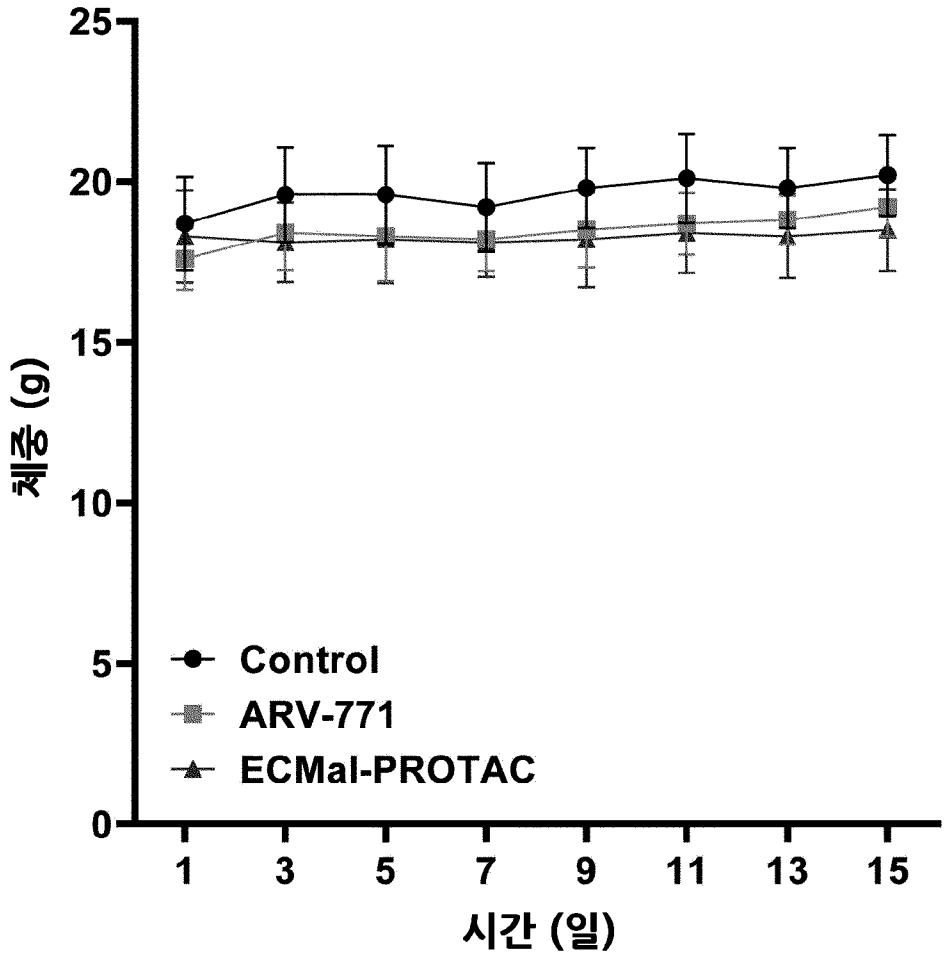
[도26]


Saline
ARV-771
ECMal-PROTAC
스케일 바 = 1 cm

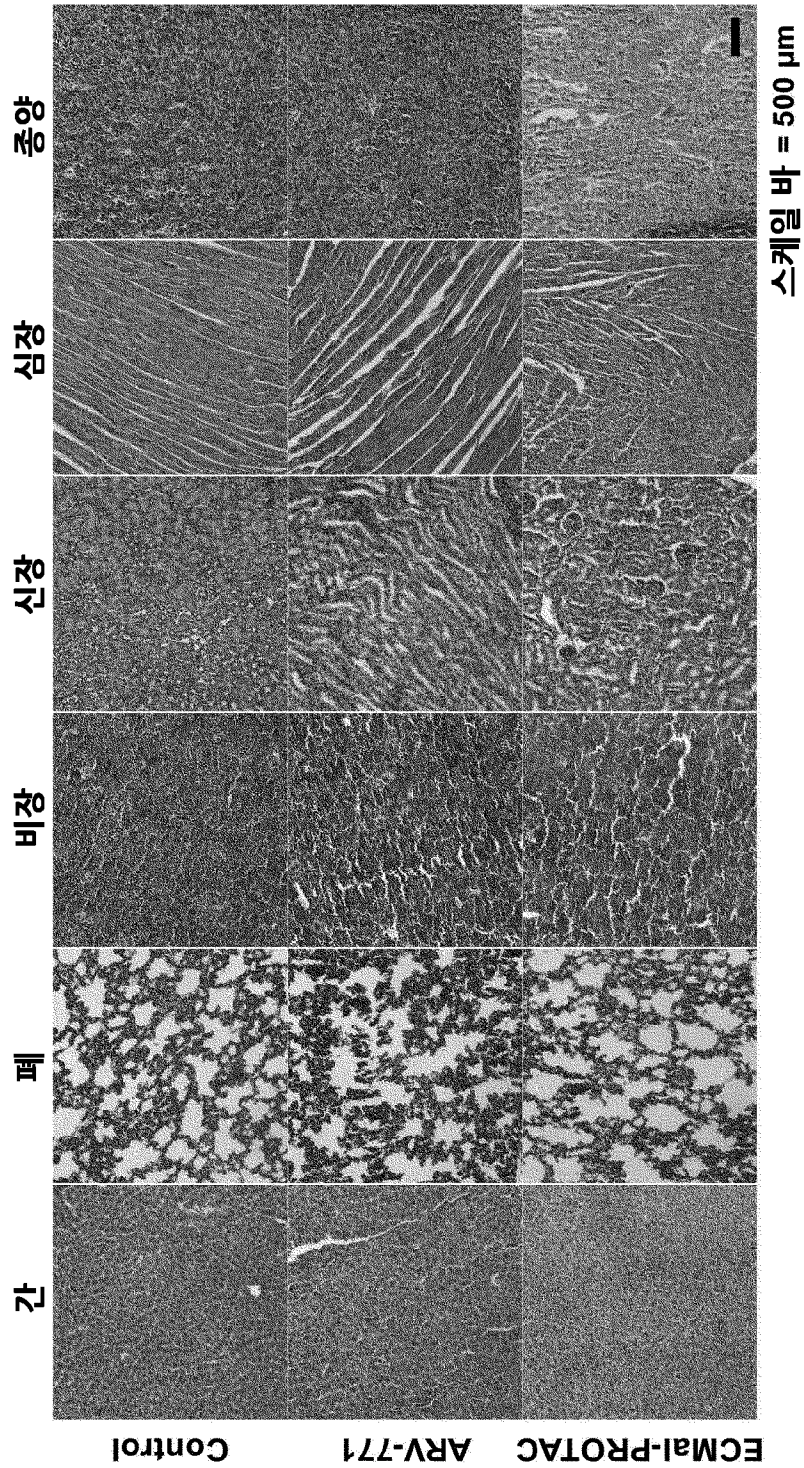
[도27]


Saline
ARV-771
ECMal-PROTAC
DAPI TUNEL
스케일 바 = 50 μm

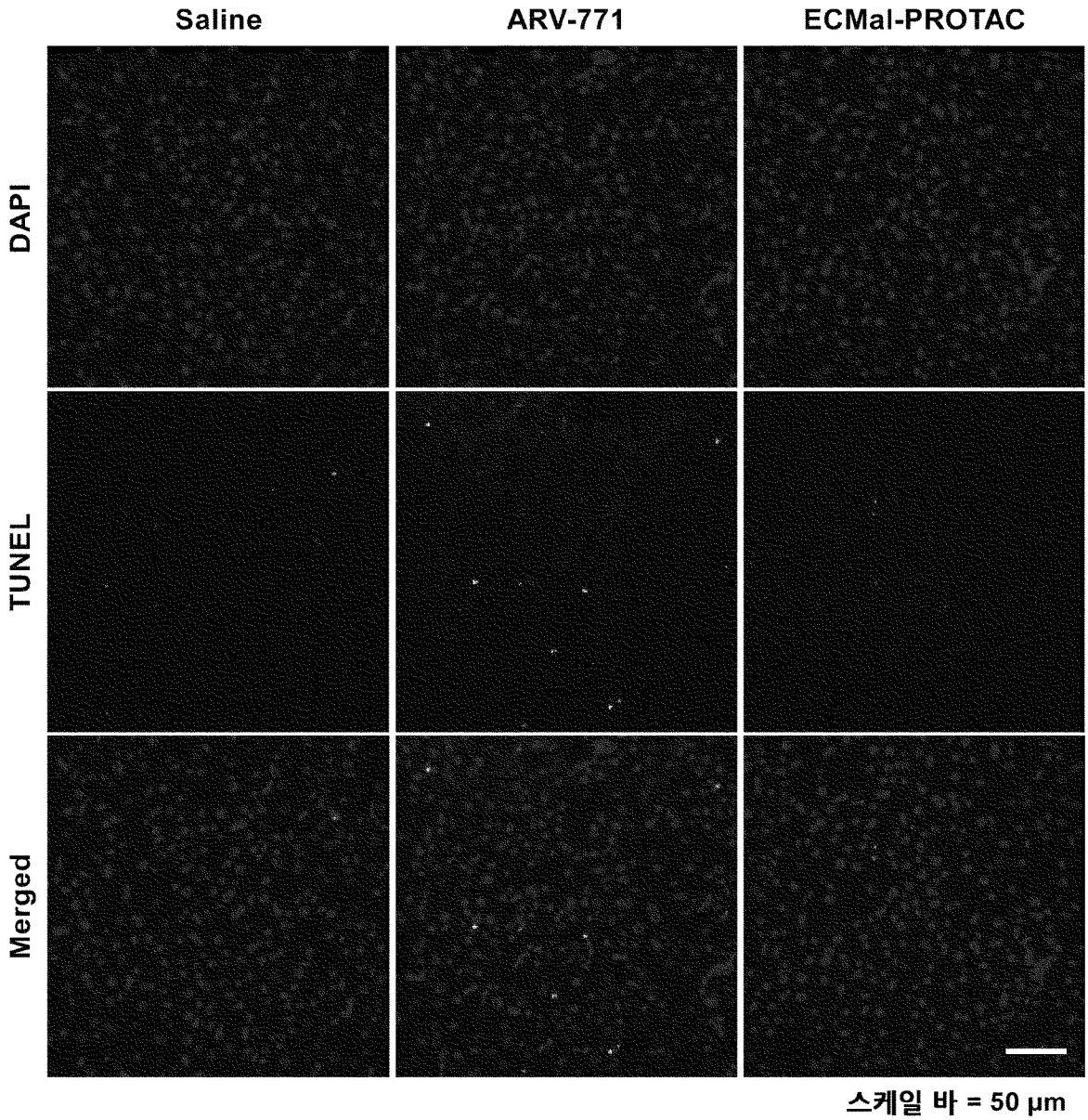
[도28]


25
20
15
10
5
0
체중 (g)
Control
ARV-771
ECMal-PROTAC
1
3
5
7
9
11
13
15
시간 (일)

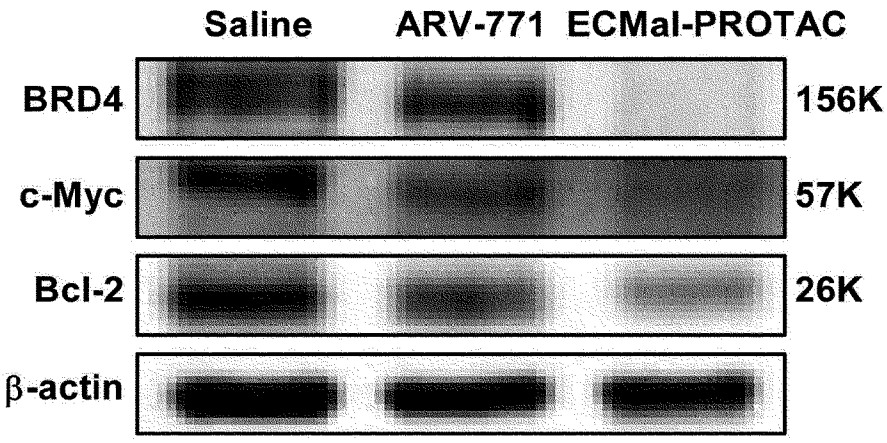
[도29]



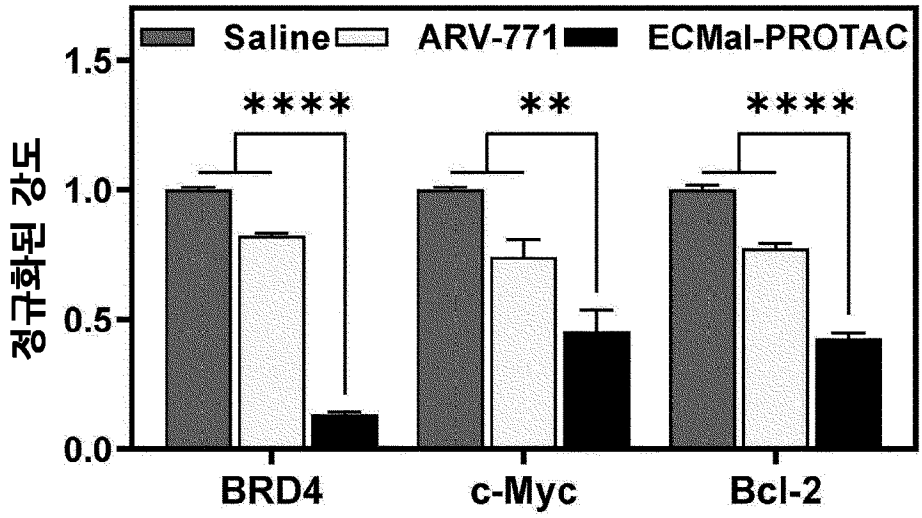
[도30]


Saline
ARV-771
ECMal-PROTAC
DAPI
TUNEL
Merged
스케일 바 = 50 μm

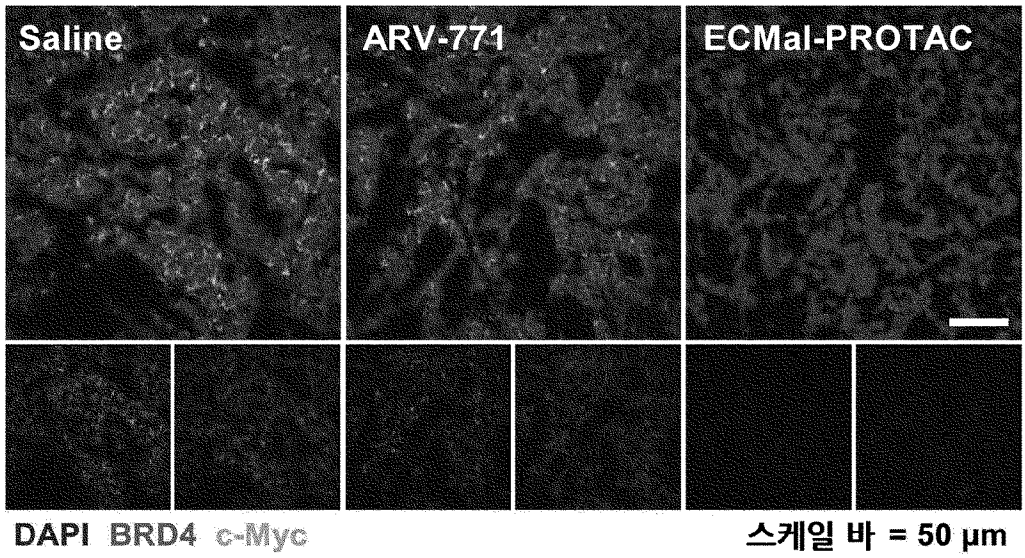
[도31]


Saline
ARV-771
ECMal-PROTAC
BRD4
156K
c-Myc
57K
Bcl-2
26K
β-actin

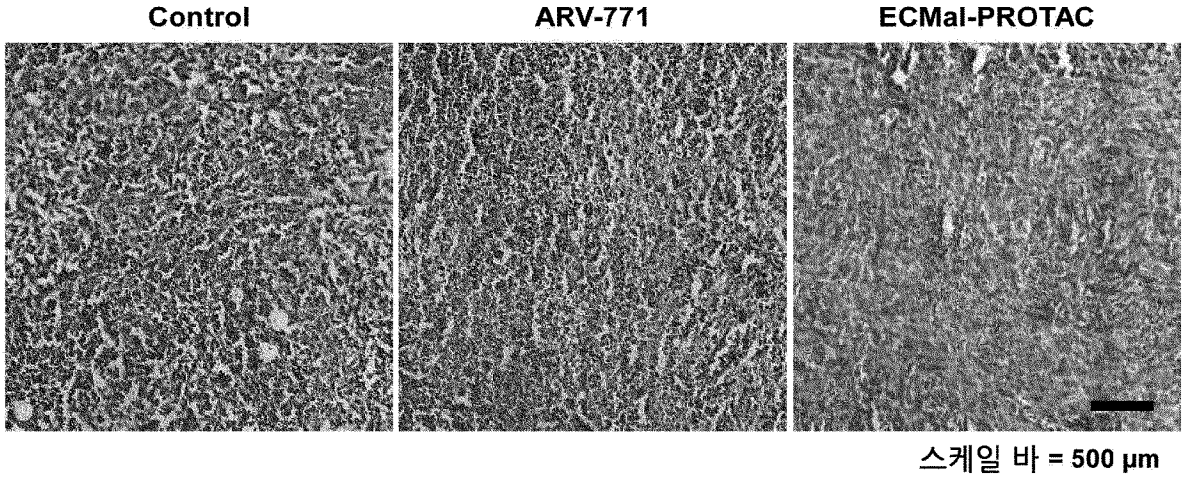
[도32]


Saline
ARV-771
ECMal-PROTAC
1.5
1.0
0.5
0.0
정규화된 강도
****
**
****
BRD4
c-Myc
Bcl-2

[도33]


Saline
ARV-771
ECMal-PROTAC
DAPI BRD4 c-Myc
스케일 바 = 50 μm

[도34]


Control
ARV-771
ECMal-PROTAC
스케일 바 = 500 μm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/020713

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/54(2017.01)i; **A61K 47/55**(2017.01)i; **A61K 31/551**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **C07D 495/14**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)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 47/54(2017.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/08(2006.01); A61K 47/18(2006.01); A61K 47/69(2017.01)

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), STN (Registry, Caplus), Google & keywords: 프로탁 (PROTAC; PROteolysis TArgeting Chimeras), 암 (cancer), 알부민 (albumin)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MANEIRO, M. et al. Antibody–PROTAC conjugates enable HER2-dependent targeted protein degradation of BRD4. ACS chemical biology. 2020, vol. 15, pp. 1306-1312. See abstract; pages 1309 and 1310; figure 1; and supporting information, page 11, formula S2.	1-4,6,7,9,10
Y		5,8
Y	SHEN, B. -Q. et al. Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates. Nature biotechnology. 2012, vol. 30, pp. 184-189. See abstract; figure 3; and figure S11.	5,8
A	GAO, J. et al. Engineered bioorthogonal POLY-PROTAC nanoparticles for tumour-specific protein degradation and precise cancer therapy. Nature Communications. 2022, vol. 13, 4318, pp. 1-14. See entire document.	1-10
A	WO 2021-234676 A1 (AAB THERAPEUTICS, LLC) 25 November 2021 (2021-11-25) See 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
"T" 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	Date of mailing of the international search report
25 March 2024	**27 March 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/020713

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2021-0141554 A (CODIAK BIOSCIENCES, INC.) 23 November 2021 (2021-11-23) See entire document.	1-10
X	CHO, H. et al. In situ albumin-binding and esterase-specifically cleaved BRD4-degrading PROTAC for targeted cancer therapy. Biomaterials. April 2023, vol. 295, 122038, pp. 1-6. See abstract; and pages 3 and 4. ※This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-10
X	조한희. 표적형 항암 치료를 위한 리소좀 특이적 나노약물. 박사학위 논문, 서울대학교 대학원, 재료공학부 재료공학 전공. February 2023 (JO, Han Hee. Lysosomal enzyme specific nanodrugs for targeted cancer therapy. Ph.D. thesis, Department of Materials Science and Engineering, Seoul National University Graduate School.) See abstract; and pages 91-143. ※This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/020713

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021-234676 A1	25 November 2021	EP 4153235 A1	29 March 2023
		US 2023-0102212 A1	30 March 2023
		WO 2021-234676 A4	20 January 2022
KR 10-2021-0141554 A	23 November 2021	AU 2020-241903 A1	14 October 2021
		CA 3133314 A1	24 September 2020
		CN 113747925 A	03 December 2021
		EP 3941528 A1	26 January 2022
		IL 286562 A	31 October 2021
		JP 2022-525924 A	20 May 2022
		MX 2021011242 A	19 January 2022
		SG 11202109587 A	28 October 2021
		WO 2020-191377 A1	24 September 2020

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/020713

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/54(2017.01)i; **A61K 47/55**(2017.01)i; **A61K 31/551**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **C07D 495/14**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/54(2017.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 47/08(2006.01); A61K 47/18(2006.01); A61K 47/69(2017.01)

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 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 프로탁 (PROTAC; PROteolysis TArgeting Chimeras), 암 (cancer). 알부민 (albumin)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	MANEIRO, M. 등, "Antibody–PROTAC conjugates enable HER2-dependent targeted protein degradation of BRD4", ACS chemical biology, 2020, 15권, 페이지 1306-1312 초록; 페이지 1309, 1310; 도면 1; supporting information, 페이지 11; 도식 S2	1-4,6,7,9,10 5,8
Y	SHEN, B. -Q. 등, "Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates", Nature biotechnology, 2012, 30권, 페이지 184-189 초록; 도면 3; 도면 S11	5,8
A	GAO, J. 등, "Engineered bioorthogonal POLY-PROTAC nanoparticles for tumour-specific protein degradation and precise cancer therapy", Nature Communications, 2022, 13권, 4318, 페이지 1-14 전문	1-10
A	WO 2021-234676 A1 (AAB THERAPEUTICS, LLC) 2021.11.25 전문	1-10
A	KR 10-2021-0141554 A (코디악 바이오사이언시즈, 인크.) 2021.11.23 전문	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
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년03월25일(25.03.2024)	**2024년03월27일(27.03.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/020713

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CHO, H. 등, "In situ albumin-binding and esterase-specifically cleaved BRD4-degrading PROTAC for targeted cancer therapy", Biomaterials, 2023.04, 295권, 122038, 페이지 1-6 초록; 페이지 3, 4 ※위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-10
X	조한희, "표적형 항암 치료를 위한 리소좀 특이적 나노약물", 박사학위 논문, 서울대학교 대학원, 재료공학부 재료공학 전공, 2023.02 초록; 페이지 91-143 ※위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-10

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/020713

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2021-234676 A1	2021/11/25	EP 4153235 A1	2023/03/29
		US 2023-0102212 A1	2023/03/30
		WO 2021-234676 A4	2022/01/20
KR 10-2021-0141554 A	2021/11/23	AU 2020-241903 A1	2021/10/14
		CA 3133314 A1	2020/09/24
		CN 113747925 A	2021/12/03
		EP 3941528 A1	2022/01/26
		IL 286562 A	2021/10/31
		JP 2022-525924 A	2022/05/20
		MX 2021011242 A	2022/01/19
		SG 11202109587 A	2021/10/28
		WO 2020-191377 A1	2020/09/24