

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 12월 3일 (03.12.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/242218 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 47/64 (2017.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01) A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 33/243 (2019.01) C12N 9/10 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/006906

(22) 국제출원일: 2020년 5월 28일 (28.05.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0062595 2019년 5월 28일 (28.05.2019) KR

(71) 출원인: 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) [KR/KR]; 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 주식회사 퓨전바이오텍 (FUSION BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34051 대전시 유성구 문지로 193, 연구동 3층, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김채규 (KIM, Chae Kyu); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 유자형 (RYU, Ja

Hyung); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).

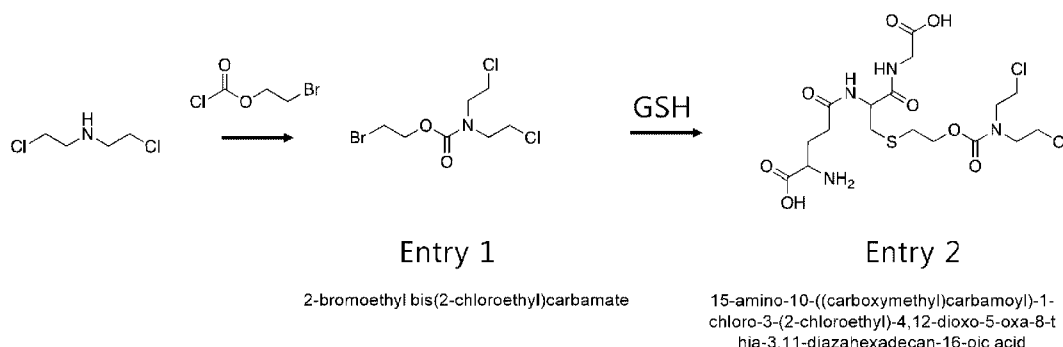
(74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13, 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).

(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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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,

(54) Title: GLUTATHIONE PRECURSOR DRUG-DELIVERY CARRIER COMPRISING GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE AND PROTEIN, WHICH HAS BINDING CAPACITY FOR TARGET CELL OR TARGET PROTEIN, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 글루타치온- S - 전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 글루타치온 전구체 약물의 전달체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a glutathione precursor drug-delivery carrier comprising a glutathione-S-transferase and a protein, which has a binding capacity for a target cell or a target protein, and a use thereof as a pharmaceutical composition. A glutathione precursor drug-delivery carrier according to an aspect can prolong in vivo retention time, and also has enhanced targeting ability for a target cell so as to be effectively delivered to the target cell, thereby being effectively usable as a targeted therapeutic agent.

(57) 요약서: 글루타치온- S - 전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 글루타치온 전구체 약물의 전달체 및 약학적 조성물로서의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 글루타치온 전구체 약물의 전달체에 의하면, 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/242218 A1

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, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 글루타치온-S-전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 글루타치온 전구체 약물의 전달체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 글루타치온-S-전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 글루타치온 전구체 약물의 전달체 및 약학적 조성물로서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재 알려져 있는 항암제의 종류는 화학항암제, 표적항암제, 면역항암제 등이 있다.
- [3] 화학항암제는 세포독성항암제, 화학약물항암제로도 불린다. 다른 항암제가 부작용이 없는 것은 아니지만, 세간에 흔히 알려진 항암치료 부작용인 백혈구 감소, 탈모, 구토중세, 설사 등은 대개 1세대 항암제인 화학항암제가 그 주범이다. 화학항암제를 쓴다고 모든 정상세포를 파괴되는 건 아니다. 주로 증식 속도가 빠른 골수의 조혈모세포, 모근세포, 음식물이 통과하는 구강 및 장내 점막, 생식기관 등에 영향을 준다. 화학항암제는 단기간에 증식하는 암세포의 특성을 찾아 공격하도록 설계되어있기 때문이다.
- [4] 대부분 정상세포는 화학항암제를 사용한 치료가 끝난 뒤 시간이 지나면 회복된다. 2~4주 간격을 두고 항암치료를 시행하는 것은 정상세포가 회복할 시간을 주는 것이다. 하지만 손발저림과 같은 말초신경독성은 완전히 회복되기까지 몇 년까지 걸릴 수도 있다고 의료계는 경고한다. 또 화학항암제로 인해 심장, 폐, 콩팥, 생식기관에 손상이 발생하면 영구적으로 지속될 수도 있다.
- [5] 최근에는 표적 치료제가 활발히 개발되고 있는데 암세포가 가진 특정 마커만을 판별하여 공격하기 때문에 정상 세포를 건드리지 않고, 암세포 살상력도 몇 배나 뛰어나다. 만성 골수성 백혈병 환자들의 희망이나 다름없는 글리벡이 그 대표적인 예. 현실적으로 정상세포, 암세포 가리지 않고 죽여버리는 전통적인 고식적 항암제의 경우에는 이미 그 효과를 더욱 끌어올리거나 부작용을 줄일 수 있는 여지가 거의 한도에 다다랐기 때문에 이러한 표적치료제의 개발이 의학의 발전에 큰 화두가 되고 있다. 다만 표적치료제도 효과가 좋은 환자군은 한정되어 있고, 내성에 취약하며, 높은 가격대에 비해 실효능이 떨어진다는 치명적인 단점이 있어 한계점이 뚜렷하다.
- [6] 화학항암제와 표적치료제의 단점을 개선한 면역항암제의 경우, CAR-T세포 치료요법이 두각을 드러내고 있다. CAR-T세포 치료요법이란 환자에서 추출한 T 세포에 인위적으로 설계한 유전자를 삽입해, 재프로그래밍된 T세포가 암세포를 공격하게끔 유도하는 방식을 말한다. CAR-T 치료요법의 경우

항암제가 잘 듣지 않는 난치암 환자에게서 높은 치료 효과를 보이거나, 독성이 매우 강력하고 부작용으로 사이토카인 방출 증후군(Cytokine Release Syndrome)이 나타날 경우 환자가 사망하는 사례가 많아 불안정한 점이 많다. 또한 1회 투여비용이 미국 기준으로 1억 5천만에 달하며, 고형암에는 치료효과가 크지 않다.

- [7] 따라서, 현재 항암제의 단점을 보완할 수 있는 약물의 개발이 계속되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 일 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 함유하는 약물 전달체를 제공하는 것이다.
- [9] 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 약물을 전달하는 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 일 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 함유하는 약물 전달체를 제공한다.
- [13] 본 명세서에서 용어 "표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질",

"표적세포 인식능을 갖는 단백질", 또는 "표적 세포 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질"은 세포의 수용체 또는 표적 단백질을 특이적으로 인식하는 또는 세포의 수용체 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질을 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 세포의 수용체 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질은 항체, 항원 결합 단편, 애피바디(affibody), 다이아바디(diabody) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

- [14] 본 명세서에서 용어 "애피바디 분자(affibody molecule)"는 특정 타겟 단백질(수용체)에 결합할 수 있는, 항체 모사체를 의미할 수 있다. 일반적으로 애피바디 분자는 20 내지 150의 아미노산 잔기로 구성되며, 2 내지 10개의 알파 헬릭스로 구성된 것일 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 애피바디 분자는 항-ErbB 애피바디 분자(ab31889), HER2-특이적 애피바디 분자(ZHER2:342), 항-EGFR 애피바디 분자(ZEGFR:2377) 등을 포함할 수 있다. 또한, 이에 한정되지 않고, 세포의 특정 수용체 또는 표적 단백질을 인식할 수 있는 애피바디 분자를 모두 포함한다. 상기 애피바디 분자가 인식할 수 있는 표적 수용체 또는 표적 단백질의 예는, 아밀로이드 베타 펩티드, 시누클레인(예를 들면, 알파-시누클레인), 아포리포프로테인(예를 들면, 아포리포프로테인 A1), 보체 인자(Complement factor)(예를 들면, C5), 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase)(예를 들면, CAIX), 인터루킨-2 수용체 알파 사슬(IL2RA; CD25), 세포 표면의 CD 항원(예를 들면, CD28), 또는 c-Jun, Factor VIII, 프비르노젠, GP120, H-Ras, Her2, Her3, HPV16 E7, IAPP(Human islet amyloid polypeptide), 이뮤노글로불린 A(IgA), IgE, IgM, 인터루킨(예를 들면, IL-1, IL-6, IL-8, IL-17), 인슐린, 스태필로코커스 단백질 A 도메인(Staphylococcal protein A domain), Raf-1, LOV 도메인(Light-oxygen-voltage-sensing domain), 또는 RSV G 단백질일 수 있다. 상기 애피바디에 대한 정보는 Stefan Stahl et al., Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications, Trends in Biotechnology, August 2017, Vol 35, No 8에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에서 포함된다.

- [15] 상기 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질은 수용체 타이로신 카이네이즈(Receptor tyrosine kinases: RTKs)에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 수용체 타이로신 카이네이즈는 표피 성장인자 수용체, 인슐린 수용체, 혈소판 유래 성장인자 수용체, 혈관내피 성장인자 수용체, 섬유아세포 성장인자 수용체, 콜레시스토킨(Cholecystokinin: CCK) 수용체, 신경영양인자(Neurotrophic factor: NGF) 수용체, 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor: HGF) 수용체, 에프린(Ephrin: Eph) 수용체, 안지오프리에틴 수용체, 및 RYK(related to receptor tyrosine kinase) 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

- [16] 상기 GST 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질은 링커를 통해

연결되어 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 링커는, 1 내지 400개, 1 내지 200개, 또는 2 내지 200개의 임의의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드일 수 있다. 상기 펩티드 링커는 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 포함할 수 있으며, Thr 및 Ala과 같은 중성 아미노산들도 포함될 수 있다. 펩티드 링커에 적합한 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다. 또한 기능적 일부분 사이의 적절한 분리를 달성하기 위하여 또는 필수적인 내부-일부분(inter-moiety)의 상호작용을 유지하기 위한 링커의 최적화를 고려하여 카피 수 "n"을 조절할 수 있다. 해당 기술분야에서 다른 가요성 링커들이 알려져 있는데, 예를 들어 수용성을 향상시키기 위하여 극성 아미노산 잔기를 추가하는 것뿐만 아니라 유연성을 유지하기 위하여 T 및 A와 같은 아미노산 잔기를 추가한 G 및 S 링커가 있을 수 있다. 따라서 일 구체예에 있어서, 상기 링커는 G, S, 및/또는 T 잔기를 포함하는 유연성 링커일 수 있다. 상기 링커는 $(G_p S_s)_n$ 및 $(S_p G_s)_n$ 으로부터 선택되는 일반식을 가질 수 있고, 이 경우, 독립적으로, p는 1 내지 10의 정수이고, s = 0 내지 10의 0 또는 정수이고, p + s는 20 이하의 정수이고, 및 n은 1 내지 20의 정수이다. 더욱 구체적으로 링커의 예는 $(GGGGS)_n$ (서열번호 2), $(SGGGG)_n$ (서열번호 3), $(SRSSG)_n$ (서열번호 4), $(SGSSC)_n$ (서열번호 5), $(GKSSGSGSESKS)_n$ (서열번호 6), $(RPPPPC)_n$ (서열번호 7), $(SSPPPPC)_n$ (서열번호 8), $(GSTSGSGKSSEGGK)_n$ (서열번호 9), $(GSTSGSGKSSEGGSGSTKG)_n$ (서열번호 10), $(GSTSGSGKPGSGEGSTKG)_n$ (서열번호 11), 또는 $(EGKSSGSGSESKEF)_n$ (서열번호 12)이고, 상기 n은 1 내지 20, 또는 1 내지 10의 정수이다.

[17] 또 다른 양상은 상기 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[18] 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 의미한다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 자연의 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 당 또는 염기 부위가 변형된 그의 유사체(analogue)도 포함한다. 일 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 단쇄 폴리뉴클레오티드이다.

[19] 또 다른 양상은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[20] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 지칭한다. 일 실시예에 따른 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 및/또는 인핸서와 같은 발현 조절 요소를 포함할 수 있으며, 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 상기 벡터는, 숙주 세포 내에서 안정적으로 상기 융합 단백질을 발현시킬 수 있는, 발현용 벡터일 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터는 벡터를 함유 하는

숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우, 복제 기원을 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 도입될 수 있으며, 상기 벡터는 플라스미드, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 및 백시니아 바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[21] 상기 벡터는 동물세포, 예를 들어, 포유동물 세포에서 작동가능한 프로모터를 포함한다. 일 실시예에 따라 적합한 프로모터는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV (Cytomegalovirus) 프로모터, U6 프로모터 및 H1 프로모터, MLV(Murine Leukemia Virus) LTR(Long terminal repeat) 프로모터, 아데노바이러스 초기 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 인간 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 마우스 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터 및 셀바이빈 (Survivin) 프로모터를 포함할 수 있다.

[22] 또한, 상기 벡터에서, 전술한 융합 단백질은 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, "작동 가능하게 연결된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[23]

[24] 또 다른 양상은 상기 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 벡터를 포함하는, 숙주 세포를 제공한다.

[25] 상기 세포, 예를 들면, 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 원생동물 (protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는, 배양된 세포 (인 비트로), 이식된 세포 (graft cell) 및 일차 세포 배양 (인 비트로 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보 (in vivo) 세포, 및 또한 인간을 포함하는 포유동물의 세포 (mammalian cell)일 수 있다. 또한, 상기 유기체는 효모, 곰팡이, 원생동물, 식물, 고등 식물 및 곤충, 양서류, 또는 포유 동물일 수 있다. 또한, 상기 세포는 동물 세포 또는 식물세포일 수 있다.

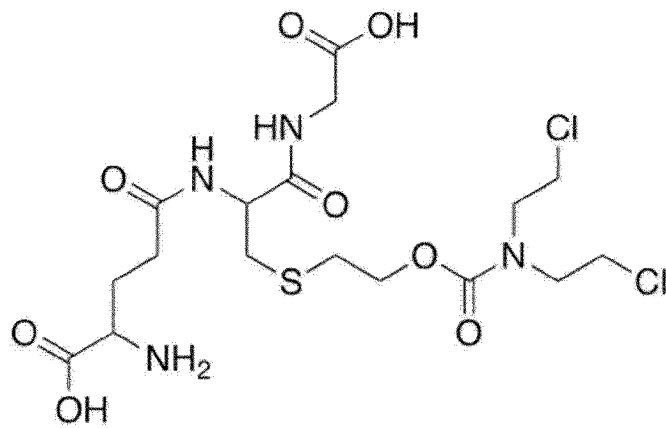
[26]

[27] 또한, 상기 글루타치온-S-전이효소와 글루타치온 전구체 약물의 결합은 GSH(Glutathione)에 의한 것일 수 있다.

[28] 일 구체예에 있어서, 상기 글루타치온 전구체 약물은 하기 화학식 1 내지 화학식 7 중 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진

군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 상기 글루타치온 전구체
약물은 글루타치온을 포함하고 있어서, 상기와 같이 글루타치온-S-전이효소와
결합되는 것일 수 있다.

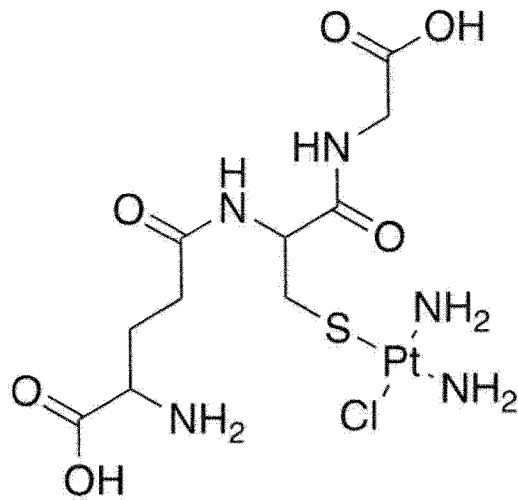
[29]



[30]

[화학식 1]

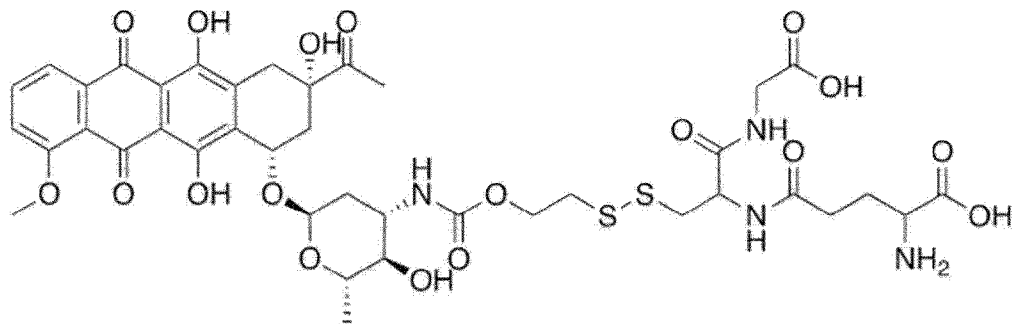
[31]



[32]

[화학식 2]

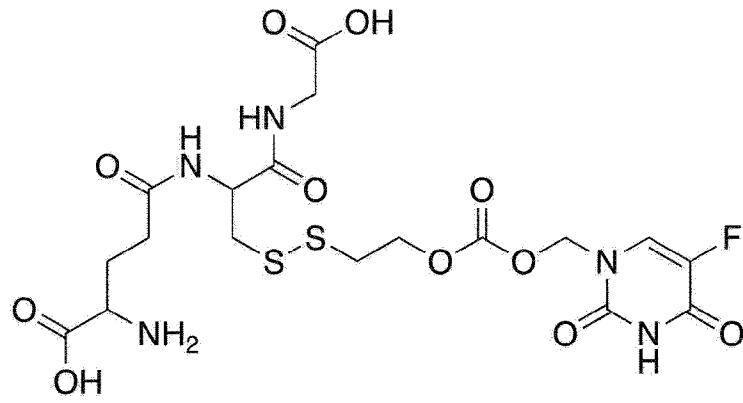
[33]



[34]

[화학식 3]

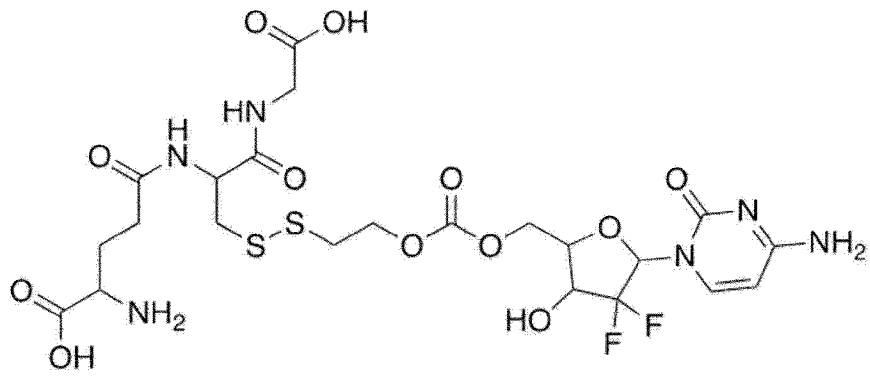
[35]



[36]

[화학식 4]

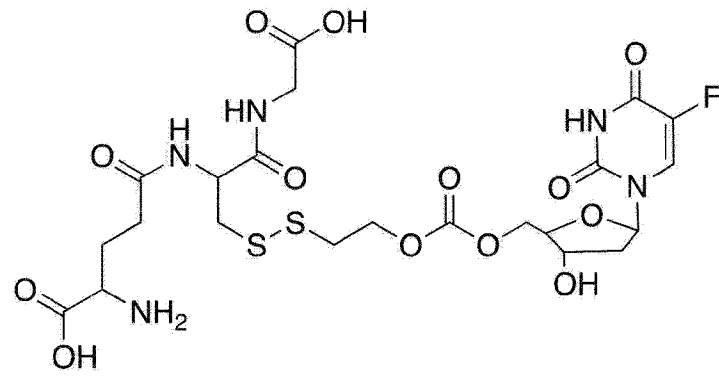
[37]



[38]

[화학식 5]

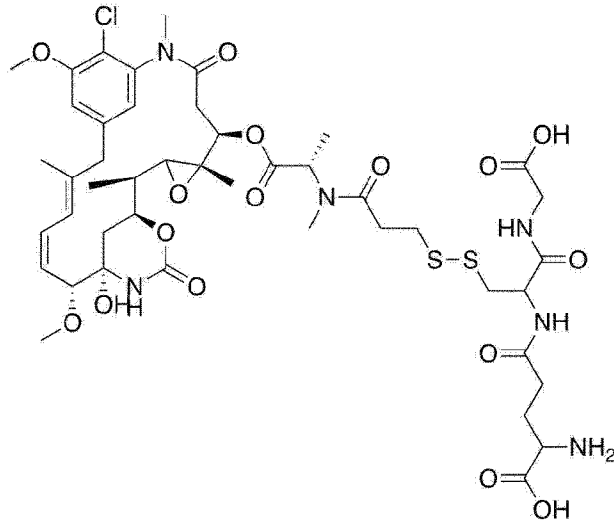
[39]



[40]

[화학식 6]

[41]



[42] [화학식 7]

[43]

[44] 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[45] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 약물을 전달하는 방법을 제공한다.

[46] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[47] 일 구체예에 있어서, 상기 글루타치온 전구체 약물은 화학식1 내지 화학식 7 중 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[48] 상기 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST), 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질, 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물에 대해서는 상기한 바와 같다.

[49]

- [50] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 포유동물은 젖과, 원숭이, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 애완동물을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 생체내에서 수득되거나 시험관내에서 배양된 생물학적 엔티티(entity)의 조직, 세포 및 그들의 자손도 또한 포함된다.
- [51] 용어 "치료제" 또는 "약학적 조성물"는, 대상체로의 투여 시에 몇몇 유리한 효과를 부여하는 분자 또는 화합물을 지칭한다. 유리한 효과는 진단적 결정을 가능하게 하는 것; 질병, 증상, 장애 또는 병태의 개선; 질병, 증상, 장애 또는 질환의 발병의 감소 또는 예방; 및 일반적으로 질병, 증상, 장애 또는 병태의 대응을 포함한다.
- [52] 본원에 사용되는 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는" 또는 "완화하는" 또는 "개선하는"은 상호교환가능하게 사용된다. 이들 용어는 치료 이익 및/또는 예방 이익을 포함하나 이들에 한정되지 않는 유리한 또는 요망되는 결과를 수득하는 방법을 지칭한다. 치료 이익은 치료 하의 하나 이상의 질병, 질환 또는 증상의 임의의 치료적으로 유의미한 개선 또는 그에 대한 효과를 의미한다. 예방 이익에 있어서, 조성물은 특정 질병, 질환 또는 증상이 발생할 위험이 있는 대상체에게 또는 질병, 질환 또는 증상이 아직 나타나지 않을지라도, 질병의 하나 이상의 생리학적 증상을 보고하는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [53] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 유리한 또는 요망되는 결과를 야기하기에 충분한 작용제의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 치료되는 대상체 및 병태, 대상체의 체중 및 연령, 병태의 중증도, 투여 방식 등 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 상기 용어는 본원에 기술된 영상화 방법 중 임의의 것에 의한 검출을 위한 이미지를 제공할 용량에 적용된다. 특정 용량은 선택된 특정 작용제, 뒤따르는 투여 요법, 그것이 다른 화합물과 병용하여 투여되는지 여부, 투여 시기, 영상화되는 조직 및 그것을 운반하는 신체 전달 시스템 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있다.
- [54] 상기 암은 폐암(예를 들면, 비소세포성 폐암), 췌장암, 위암, 간암, 대장암, 뇌암, 유방암, 갑상선암, 방광암, 식도암, 또는 자궁암일 수 있다. 또한, 상기 암은 항암제에 대한 내성(예를 들면, 다제 내성)을 갖는 위암, 유방암, 폐암, 간암, 식도암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [55] 상기 약학적 조성물은 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(Nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [56] 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여

조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 마크로콜, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[57] 또한, 상기 약학적 조성물은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(Carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(Ascorbic acid) 또는 글루타치온(Glutathione)과 같은 항산화제(Antioxidants), 킬레이트화제(Chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(Stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[58] 상기 약학적 조성물의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

[59] 또 다른 양상은 하기 i) 내지 iii) 단계를 포함하는, 약물 전달체의 제조 방법을 제공한다:

[60] i) 약물에 링커(예를 들면, GSH)를 결합시키는 단계; ii) 상기 단계 i)에서 링커와 결합된 약물 표면에 GST 융합 단백질을 결합시키는 단계.

발명의 효과

[61] 일 양상에 따른 글루타치온 전구체 약물의 전달체에 의하면, 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[62] 도 1은 GST-Afb 융합 단백질의 세포 독성 및 세포 표적능을 확인한 결과이다:

[63] 도 1a는 GST-Afb 융합 단백질이 Afb 표적 세포에 대하여 세포 생존율을 저하시키지 않음을 확인한 결과이고; 및 도 1b는 GST-Afb 융합 단백질이 Afb 표적 세포에 대하여 나타내는 세포 표적능을 확인한 결과이다.

[64] 도 2는 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 2의 합성을 도식화 한 것이다.

[65] 도 3은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 3의 합성을 도식화 한 것이다.

[66] 도 4는 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 5의 합성을 도식화 한 것이다.

[67] 도 5는 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 7의 합성을 도식화 한 것이다.

[68] 도 6은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 9의 합성을 도식화 한

것이다.

[69] 도 7은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 11의 합성을 도식화 한 것이다.

[70] 도 8은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 12의 합성을 도식화 한 것이다.

[71] 도 9는 엔트리 2가 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도를 나타낸 그래프이다.

[72] 도 10은 엔트리 3이 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도를 나타낸 그래프이다.

[73] 도 11은 엔트리 5가 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도를 나타낸 그래프이다.

[74] 도 12는 엔트리 2,3,5,7,9,11 및 12가 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도 값을 나타낸 표이다.

[75] 도 13은 융합단백질과 엔트리 2가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[76] 도 14는 융합단백질과 엔트리 3이 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[77] 도 15는 융합단백질과 엔트리 5가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[78] 도 16은 융합단백질과 엔트리 7이 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[79] 도 17은 융합단백질과 엔트리 9가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[80] 도 18은 융합단백질과 엔트리 11이 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[81] 도 19는 융합단백질과 엔트리 12가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[82] 도 20은 융합단백질과 엔트리 2,3,5,7,9,11 및 12가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타내는 IC50 값을 나타낸 표이다.

발명의 실시를 위한 형태

[83] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[84]

[85] 실시예 1. 글루타치온-S-전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 융합 단백질의 발현

[86] <1-1> 애피바디(affibody) 및 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST) 융합 단백질의 제조

[87] 본 발명에서는 약물 전달체로 사용하기 위한 생체 내 환경에서도 안정성 및 표적능이 향상된 약물 전달체를 제조하고자 하였다. 이를 위해, 먼저 표적능을 갖는 융합 단백질(fusion protein)을 제조하였다. 융합 단백질은 암세포 표면의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 애피바디(affibody, Afb)와 GST가 결합된 형태가 되도록 발현하였다.

[88] 구체적으로, 본 발명에서는 Afb로서 HER2에 특이적으로 결합하는 HER2 Afb 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 EGFR Afb를 사용하였다. 각각의 HER2 Afb 또는 EGFR Afb를 암호화하는 유전자의 말단에 추가 링커 도메인(서열번호 1: GGGLVPRGSGGGCGGGGTGGGSGGG)을 암호화하는 유전자를 결합시킨 다음, pETduet 플라스미드에 삽입하였다. 또한, GST 과발현을 위해서 GST의 N-말단에 6XHis 태그가 연결되도록 디자인한 GST 암호화 유전자를 상기 pETduet 플라스미드에 삽입하여, Afb와 GST가 링커로 연결된 융합 단백질(GST-Afb)의 과발현을 위한 플라스미드를 구축하였다. 구축된 플라스미드에서 PCR 및 DNA 서열분석을 통해 GST-Afb 암호화 서열이 정상적으로 삽입되었는지 확인하였다. 그런 다음, 구축된 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 삽입하여 배양한 다음, IPTG를 처리하고 30 °C에서 16 시간 동안 배양하여 GST-Afb의 과발현을 유도하였다. 과발현 유도된 *E. coli* 세포는 5000Xg로 4 °C에서 10 분간 원심분리하여 침전된 세포를 수득하고, 인산염 완충용액(50 mM 인산 나트륨 및 100 mM 염화 나트륨, pH 6.5)에 세포를 현탁하였다. 세포 현탁액에 리소자임(lysozyme)을 처리하고 20 분간 실온에서 배양한 다음, 30 초 파쇄 및 1 분 간격으로 총 10 분가 초음파 파쇄하였다. 파쇄 후, 12000Xg로 4 °C에서 1 시간 동안 원심분리하여 상층액을 GST-Afb 포함 분획으로서 수득하였다. 상층액은 FPLC를 이용한 금속이온 친화 크로마토그래피(immobilized metal affinity chromatography; 1mL HisTrap FF 컬럼, GE HealthCare)로 정제하여 GST-Afb를 분리 하였다. 분리한 GST-Afb(GST-HER2 Afb 및 GST-EGFR Afb)는 PBS(pH 7.4)에서 밤새도록 투석하여 농축하였다. 농축한 GST-HER2 Afb 및 GST-EGFR Afb는, SDS-PAGE 분석 및 ESI-TOF MS(electrospray ionization time-of-light mass spectrometry) 분석을 통해 분리한 단백질의 순도 및 분자량을 분석하였다.

[89]

[90] <1-2> GST-Afb 융합 단백질의 세포 독성 및 세포 표적능 확인

[91] 본 발명에서 발현한 GST-Afb 융합 단백질을 약물 전달체로서 적용할 수 있는지 확인하기 위해 세포 독성 및 세포내 흡수능을 확인하고자 하였다.

[92] 구체적으로, 먼저 GST-HER2 Afb를 대상으로 세포 독성 여부를 확인하기 위해 인간 유방암 세포주인 SK-BR-3 세포를 준비하였다. 준비한 SK-BR-3 세포는 DMEM 배지(11995065, Invitrogen, S.Korea)에서 배양하였다. 배지에는 10% 우태아혈청(FBS), 100 µg/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린을

첨가하였고, 배양 기간 중에는 배지를 매일 한번씩 교체하였다. 배양 환경은 37 °C의 5% CO₂ 배양기로 유지하였다. 세포 접종 후 세포가 85% 포화도로 증식되면, 부착 배양된 세포를 분리하여 실험에 사용하였다. SK-BR-3 세포를 분리하여, 96 웰 플레이트(Thermo Scientific Inc. Korea)에 5X10³ 세포/웰의 농도로 각각의 세포를 접종하고 37 °C의 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 GST-HER2 Afb를 0.3 μM 내지 10 μM의 농도로 SK-BR-3 세포에 처리하고 24 시간 동안 추가 배양하였다. 배양 종료 후, 알라마르 블루 염색약(alar blue dye; DAL 2015, Invitrogen, Korea)을 사용하여 세포 생존률을 확인하였다. 세포 생존률을 확인하기 위해 형광 염료에 대한 여기 파장(excitation wavelength)을 565 nm로 설정하였으며 이에 따른 방출 파장(monitored emission)을 590 nm로 설정하여 형광 플레이트 리더기(Tecan Infinite Series, Germany)로 형광 분석하였다. 또한, GST-HER2 Afb 중 GST를 형광-5-말레이미드(fluorescein-5-maleimide, F5M)로 표지하여 세포 내로 흡수(cell uptake)된 GST-HER2 Afb의 위치를 확인하였다. 음성 대조군으로서는 정상 상피 세포주인 MCF-10A 세포를 사용하여 동일한 방법을 수행하여 세포 생존률 및 세포 내 흡수 정도를 확인하였다.

[93] 이와 함께, GST-Afb에서 GSH와 표적 수용체 간의 상호작용을 실시간으로 확인하기 위해 수정진동자저울(Quartz Crystal Microbalance, QCM) 및 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 분석을 수행하였다.

[94] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 GST-HER2 Afb가 세포에 대하여는 독성을 나타내지 않으나, 암 세포 특이적으로 흡수될 수 있음을 확인하였다. GST-HER2 Afb를 SK-BR-3 세포 및 MCF-10A 세포에 처리하여 배양하였을 때 처리 농도와는 관계없이 세포 사멸 정도를 나타내지 않아 GST-Afb에 의해 세포 독성을 나타내지 않음을 확인한 반면(도 1a), GST-HER2 Afb는 유방암 세포주인 SK-BR-3 세포에만 결합하는 결합능을 나타내어 GST-Afb가 암세포 특이적인 표적능을 나타내는 것으로 확인하였다(도 1b). 이를 통해, 본 발명에서 단백질 코로나 외층으로 사용하기 위해 발현한 GST-Afb 융합 단백질은 정상 세포에 대하여 독성을 나타내지 않고 암 세포에 대한 표적능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[95]

[96] 실시예 2. 글루타치온 전구체 약물의 합성

[97] 본 발명의 글루타치온 전구체 약물의 합성은 도 2 내지 도 8과 같은 scheme으로 제작하였다. 하기 기재된 엔트리는 글루타치온 전구체 약물을 의미한다.

[98] 구체적으로, 먼저 엔트리(entry) 1인 2-브로모에틸 비스(2-클로로에틸)카바메이트 (2-bromoethyl bis(2-chloroethyl)carbamate)의 합성은 비트(2-클로로에틸)아민 (Bis(2-chloroethyl)amine) (20 mg, 0.1408 mmol)과 수산화 나트륨 (Sodium hydroxide) (8.448 mg, 0.2112 mmol)을 먼저 메틸 클로라이드 (methyl chloride) 5mL에 섞은 후, 2-브로모에틸

카보노클로라이데이트 (2-bromoethyl carbonochloridate) (26.39 mg, 0.1408 mmol) 을 첨가하였다.

[99] 엔트리 2인

15-아미노-10-((카복시메틸)카바모일)-1-클로로-3-(2-클로로에틸)-4,12-디옥소-5-옥사-8-티아-3,11-디아자헥사데칸-16-온 산

(15-amino-10-((carboxymethyl)carbamoyl)-1-chloro-3-(2-chloroethyl)-4,12-dioxo-5-oxa-8-thia-3,11-diazahexadecan-16-oic acid)의 합성은 2-브로모에틸

비스(2-클로로에틸)카바메이트 (2-bromoethyl bis(2-chloroethyl)carbamate) (10 mg, 0.034 mmol)을 pH 7.4 PBS 용액에 넣은 후, PBS에 녹은 GSH ((glutathione), 7.683 mg, 0.025mmol)을 한방울씩 첨가하며 실온에서 24시간 교반하였다. 그 후 HPLC 과정을 통하여 분리하였다.

[100] 엔트리 3은 시스플라틴 (Cisplatin) (10mg, 0.0333 mmol) 을 GSH ((glutathione), 15mg, 0.05mmol) pH 7.4 PBS 용액에 섞고 실온에서 24시간 반응후, HPLC 과정을 통하여 분리하였다.

[101] 엔트리 4인 2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸

((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S)-3-아세틸-3,5,12-트리히드록시-10-메톡시-6,11-디옥소-1,2,3,4,6,11-헥사히드로테트라센-1-일)옥시)-3-히드록시-2-메틸테트라히드로-2H-피란-4-일)카바메이트 (2-(pyridin-2-ylidisulfaneyl)ethyl

((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S)-3-acetyl-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)-3-hydroxy-2-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)carbamate)는 4-니트로페닐 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸)카보네이트 (4-nitrophenyl (2-(pyridine-2-ylidisulfaneyl)ethyl)carbonate) (20 mg, 0.0568 mmol)과 DMAP (18.52 mg, 0.1516 mmol)을 건조 메틸 클로라이드 (Dry methyl chloride) 7mL에 녹인 후 다우노루비신 (Daunorubicin) (20 mg, 0.079 mmol) 을 첨가 후 24시간 동안 환류시켰다. 메탄올로 DMAP을 세척한 후 컬럼크로마토그래피를 통하여 분리하였다.

[102] 엔트리 5인 N5-(3-((2-(((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S

)-3-아세틸-3,5,12-트리히드록시-10-메톡시-6,11-디옥소-1,2,3,4,6,11-헥사히드로테트라센-1-일)옥시)-3-히드록시-2-메틸테트라히드로-2H-피란-4-일)카바모일)옥시)에틸)디설파닐)-1-((카복시메틸)아미노)-1-옥소프로판-2-일)글루타민 (N

5-(3-((2-(((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S)-3-acetyl-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)-3-hydroxy-2-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)carbamoyl)oxy)ethyl)disulfaneyl)-1-((carboxymethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)glutamine)은 2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸

((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S)-3-아세틸-3,5,12-트리히드록시-10-메톡시-6,11-디옥소-1,2,3,4,6,11-헥사히드로테트라센-1-일)옥시)-3-히드록시-2-메틸테트라히드로-2H-피란-4-일)카바메이트 (2-(pyridin-2-ylidisulfaneyl)ethyl

((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S)-3-acetyl-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4

,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)-3-hydroxy-2-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)carbamate) (15 mg, 0.02 mmol)을 Di water : MeOH 1:1 5mL에 녹인 후 글루타치온 (glutathione) (5.194 mg, 0.0169 mmol)을 한 방울씩 첨가하며 0 °C에서 24시간 교반하였다. 그 후 HPLC 과정을 통하여 분리하였다.

- [103] 엔트리 6인 (5-플루오로-2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)메틸 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸) 카보네이트 ((5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)methyl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl carbonate)는 4-니트로페닐 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸)카보네이트 (4-nitrophenyl (2-(pyridine-2-yl)disulfaneyl)ethyl)carbonate) (50 mg, 0.142 mmol)과 DMAP (46.23 mg, 0.3784 mmol)을 건조 DCM 15mL에 녹인 후 5-플루오로-1-(히드록시메틸)피리미딘-2,4-디온 (5-fluoro-1-(hydroxymethyl)pyrimidine-2,4-dione) (15.15 mg, 0.0946 mmol) 을 첨가 후 16시간 동안 실온에서 반응을 진행하였다. 메탄올로 DMAP을 세척한 후 DCM, 증류수로 추출한 후 MgSO₄로 건조시킨 후 컬럼크로마토그래피를 통하여 분리하였다.
- [104] 엔트리 7인 15-아미노-10-((카복시메틸)카바모일)-1-(5-플루오로-2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-3,12-디옥소-2,4-디옥사-7,8-디티아-11-아자헥사데칸-16-온산 (15-amino-10-((carboxymethyl)carbamoil)-1-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,12-dioxo-2,4-dioxo-7,8-dithia-11-azahexadecan-16-oic acid)은 5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidinyl methyl (2-(pyridine-2-yl)disulfaneyl)ethyl) 카보네이트 (carbonate) (20 mg, 0.0536 mmol)를 용매 (Di water : MeOH = 1:1) 10mL에 녹인 후 글루타치온 (13.74 mg, 0.0447 mmol)을 한방울씩 첨가하며 0 °C에서 12시간 반응 후 HPLC 과정을 통하여 분리하였다.
- [105] 엔트리 8인 (5-(4-아미노-2-옥소피리미딘-1(2H)-일)-4,4-디플루오로-3-히드록시테트라히드로푸란-2-일)메틸 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸) 카보네이트 ((5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4,4-difluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl carbonate)는 4-니트로페닐 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸)카보네이트 ((4-nitrophenyl (2-(pyridine-2-yl)disulfaneyl)ethyl)carbonate) (30 mg, 0.0851 mmol)과 DMAP (15.64 mg, 0.128 mmol)을 건조 DCM 15mL에 녹인 후 쥘시타빈 (11.21 mg, 0.0426 mmol)을 첨가 후 12시간 동안 실온에서 반응을 진행하였다. 테트라클로로메탄 (Tetrachloromethane)을 이용하여 재결정화시킨 후 감압필터를 이용하여 분리한 후 NMR로 확인하였다.
- [106] 엔트리 9인 15-아미노-1-(5-(4-아미노-2-옥소피리미딘-1(2H)-일)-4,4-디플루오로-3-히드록시

테트라히드로푸란-2-일)-10-((카복시메틸)카바모일)-3,12-디옥소-2,4-디옥사-7,8-디티아-11-아자헥사데칸-16-온산

(15-amino-1-(5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4,4-difluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-10-((carboxymethyl)carbamoil)-3,12-dioxo-2,4-dioxo-7,8-dithia-11-azahexadecan-16-oic acid)은

(5-(4-아미노-2-옥소피리미딘-1(2H)-일)-4,4-디플루오로-3-히드록시테트라히드로푸란-2-일)메틸 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸) 카보네이트

((5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4,4-difluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl) carbonate) (15 mg, 0.0315 mmol)을 용매 (PBS 완충액) 6mL에 녹인 후 글루타치온 (6.45 mg, 0.021 mmol)을 한방울씩 첨가하며 실온에서 12시간 반응 후 원심 분리기를 이용하여 분리한 후 NMR로 반응을 확인하였다.

[107] 엔트리 10인 ((2R,3S,5R

)-5-(5-플루오로-2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-히드록시테트라히드로푸란-2-일)메틸 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸) 카보네이트 (((2R,3S,5R)-5-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl) carbonate)는 4-니트로페닐

(2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸)카보네이트 (4-nitrophenyl

(2-(pyridine-2-yl)disulfaneyl)ethyl)carbonate) (20 mg, 0.057 mmol)와 DMAP (10.4 mg, 0.0851 mmol)을 건조 DMF 10mL에 녹인 후 플록스유리딘 (floxuridine) (6.99 mg, 0.0284 mmol)을 첨가 후 16시간 동안 실온에서 반응을 진행하였다. 에탄올로 DMAP을 세척한 후 컬럼크로마토그래피를 통하여 분리하였다.

[108] 엔트리 11인 15-아미노-10-((카복시메틸)카바모일)-1-((2R,3S,5R

)-5-(5-플루오로-2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-히드록시테트라히드로푸란-2-일)-3,12-디옥소-2,4-디옥사-7,8-디티아-11-아자헥사데칸-16-온산

(15-amino-10-((carboxymethyl)carbamoil)-1-((2R,3S,5R)-5-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3,12-dioxo-2,4-dioxo-7,8-dithia-11-azahexadecan-16-oic acid)은 ((2R,3S,5R

)-5-(5-플루오로-2,4-디옥소-3,4-디히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-히드록시테트라히드로푸란-2-일)메틸 (2-(피리딘-2-일디설파닐)에틸) 카보네이트

((((2R,3S,5R)-5-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl) carbonate) (33.77 mg, 0.0735 mmol)을 용매 (Di water : pH 7.4 PBS = 1:1) 10mL에 녹인 후 글루타치온 (15 mg, 0.049 mmol)을 한방울씩 첨가하며 22 °C에서 16시간 반응 후 추출한 후 메탄올을 이용하여 원심 분리기로 분리한 후 NMR로 확인하였다.

[109] 엔트리 12인

N5-(1-((카복시메틸)아미노)-3-(((3-(((2S)-1-(((14S,16S,33S,2R,4R,10E,12Z,14R)-86-클로로-14-히드록시-85,14-디메톡시-33,2,7,10-테트라메틸-12,6-디옥소-7-아자-1(

6,4)-옥사지나나-3(2,3)-옥시라나-8(1,3)-벤젠아시클로테트라데카판-10,12-디엔-4-일)-옥시)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)아미노)-3-옥소프로필)디술팜닐)-1-옥소프로판-2-일)글루타민

(N5-(1-((carboxymethyl)amino)-3-(((2S)-1-(((14S,16S,33S,2R,4R,10E,12Z,14R)-8-chloro-14-hydroxy-85,14-dimethoxy-33,2,7,10-tetramethyl-12,6-dioxo-7-aza-1(6,4)-oxazinana-3(2,3)-oxirana-8(1,3)-benzenacyclotetradecaphane-10,12-dien-4-yl)oxy)-1-oxopropan-2-yl)(methyl)amino)-3-oxopropyl)disulfaneyl)-1-oxopropan-2-yl)glutamine)은 메르탄신 (Mertansine) (10 mg, 0.0135 mmol)을 용매 (DMF : pH 7.2 PBS 완충액=1:30)에 녹인 후 PBS 완충액에 녹인 글루타치온 (2.76 mg, 0.01 mmol)을 한방울씩 첨가하여 실온에서 10시간 반응시켰다. 뜨거운 DMF 소량에 녹인 후 4 °C에서 24시간 동안 재결정화 시키고 감압필터로 생성물을 수득하였다.

- [110] 각 엔트리의 NMR 결과는 엔트리 1은 ^1H NMR: δ 3.47 (2H, t, J = 6.3 Hz), 3.56 (4H, t, J = 5.3 Hz), 3.83 (4H, t, J = 5.3 Hz), 4.34 (2H, t, J = 6.3 Hz), 엔트리 2는 ^1H NMR: δ 1.86-1.98 (2H, 1.92 (dt, J = 7.6, 7.4 Hz), 1.92 (dt, J = 7.6, 7.4 Hz)), 2.26-2.34 (2H, 2.30 (t, J = 7.4 Hz), 2.30 (t, J = 7.4 Hz)), 2.96-3.08 (4H, 3.04 (t, J = 6.0 Hz), 2.98 (d, J = 7.3 Hz), 2.98 (d, J = 7.3 Hz), 3.04 (t, J = 6.0 Hz)), 3.46 (1H, t, J = 7.6 Hz), 3.53-3.59 (4H, 3.56 (t, J = 5.3 Hz), 3.56 (t, J = 5.3 Hz)), 3.75-3.76 (2H, 3.75 (s), 3.75 (s)), 3.80-3.86 (4H, 3.83 (t, J = 5.3 Hz), 3.83 (t, J = 5.3 Hz)), 4.25-4.33 (2H, 4.29 (t, J = 6.0 Hz), 4.29 (t, J = 6.0 Hz)), 4.40 (1H, t, J = 7.3 Hz), 엔트리 3은 ^1H NMR: δ 1.86-1.98 (2H, 1.92 (dt, J = 7.6, 7.4 Hz), 1.92 (dt, J = 7.6, 7.4 Hz)), 2.24-2.32 (2H, 2.28 (t, J = 7.4 Hz), 2.28 (t, J = 7.4 Hz)), 3.30-3.35 (2H, 3.33 (d, J = 7.0 Hz), 3.33 (d, J = 7.0 Hz)), 3.46 (1H, t, J = 7.6 Hz), 3.75-3.76 (2H, 3.75 (s), 3.75 (s)), 4.56 (1H, t, J = 7.0 Hz), 엔트리 4는 ^1H NMR: δ 1.28 (3H, d, J = 6.7 Hz), 1.60 (1H, ddd, J = 14.6, 3.5, 2.9 Hz), 2.13 (3H, s), 2.30-2.49 (3H, 2.38 (ddd, J = 14.6, 10.2, 2.6 Hz), 2.44 (dd, J = 14.5, 3.8 Hz), 2.40 (dd, J = 14.5, 10.1 Hz)), 3.04 (1H, d, J = 15.8 Hz), 3.18-3.30 (2H, 3.23 (d, J = 15.8 Hz), 3.24 (dd, J = 10.3, 10.2 Hz)), 3.47-3.53 (2H, 3.50 (t, J = 5.2 Hz), 3.50 (t, J = 5.2 Hz)), 3.70 (3H, s), 3.83 (1H, td, J = 10.2, 3.5 Hz), 4.09 (1H, dq, J = 10.3, 6.7 Hz), 4.33-4.39 (2H, 4.36 (t, J = 5.2 Hz), 4.36 (t, J = 5.2 Hz)), 4.89-4.99 (2H, 4.97 (dd, J = 2.9, 2.6 Hz), 4.93 (dd, J = 10.1, 3.8 Hz)), 7.02 (1H, dd, J = 8.2, 1.3 Hz), 7.21 (1H, ddd, J = 7.4, 5.4, 1.7 Hz), 7.36 (1H, ddd, J = 7.8, 1.7, 0.5 Hz), 7.51 (1H, dd, J = 8.2, 7.8 Hz), 7.66 (1H, ddd, J = 7.8, 7.4, 1.9 Hz), 7.75 (1H, dd, J = 7.8, 1.3 Hz), 8.43 (1H, ddd, J = 5.4, 1.9, 0.5 Hz), 엔트리 5는 ^1H NMR: δ 1.28 (3H, d, J = 6.7 Hz), 1.60 (1H, ddd, J = 14.6, 3.5, 2.9 Hz), 1.86-1.98 (2H, 1.92 (dt, J = 7.6, 7.4 Hz), 1.92 (dt, J = 7.6, 7.4 Hz)), 2.13 (3H, s), 2.26-2.49 (5H, 2.38 (ddd, J = 14.6, 10.2, 2.6 Hz), 2.44 (dd, J = 14.5, 3.8 Hz), 2.40 (dd, J = 14.5, 10.1 Hz), 2.30 (t, J = 7.4 Hz), 2.30 (t, J = 7.4 Hz)), 3.04 (1H, d, J = 15.8 Hz), 3.18-3.33 (4H, 3.23 (d, J = 15.8 Hz), 3.24 (dd, J = 10.3, 10.2 Hz), 3.31 (d, J = 7.2 Hz), 3.31 (d, J = 7.2 Hz)), 3.40-3.50 (3H, 3.46 (t, J

= 7.6 Hz), 3.43 (t, $J = 5.1$ Hz), 3.43 (t, $J = 5.1$ Hz)), 3.70 (3H, s), 3.75-3.76 (2H, 3.75 (s), 3.75 (s)), 3.83 (1H, td, $J = 10.2, 3.5$ Hz), 4.09 (1H, dq, $J = 10.3, 6.7$ Hz), 4.38-4.44 (2H, 4.41 (t, $J = 5.1$ Hz), 4.41 (t, $J = 5.1$ Hz)), 4.53 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 4.89-4.99 (2H, 4.97 (dd, $J = 2.9, 2.6$ Hz), 4.93 (dd, $J = 10.1, 3.8$ Hz)), 7.02 (1H, dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz), 7.51 (1H, dd, $J = 8.2, 7.8$ Hz), 7.75 (1H, dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz),
 엔트리 6은 ^1H NMR: δ 3.45 (2H, t, $J = 5.1$ Hz), 4.40 (2H, t, $J = 5.1$ Hz), 5.67 (2H, s), 7.21 (1H, ddd, $J = 7.4, 5.4, 1.7$ Hz), 7.36 (1H, ddd, $J = 7.8, 1.7, 0.5$ Hz), 7.66 (1H, ddd, $J = 7.8, 7.4, 1.9$ Hz), 8.43 (1H, ddd, $J = 5.4, 1.9, 0.5$ Hz), 8.63 (1H, s),
 엔트리 7은 ^1H NMR: δ 1.86-1.98 (2H, 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz), 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz)), 2.26-2.34 (2H, 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz), 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz)), 3.29-3.33 (2H, 3.31 (d, $J = 7.2$ Hz), 3.31 (d, $J = 7.2$ Hz)), 3.42-3.50 (3H, 3.46 (t, $J = 7.6$ Hz), 3.47 (t, $J = 5.1$ Hz), 3.47 (t, $J = 5.1$ Hz)), 3.75-3.76 (2H, 3.75 (s), 3.75 (s)), 4.42-4.49 (2H, 4.46 (t, $J = 5.1$ Hz), 4.46 (t, $J = 5.1$ Hz)), 4.53 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 5.66-5.67 (2H, 5.67 (s), 5.67 (s)), 8.63 (1H, s), 엔트리 8은 ^1H NMR: δ 3.42-3.48 (2H, 3.45 (t, $J = 5.1$ Hz), 3.45 (t, $J = 5.1$ Hz)), 3.92 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.02 (1H, dt, $J = 7.3, 3.9$ Hz), 4.42-4.48 (4H, 4.45 (t, $J = 5.1$ Hz), 4.44 (d, $J = 3.9$ Hz), 4.44 (d, $J = 3.9$ Hz), 4.45 (t, $J = 5.1$ Hz)), 5.66 (1H, s), 6.24 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 7.21 (1H, ddd, $J = 7.4, 5.4, 1.7$ Hz), 7.36 (1H, ddd, $J = 7.8, 1.7, 0.5$ Hz), 7.61-7.71 (2H, 7.66 (d, $J = 10.2$ Hz), 7.66 (ddd, $J = 7.8, 7.4, 1.9$ Hz)), 8.43 (1H, ddd, $J = 5.4, 1.9, 0.5$ Hz), 엔트리 9는 ^1H NMR: δ 1.86-1.98 (2H, 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz), 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz)), 2.26-2.34 (2H, 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz), 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz)), 3.29-3.33 (2H, 3.31 (d, $J = 7.2$ Hz), 3.31 (d, $J = 7.2$ Hz)), 3.42-3.50 (3H, 3.46 (t, $J = 7.6$ Hz), 3.47 (t, $J = 5.1$ Hz), 3.47 (t, $J = 5.1$ Hz)), 3.75-3.76 (2H, 3.75 (s), 3.75 (s)), 3.92 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.02 (1H, dt, $J = 7.3, 3.9$ Hz), 4.42-4.48 (3H, 4.44 (d, $J = 3.9$ Hz), 4.45 (t, $J = 5.1$ Hz), 4.44 (d, $J = 3.9$ Hz)), 4.45 (1H, t, $J = 5.1$ Hz), 4.53 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 5.66 (1H, s), 6.24 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 7.66 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 엔트리 10은 ^1H NMR: δ 2.06 (1H, ddd, $J = 14.5, 7.1, 4.4$ Hz), 2.27 (1H, ddd, $J = 14.5, 8.1, 7.4$ Hz), 3.31 (1H, ddd, $J = 9.3, 7.4, 7.1$ Hz), 3.42-3.48 (2H, 3.45 (t, $J = 5.1$ Hz), 3.45 (t, $J = 5.1$ Hz)), 4.12 (1H, dt, $J = 9.3, 4.5$ Hz), 4.41-4.48 (4H, 4.45 (t, $J = 5.1$ Hz), 4.43 (d, $J = 4.5$ Hz), 4.43 (d, $J = 4.5$ Hz), 4.45 (t, $J = 5.1$ Hz)), 6.13 (1H, dd, $J = 8.1, 4.4$ Hz), 7.21 (1H, ddd, $J = 7.4, 5.4, 1.7$ Hz), 7.36 (1H, ddd, $J = 7.8, 1.7, 0.5$ Hz), 7.66 (1H, ddd, $J = 7.8, 7.4, 1.9$ Hz), 8.43 (1H, ddd, $J = 5.4, 1.9, 0.5$ Hz), 8.59 (1H, s), 엔트리 11은 ^1H NMR: δ 1.86-1.98 (2H, 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz), 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz)), 2.06 (1H, ddd, $J = 14.5, 7.1, 4.4$ Hz), 2.19-2.35 (3H, 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz), 2.27 (ddd, $J = 14.5, 8.1, 7.4$ Hz), 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz)), 3.25-3.38 (3H, 3.31 (ddd, $J = 9.3, 7.4, 7.1$ Hz), 3.31 (d, $J = 7.2$ Hz), 3.31 (d, $J = 7.2$ Hz)), 3.42-3.50 (3H, 3.46 (t, $J = 7.6$ Hz), 3.47 (t, $J = 5.1$ Hz), 3.47 (t, $J = 5.1$ Hz)), 3.75-3.76 (2H, 3.75 (s), 3.75 (s)), 4.12 (1H, dt, $J = 9.3, 4.5$ Hz), 4.41-4.48 (3H, 4.43 (d, $J = 4.5$ Hz), 4.45 (t, $J = 5.1$

Hz), 4.43 (d, $J = 4.5$ Hz)), 4.45 (1H, t, $J = 5.1$ Hz), 4.53 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 6.13 (1H, dd, $J = 8.1, 4.4$ Hz), 8.59 (1H, s), 엔트리 12는 ^1H NMR: δ 1.08 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.32 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.45 (3H, s), 1.63 (3H, s), 1.86-1.99 (3H, 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz), 1.94 (dd, $J = 14.8, 2.6$ Hz), 1.92 (dt, $J = 7.6, 7.4$ Hz)), 2.10 (1H, ddq, $J = 9.2, 8.1, 7.1$ Hz), 2.18-2.34 (3H, 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz), 2.25 (dd, $J = 14.8, 10.2$ Hz), 2.30 (t, $J = 7.4$ Hz)), 2.37-2.41 (2H, 2.39 (t, $J = 2.7$ Hz), 2.39 (t, $J = 2.7$ Hz)), 2.59 (3H, s), 2.68-2.83 (3H, 2.72 (d, $J = 14.0$ Hz), 2.77 (dd, $J = 15.0, 6.2$ Hz), 2.73 (d, $J = 14.0$ Hz)), 2.88-3.00 (2H, 2.90 (d, $J = 9.2$ Hz), 2.95 (dd, $J = 15.0, 2.1$ Hz)), 3.14-3.17 (2H, 3.15 (t, $J = 2.7$ Hz), 3.15 (t, $J = 2.7$ Hz)), 3.29-3.33 (2H, 3.31 (d, $J = 6.4$ Hz), 3.31 (d, $J = 6.4$ Hz)), 3.41-3.50 (7H, 3.45 (s), 3.46 (t, $J = 7.6$ Hz), 3.43 (s)), 3.71 (3H, s), 3.75-3.76 (2H, 3.75 (s), 3.75 (s)), 4.23 (1H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.30 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 4.54 (1H, t, $J = 6.4$ Hz), 5.17 (1H, ddd, $J = 10.2, 8.1, 2.6$ Hz), 5.68 (1H, dd, $J = 6.2, 2.1$ Hz), 5.85 (1H, dd, $J = 9.9, 1.7$ Hz), 5.97 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 6.77 (1H, dd, $J = 10.3, 9.9$ Hz), 7.43 (1H, d, $J = 2.6$ Hz)이다.

[111] 도 2는 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 2의 합성을 도식화 한 것이다.

[112] 도 3은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 3의 합성을 도식화 한 것이다.

[113] 도 4는 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 5의 합성을 도식화 한 것이다.

[114] 도 5는 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 7의 합성을 도식화 한 것이다.

[115] 도 6은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 9의 합성을 도식화 한 것이다.

[116] 도 7은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 11의 합성을 도식화 한 것이다.

[117] 도 8은 글루타치온 전구체 약물의 한 종류인 엔트리 12의 합성을 도식화 한 것이다.

[118]

[119] 실시예 3. 글루타치온 전구체 약물과 융합 단백질간의 결합 확인

[120] 글루타치온 전구체 약물과 융합 단백질간의 결합을 ITC (isothermal titration calorimetry) 방법을 사용하여 확인하였다.

[121] 먼저 증류수로 대조 샘플을 채운 후, 튜브를 이용하여 플라스틱 주사기를 주입 주사기의 주입구에 연결하였다. 주입 주사기를 증류수로 행군 뒤, 완충액으로 행구었다. 시스템을 통해 공기를 흡입하여 주입 주사기를 완전히 비웠다. 주사 주사기의 바늘을 HER2 표적 세포바디가 부착된 글루타치온-S-전이효소 용액에 넣고 주사기 전체가 가득 찰 때까지 융합단백질을 주사기에 끌어들이었다. 주입구 및 연결된 튜브에 100 μL 까지 계속 끌어들이고 주사기의 주입구를 즉시 닫고

튜브와 플라스틱 주사기를 분리하였다. 주사기에서 기포를 제거하기 위해 주입 주사기를 두 번 더 배출하고 다시 300uL까지 채웠다. 융합단백질 용액에서 주사기를 제거하고 주사기에서 용량이 제거될 수 있으므로 주사기 팁을 킴와이프에 닿지 않도록 주의하면서 킴와이프를 측면을 닦아 방울을 제거하였다. 또한 주사기 팁에서 용량이 손실될 수 있으므로 주사기를 두드리거나 병에 넣지 않도록 주의하였다. 그 다음, 주입 주사기를 엔트리 2,3,5,7,9,11 및 12를 각각 녹인 PBS 버퍼용액에 넣었다. 융합단백질을 주입 후, 시스템에 평형화 할 시간이 주어지고 다음 주입이 발생하기 전에 열 신호가 기준선으로 복귀하도록 5분 기다린다. 그 후 후속 주입을 300 uL로 유지한 후, 실험 온도를 25 °C로 선택한다. 위와 같이 파라미터를 설정 한 후 실험을 시작하였다. 실험은 오차발생을 줄이기 위해 3번 반복으로 진행하였다.

- [122] 그 다음, 데이터를 분석하였다. 구체적으로, 모든 데이터 피팅 프로그램 (일반적으로 제조업체에서 계측기와 함께 제공)에서 매크로를 사용하여 데이터 피팅을 쉽게 수행할 수 있다. 데이터를 피팅하는 데 사용할 데이터 피팅 모델 (한개의 결합 부위, 두개/여러개의 결합 부위, 협동 결합 등)을 선택한다. 데이터는 피팅 파라미터, 화학량론 (n), 엔탈피 (ΔH) 및 결합 친화도 (K_a)의 초기 추측에 적합할 수 있고 ITC 엔탈피 값을 van't Hoff 플롯의 엔탈피와 비교할 수 있다. 거대 분자 농도가 증가함에 따라 열 신호의 절대 값이 증가해야 하기 때문에 상이한 농도의 리간드 또는 거대 분자를 사용하는 것이 도움이 될 수 있다. 세포와 주사기의 완충액이 일치하지 않으면 잡음이 발생할 가능성이 높다. 잡음에 대한 또 다른 가능성은 불순물이 있는 샘플에서 발생한다.
- [123] 그 결과, 도 9 내지 도 12에 나타난 바와 같이 융합단백질과 각 엔트리의 결합은 0.92 내지 1.1 μM 수준으로 결합함을 나타냈다.
- [124] 도 9는 엔트리 2가 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도를 나타낸 그래프이다.
- [125] 도 10은 엔트리 3이 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도를 나타낸 그래프이다.
- [126] 도 11은 엔트리 5가 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도를 나타낸 그래프이다.
- [127] 도 12는 엔트리 2,3,5,7,9,11 및 12가 융합단백질에 결합하는 경우 결합 친화도 값을 나타낸 표이다.

[128]

[129] **실시예 4. 글루타치온 전구체 약물과 융합단백질이 결합된 복합체의 세포 독성 확인**

- [130] 글루타치온 전구체 약물 (엔트리)와 융합단백질이 결합된 복합체의 항암 효과를 관찰하기 위해 세포 독성을 분석하였다.
- [131] 구체적으로, 인간 유방암 세포(human breast cancer cell)인 SKBR3 세포에 대한 Her2 지향 융합단백질(Fusion protein)과 엔트리 2, 3, 5, 7, 9, 11, 및 12가 각각

결합된 복합체의 세포 생존력은

3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨

브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT)의

불용성 포르마잔(formazan)으로의 환원을 관찰하여 평가하였다. 10% FBS가

첨가된 DMEM에서 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^3 세포의 밀도로

파종하고 밤새 배양한 후, 100 nM ~ 1 μ M 농도 범위의 엔트리 2, 3, 5, 7, 9, 11, 및

12를 각각 세포에 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 대조군 실험은

융합단백질과 각 엔트리 2, 3, 5, 7, 9, 11, 및 12로 수행하였다. 그 다음, 세포를

3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨

브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT)와

배양한 뒤, 결정화된 포르마잔을 ELISA 플레이트 판독기로 595 nm에서

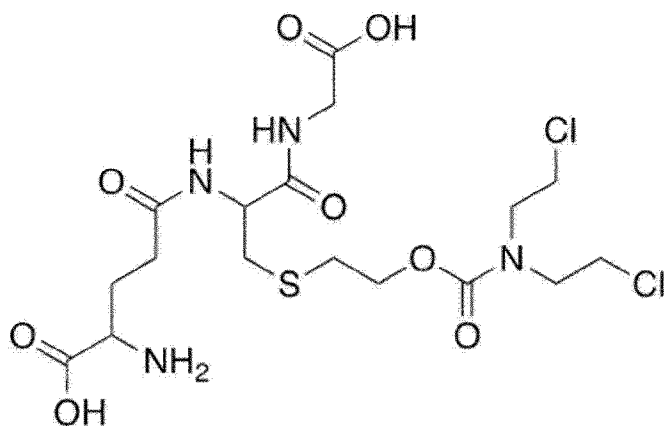
흡광도를 측정하여 정량화하였다. 결과는 생존력 백분율 = [(A550 (처리된

세포)-배경값) / (A550 (처리되지 않은 세포)-배경값)] x 100으로 표현되었다.

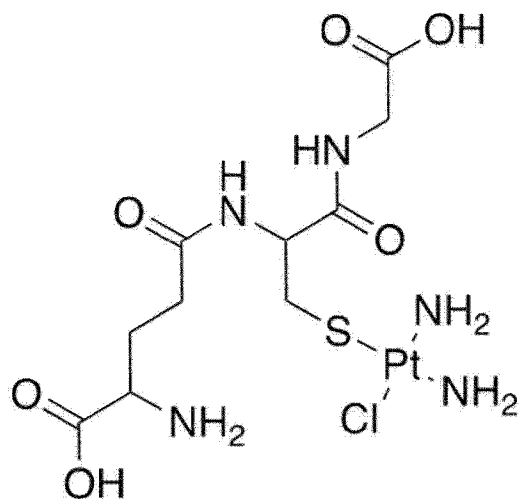
- [132] 그 결과, Her2 지향 융합단백질(Fusion protein) 또는 엔트리 2, 3, 5, 7, 9, 11, 및 12 자체의 세포독성은 50ug/ml 까지 미비한 수준이나, 융합단백질(Fusion protein)과 엔트리 2, 3, 5, 7, 9, 11, 및 12이 각각 결합된 복합체의 세포독성은 IC50 수치가 1 내지 60 ug/ml 임을 나타냈다 (도 13 내지 도 20). 이러한 결과는, 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 글루타치온—S—전이효소 (glutathione-S-transferase, GST)에 글루타치온 전구체 약물이 결합하는 복합체를 조성하고 있다는 것과, 표적세포로 글루타치온 전구체 약물을 전달하여 치료용 목적으로 적용 가능함을 나타낸다.
- [133] 도 13은 융합단백질과 엔트리 2가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [134] 도 14는 융합단백질과 엔트리 3이 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [135] 도 15는 융합단백질과 엔트리 5가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [136] 도 16은 융합단백질과 엔트리 7이 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [137] 도 17은 융합단백질과 엔트리 9가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [138] 도 18은 융합단백질과 엔트리 11이 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [139] 도 19는 융합단백질과 엔트리 12가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [140] 도 20은 융합단백질과 엔트리 2,3,5,7,9,11 및 12가 결합된 복합체의 세포 독성을 나타내는 IC50 값을 나타낸 표이다.

청구범위

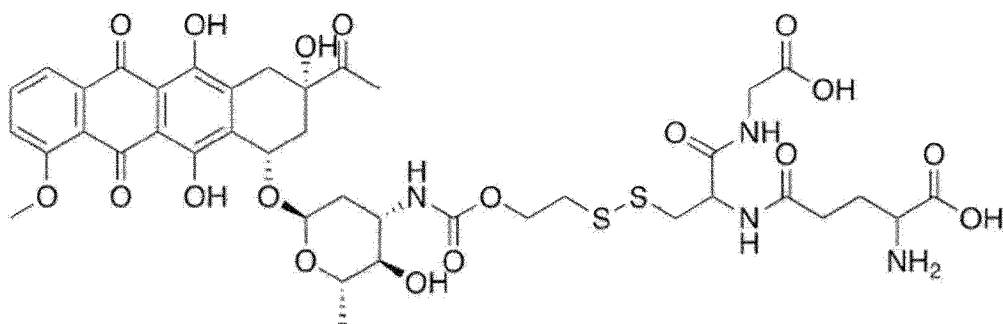
- [청구항 1] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을
갖는 단백질을 연결하는 링커; 및
상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을
함유하는 약물 전달체.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는
단백질은 수용체 타이로신 카이네이즈(Receptor tyrosine kinases: RTKs)에
특이적으로 결합하는 것인 약물 전달체.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 수용체 타이로신 카이네이즈(Receptor tyrosine
kinases: RTKs)는 표피 성장인자 수용체, 인슐린 수용체, 혈소판 유래
성장인자 수용체, 혈관내피 성장인자 수용체, 섬유아세포 성장인자
수용체, 콜레시스토킨(Cholecystokinin: CCK) 수용체,
신경영양인자(Neurotrophic factor: NGF) 수용체, 간세포 성장인자
(Hepatocyte growth factor: HGF) 수용체, 에프린(Ephrin: Eph) 수용체,
안지오펜티에틴 수용체, 및 RYK(related to receptor tyrosine kinase)
수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인 약물 전달체.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 글루타치온-S-전이효소와 글루타치온 전구체
약물의 결합은 GSH(Glutathione)에 의한 것인 약물 전달체.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 글루타치온 전구체 약물은 하기 화학식 1 내지
화학식 7 중 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로
이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인 약물 전달체.



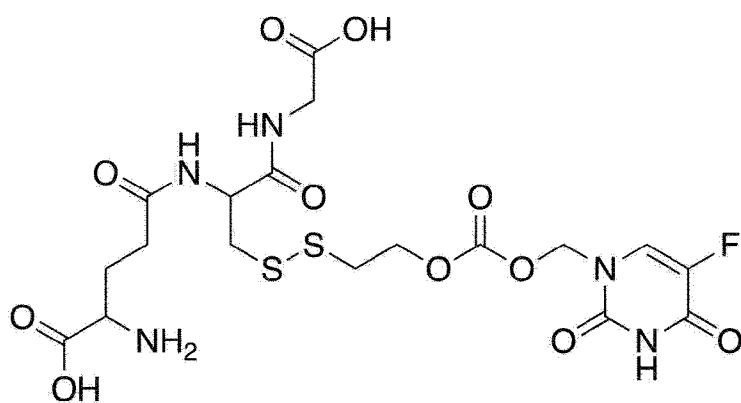
[화학식 1]



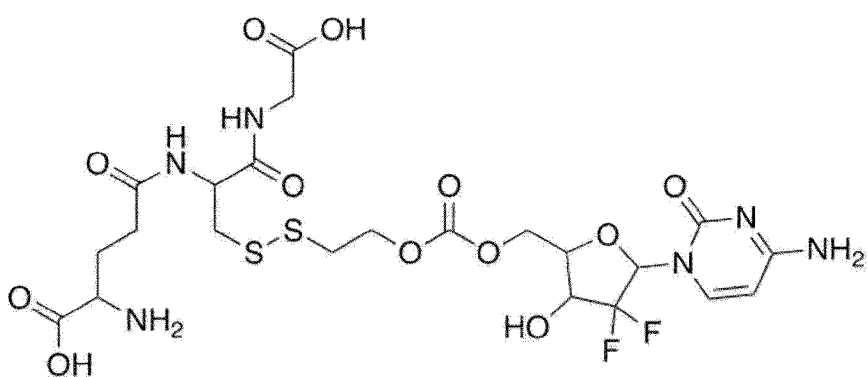
[화학식 2]



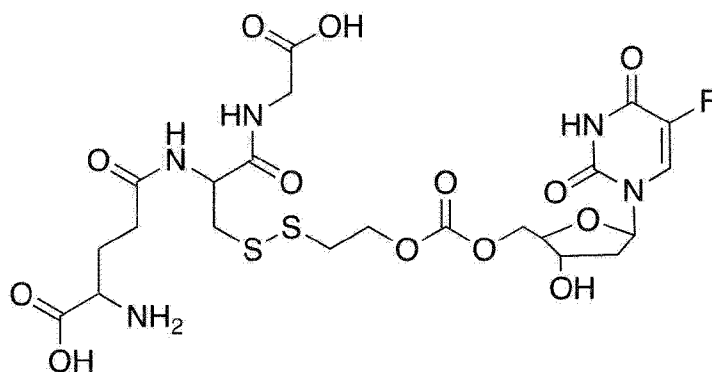
[화학식 3]



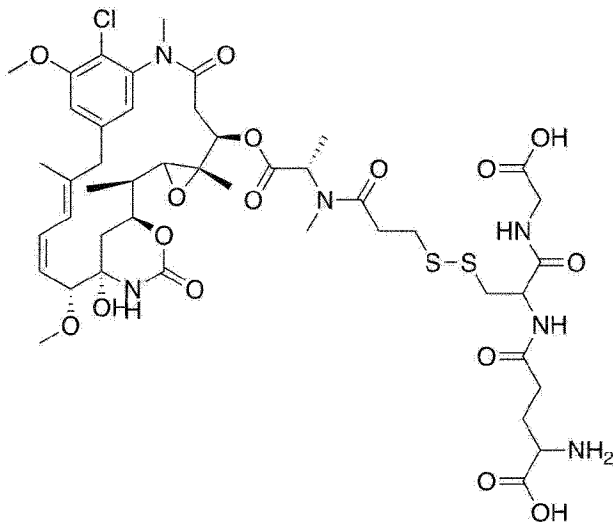
[화학식 4]



[화학식 5]



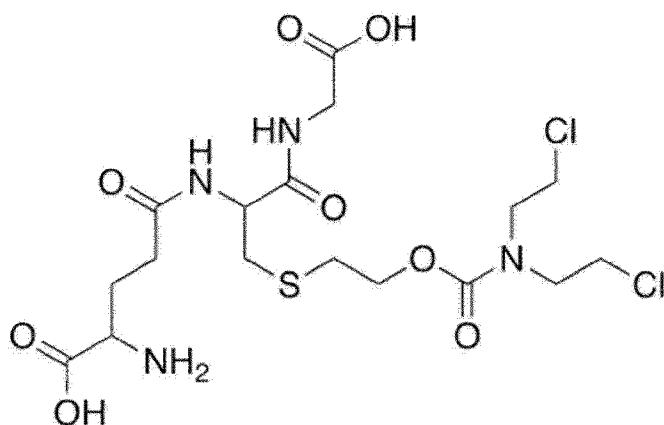
[화학식 6]



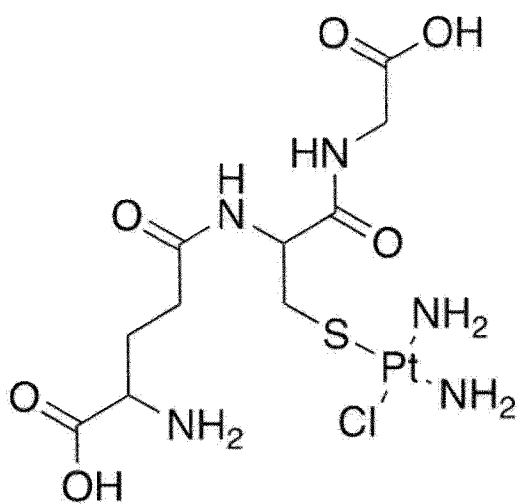
[화학식 7]

- [청구항 6] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을
갖는 단백질을 연결하는 링커; 및
상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을
포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는
단백질은 표피 성장인자 수용체, 인슐린 수용체, 혈소판 유래 성장인자
수용체, 혈관내피 성장인자 수용체, 및 안지오프이에틴 수용체에
특이적으로 결합하는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서, 상기 글루타치온-S-전이효소와 글루타치온 전구체
약물의 결합은 GSH(Glutathione)에 의한 것인 암 예방 또는 치료용 약학적
조성물.
- [청구항 9] 청구항 6에 있어서, 상기 글루타치온 전구체 약물은 하기 화학식 1 내지
화학식 7 중 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로

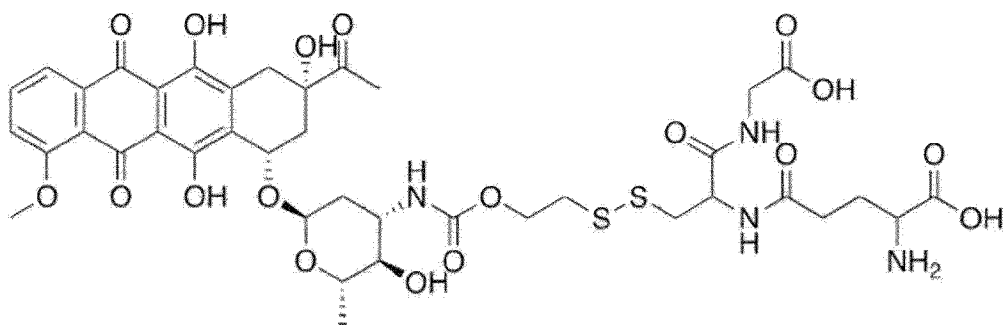
이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.



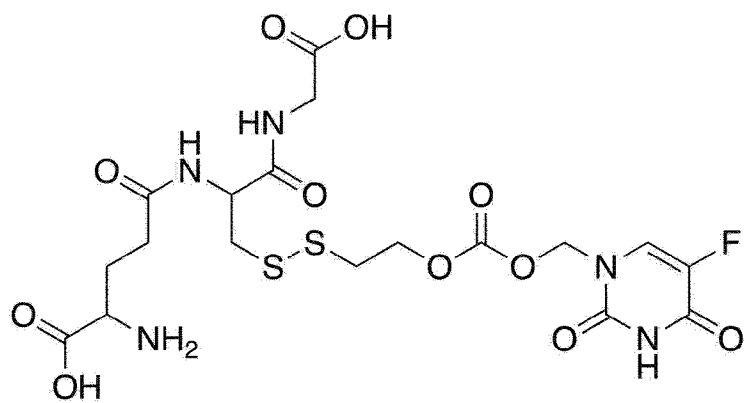
[화학식 1]



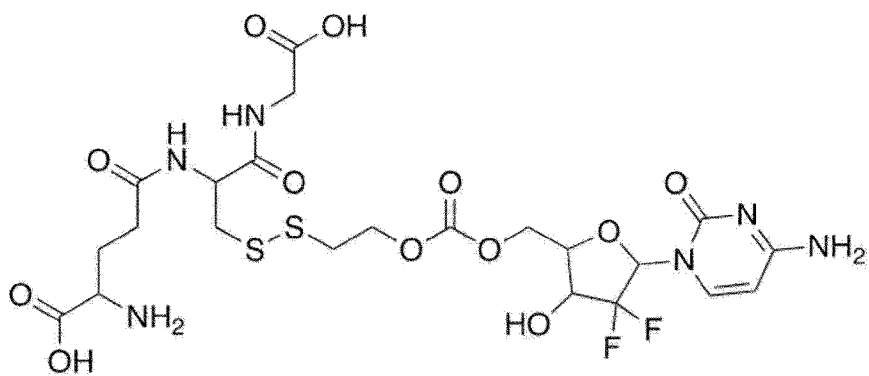
[화학식 2]



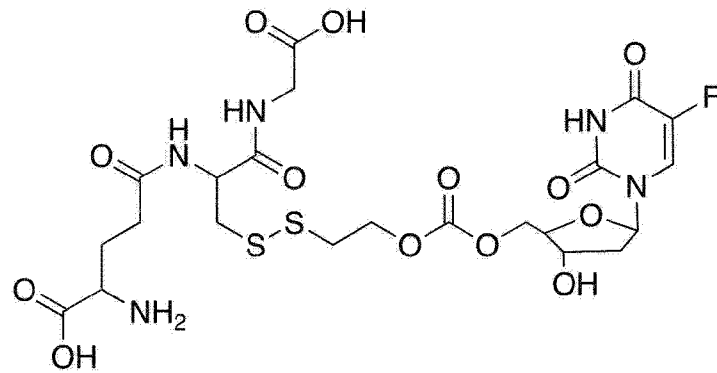
[화학식 3]



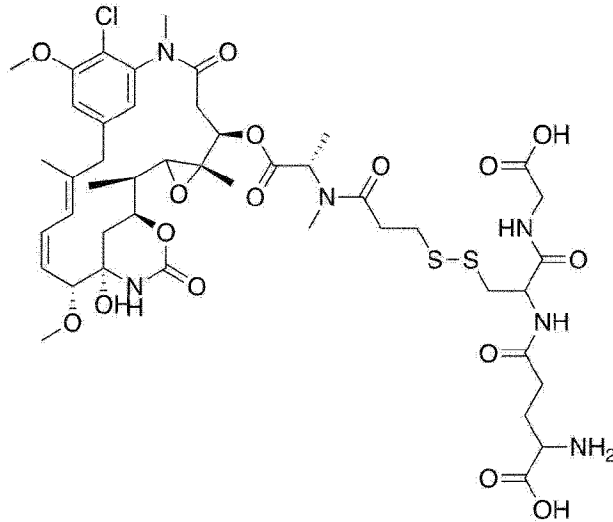
[화학식 4]



[화학식 5]



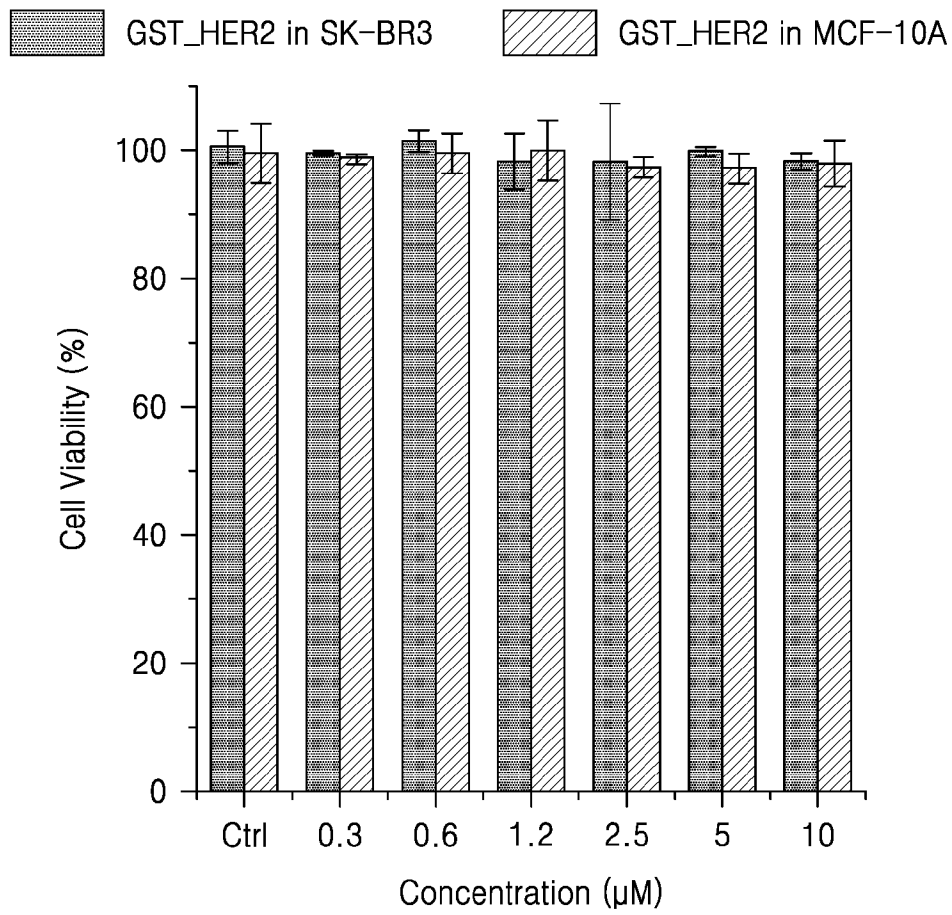
[화학식 6]



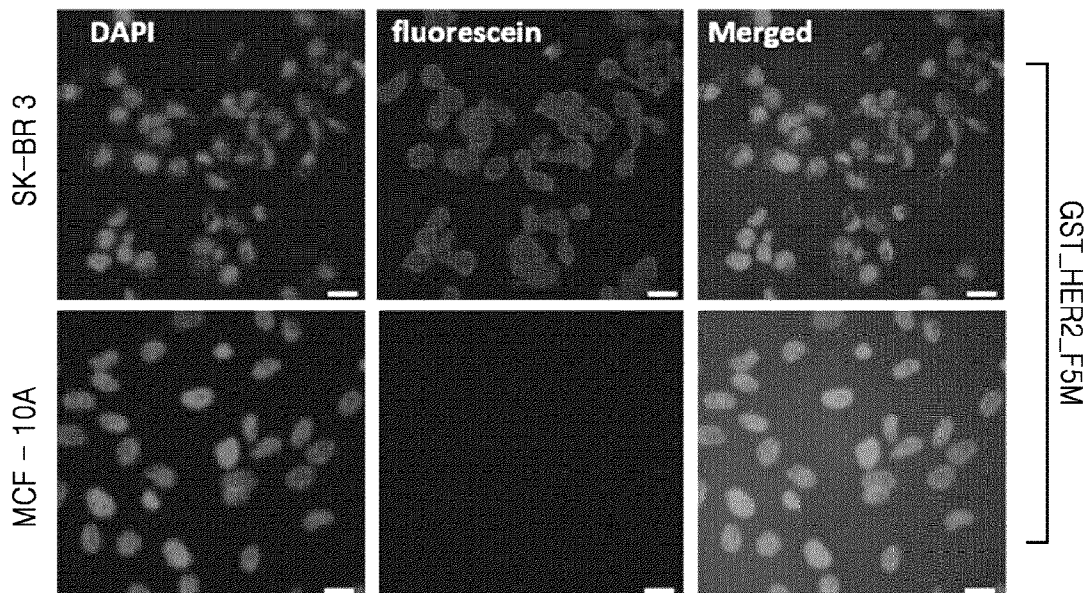
[화학식 7]

- [청구항 10] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을
갖는 단백질을 연결하는 링커; 및
상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을
함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는
개체 내 약물을 전달하는 방법.
- [청구항 11] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을
갖는 단백질을 연결하는 링커; 및
상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 글루타치온 전구체 약물을
함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는
암을 예방하거나 치료하는 방법.

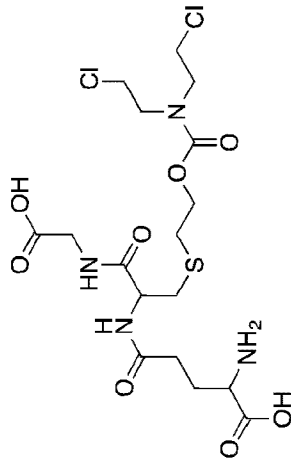
[도 1a]



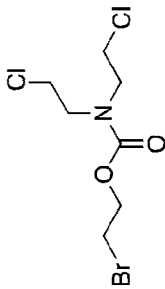
[도 1b]



[도2]



GSH



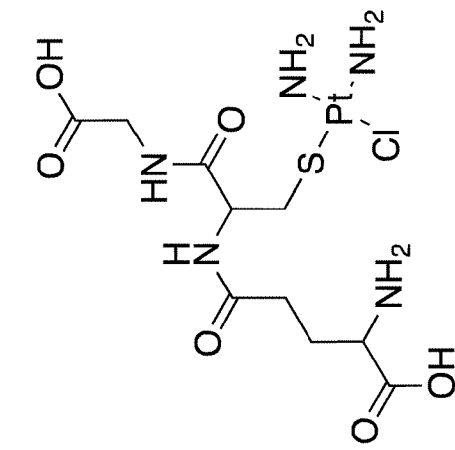
Entry 1

2-bromoethyl bis(2-chloroethyl)carbamate

Entry 2

15-amino-10-((carboxymethyl)carbamoyl)-1-chloro-3-(2-chloroethyl)-4,12-dioxo-5-oxa-8-thia-3,11-diazahexadecan-16-oic acid

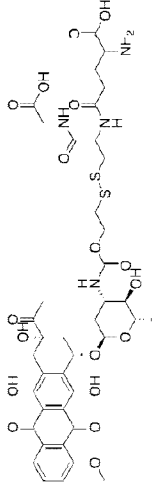
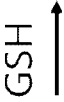
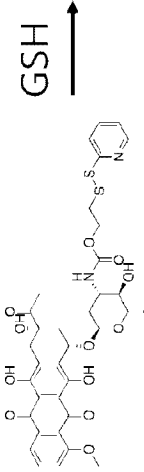
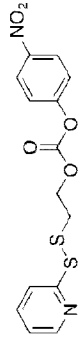
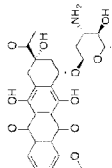
[도3]



Entry 3

[도4]

Daunorubicin



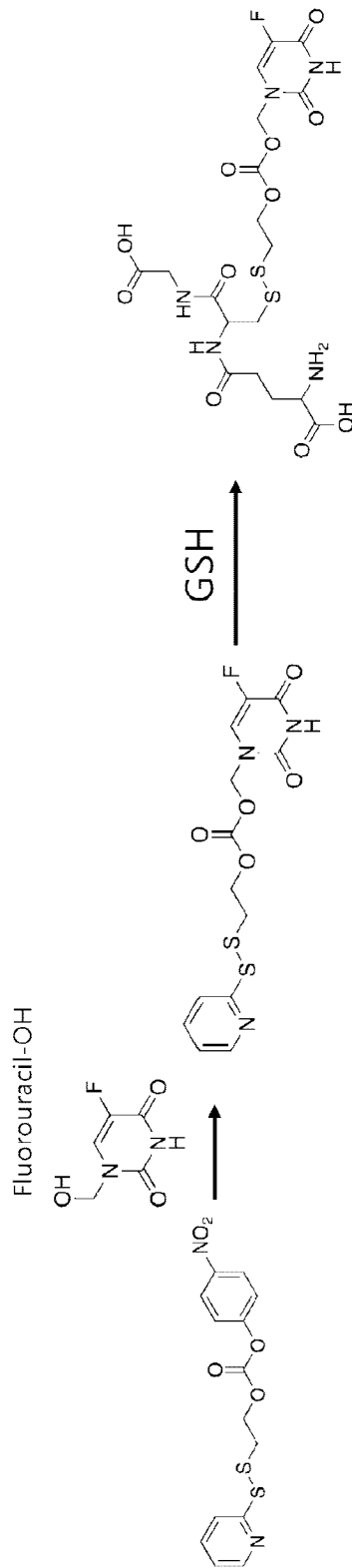
Entry 4

2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl ((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S)-3-acetyl-3,5,12-trihydroxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)-3-hydroxy-2-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)carbamate

Entry 5

N5-(3-((2-(((2S,3R,4S,6R)-6-(((1S,3S)-3-acetyl-3,5,12-trihydroxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)-3-hydroxy-2-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)carbamoyloxy)ethyl)disulfaneyl)-1-((carboxymethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)glutamine

[도5]



Entry 6

(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl) methyl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl carbonate

Entry 7

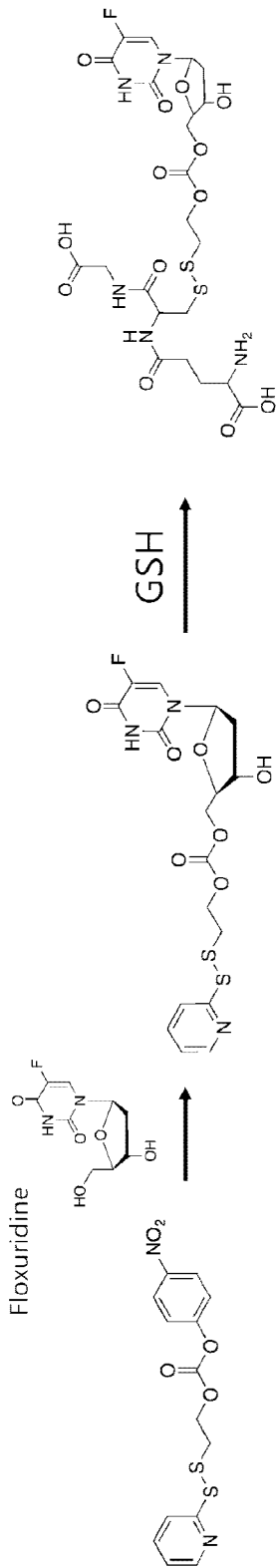
15-amino-10-((carboxymethyl)carbamoyl)-1-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,12-dioxo-2,4-dioxo-7,8-dithia-1-azahexadecan-16-oic acid

The diagram illustrates the conversion of Gemcitabine to Gemcitabine diphosphate (GMP) by the enzyme GSH. Gemcitabine, a nucleoside analog, is shown on the left. It consists of a pyrimidine ring with an amino group at the 4-position and a cyano group at the 2-position, attached to a deoxyribose sugar. The sugar has a hydroxyl group at the 3' position and a cyano group at the 5' position. The reaction is catalyzed by GSH, as indicated by the arrow labeled 'GSH'. The product, Gemcitabine diphosphate (GMP), is shown on the right. It is a nucleotide where the gemcitabine base is attached to a ribose sugar, which is in turn attached to a pyrophosphate group (two phosphate groups linked by an oxygen atom). The pyrophosphate group is further linked to a pyridine ring, which is part of a larger molecule. The pyridine ring has a cyano group at the 2-position and a cyano group at the 4-position. The pyridine ring is attached to a pyrophosphate group, which is further linked to a pyridine ring, which is part of a larger molecule. The pyridine ring has a cyano group at the 2-position and a cyano group at the 4-position. The pyridine ring is attached to a pyrophosphate group, which is further linked to a pyridine ring, which is part of a larger molecule.

(5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2*H*)-yl)-4,4-difluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl 2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl carbonate

15-amino-1-(5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4,4-difluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-10-(carboxymethyl)carbonyl)-3,12-dioxo-2,4-dioxo-7,8-dithia-11-azaheptadecan-16-oic acid

[도7]



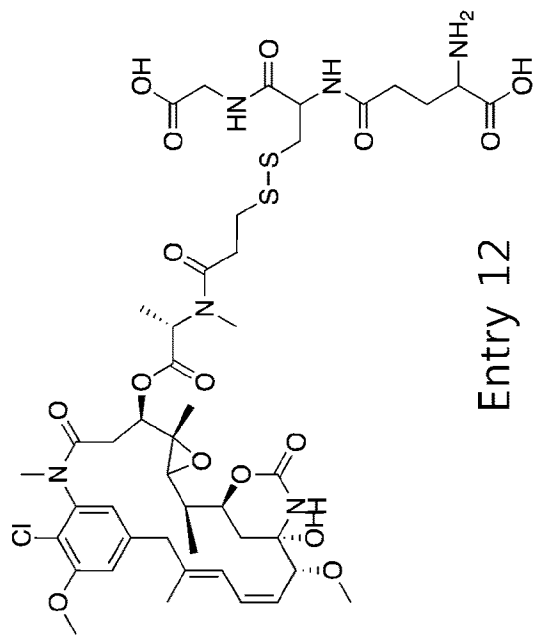
Entry 10

((2*R*,3*S*,5*R*)-5-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl carbonate

Entry 11

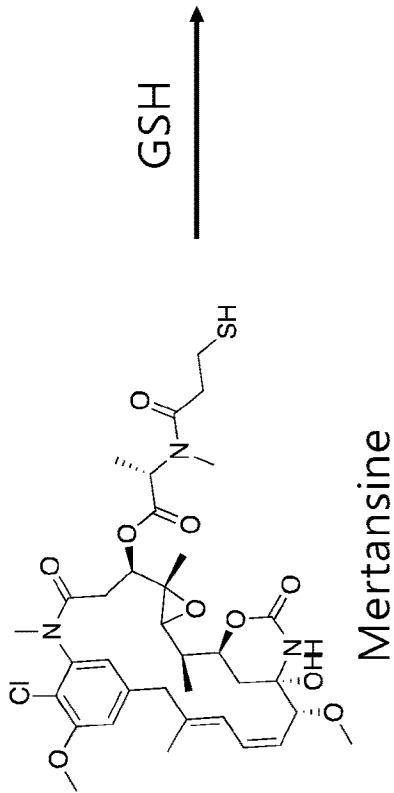
15-amino-10-((carboxymethyl)carbamoyl)-1-((2*R*,3*S*,5*R*)-5-(5-fluoro-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3,12-dioxo-2,4-dioxo-7,8-dithia-11-azahexadecan-16-oic acid

[도8]



Entry 12

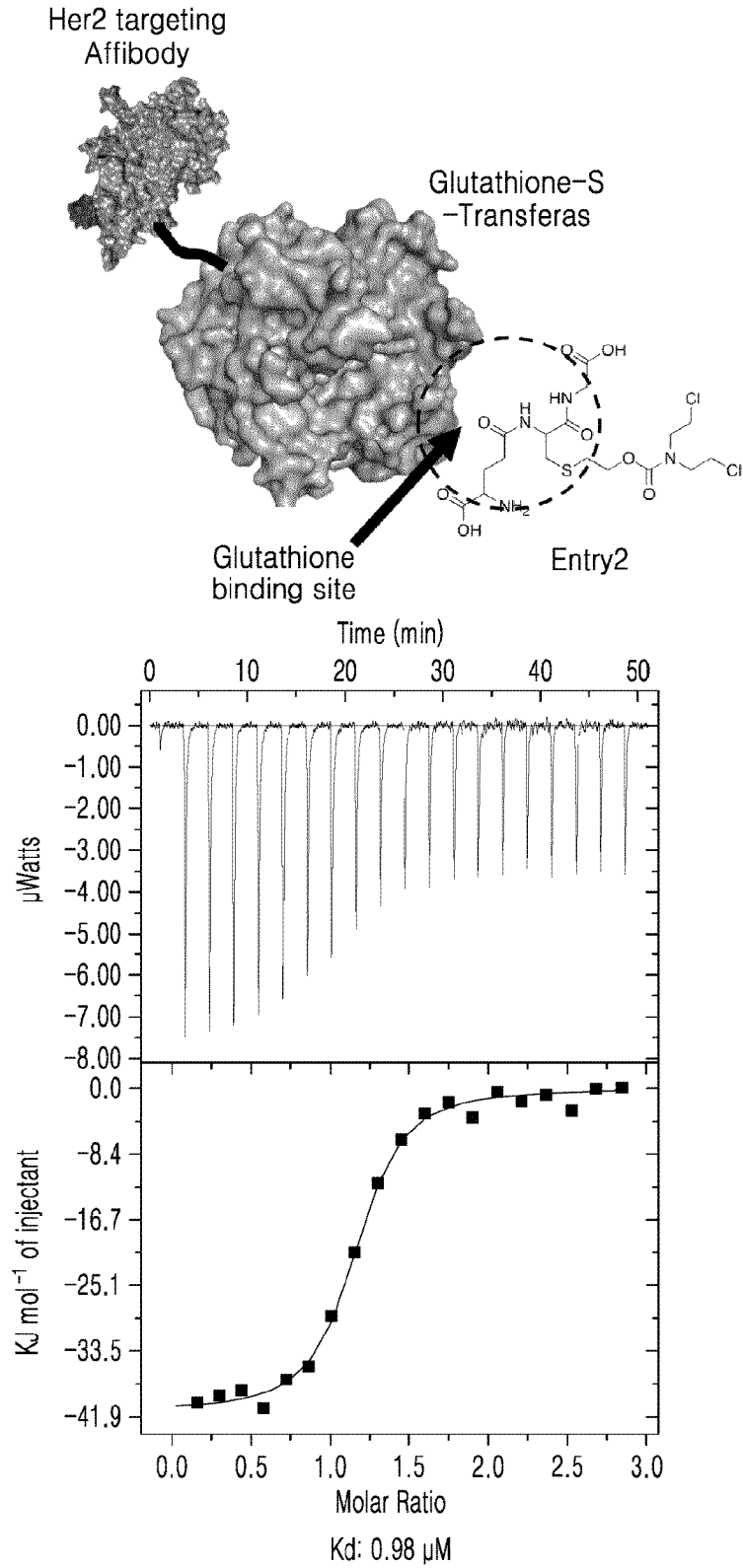
N5-(1-((carboxymethyl)amino)-3-((3-(((2S)-1-(((14S, 16S, 33S, 2R, 4R, 10E, 12Z, 14R)-86-chloro-14-hydroxy-85, 14-dimethoxy-33, 2, 7, 10-tetramethyl-12, 6-dioxo-7-aza-1(6, 4)-oxazinana-3(2, 3)-oxirana-8(1, 3)-benzenacyclotetradecaphane-10, 12-dien-4-yl)oxy)-1-oxopropan-2-yl)(methyl)amino)-3-oxopropyl)disulfaneyl)-1-oxopropan-2-yl)glutamine



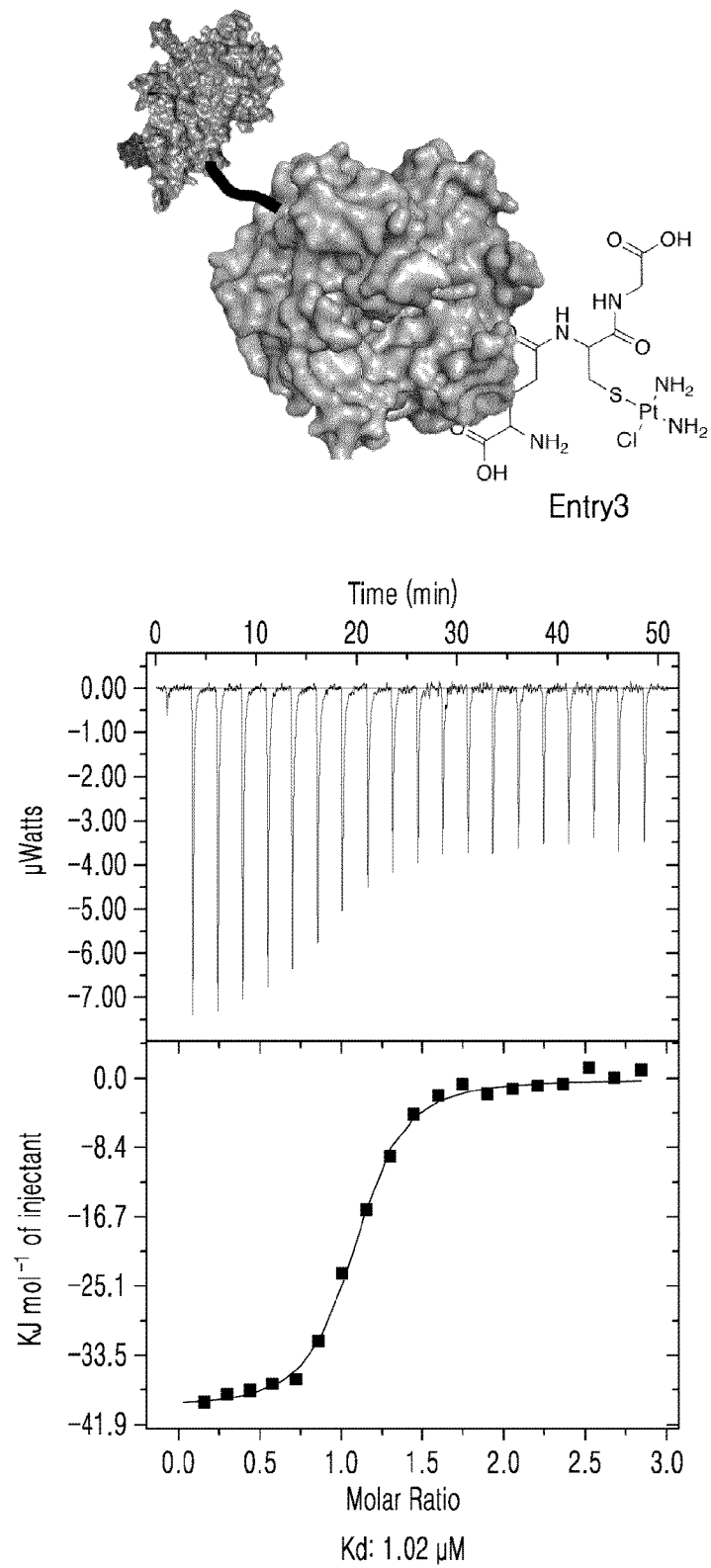
Mertansine

GSH

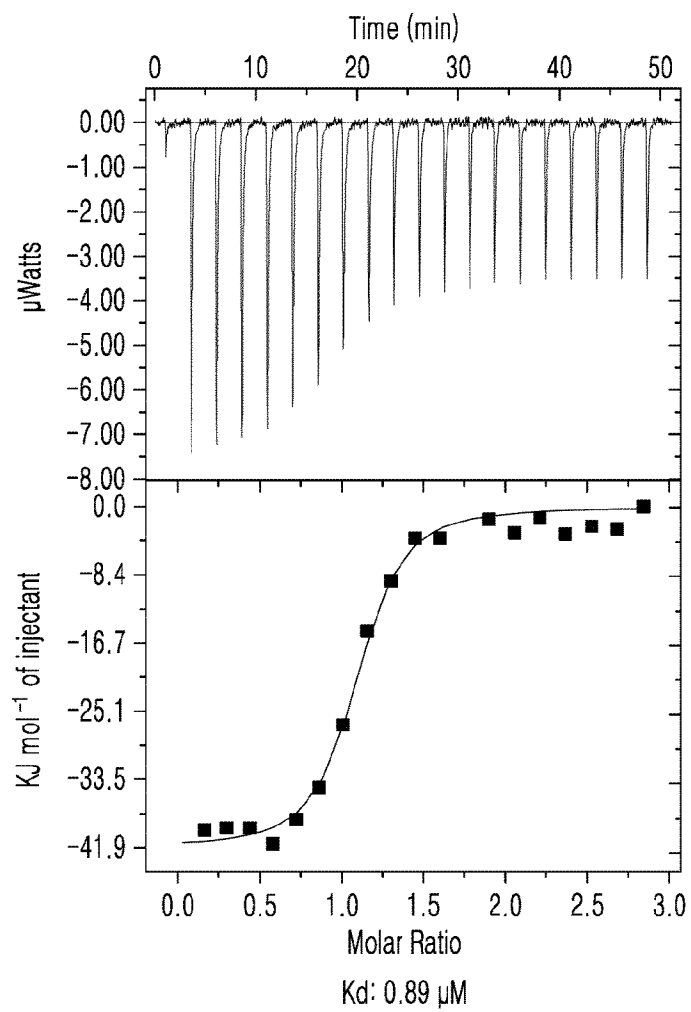
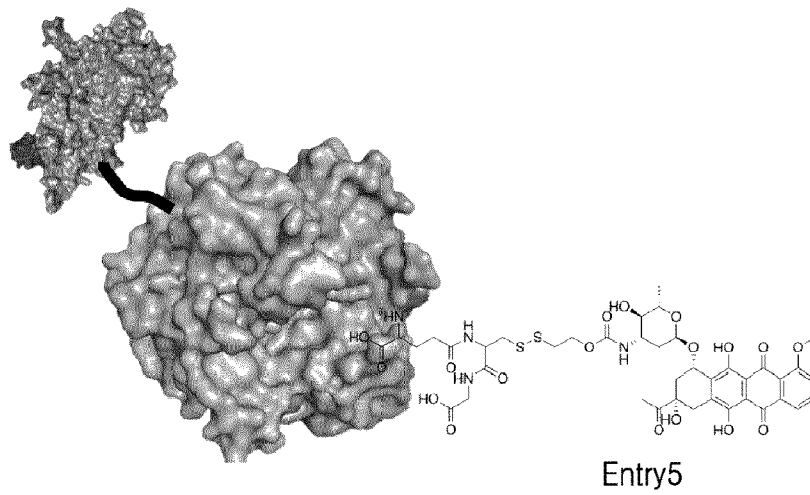
[도9]



[도10]



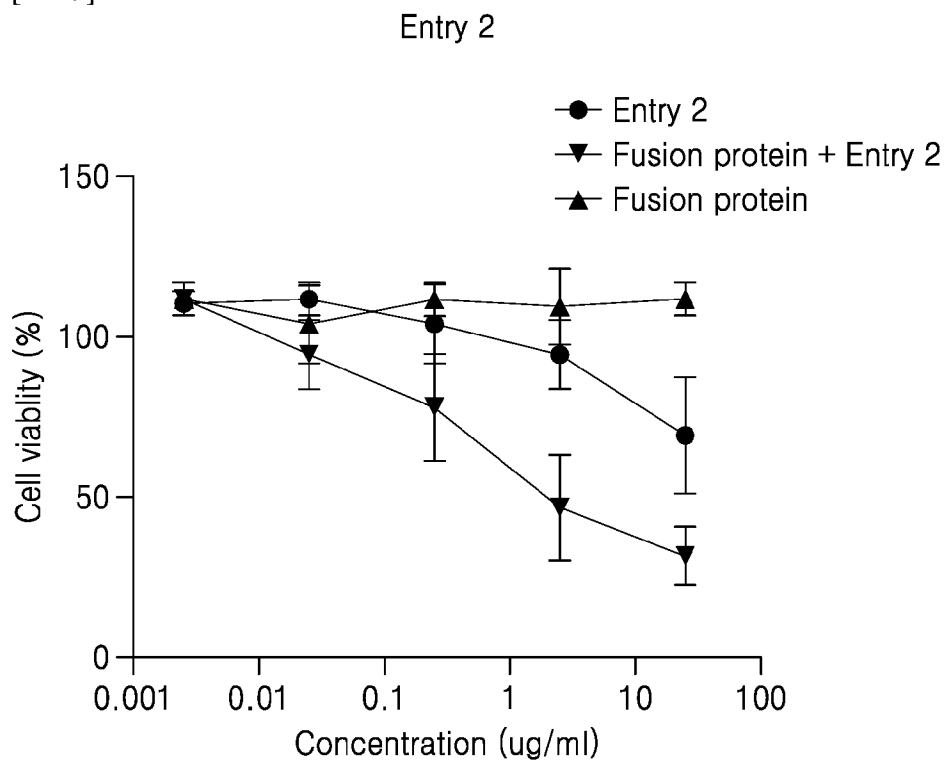
[도11]



[도12]

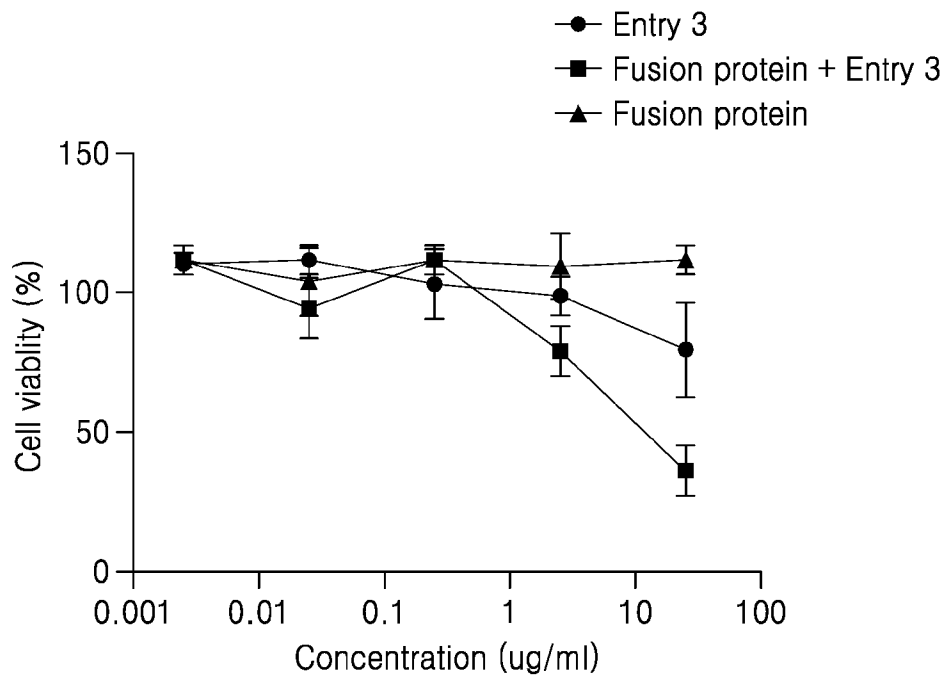
Entry	Kd value (uM)
Fusion protein + Entry 2	0.98
Fusion protein + Entry 3	1.02
Fusion protein + Entry 5	0.89
Fusion protein + Entry 7	0.92
Fusion protein + Entry 9	1.1
Fusion protein + Entry 11	0.95
Fusion protein + Entry 12	0.92

[도13]



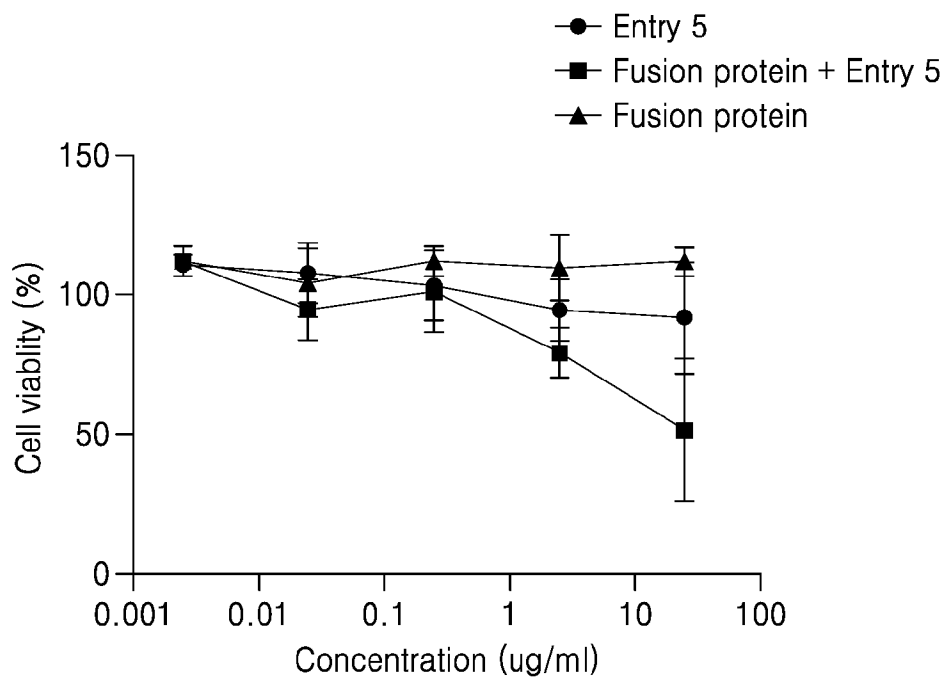
[도14]

Entry 3



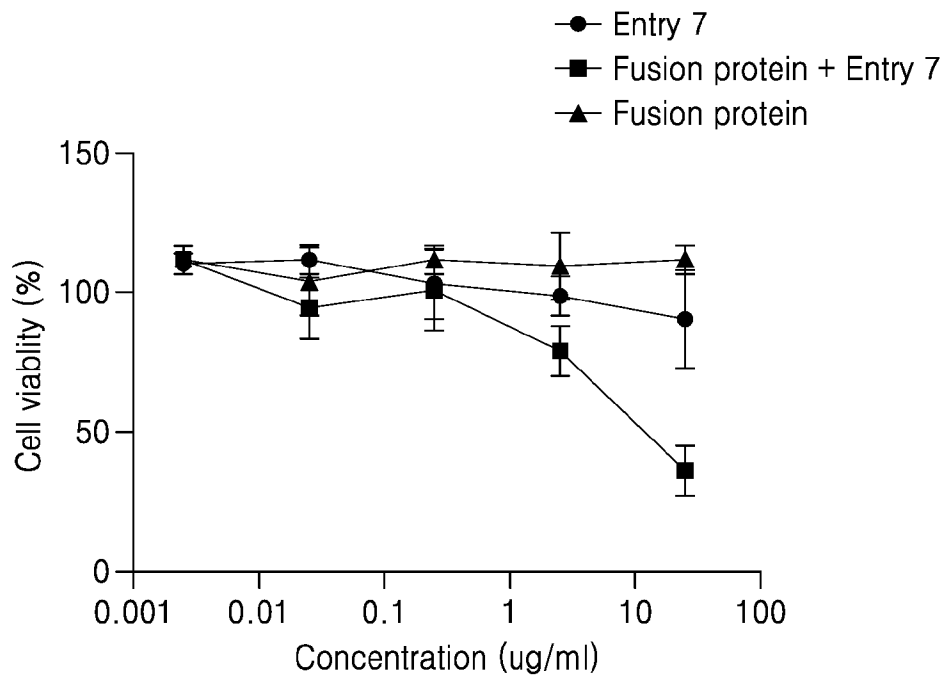
[도15]

Entry 5



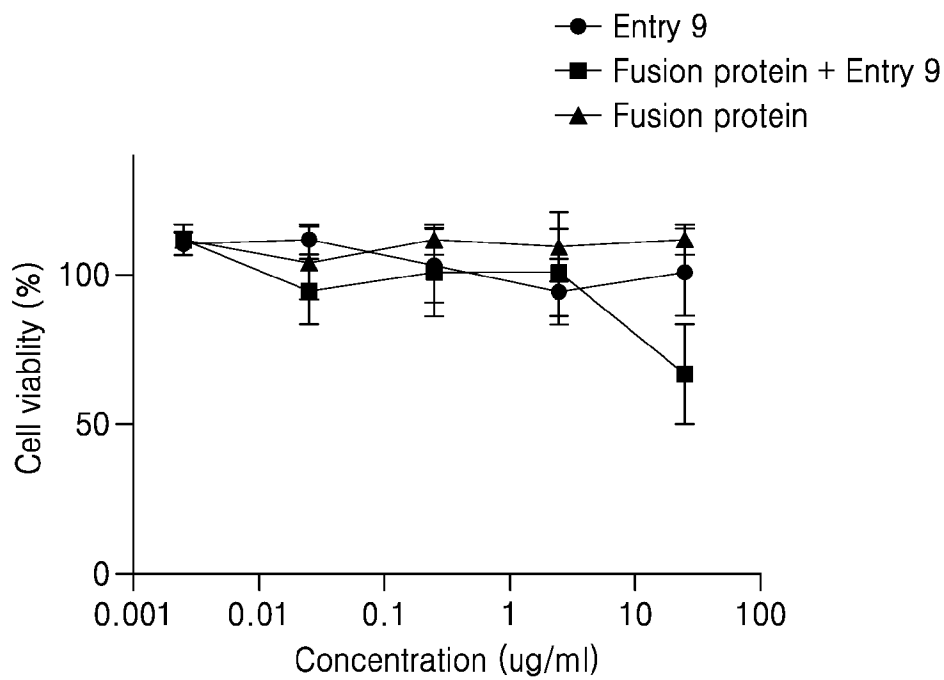
[도16]

Entry 7



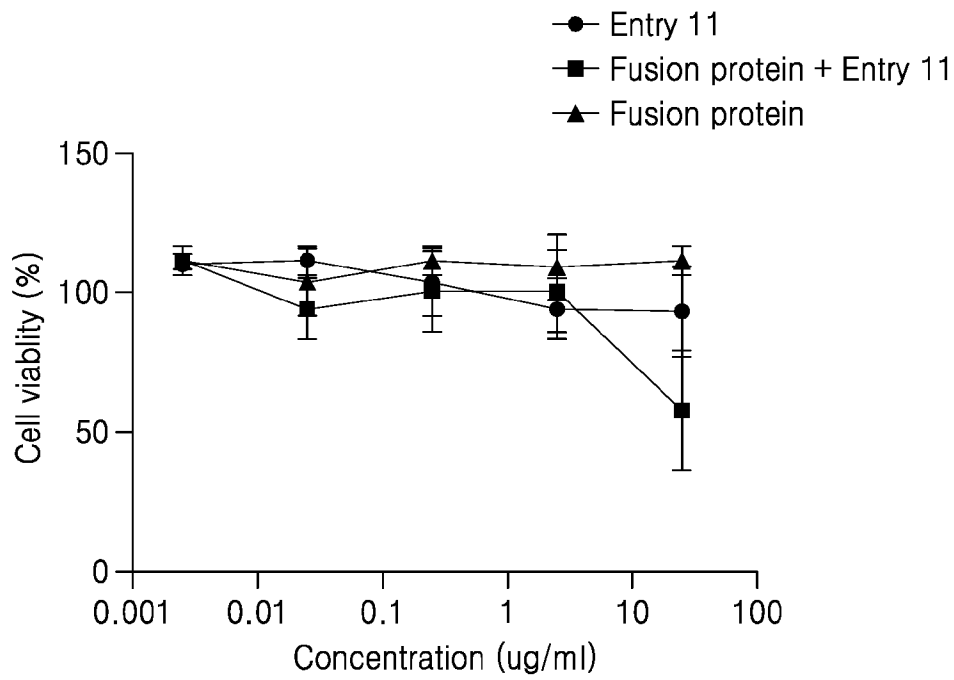
[도17]

Entry 9



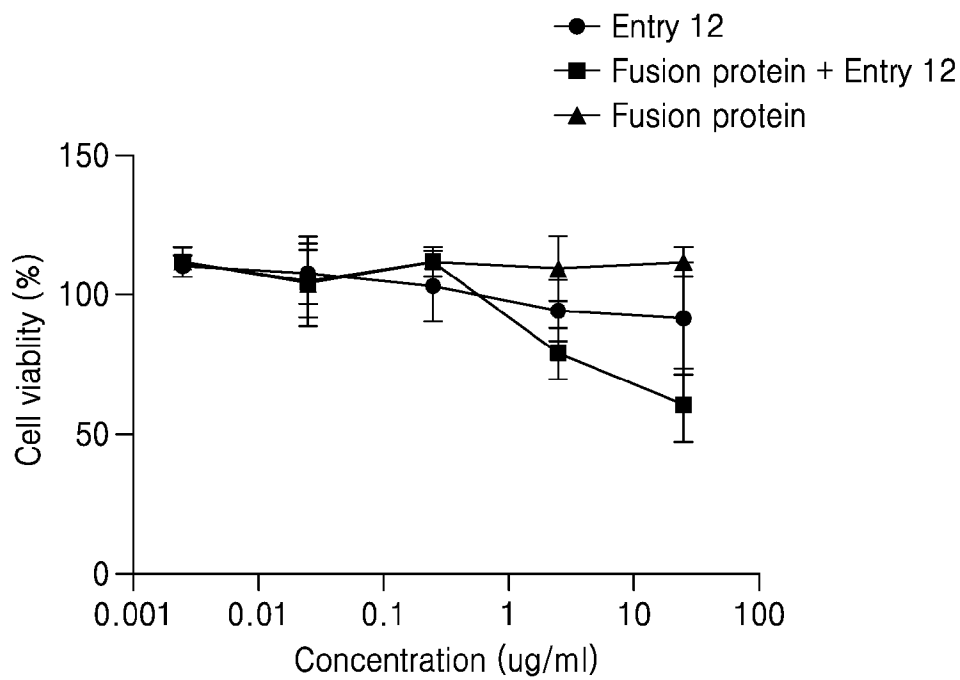
[도18]

Entry 11



[도19]

Entry 12



[도20]

Entry	IC50 value (ug/ml)
Fusion protein + Entry 2	1.7
Fusion protein + Entry 3	14.5
Fusion protein + Entry 5	17.4
Fusion protein + Entry 7	12.7
Fusion protein + Entry 9	63.5
Fusion protein + Entry 11	32.8
Fusion protein + Entry 12	41.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/006906

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/64(2017.01)i, A61K 47/65(2017.01)i, A61K 38/06(2006.01)i, A61K 33/243(2019.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 31/7068(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 9/10(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 47/64; A61K 47/48; A61K 9/06; A61K 47/65; A61K 38/06; A61K 33/243; A61K 31/704; A61K 31/7068; A61P 35/00; C12N 9/10

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) & Keywords: glutathione-S-transferase(GST), protein, linker, glutathione precursor drug

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOON, H. et al. Plug-and-playable fluorescent cell imaging modular toolkits using the bacterial superglue. SpyTag/SpyCatcher. Chemical Communications. 2016, vol. 52, no. 97, pages 14051-14054 See pages 14051, 14053.	1-9
A	BERNAREGGI, A. et al. Characterization of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry Evidence for their formation in vitro but not in vivo after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients. Journal of Chromatography B. 1995, vol. 669, pages 247-263 See the entire document.	1-9
A	ALLOCATI, N. et al. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. Oncogenesis. 2018, vol. 7, no. 8, pages 1-15 See the entire document.	1-9
A	WO 98-00173 A2 (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY) 08 January 1998 See the entire document.	1-9
A	US 2015-0258211 A1 (RAYAHIN, J. et al.) 17 September 2015 See the entire document.	1-9



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

"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

01 SEPTEMBER 2020 (01.09.2020)

Date of mailing of the international search report

01 SEPTEMBER 2020 (01.09.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/006906

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10-11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10-11 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/006906

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 98-00173 A2	08/01/1998	AT 249842 T	15/10/2003
		DE 69724964 T2	22/07/2004
		DK 0909184 T3	22/12/2003
		EP 0909184 A2	21/04/1999
		EP 0909184 B1	17/09/2003
		ES 2208923 T3	16/06/2004
		JP 2001-505533 A	24/04/2001
		US 2003-0109555 A1	12/06/2003
		US 6653331 B2	25/11/2003
		WO 98-00173 A3	07/05/1998
US 2015-0258211 A1	17/09/2015	US 9457101 B2	04/10/2016
		WO 2013-184915 A1	12/12/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/64(2017.01)i, A61K 47/65(2017.01)i, A61K 38/06(2006.01)i, A61K 33/243(2019.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 31/7068(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/64; A61K 47/48; A61K 9/06; A61K 47/65; A61K 38/06; A61K 33/243; A61K 31/704; A61K 31/7068; A61P 35/00; C12N 9/10

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), STN(Registry, Caplus) & 키워드: 글루타치온-S-전이효소(glutathion-S-transferase, GST), 단백질(protein), 링커(linker), 글루타치온 전구체 약물(glutathion precursor drug)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MOON, H. 등, "Plug-and-playable fluorescent cell imaging modular toolkits using the bacterial superglue, SpyTag/SpyCatcher", Chemical Communications, 2016, 제52권, 제97호, 페이지 14051-14054 페이지 14051, 14053	1-9
A	BERNAREGGI, A. 등, "Characterization of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry Evidence for their formation in vitro but not in vivo after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients", Journal of Chromatography B, 1995, 제669권, 페이지 247-263 전체 문헌	1-9
A	ALLOCATI, N. 등, "Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases", Oncogenesis, 2018, 제7권, 제8호, 페이지 1-15 전체 문헌	1-9
A	WO 98-00173 A2 (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY) 1998.01.08 전체 문헌	1-9
A	US 2015-0258211 A1 (RAYAHIN, J. 등) 2015.09.17 전체 문헌	1-9

☐ 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 이후 "X"에 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 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 09월 01일 (01.09.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 09월 01일 (01.09.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10-11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10-11은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 98-00173 A2	1998/01/08	AT 249842 T DE 69724964 T2 DK 0909184 T3 EP 0909184 A2 EP 0909184 B1 ES 2208923 T3 JP 2001-505533 A US 2003-0109555 A1 US 6653331 B2 WO 98-00173 A3	2003/10/15 2004/07/22 2003/12/22 1999/04/21 2003/09/17 2004/06/16 2001/04/24 2003/06/12 2003/11/25 1998/05/07
US 2015-0258211 A1	2015/09/17	US 9457101 B2 WO 2013-184915 A1	2016/10/04 2013/12/12