



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0104463  
(43) 공개일자 2021년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 47/54 (2017.01) A61K 31/704 (2006.01)  
A61K 47/65 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)  
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 47/545 (2017.08)  
A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0019242  
(22) 출원일자 2020년02월17일  
심사청구일자 2020년02월17일

(71) 출원인  
울산대학교 산학협력단  
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)  
파로스젠 주식회사  
서울특별시 송파구 위례순환로 387, 2관 404호(장지동, 대신위례센터)  
(뒷면에 계속)

(72) 발명자  
김상환  
경기도 성남시 분당구 판교로 430, 306동 703호  
김상윤  
서울특별시 강남구 압구정로 201, 84동 405호  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
한윤호

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 항암제 프로드러그 컨쥬게이트의 새로운 용도

(57) 요약

본 발명은 난치성 암으로 알려진 KRAS 변이체 유전자형 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 암에 대한 효과적인 치료를 위해, 알부민 결합 기능기(albumin binding moiety), 링커 및 항암 화학요법제를 포함하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트를 포함하는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 47/65* (2017.08)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C12Q 1/6886* (2018.05)

*G01N 33/6893* (2013.01)

*C12Q 2600/156* (2013.01)

(71) 출원인

**서울대학교산학협력단**

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

**재단법인 아산사회복지재단**

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

**변영로**

서울특별시 도봉구 마들로 859-19, 113동 1402호

**조한희**

서울특별시 동대문구 고산자로 521, 803호

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

알부민 결합 기능기(albumin binding moiety), 링커 및 항암 화학요법제를 포함하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트를 포함하는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 암 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알부민 결합 기능기(albumin binding moiety)는 말레이미드기(maleimide group), 피리딜디티올기(pyridyldithiol group), 올레이트(oleate group), 폴리에틸렌 글리콜, 히알루론산, 알부민 결합 펩타이드(PEP, 서열번호 1), 팔미트기(palmitate group), 4-(p-iodophenyl)butyric acid 또는 알부민에 특이적으로 결합하는 단일쇄 기반 항체 유사체 예컨대, V<sub>H</sub>H, scFv, V<sub>NAR</sub>, DARPIn, nanobody, monobody, 또는 VLR인, 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 링커는 펩타이드 링커, 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커인, 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩타이드 링커는 생체내 절단형 펩타이드 링커 또는 생체내 비절단형 링커인, 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 생체내 절단형 펩타이드 링커는 사이클로펩타이드 펩타이드 링커 또는 단백질 절단효소 감수성 펩타이드 링커인, 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단백질 절단효소 감수성 펩타이드 링커는 카스페이즈, 카텝신, 푸린, 또는 메탈로매트릭스 프로테이네이즈에 의해 절단이 되는 펩타이드를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

DEVD(서열번호 13), DLDV(서열번호 14), DEID(서열번호 15), DEHD(서열번호 16), DKAD(서열번호 17), DSFD(서열번호 18), DSSD(서열번호 19), DGKD(서열번호 20), DYND(서열번호 21), DRPD(서열번호 22), DNVD(서열번호 23), VQVD(서열번호 24), LETD(서열번호 25), LEHD(서열번호 26), WEHD(서열번호 27), ELQTDG(서열번호 28), RIEADS(서열번호 29), VDVA(서열번호 30), DFRD(서열번호 31), KGDEV(서열번호 32), RGDEV(서열번호 33), CRGDCGDEV(서열번호 34), DEVDR(서열번호 35), CQRPPRDEV(서열번호 36), GRRG(서열번호 37), FRRG(서열번호 38), ARRG(서열번호 39), KRRG(서열번호 40), RGRRG(서열번호 41), DXXD(서열번호 42), LXXD(서열번호 43) 또는 VXXD(서열번호 44)로 구성되는 분으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 8

제3항에 있어서,

상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커는 KGDEV(서열번호 32)-PABC, DEV(서열번호

13)-PABC, RGDEVD(서열번호 33)-PABC, RGDEVD(서열번호 33)-MBA, CQRPPRDEVD(서열번호 36)-PABC, DEID(서열번호 15)-PABC, DLVD(서열번호 14)-PABC, RGDEVD(서열번호 33)-MBA, 및 KGDEVD(서열번호 32)-PABC인, 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

상기 항암 화학요법제는 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토프린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토티렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 캄토테신(camptothecin), 토폠테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 (auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

**청구항 10**

제1항에 있어서,

상기 프로드러그 컨쥬게이트는 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-KGDEVD-PABC-다우노루비신, 말레이미드-KGDEVD-PABC-파클리탁셀, 말레이미드-KGDEVD-PABC-MMAE, 말레이미드-DEVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-DEID-PABC-독소루비신, 말레이미드-DLVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-DEVD-독소루비신, 피리딜디티올-KGDEVD-PABC-독소루비신, 올리에이트-KGDEVD-PABC-독소루비신, 폴리에틸렌 글리콜-KGDEVD-PABC-독소루비신, 히알루로난-KGDEVD-PABC-독소루비신, 폴레이트-KGDEVD-PABC-독소루비신, RGDEVD-PABC-독소루비신, CQRPPRDEVD-PABC-독소루비신, RGDEVD-MBA-독소루비신, DEVD-다우노루비신-RGDSC, 및 HSA-말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신으로 이루어진 군에서 선택되는, 조성물.

**청구항 11**

암환자로부터 분리된 암조직 생검으로부터 DNA 또는 단백질을 분리하는 단계;

분리된 DNA 또는 단백질을 이용하여 KRAS 및 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 또는 상기 PTEN 단백질의 소실 여부를 조사하는 단계; 및

상기 KRAS를 암호화하는 유전자가 변이되었거나, 상기 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자에 상기 PTEN 단백질의 소실을 가져오는 돌연변이가 발생하거나 또는 상기 PTEN 단백질의 발현이 소실된 것으로 판정될 경우, 상기 암환자를 알부민 결합 기능기, 링커 및 항암 화합물을 포함하는 항암제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여대상으로 판정하는 단계를 포함하는, 암환자에 최적의 처방을 위한 정보제공 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 KRAS를 암호화하는 유전자의 변이 여부는 염기서열 결정, DNA 마이크로어레이, 또는 대립유전자 특이적 PCR 반응에 의해 분석되는, 방법.

**청구항 13**

제11항에 있어서,

상기 PTEN 단백질의 소실 여부는 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 분석 또는 PTEN 단백질의 발현 여부에 대한 단백질 정량분석에 의해 수행되는, 방법.

**청구항 14**

암환자로부터 분리된 암조직 샘플으로부터 DNA 또는 단백질을 분리하는 단계;

분리된 DNA 또는 단백질을 이용하여 KRAS 및 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 또는 상기 PTEN 단백질의 소실 여부를 조사하는 단계; 및

상기 KRAS를 암호화하는 유전자가 변이되었거나, 상기 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자에 상기 PTEN 단백질의 소실을 가져오는 돌연변이가 발생하거나 또는 상기 PTEN 단백질의 발현이 소실된 것으로 판정될 경우, 상기 암환자에 대하여 알부민 결합 기능기, 링커 및 항암 화합물을 포함하는 항암제 프로드러그 컨쥬게이트를 투여하는 단계를 포함하는, KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실을 갖는 암에 대한 치료방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

상기 KRAS를 암호화하는 유전자의 변이 여부는 염기서열 결정, DNA 마이크로어레이, 또는 대립유전자 특이적 PCR 반응에 의해 분석되는, 치료방법.

**청구항 16**

제14항에 있어서,

상기 PTEN 단백질의 소실 여부는 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 분석 또는 PTEN 단백질의 발현 여부에 대한 단백질 정량분석에 의해 수행되는, 치료방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 항암제 프로드러그 컨쥬게이트의 새로운 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 암에 특이적으로 작용하는 항암제 프로드러그 컨쥬게이트의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 항암 화학요법제(또는 항암제)는 강한 항암 효과로 인해 항암치료 시 가장 주요하게 사용되는 치료법이나, 심각한 부작용과 독성으로 인한 투여 제한과 같은 문제를 안고 있다. 따라서 해당 항암 요법이 정상조직에서는 작용하지 않도록 하고 암 조직에서만 선택적으로 작용하도록 하는 것이 필요하다. 이를 위해 기존에는 생체지표 중 정상세포에서는 발현하지 않거나 드물게 나타나는 반면 종양 세포에서 특이적으로 발현되는 것을 인식하고 결합하는 항체 혹은 펩타이드를 등을 이용하여 암 조직에만 선택적으로 약물이 전달되도록 하는 약물이 보편적으로 응용되어 왔다. 그러나 이러한 약물은 같은 암 종류라 하더라도 환자별로 그 유전자형질이 상이하기 때문에 해당 생체지표를 가진 암이 발병되어 있는 환자에게만 사용할 수 있다는 한계점을 가지고 있다.

[0003] 또한 최근 연구 결과에서 하나의 암 조직 안에서도 서로 다른 유전자형질을 가지고 있다는 종양 내 이질성 (intratumor heterogeneity)이 밝혀져, 발병한 암의 특성을 결정하는 통상적인 샘플이 해당 암의 유전자형질을 대표할 수 없다는 것이 알려졌다. 이는 특정 생체지표가 발현됨이 확인되었어도 해당 생체지표를 활용한 약물의 효과가 불분명하다는 것을 의미한다.

[0004] 더구나 해당 생체지표를 나타내는 종양 세포가 암조직 내에서 다수를 차지한다고 해도, 나머지 종양 세포들에 상기 약물이 영향을 미치지 못하므로, 치료 후 잔존하는 종양 세포들에 의해 암 조직의 성장이 재발하게 된다. 이와 같은 이유로 기존의 약물은 항암제를 전체 종양 세포에 선택적으로 전달하는데 있어 근본적인 한계가 있다고 볼 수 있으며, 이상적인 항암 화학요법제의 전달 시스템이라고 할 수 없다. 더불어, 대부분의 암 조직들이 해당 생체지표를 발현하는 경우 상기 암 조직에 근접하거나 인접한 다른 세포에 영향을 줘 부작용이나 독성을

야기할 수 있다.

[0005] 이러한 문제를 해결하기 위한 일환으로, 종양 세포 및 암 조직 내에서 특이적으로 활성화될 수 있는 프로드러그들이 개발되었다. 이러한 기술들과 관련하여, 미국 특허등록 제7,445,764호는 절단 가능한 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase, MMP), 절단 가능한 펩타이드 및 독소루비신 항암제의 컨쥬게이트를 제시한 바 있고, 미국특허 공개 제2010/0111866호는 말레이미드-하이드라존-독소루비신 형태를 갖는 프로드러그 컨쥬게이트를 개시하고 있으며, 미국특허 공개 제2013/0338422호는 펩타이드 시퀀스-DEVD-독소루비신 형태의 프로드러그 컨쥬게이트를 언급하고 있다. 그러나, 이들 컨쥬게이트들은 낮은 효능, 낮은 선택성 및/또는 잦은 투약 등과 같은 문제가 여전히 남아 있다.

[0006] 이에, 종양 세포에만 선택적으로 작용하고 정상 조직에는 영향을 미치지 않아 부작용을 최소화하고, 증폭된 효능을 발휘하는 프로드러그와 같은 항암 화학요법제의 개발이 요구된다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기 문제점을 포함한 여러가지 문제점들을 해결할 수 있는 것으로서, 본 발명의 목적은 KRAS 변이체 혹은 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 세포에만 선택적으로 작용하고, 정상 조직에는 영향을 미치지 않으며, 부작용을 최소화하고 증폭된 효능을 갖는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트를 제공하는 데 있다. 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트를 이용하여 다양한 암종의 치료에 사용하는 용도를 제공하는데 있다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

#### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 관점에 따르면, 알부민 결합 기능기(albumin binding moiety), 링커 및 화학요법제를 포함하는 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트를 포함하는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 암 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0009] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 암환자로부터 분리된 암조직 생검으로부터 DNA 또는 단백질을 분리하는 단계; 분리된 DNA 또는 단백질을 이용하여 KRAS 및 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 또는 상기 PTEN 단백질의 소실 여부를 조사하는 단계; 및 상기 KRAS를 암호화하는 유전자가 변이되었거나, 상기 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자에 상기 PTEN 단백질의 소실을 가져오는 돌연변이가 발생하거나 또는 상기 PTEN 단백질의 발현이 소실된 것으로 판정될 경우, 상기 암환자를 알부민 결합 기능기, 링커 및 항암 화합물을 포함하는 항암제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여대상으로 판정하는 단계를 포함하는, 암환자에 최적의 처방을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

[0010] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 암환자로부터 분리된 암조직 생검으로부터 DNA 또는 단백질을 분리하는 단계; 분리된 DNA 또는 단백질을 이용하여 KRAS 및 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 또는 상기 PTEN 단백질의 소실 여부를 조사하는 단계; 및 상기 KRAS를 암호화하는 유전자가 변이되었거나, 상기 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자에 상기 PTEN 단백질의 소실을 가져오는 돌연변이가 발생하거나 또는 상기 PTEN 단백질의 발현이 소실된 것으로 판정될 경우, 상기 암환자를 알부민 결합 기능기, 링커 및 항암 화합물을 포함하는 항암제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여대상으로 판정하는 단계를 포함하는, 암환자에 최적의 처방을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

#### 발명의 효과

[0011] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 그동안 치료가 난망했던 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실의 유전자형을 갖는 항암제 내성 암에 대한 효과적인 치료가 가능하다. 그러나, 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

#### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 상업적으로 이용가능한 인간 혈청 알부민(HSA)과 반응한 후의 HPLC 분석 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 인간 혈청 알부민(HSA)과 반응한 후 HPLC 분석 결과이다.

도 3은 인간 혈청 알부민과 결합된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 (HSA-KGDEVD-PABC-독소루비신)을 재조합된 인간 카스페이즈-3에 의한 절단 반응과 관련된 HPLC 분석 결과이다.

도 4는 인간 혈청 알부민과 결합된 말레이미드-KGDVED-PABC-독소루비신 (HSA-KGDVED-PABC-독소루비신)을 재조합된 인간 카스페이즈-3에 의한 절단 반응과 관련된 HPLC 분석 결과이다.

도 5는 인간 혈청 알부민과 결합된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 (HSA-KGDEVD-PABC-독소루비신)을 재조합된 인간 카스페이즈-3의 사용 여부에 따라 시험관내 조건(*in vitro*) 실험을 통한 농도 의존성을 보여주는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 또는 AcKGDEVD-PABC-독소루비신을 스프레그-다우리 랫트에 정맥투여 후 독소루비신의 시간에 따른 혈장 농도 변화를 보여주는 그래프이다.

도 7은 시노물구스 원숭이에 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 또는 AcKGDEVD-PABC-독소루비신을 정맥 투여한 후 독소루비신의 혈장 농도 변화를 보여주는 그래프이다.

도 8은 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 암세포 집단을 판별하기 위한 단백질 분석법(western blot)의 결과이다.

도 9는 형광으로 표지된 인간 혈청 알부민을 야생형 KRAS 유전자형을 갖는 종양 세포들에 투여한 결과를 나타내는 일련의 형광현미경 사진이다.

도 10은 형광으로 표지된 인간 혈청 알부민을 KRAS 변형 유전자형을 갖는 종양 세포들에 투여한 결과를 나타내는 일련의 형광현미경 사진이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트가 인간 혈청 알부민에 결합된 인간 혈청 알부민-프로드러그 컨쥬게이트가 각각 야생형 KRAS 종양 세포와 KRAS 변이체 유전자형의 종양 세포에 투여된 결과를 나타내는 일련의 형광현미경 사진이다.

도 12는 형광으로 표지된 인간 혈청 알부민을 야생형 PTEN 단백질 유전자형의 종양 세포에 투여한 결과를 나타내는 일련의 형광현미경 사진이다.

도 13은 형광으로 표지된 인간 혈청 알부민을 PTEN 단백질 소실 유전자형의 종양 세포에 투여한 결과를 나타내는 일련의 형광현미경 사진이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 야생형 KRAS 혹은 KRAS 변이체 유전자형의 종양세포에 처리한 시험관내 조건 실험을 통해 농도 의존적 세포독성을 확인한 결과를 나타내는 일련의 그래프이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 야생형 PTEN 단백질 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형의 종양세포에 처리한 시험관내 조건 실험을 통해 농도 의존적 세포독성을 확인한 결과를 나타내는 일련의 그래프(상단) 및 실험에 사용된 세포의 종류, KRAS 및 PTEN의 유전자형 그리고 측정된 독소루비신의 IC<sub>50</sub>를 나타낸 도표(하단)이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 야생형 KRAS 또는 KRAS 변이체 유전자형의 종양 세포로 접종된 쥐에 투여한 후 농도에 따른 종양의 크기를 조사한 결과를 나타내는 일련의 그래프이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 야생형 KRAS 혹은 KRAS 변이체 유전자형의 종양 세포로 접종된 쥐에 투여한 후 농도에 따른 쥐의 무게를 조사한 결과를 나타내는 일련의 그래프이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 PTEN 소실 유전자형의 종양 세포(H1299)로 접종된 쥐에 투여한 후 농도에 따른 종양의 크기(좌측) 및 쥐의 무게(우측)를 조사한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신(MDP1)과 기존에 상업적으로 이용되는

Aldoxorubicin(Aldox)을 비교검증하기 위해 KRAS 변이체 유전자형의 종양 세포로 접종한 쥐에 투여하고 종양의 크기(좌측) 및 몸무게(우측)를 조사한 결과를 나타내는 일련의 그래프이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신(MDP1)과 기존에 상업적으로 이용되는 Aldoxorubicin(Aldox)을 비교검증하기 위해 KRAS 변이체 유전자형의 종양 세포로 접종된 쥐에 투여하고 실험 종료 후 종양 조직을 적출하여 촬영한 일련의 사진(좌측) 및 종양조직의 무게를 측정된 결과를 나타내는 그래프(우측)이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**[0013] 용어의 정의:**

[0014] 본 문서에서 사용되는 용어 "알부민 결합 기능기(albumin binding moiety)"는 투여 후 생체 내에서 혈장 알부민과 공유 또는 비공유 결합에 의해 결합할 수 있는 기능기를 의미한다. 이러한 알부민 결합 기능기로는 대표적으로 말레이미드(maleimide)가 존재하는데 말레이미드기를 가진 화합물은 혈장 내에서 혈장 알부민의 34번째 아미노산인 시스테인의 유리 티올기와 말레이미드 사이의 공유결합에 의해 티오에테르 결합을 형성함으로써 안정적인 알부민-화합물 컨쥬게이트를 형성한다. 아울러, 4-(p-iodophenyl)butyric acid 역시 알부민과 결합하는 것으로 알려져 있는데, 상기 4-(p-iodophenyl)butyric acid는 비공유결합에 의해 알부민에 선택적으로 결합하는 것으로 알려지고 있다. 뿐만 아니라, 올레이트(oleate), 폴레이트(folate), 팔미트산(palmitic acid, PA) 역시 알부민의 다양한 부위에 비공유결합에 의해 결합하는 것으로 알려져 있고, 알부민 결합 펩타이드(PEP, DICLPRWGCLW, 서열번호 1) 역시 알부민의 특정 위치 특이적으로 비공유 결합에 의해 결합하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라, 다양한 화합물들이 알부민과 특이적 또는 비특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있다(Zorzi *et al.*, Med. Chem. Commun. 2019, 10(7): 1068-1081)

[0015] 본 문서에서 사용되는 "링커(linker)"는 두 가지 화합물을 연결해주는 구조로서 대표적으로 펩타이드 링커와 비펩타이드 링커가 존재한다. 펩타이드 링커는 생체내 절단형 펩타이드 링커와 생체내 비절단형 링커로 나뉘며, 생체내 비절단형 펩타이드 링커로 대표적인 것은 (G4S)<sub>n</sub>(반복단위: 서열번호 2)이나, (GGSGSS)<sub>n</sub>(반복단위: 서열번호 3), (EAAAK)<sub>n</sub>(반복단위: 서열번호 4), A(EAAAK)<sub>n</sub>A, A(EAAAK)<sub>4</sub>ALEA(EAAAK)<sub>4</sub>A(서열번호 5), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 6), EGKSSGSGSESKST(서열번호 7), GSAGSAAGSGEF(서열번호 8), (Ala-Pro)<sub>n</sub> 등이 존재하며, 생체내 절단형 펩타이드 링커로는 사이클로펩타이드 링커와 단백질 절단효소 감수성 링커가 존재한다. 상기 단백질 절단효소 감수성 링커는 카스페이즈나 카텝신, 퓨린, 메탈로매트릭스 프로테아제(MMP) 등의 생체 내 존재하는 단백질 절단효소에 절단되는 절단 부위를 갖는 펩타이드로서, E2A(서열번호 9), F2A(서열번호 10), T2A(서열번호 11), 또는 P2A(서열번호 12) 펩타이드나, DEVD(서열번호 13), DLDV(서열번호 14), DEID(서열번호 15), DEHD(서열번호 16), DKAD(서열번호 17), DSFD(서열번호 18), DSSD(서열번호 19), DGKD(서열번호 20), DYND(서열번호 21), DRPD(서열번호 22), DNVD(서열번호 23), VQVD(서열번호 24), LETD(서열번호 25), LEHD(서열번호 26), WEHD(서열번호 27), ELQTDG(서열번호 28), RIEADS(서열번호 29), VDVAD(서열번호 30), DFRD(서열번호 31), KGDEVD(서열번호 32), RGDEVD(서열번호 33), CRGDCGGDEVD(서열번호 34), DEVDR(서열번호 35), CQRPPRDEVD(서열번호 36), GRRG(서열번호 37), FRRG(서열번호 38), ARRG(서열번호 39), KGRRG(서열번호 40), RGDRRG(서열번호 41), DXXD(서열번호 42), LXXD(서열번호 43) 또는 VXXD(서열번호 44) 등과 같은 카스페이즈 또는 카텝신 의존적 절단 부위 등이 존재한다. 비펩타이드 링커로는 알킬렌 링커, 폴리알킬렌 옥사이드 링커, NHS 에스테르 링커, 아릴렌 링커, PABC(p-aminocarbamate) 링커, Merrifield 링커, Wang 링커, Sasrin 링커, Tritiyl 링커, RINK-amide 링커, Kenner 링커, Silyl 링커, Triazene 링커, photocleavable linker, 말레이미드 알칸 링커, 하이드라존 링커, 다이설파이드 링커, 글루쿠로나이드-MABC 링커, 아조벤젠 링커, 디알콕시디페닐실란 링커, Val-Cit-PABC 링커 등이 존재한다.

[0016] 본 문서에서 사용되는 용어 "KRAS 변이체"는 발암유전자(oncogenen) 중의 하나인 KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) 유전자에 돌연변이가 발생하여 생성되는 비정상적인 K-Ras 단백질을 의미한다. 이러한 KRAS 변이체는 야생형 KRAS의 12번째 아미노산인 글라이신(G)이 아스파르트산(D), 시스테인(C), 세린(S) 또는 발린(V)으로 치환된 것을 포함한다. 이러한 KRAS 변이체는 EGFR이나 다른 타이로신 카이네이즈 단백질로부터 신호가 없더라도 항상 활성화되어 세포 증식을 자극한다. 이러한 암에서는 EGFR을 표적으로 하는 표적 항암제 예컨대 Herceptin과 같은 약물이 약효를 발휘하지 못하게 된다. KRAS 돌연변이는 인간 암에 있어서, 특히 췌장암, 대장암, 폐암 그리고 백혈병에 있어서, 약 15 내지 20%를 차지하며, 특히 약 30 내지 40%의 대장암과 15 내지 30%의 폐암이 KRAS 변이체를 가지고 있는 것으로 알려지고 있다.



- [0017] 본 문서에서 사용되는 용어 "PTEN 단백질"은 phosphatase and tension homolog의 약자로서 PTEN 유전자에 의해 암호화되며, PTEN 유전자의 돌연변이가 다수의 암의 발달에 있어서 중요한 단계인 것으로 알려지고 있다. PTEN은 세포주기의 조절에 관련된 탈인산효소(phosphatase)에 작용을 함으로써 종양 억제 유전자로 작용하는데, 세포 내에서 phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate의 세포내 수준을 음성적으로 조절하며 Akt/PKB 신호전달 경로를 음성적으로 조절함으로써 종양 억제자로 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 종양의 발달 과정에서 PTEN의 결실 또는 돌연변이가 세포증식을 증가 및 세포사멸의 감소를 야기하며, 특히 전립선암 환자의 70%에서 PTEN 유전자 한 카피가 결실되어 있다고 한다.
- [0018] 본 문서에서 사용되는 용어 "항암제 프로드러그 컨쥬게이트"는 항암 화합물이 다른 화합물, 단백질 또는 펩타이드에 링커에 연결된 컨쥬게이트로 그 자체로는 약리활성을 나타내지 않거나, 반감기가 증가하여 혈류를 따라 이동하다가, 병소 인근에서 링커가 절단됨으로써 활성형의 항암 화합물이 방출되는 구조의 약물을 의미한다.
- [0019] 본 문서에서 사용되는 용어 "PABC"는 p-aminocarbamate를 의미하며 PABC로 연결된 항체-약물 컨쥬게이트는 혈류 내에서는 안정적이다가 세포 내로 흡수되면 세포 내의 라이소좀의 세포내 프로테아제에 의해 선택적으로 절단된다.
- [0020] **발명의 상세한 설명:**
- [0021] 본 발명의 일 관점에 따르면, 알부민 결합 기능기(albumin binding moiety), 링커 및 항암 화학요법제를 포함하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트를 포함하는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 암 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0022] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 알부민 결합 기능기(albumin binding moiety)는 말레이미드기(maleimide group), 피리딜디티올기(pyridyldithiol group), 올레이트(oleate group), 폴레이트기(folate group), 알부민 결합 펩타이드(PEP, 서열번호 1), 팔미트기(palmitate group), 4-(p-iodophenyl)butyric acid 또는 알부민에 특이적으로 결합하는 단일쇄 기반 항체 유사체, 예컨대, V<sub>H</sub>H, scFv, V<sub>NAR</sub>, DARPIn, nanobody, monobody, 또는 VLR일 수 있다.
- [0023] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 링커는 펩타이드 링커 또는 비펩타이드 링커일 수 있고, 펩타이드 링커와 비펩타이드 링커가 혼재된 형태일 수 있다. 한편, 상기 펩타이드 링커는 생체내 절단형 펩타이드 링커 또는 생체내 비절단형 링커일 수 있고, 상기 생체내 절단형 펩타이드는 사이클로펩타이드 펩타이드 링커 또는 단백질 절단효소 감수성 펩타이드 링커일 수 있으며, 상기 단백질 절단효소 감수성 펩타이드 링커는 카스페이즈, 카텝신, 푸린, 또는 메탈로매트릭스 프로테아제에 의해 절단이 되는 펩타이드일 수 있고, 더 구체적으로는 DEVD(서열번호 13), DLDV(서열번호 14), DEID(서열번호 15), DEHD(서열번호 16), DKAD(서열번호 17), DSFD(서열번호 18), DSSD(서열번호 19), DGKD(서열번호 20), DYND(서열번호 21), DRPD(서열번호 22), DNVD(서열번호 23), VQVD(서열번호 24), LETD(서열번호 25), LEHD(서열번호 26), WEHD(서열번호 27), ELQTDG(서열번호 28), RIEADS(서열번호 29), VDVAD(서열번호 30), DFRD(서열번호 31), KGDEVD(서열번호 32), RGDEVD(서열번호 33), CRGDCGDEVD(서열번호 34), DEVDR(서열번호 35), CQRPPRDEVD(서열번호 36), GRRG(서열번호 37), FRRG(서열번호 38), ARRG(서열번호 39), KGRRG(서열번호 40), RGDRRG(서열번호 41), DXXD(서열번호 42), LXXD(서열번호 43) 또는 VXXD(서열번호 44)일 수 있다. 상기 펩타이드 링커와 비펩타이드 링커가 혼재된 링커는 KGDEVD(서열번호 32)-PABC, DEVD(서열번호 13)-PABC, RGDEVD(서열번호 33)-PABC, RGDEVD(서열번호 33)-MBA, CQRPPRDEVD(서열번호 36)-PABC, DEID(서열번호 15)-PABC, DLVD(서열번호 14)-PABC, RGDEVD(서열번호 33)-MBA, 또는 KGDEVD(서열번호 32)-PABC일 수 있다.
- [0024] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 항암 화학요법제는 사이클로포스파아마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토펜(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토크세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오

구아닌(thioguanine), 캠포테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DMI(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0025] 좀더 구체적인 구현예에서, 상기 컨쥬게이트는 말레이미드-KGDEVD(서열번호 29)-PABC-독소루비신, 말레이미드-KGDEVD-PABC-다우노루비신, 말레이미드-KGDEVD-PABC-파클리탁셀, 말레이미드-KGDEVD-PABC-MMAE, 말레이미드-DEVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-DEID-PABC-독소루비신, 말레이미드-DLVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-DEVD-독소루비신, 피리딜디티올-KGDEVD-PABC-독소루비신, 올리에이트-KGDEVD-PABC-독소루비신, 폴리에이트-KGDEVD-PABC-독소루비신, 및 HSA-말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 암환자로부터 분리된 암조직 생검으로부터 DNA 또는 단백질을 분리하는 단계; 분리된 DNA 또는 단백질을 이용하여 KRAS 및 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 또는 상기 PTEN 단백질의 소실 여부를 조사하는 단계; 및 상기 KRAS를 암호화하는 유전자가 변이되었거나, 상기 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자에 상기 PTEN 단백질의 소실을 가져오는 돌연변이가 발생하거나 또는 상기 PTEN 단백질의 발현이 소실된 것으로 판정될 경우, 상기 암환자를 알부민 결합 기능기, 링커 및 항암 화합물을 포함하는 항암제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여대상으로 판정하는 단계를 포함하는, 암환자에 최적의 처방을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

[0027] 상기 방법에 있어서, 상기 KRAS를 암호화하는 유전자의 변이 여부는 염기서열 결정, DNA 마이크로어레이, 또는 대립유전자 특이적 PCR 반응에 의해 분석될 수 있다.

[0028] 상기 방법에 있어서, 상기 PTEN 단백질의 소실 여부는 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 분석 또는 PTEN 단백질의 발현 여부에 대한 단백질 정량분석에 의해 수행될 수 있다. 상기 유전자형 분석은 상술한 바와 같이, 염기서열 결정, DNA 마이크로어레이 분석, 대립유전자 특이적 PCR 등 당업계에 알려진 그 어떠한 방법이라도 사용할 수 있고, 상기 단백질 정량분석은 질량분석법, 웨스턴 블랏 분석, 단백질 마이크로어레이 분석, ELISA, RIA, 면역공침전법 등 본 발명이 속한 기술분야에서 잘 알려진 그 어떠한 방법을 사용할 수 있다. 더 바람직하게는, 임상에서 사용할 경우 질량분석법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 암환자로부터 분리된 암조직 생검으로부터 DNA 또는 단백질을 분리하는 단계; 분리된 DNA 또는 단백질을 이용하여 KRAS 및 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 또는 상기 PTEN 단백질의 소실 여부를 조사하는 단계; 및 상기 KRAS를 암호화하는 유전자가 변이되었거나, 상기 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자에 상기 PTEN 단백질의 소실을 가져오는 돌연변이가 발생하거나 또는 상기 PTEN 단백질의 발현이 소실된 것으로 판정될 경우, 상기 암환자에 대하여 알부민 결합 기능기, 링커 및 항암 화합물을 포함하는 항암제 프로드러그 컨쥬게이트를 투여하는 단계를 포함하는, KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실을 갖는 암에 대한 치료방법이 제공된다.

[0030] 상기 치료방법에 있어서, 상기 KRAS를 암호화하는 유전자의 변이 여부는 염기서열 결정, DNA 마이크로어레이, 또는 대립유전자 특이적 PCR 반응에 의해 분석될 수 있다.

[0031] 상기 치료방법에 있어서, 상기 PTEN 단백질의 소실 여부는 PTEN 단백질을 암호화하는 유전자의 유전자형 분석 또는 PTEN 단백질의 발현 여부에 대한 단백질 정량분석에 의해 수행될 수 있다. 아울러, 상기 유전자형 분석은 상술한 바와 같이, 염기서열 결정, DNA 마이크로어레이 분석, 대립유전자 특이적 PCR 등 당업계에 알려진 그 어떠한 방법이라도 사용할 수 있고, 상기 단백질 정량분석은 질량분석법, 웨스턴 블랏 분석, 단백질 마이크로어레이 분석, ELISA, RIA, 면역공침전법 등 본 발명이 속한 기술분야에서 잘 알려진 그 어떠한 방법을 사용할 수 있다. 더 바람직하게는, 임상에서 사용할 경우 질량분석법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0032] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0033] **항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트(Chemotherapeutic Prodrug conjugate)**

[0034] 본 발명에서 제시하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 (i) 알부민 결합 기능기 (ii) 상기 기능기에 직접 또는 링커를 통하여 연결되고, 카스페이즈 혹은 카텡신에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커 (iii) 상기 펩타이드 링커에 직접 또는 링커를 통해 연결되는 항암 화학요법제를 포함한다. 이하 본 발명에서 언급하는 바에

따르면, 본 발명에서 제시하는 컨쥬게이트는 세포사멸유도 방법, 세포사멸 증폭 방법 및 암 치료법 등에 유용하다.

[0035] 본 발명에서 제시하는 바람직한 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 구체예는 하기와 같다:

[0036] 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-KGDEVD-PABC-다우노루비신, 말레이미드-KGDEVD-PABC-파클리탁셀, 말레이미드-KGDEVD-PABC-MMAE, 말레이미드-DEVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-DEID-PABC-독소루비신, 말레이미드-DLVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-DEVD-독소루비신, 말레이미드-DEVD-MMAE, 피리디디티올-KGDEVD-PABC-독소루비신, 올리에이트-KGDEVD-PABC-독소루비신, 폴레이트-KGDEVD-PABC-독소루비신, 말레이미드-KGRRG-PABC-독소루비신, 말레이미드-KGRRG-PABC-다우노루비신, 말레이미드-KGRRG-PABC-파클리탁셀, 말레이미드-KGRRG-PABC-MMAE, 말레이미드-GRRG-PABC-독소루비신, 말레이미드-FRRG-PABC-독소루비신, 말레이미드-ARRG-PABC-독소루비신, 말레이미드-GRRG-독소루비신, 말레이미드-GRRG-MMAE, 피리디디티올-KGRRG-PABC-독소루비신, 올리에이트-KGRRG-PABC-독소루비신, 및 폴레이트-KGRRG-PABC-독소루비신일 수 있다.

[0037] 상기 개별적인 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트들은 후술할 실시예에 자세히 도시되어 있다.

[0038] **알부민 결합 기능기(albumin binding moiety)**

[0039] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명에서 제시하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 알부민 결합 기능기를 포함한다. 상기 알부민 결합 기능기는 혈청 알부민(serum albumin)에 대해 결합한다. 일 구현예에 따르면, 상기 알부민 결합 기능기는 작용성 화학 관능기, 펩타이드 기능기, 항체 기능기(항체 단편 및 단쇄 항체 기능기를 포함), 앵타머, 올리고뉴클레오타이드 또는 당류를 하나 또는 그 이상을 포함한다. 상기 알부민 결합 기능기는 생체 내 투여시 혈청 알부민과 결합한 후, 병소로의 향상된 투과성 및 정체성(Enhanced Permeability and Retention, EPR) 효과에 의해 수동적으로 중앙 조직을 표적지향할 수 있다. 더불어 상기 알부민 결합 기능기는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 중앙 조직에 대한 선택적인 표적지향이 가능하다.

[0040] 더욱 바람직한 양태에서, 상기 알부민 결합 기능기는 말레이미드기(maleimide group), 피리디디티올기(pyridyldithiol group), 올리에이트기(oleate), PEG(polyethylene glycol), 폴레이트기(folate group), 팔미트기(palmitate group), 알부민 결합 펩타이드(PEP, 서열번호 1) 또는 알부민에 특이적으로 결합하는 단일쇄 기반 항체 단편 또는 유사체, 예컨대, scFv, V<sub>H</sub>H, nanobody, monobody, V<sub>NAR</sub>, affibody, VLR 등일 수 있다.

[0041] **링커(linker)**

[0042] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 제시하는 프로드러그 컨쥬게이트는 상기 화학요법제와 알부민 결합 기능을 연결하는 링커를 포함한다. 상기 링커는 펩타이드 링커 또는 비펩타이드 링커일 수 있고, 선택적으로 상기 펩타이드 링커와 비펩타이드 링커가 모두 포함된 형태일 수 있다. 한편, 상기 펩타이드 링커는 생체내 절단형 펩타이드 링커 또는 생체내 비절단형 링커일 수 있고, 상기 생체내 절단형 펩타이드는 사이클로펩타이드 펩타이드 링커 또는 단백질 절단효소 감수성 펩타이드 링커일 수 있으며, 상기 단백질 절단효소 감수성 펩타이드 링커는 카스페이즈, 카텝신, 퓨린, 또는 메탈로매트릭스 프로테이네이즈에 의해 절단이 되는 펩타이드일 수 있다. 상기 단백질 절단효소 감수성 펩타이드 링커는 카스페이즈-절단 가능 링커 또는 카텝신-절단 가능 링커를 포함한다.

[0043] 본 문서에서 사용되는 용어 '카스페이즈(caspase)'는 세포사멸의 진행에 의해 활성화되는(예를 들면, 발현되는) 시스테인-아스파르 프로테아제(cysteine-aspartic protease), 시스테인 의존성 아스파르테이트-지향 프로테아제(cysteine-dependent aspartate-directed proteases)를 의미한다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 카스페이즈는 카스페이즈-3, 카스페이즈-7 또는 카스페이즈-9이다.

[0044] 본 문서에서 사용되는 용어 '카텝신(cathepsin)'은 종양세포 내에서 과발현되고, 라이소좀과 같은 산성 환경에서 활성화되는 프로테아제를 의미한다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 카텝신은 카텝신-B 또는 카텝신-D이다.

[0045] 본 문서에서 사용되는 용어 '아미노산'은 천연 발생 아미노산(천연 아미노산)과 천연 발생 아미노산을 화학적으로 처리한 비천연 발생 아미노산(합성 아미노산)을 포함하는 아미노산을 의미한다.

[0046] 글리신을 제외한 천연 아미노산은 키랄 탄소 원자를 포함한다. 또한, 아미노산은 L-형 또는 D-형 이성질체의 형태를 가질 수 있다. 바람직하기로, 상기 아미노산은 β-알라닌(β-alanine, BALA), γ-아미노부티르산(γ-aminobutyric acid, GABA), 5-아미노발레르산(5-aminovaleric acid), 글리신(glycine, Gly 또는 G), 페닐글리신(phenylglycine), 아르기닌(arginine, Arg 또는 R), 호모아르기닌(homoarginine, Har 또는 hR), 알라닌

(alanine, Ala 또는 A), 발린(valine, Val 또는 V), 노르발린(norvaline), 류신(leucine, Leu 또는 L), 노르류신(norleucine, Nle), 이소류신(isoleucine, Ile 또는 I), 세린(serine, Ser 또는 S), 이소세린(isoserin), 호모세린(homoserine, Hse), 트레오닌(threonine, Thr 또는 T), 알로트레오닌(allothreonine), 메티오닌(methionine, Met 또는 M), 에티오닌(ethionine), 글루탐산(glutamic acid, Glu 또는 E), 아스파르트산(aspartic acid, Asp 또는 D), 아스파라긴(asparagine, Asn 또는 N), 시스테인(cysteine, Cys 또는 C), 시스틴(cystine), 페닐알라닌(phenylalanine, Phe 또는 F), 티로신(tyrosine, Tyr 또는 Y), 트립토판(tryptophan, Trp 또는 W), 라이신(lysine, Lys 또는 K), 하이드록시라이신(hydroxylysine, Hyl), 히스티딘(histidine, His 또는 H), 오르니틴(ornithine, Orn), 글루타민(glutamine, Gln 또는 Q), 시트룰린(citrulline), 프롤린(proline, Pro 또는 P), 및 4-하이드록시프롤린(4-hydroxyproline, Hyp 또는 O)를 포함한다.

- [0047] 본 문서에서 사용되는 용어 '펩타이드'는 펩타이드 및 이의 유사체(펩타이드 유사체)를 의미하고, 이때 상기 펩타이드 유사체는 천연 발생 아미노산과 글리코실화, 개질 R 관능기, 및/또는 개질 펩타이드 주쇄와 같은 개질된 비천연 발생 아미노산을 포함한다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 키랄 아미노산의 L-이성질체만을 포함한다. 다른 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 키랄 아미노산의 D-이성질체만을 포함한다. 또 다른 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 키랄 아미노산의 하나 또는 그 이상의 L-이성질체 및 D-이성질체 모두를 포함한다.
- [0048] 상기 펩타이드 유사체는 우레탄, 우레아, 에스테르 또는 티오에스테르 결합과 같은 아마이드 결합과 다른 적어도 하나의 결합을 펩타이드의 아미노산 서열 내 포함할 수 있다. 본 명세서에서 언급하는 펩타이드 또는 펩타이드 유사체는 선형, 고리형 또는 가지형일 수 있으며, 바람직하기로 선형이다.
- [0049] 본 문서에서 사용되는 '카스페이즈-절단 가능 펩타이드 링커'는 카스페이즈에 의해 절단 가능한 두 개 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 갖는 펩타이드 서열을 의미한다. 몇몇 구현예에 따르면, 상기 카스페이즈에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커는 Asp-Xaa-Xaa-Asp(서열번호 42)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 같은 카스페이즈-3 또는 카스페이즈-7에 의해 절단 가능하고, 이때 상기 Xaa는 L- 또는 D-이성질체의 그 어떠한 아미노산도 포함된다. 몇몇 구현예에 따르면, 상기 카스페이즈에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커는 Leu-Xaa-Xaa-Asp(서열번호 43) 또는 Val-Xaa-Xaa-Asp(서열번호 44)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 같은 카스페이즈-9에 의해 절단 가능하고, 이때 상기 Xaa는 L- 또는 D-이성질체의 그 어떠한 아미노산도 포함된다.
- [0050] 본 문서에서 사용되는 용어 '카텝신-절단 가능 펩타이드 링커'는 카텝신에 의해 절단 가능한 두 개 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 갖는 펩타이드 시퀀스를 의미한다. 몇몇 구현예에 따르면, 상기 카텝신에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커는 Xaa-Arg-Arg-Xaa(서열번호 49)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 같은 카텝신-B에 의해 절단 가능하고, 이때 상기 Xaa는 그 어떠한 L-아미노산도 포함한다.
- [0051] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 카스페이즈에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커는 하기 군으로 이루어진 것 중에서 하나이다:
- [0052] Asp-Glu-Val-Asp (서열번호 13),
- [0053] Asp-Leu-Val-Asp (서열번호 14),
- [0054] Asp-Glu-Ile-Asp (서열목록 15), 및
- [0055] Leu-Glu-His-Asp (서열목록 16).
- [0056] 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 카스페이즈-절단 가능 펩타이드 링커는 Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp(서열번호 32), 또는 상술한 KGDEVDR로 구성된다.
- [0057] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 카텝신에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커는 하기 군으로 이루어진 것 중에서 하나이다:
- [0058] Gly-Arg-Arg-Gly (서열번호 37),
- [0059] Phe-Arg-Arg-Gly (서열번호 38), 및
- [0060] Ala-Arg-Arg-Gly (서열번호 39).
- [0061] 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 카텝신에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커는 Lys-Gly-Arg-Arg-Gly(서열번호 40), 또는 상술한 KGRRG로 구성된다.

- [0062] 몇몇 구현예에 따르면, 상기 카스페이즈- 혹은 카텝신-절단 가능 펩타이드 링커의 존재는 링커가 절단되기 전까지 프로드러그 컨쥬게이트가 비활성이 되게 한다. 이러한 예와 동일하게, 상기 프로드러그 컨쥬게이트는 건강한 세포에 최소한의 해를 가한다. 본 발명의 일 실시예에 따른 프로드러그 컨쥬게이트는 오직 카스페이즈 혹은 카텝신이 있을 때에 활성화가 되기 때문이다. 예를 들면 중앙세포가 사멸을 하는 것처럼 세포도 사멸을 한다. 따라서, 몇몇 구현예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 최소의 부작용을 나타낸다.
- [0063] 선택적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 단백질 절단효소에 의해 절단되는 펩타이드 링커 대신에 비절단형 펩타이드를 포함할 수 있다. 이러한 비절단형 펩타이드를 포함하는 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 비록 절단형 펩타이드를 채용하고 있는 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트에 비해서 항암활성이 다소 떨어지기는 하였으나, KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실과 관련된 유전자형을 가진 암에 있어서, 화학요법제 단독 사용시보다는 더 뛰어난 항암활성을 나타냈다. 이는 비절단형 펩타이드라고 하더라도 암세포 내로 본 발명의 일 실시예에 따른 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트가 내세포작용(endocytosis)에 의해 흡수된 후, 엔도솜(endosome) → 라이소솜(lysosome) 경로를 통해 분해될 때, 비특이적인 단백질 절단에 의해 화학요법제가 방출이 되고 핵내로 이행을 함으로써 암세포 사멸을 유발하는 현상이 발생했기 때문인 것으로 해석이 된다.
- [0064] 따라서, 본 발명에서는 단백질 절단효소에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커 대신 일반적인 융합단백질의 제조에 사용되는 유연성 링커(flexible linker) 예컨대 (GS<sub>4</sub>)<sub>n</sub>과 같은 링커들도 사용이 가능하며, 세포내에서 절단이 가능한 것이라면 펩타이드 결합이 아닌 다른 공유결합에 의해 화학요법제 및 말레이미드기를 연결하는 화학적 링커 역시 사용을 배제하지 않는다.
- [0065] 이러한 화학적 링커는 본 발명에서 특별히 한정하지 않으며, 결합을 목적으로 약학적 조성물에 사용되는 것이면 어느 것이든 사용 가능하다. 바람직한 링커는 PABC(p-aminocarbamate) 링커를 예시로 제시될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니며, 알킬렌 링커, 아릴렌 링커, 폴리알킬렌 옥사이드 링커(예컨대, PEG), NHS 에스테르 링커, Merrifield 링커, Wang 링커, Sasrin 링커, Triteryl 링커, RINK-amide 링커, Kenner 링커, Silyl 링커, Triazene 링커, 광절단성 링커, 말레이미드 알칸 링커, 하이드라존 링커, 다이설파이드 링커, 글루쿠코나이드-MABC 링커, 아조벤젠 링커, 및 디알록시디페닐실란 링커 등이 사용될 수 있다.
- [0066] 전술한 바에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 상기 알부민 결합 기능이 상기 펩타이드 링커의 N-말단에 결합되고, 동시에 상기 펩타이드 링커의 C-말단이 상기 항암 화학요법제에 결합된 형태를 가질 수 있다. 또한, 이와 반대로 본 발명의 일 실시예에 따른 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 상기 알부민 결합 기능이 상기 펩타이드 링커의 C-말단에 결합되고, 동시에 상기 펩타이드 링커의 N-말단이 항암 화학요법제에 결합되는 형태를 가질 수 있다.
- [0067] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명에서 제시하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 펩타이드 링커가 상기 화학적 링커의 직간접적인 결합을 통해 항암 화학요법제에 결합되고, 상기 펩타이드 링커의 직간접적인 결합을 통해 상기 알부민 결합 기능기에 결합된다. 예를 들면, 다이노루비신은 항암 효과를 나타내고, 이의 14-CH<sub>3</sub> 위치에서 말레이미드 또는 폴레이트와 같은 기능기와 컨쥬게이트된다. 이에, 카스페이즈에 의해 유도된 절단을 통해 항암 효과를 나타내며, 유리 다우노루비신의 방출이 요구되지 않는다. 또한, 본 발명의 몇몇 구현예에 따르면, 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 펩타이드 링커가 상기 화학적 링커의 직간접적인 결합을 통해 다우노루비신에 대해 결합되고, 이때 상기 다우노루비신의 14-CH<sub>3</sub> 위치에서 말레이미드 또는 폴레이트와 같은 기능기에 대해 상기 화학적 링커의 직간접적인 결합을 통해 컨쥬게이트된다.
- [0068] **항암 화학요법제(Chemotherapeutic agent)**
- [0069] 상기 언급된 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 프로드러그 컨쥬게이트는 항암 화학요법제를 포함한다.
- [0070] 본 문서에서 사용되는 용어 "항암 화학요법제(anticancer chemotherapeutics)"는 암 치료를 위해 사용되는 저분자 화합물과 같은 암 치료에 유용한 화합물을 의미한다. 바람직한 구현예에 따르면, 항암 화학요법제는 일례로 중앙 세포 및 암 조직과 같은 표적 세포 내에 세포사멸을 유도한다. 본 명세서에서 언급한 컨쥬게이트 내 항암 화학요법제로는 이 분야의 공지된 것이면 어느 것이든 사용 가능하다.
- [0071] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항암 화학요법제는 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 발루비신(valrubicin) 또는 이들의 유도체와 같은 안트라사이

클린(anthracycline); 액티노마이신-D(actinomycin-D), 블레오마이신(bleomycin), 미토마이신-C(mitomycin-C), 칼리케이마이신(calicheamicin) 또는 이들의 유도체와 같은 항생제(antibiotic); 사이클로포스프아마이드(cyclophosphamide), 메콜레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 이포스프아마이드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카르바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin) 또는 이들의 유도체와 같은 알킬화제(alkylating agent); 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate) 또는 이들의 유도체와 같은 백금계 제제(platinum-based agent); 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토프린(6-mercaptapurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스우리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토티레세이트(methotrexate), 페메트렉시드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine) 또는 이들의 유도체와 같은 대사 길항제(antimetabolite); 캄토테신(camptothecin), 토폠테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone) 또는 이들의 유도체와 같은 토포이소머라제 억제제; 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라무스틴(estrामustine), 메이탄신(maytansine), DM1 (mertansine), DM4, 돌라스틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 또는 이들의 유도체와 같은 유사분열 억제제(mitotic inhibitor)를 포함한다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항암 화학요법제는 독소루비신 또는 다노루비신이다.

[0072] 일 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항암 화학요법제 프로드러그 컨주게이트는 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨주게이트, 약학적으로 허용 가능한 담체, 첨가제 및/또는 희석제를 포함하는 조성물과 같은 약학적 조성물로서 제공될 수 있다. 사용 가능한 담체(carriers), 첨가제, 희석액의 예는 락토스, 텍스트로스, 수쿠로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 녹말, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 인산칼슘, 규산칼슘, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 등을 포함한다.

[0073] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 비경구 또는 국소 투여방식을 포함하는 투여 방식에 의해 제조가 가능하다. 몇몇 구현예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 정맥 주사 또는 투여와 같은 주사 또는 투여가 바람직하고, 주사 또는 투여를 위해 멸균 조성물로서 제조될 수 있다. 다른 구현예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 경구 투여에 적합하도록 분말, 과립, 타블렛, 캡슐, 현탁액, 에멀전 또는 시럽 제형으로 제조가 가능하다. 다른 구현예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 흡입에 적합하도록 비강 또는 경구 스프레이 또는 에어로졸 제형으로 제조가 가능하다. 다른 구현예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 직장 또는 질내 투여에 적합하도록 좌약 제형으로 제조가 가능하다. 다른 구현예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 국소 또는 경피 투여에 적합하도록 용액, 에멀전, 젤 또는 패치 제형으로 제조가 가능하다. 이러한 조성에 적합한 조성 및 부형제는 이 분야에서 공지된 바의 것이면 어느 것이든 사용 가능하다.

[0074] 경구 투여를 위한 고형 제제의 예로는 타블렛, 알약, 분말, 과립, 캡슐 등을 포함한다. 고형 제제는 본 발명에 따른 컨주게이트와 적어도 하나의 부형제, 예를 들면, 녹말, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등과의 혼합에 의해 제조될 수 있다. 상기 제제는 단순 부형제에 더하여, 마그네슘 스테아레이트 또는 탈크와 같은 윤활제가 타블렛화 공정 또는 다른 공정 중에 첨가 사용될 수 있다.

[0075] 경구 투여를 위한 액상 제제의 예로는 용액, 현탁액, 에멀전 및 시럽을 포함한다. 상기 액상 제제는 일례로, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등과 같은 다양한 첨가제, 이에 더하여 물, 및 선택적으로 액상 파라핀을 더욱 포함할 수 있다.

[0076] 비경구 투여를 위한 제형의 예로는 멸균 수용액, 비수용성 용액, 현탁액, 에멀전, 동결건조 제제 및 좌약을 포함한다. 비수용성 용액 및 현탁액은, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 또는 에틸올리에이트와 같은 투여가능한 에스터를 포함한다. 좌약 제형을 위한 기본 조성은 예를 들면, 위텡솔(witepsol), 매크로골(macrogol), 트윈61(tween 61), 카카오 버터, 라우린 버터, 글리세로젤라틴 등을 포함한다.

- [0077] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 물에 용해시키거나 다른 약학적으로 허용 가능한 수용성 담체 내에서 용해시키고, 이때 상기 컨쥬게이트는 선택적으로 다른 약학적으로 허용 가능한 부형제, 보존제 등에 대해 우수한 용해도를 갖게 된다.
- [0078] **프로드러그 컨쥬게이트를 이용한 방법(Method using prodrug conjugates)**
- [0079] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 세포사멸 유도 방법, 세포사멸 증가방법, 및 항암 치료 방법에 유용하다. 일부 구현예에 따르면, 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 표적 세포(일례로, 종양 세포)의 세포사멸 유도, 표적 세포의 세포사멸 증가를 필요로 하는 대상자, 및/또는 암 치료를 필요로 하는 대상자에게 투여가 가능하다.
- [0080] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 암 치료를 필요로 하는 개체에 투여가 가능하다.
- [0081] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 카스페이즈-절단 가능한 펩타이드 링커를 포함하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 조직을 표적으로 하고, 세포 내 흡수를 통해 가수분해됨으로써 세포사멸을 유발하여 카스페이즈의 발현을 유도할 수 있다.
- [0082] 일부 구현예에 따르면, 일반적인 종양 치료 대상 개체에게는 본 발명의 일 실시예에 따른 카스페이즈-절단 가능한 펩타이드 링커를 포함하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여 전 또는 이와 동시에 표적 세포 내 세포사멸을 유도하는 치료가 적용되고, 이로 인해 카스페이즈의 발현이 유도된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 세포사멸은 치료적으로 허용 가능한 방법에 의해 유도가 가능하며, 이러한 방법은 방사선 치료, 고강도 집중 초음파 치료법(high intensity focused ultrasonic therapy, HIFU), 발열 치료, 레이저 치료, 광역학 치료(photodynamic therapy), 화학요법 치료 및 저온수술, 또는 종양 세포를 표적하는 저분자 티로신 키나아제 억제제(TKI) 또는 모노클로날 항체와 같은 표적 치료로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료법에 의해 이루어진다. 상기 항암 화학요법제는 상기 언급한 바를 포함하며, 이 분야에서 공지된 항암 화학요법제일 수 있으며, 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 항암 화학요법제와는 같거나 다를 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 종양 또는 암은 전이되거나 또는 특정할 수 없는 위치를 포함하도록, 상기 세포사멸 유도 치료는 TKIs, 항체, 펩타머 또는 표적 나노입자와 같은 종양 세포를 표적하는 표적 치료를 포함한다.
- [0083] 바람직한 구현예에 따르면, 세포사멸은 방사선 치료에 의해 유도된다. 본 명세서에서 언급하는 '방사선 치료'의 용어는 외부 방사선 치료, 밀봉선원 방사선 치료(sealed source radiation therapy), 시스템적 방사선 동위원소 치료(systemic radioisotope therapy)를 포함하는 모든 방법의 방사선 치료를 의미한다. 몇몇 구현예에 따르면, 상기 방사선 치료는 종양 위치와 같은 표적 위치에 국부적으로 집중된다. 다른 구현예에 따르면, 상기 방사선 치료는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여에 앞서서 것이 효과적이다. 방사선 치료를 이용한 다른 구현예에 따르면, 상기 방사선 치료는 감마나이프 방사, 사이버 나이프 방사 및/또는 고강도 집중 초음파 치료법을 포함한다.
- [0084] 일부 구현예에 따르면, 상기 방사선 치료는 낮은 방사선량의 치료를 포함한다. 바람직한 구현예에 따르면, 성인 대상자는 1회 약 70 Gy의 방사선량으로 치료된다. 다른 구현예에 따르면, 성인 대상자의 경우 약 35 Gy까지의 단일 선량으로 치료된다. 또 다른 구현예에 따르면, 성인 대상자는 1주일 당 약 10 Gy의 선량으로 치료된다.
- [0085] 상술한 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 다양한 경로를 통해 투여가 가능하다. 바람직한 구현예에 따르면, 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 정맥 투여가 가능하다. 이때 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여량은 투여되는 대상자 및 상태에 따라 다양하게 변경 가능하고, 이 분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 결정될 수 있다. 몇몇 구현예에 따르면, 대상자에 대한 투여량은 약 1 mg/kg ~ 약 100 mg/kg, 바람직하기로 약 5 mg/kg ~ 약 75 mg/kg, 더욱 바람직하기로 약 10 mg/kg ~ 약 50 mg/kg, 또는 더 많은 양을 포함할 수 있다. 보다 구체적인 구현예에 따르면, 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 항암제의 단독 사용 보다 낮은 독성을 나타내어, 결과적으로 항암제의 단독 사용시 비독성을 나타내는 함량보다 더 높은 양의 투여량을 가질 수 있다.
- [0086] 몇몇 구현예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 표적 영역에 국소 투여와 같이 종양 위치에 국소적으로 투여된다. 다른 구현예에 따르면, 이러한 표적 영역은 상기 제시한 바와 같은 세포사멸 유도 치료가 이미 치료가 진행된 영역이다.
- [0087] 몇몇 구현예에 따르면, 상기 대상자는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트 투여 후 추가의 세포사멸 유도

치료를 진행하는 것이 바람직하다. 이러한 구현예에 따르면, 연속하는 세포사멸 유도 치료는 이전의 세포사멸 유도 치료와 비교하여 같거나 동일할 수 있다. 선택적으로, 연속하는 세포사멸 유도 치료는 이전의 세포사멸 유도 치료와는 다를 수 있다. 이러한 차이는 본 발명에서 특별히 한정하지 않으며 치료 종류(예, 방사선 치료, 발열 치료법, 레이저 치료, 광역동 치료, 항암화학요법, 저온 수술, 또는 표적 치료), 항암 화학요법제 또는 표적 분자 치료가 가능하다. 바람직하기로 방사선 치료가 가능하며, 이때 치료 시 선량, 조사 시간 등은 세포사멸 유도 치료에 따라 변경 가능하다.

[0088] 바람직한 구현예에 따르면, 본 명세서에서 언급하는 세포사멸 증가 방법은 하기 단계를 따른다: 세포사멸은 상기 언급한 바와 같이, 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 조직에 우선적으로 흡수된다. 상기 카스페이즈 절단 가능한 펩타이드 컨쥬게이트는, 가수분해되어 항암 화학요법제를 방출하고 세포사멸을 유도하여, 결과적으로 카스페이즈를 발현한다. 잔존하는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 카스페이즈-절단 가능한 펩타이드 링커는 발현된 카스페이즈에 의해 절단되고, 항암 화학요법제가 추가로 방출된다. 상기 항암 화학요법제는 추가적인 세포의 사멸을 유도하고, 결과적으로 추가적인 카스페이즈의 발현이 이루어지며, 추가적인 프로드러그 컨쥬게이트의 카스페이즈 유도 절단 활성이 일어나, 결과적으로 세포사멸을 증가시킨다. 이러한 증가는 표적 종양 세포와 같은 표적 세포의 살상에 대한 높은 효율 및 특이성이 있는 방법이라 할 수 있다. 더욱이, 이러한 증가 효과는 세포사멸 유도 치료 및/또는 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 투여량 사이의 시간을 연장하는 효과가 있다. 몇몇 구현예에 따르면, 상기 증가 효과는 다수의 암 세포들을 치료하는데 요구되는 항암 화학요법제의 함량을 저감할 수 있다.

[0089] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 카스페이즈 혹은 카텡신에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커의 절단에 앞서 비활성을 갖는다. 이에, 상기 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트는 건강한 세포에 대해 비독성(또는 사멸)을 갖는다. 바람직한 구현예에 따르면, 비컨쥬게이트된 형태로 동일 항암 화학요법제를 투여한 것과 비교하여, 본 발명에서 제시하는 방법은 정상 세포에 대해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 그 이상의 손상을 저감하는 효과가 있다.

[0090] 더욱이, 본 발명에 따른 카스페이즈 절단 가능한 펩타이드 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 세포사멸 효과는 일례로, 세포사멸이 진행되는 세포와 같은 카스페이즈가 발현하는 세포에 대해 선택성을 갖는다. 이에, 일단 표적 영역(일례로, 표적 조직) 내에서 세포사멸이 유도되면, 본 발명에 따른 방법은 다른 표적 세포의 세포사멸을 선택적이면서도 효과적으로 유도하여, 이로 인해 일례로 암을 치료한다.

[0091] 또 다른 발명에 따른 카텡신 절단 가능한 펩타이드 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 세포사멸 효과는 일례로, 카텡신 효소가 과발현되는 세포에 대해 선택성을 갖는다. 이에, 대다수의 종양 세포에서 카텡신 효소가 과발현되면, 본 발명에 따른 방법은 상기 효소가 과발현된 종양 세포만을 선택적이면서도 효과적으로 사멸시켜 암을 치료한다.

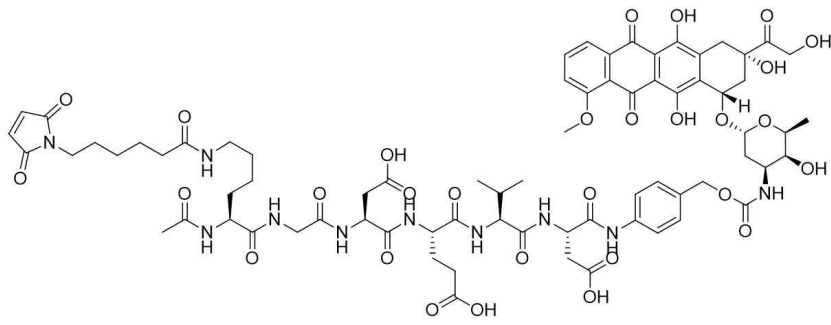
[0092] 상기 발명에 따른 항암 화학요법제 프로드러그 컨쥬게이트의 세포사멸 효과는 KRAS 변이체 또는 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 조직에 대한 선택적이고 효과적인 치료 효과를 나타내어, 이로 인해 일례로 암을 치료한다.

[0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

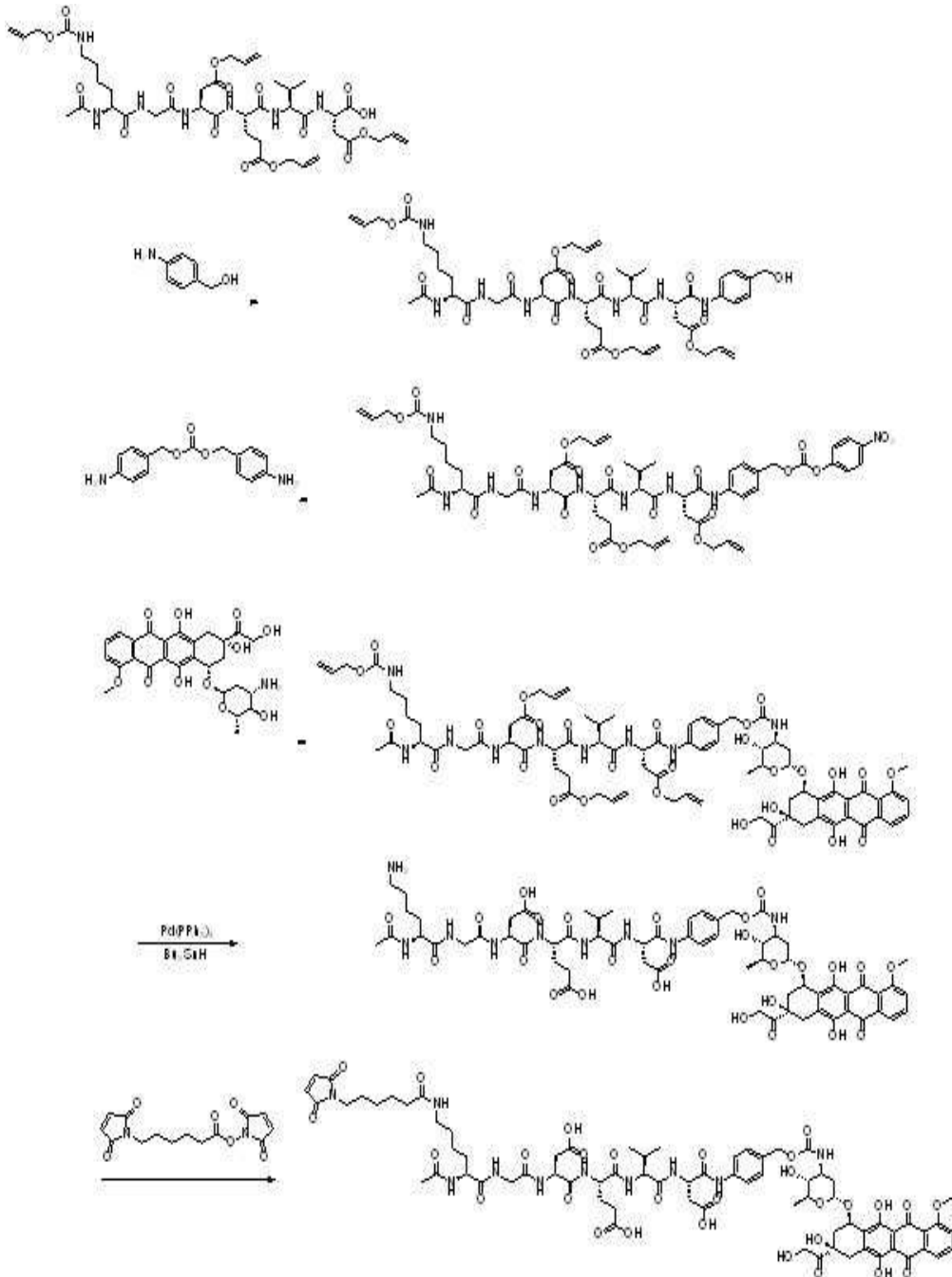
[0094] **실시예 1: 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0095] Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp 펩타이드(서열번호 32)의 N-말단에 티올기와 결합 가능한 말레이미드가 유도되어 있고 C-말단에 항암 화학요법제, 특히 항암제로서의 유효성분인 독소루비신이 화학적으로 결합되어 있는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 프로드러그를 하기 반응식 1에 도시된 방법으로 제조하였다.





[0096]



[0097]

[0098]

[0099]

본 실시예의 물질은 정맥투여 후 내인성 알부민의 티올기와 결합하는 말레이미드기와 방사선 조사된 종양에서 활성화되는 카스페이즈-3에 의해 효소적으로 가수분해되는 Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp 펩타이드(서열번호 32)를 포함하는 링커가 항암 화학요법제인 독소루비신에 결합되어 내인성 알부민에 의해 종양 조직까지 물질이 전달된

후 카스페이즈 3에 의해 독소루비신이 방출된다.

[0100] 본 발명의 프로드러그 컨쥬게이트의 제조방법을 더욱 구체적으로 설명하면, 우선 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OA11)-Glu(OA11)-Val-Asp(OA11)-OH(1000 mg, 1.10 mmol)와 4-아미노벤질 알코올(2 eq), 2-에톡시-2H-퀴놀린-1-카르복실산 에틸 에스테르(EEDQ, 2 eq)를 무수 디메틸포름아미드(DMF, 40 mL)에 녹인 후 질소 기체 하에 상온에서 16 시간 교반하였다. 용액을 진공농축 후 에테르로 결정화시켜 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OA11)-Glu(OA11)-Val-Asp(OA11)-PABOH를 수득하였다.

[0101] 상기 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OA11)-Glu(OA11)-Val-Asp(OA11)-PABOH(1,095 mg, 1.08 mmol)과 비스(p-니트로페닐)카보네이트(5.4 eq)을 무수 DMF(35 mL)에 녹인 후 질소 기체 하에 상온에서 교반하였다. 이후 N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA, 3.2 eq)를 천천히 첨가하고 16시간 교반하였다. 용액을 진공농축 후 에테르로 결정화시켜 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OA11)-Glu(OA11)-Val-Asp(OA11)-PABC를 수득하였다.

[0102] 상기 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OA11)-Glu(OA11)-Val-Asp(OA11)-PABC(998 mg, 0.9 mmol)과 독소루비신 염산염(1.2 eq)을 무수 DMF(35 mL)에 녹인 후 질소 기체 하에 어두운 환경에서 교반하였다. 이후 DIPEA(5.4 eq)을 천천히 첨가한 후 12시간 교반하였다. 용액을 진공농축 후 물에서 침전하여 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OA11)-Glu(OA11)-Val-Asp(OA11)-PABC-Dox를 수득하였다.

[0103] 상기 Ac-Lys(OAloc)-Gly-Asp(OA11)-Glu(OA11)-Val-Asp(OA11)-PABC-Dox(1,240 mg, 0.8 mmol)을 클로로포름/아세트산/4-메틸모르폴린을 37/2/1의 비율로 혼합한 용액 (총 510 mL)에 녹이고, 질소 가스 하에서 교반하였다. 이후 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐( $Pd(PPh_3)_4$ , 3 eq)를 클로로포름(21 mL)에 녹인 후 상기 혼합용액에 천천히 첨가하고 6시간 상온에서 교반하였다. 반응 종결 후 발생한 침전물을 혼합용액과 분리하여 얻어내고 건조시킨 후 물에 녹여 C18 역상 칼럼을 이용한 반-분취 HPLC(물/ $CH_3CN$ , 첨가제로서 1% 아세트산 포함,  $CH_3CN$  20-100% over 50 min, 5 ml/min)로 정제하여 탈보호화된 Ac-Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-PABC-DOX(붉은색 비결정형 고체)을 분리해 얻었다. ESI-MS:  $m/z$  1378.4  $[M + H]^+$ .

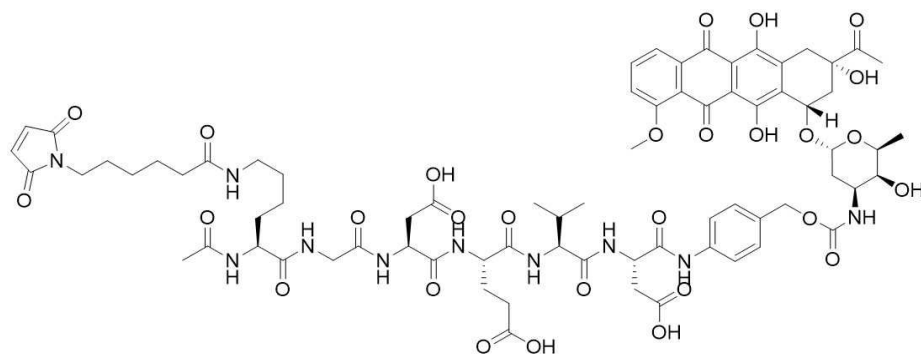
[0104] 상기 Ac-Lys-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-PABC-DOX과 N-( $\epsilon$ -말레이미도카프록실옥시)숙신이미드 에스테르(EMCS, 2 eq)를 무수 DMF에 녹이고 트리에틸아민(2.5 eq)를 가하고 상온에서 2시간 교반하였다.

[0105] 농도구배 시스템(물/ $CH_3CN$ , 첨가제로 0.05% 트리플루오로아세트산(TFA) 포함,  $CH_3CN$  20-50% over 50 min, 8 ml/min)에서 ODS-A 5  $\mu m$  역상 반-분취 칼럼(150 mm x 20 mm)을 사용하는 반-분취용 HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)로 최종산물이 분리되었으며 Ac-Lys(EMC)-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-PABC-DOX(적색 비정형 고체)를 수득하였다(상기 EMC는  $\epsilon$ -말레이미도카프론산을 나타냄).

[0106] 피크는 290 nm에서 모니터링하였다. 최종 산물의 분리는 농도구배 시스템 (물/ $CH_3CN$ , 첨가제로 0.1% TFA 사용,  $CH_3CN$  20-50% over 50 min, 8 ml/min)에서 ODS-A 5  $\mu m$  분석용 칼럼(150 mm x 3 mm; YMC)을 사용하는 분석 HPLC (Agilent 1300 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 통해 확인되었다. 피크는 UV탐지기 (214 nm) 및 형광 탐지기(excitation 470 nm, emission 580 nm)를 통해 모니터링하였다. 최종산물의 순도는 95% 이상으로 확인되었다. ESI-MS ( $m/z$ ): 1593.3  $[M+Na]^+$ .

[0107] **실시예 2: 말레이미드-KGDEVD-PABC-다우노루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0108] 실시예 1에서 독소루비신 대신 다우노루비신을 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 2의 구조를 갖는 말레이미드-KGDEVD-PABC-다우노루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다.

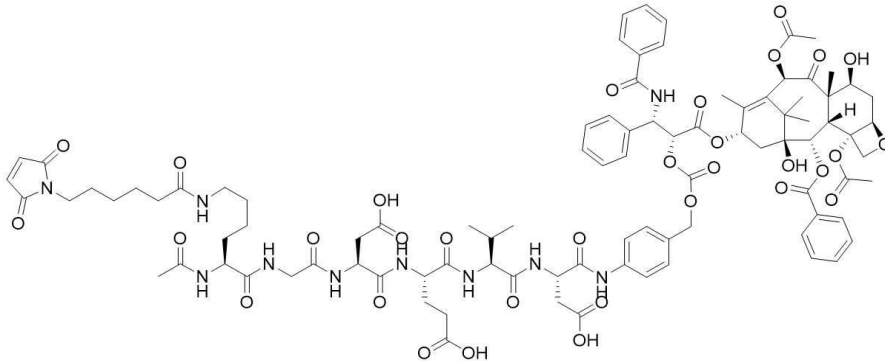


[0109]

[0110] (화학식 2)

[0111] **실시예 3: 말레이미드-KGDEVD-PABC-파클리탁셀 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

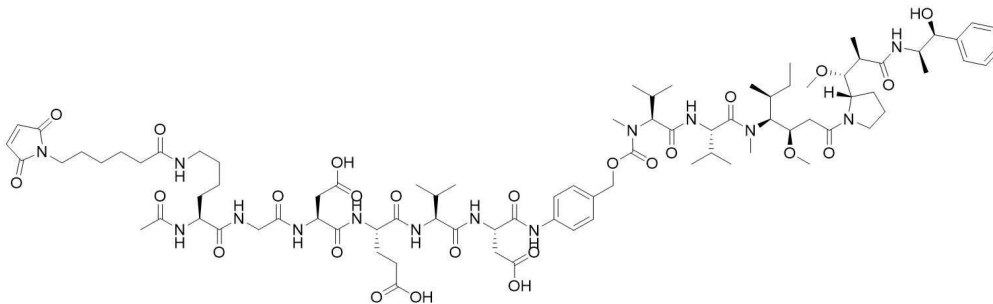
[0112] 실시예 1에서 독소루비신 대신 파클리탁셀을 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 3의 구조를 갖는 말레이미드-KGDEVD-PABC-파클리탁셀 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다.



[0113] (화학식 3)

[0115] **실시예 4: 말레이미드-KGDEVD-PABC-MMAE 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

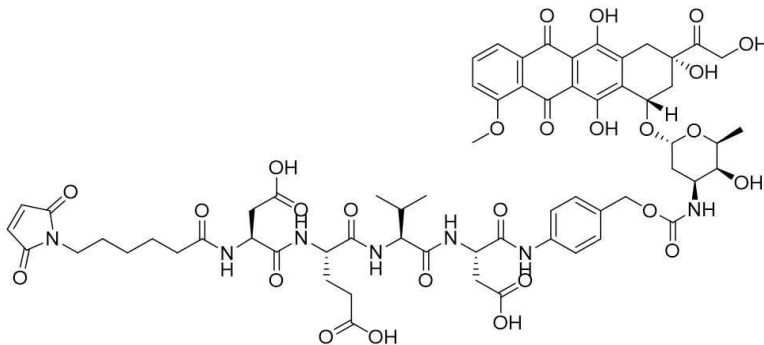
[0116] 실시예 1에서 독소루비신 대신 MMAE(monomethyl auristatin E)을 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 4의 구조를 갖는 말레이미드-KGDEVD-MMAE 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다.



[0117] (화학식 4)

[0119] **실시예 5: 말레이미드-DEVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0120] 실시예 1에서 펩타이드 링커인 KGDEVD(서열번호 32) 대신 DEVD(서열번호 13)를 합성한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 5의 구조를 갖는 말레이미드-DEVD-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다. DEVD는 카스페이즈-3, 카스페이즈-7, 카스페이즈-9에 의해 절단 가능하다.

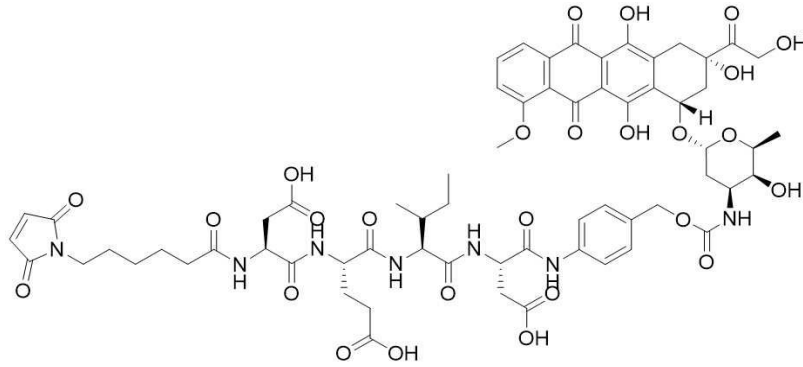


[0121] (화학식 5)

[0122] **실시예 6: 말레이미드-DEID-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0123] 실시예 1에서 펩타이드 링커인 KGDEVD(서열번호 32) 대신 카스페이즈에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커 DEID(서열번호 15)를 합성한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 6의 구조를 갖는 말레이미드-DEID-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다(도 7). 상기 DEID 펩타이드 링커는 카스페이즈-3, 카스페이즈-7,

및 카스페이즈-9에 의해 절단 가능하다.



[0124]

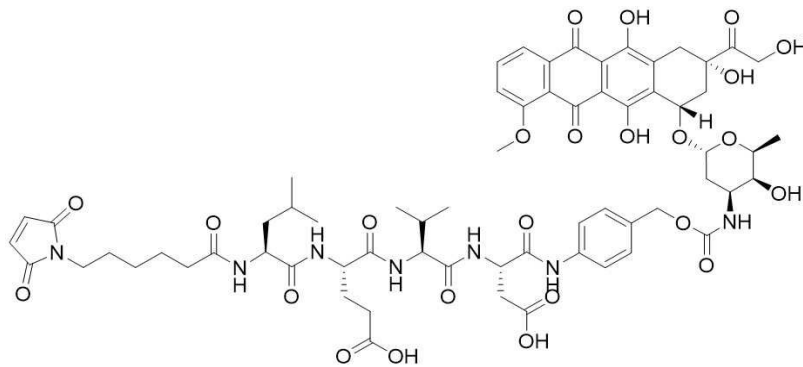
(화학식 6)

[0125]

**실시예 7: 말레이미드-DLVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0126]

실시예 1에서 펩타이드 링커인 KGDEVD(서열번호 32) 대신 카스페이즈에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커 DLVD(서열번호 14)를 합성한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 7의 구조를 갖는 말레이미드-DLVD-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다. 상기 DLVD는 카스페이즈-3, 카스페이즈-7, 카스페이즈-9에 의해 절단 가능하다.



[0127]

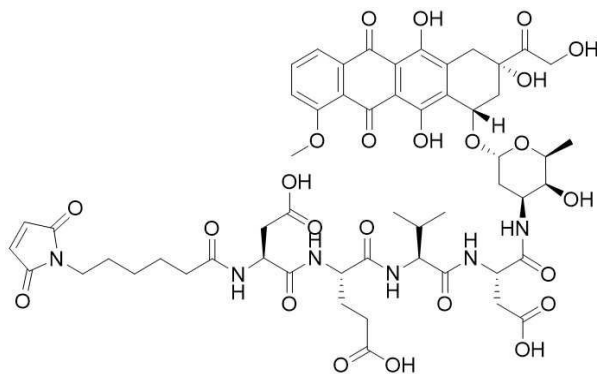
(화학식 7)

[0128]

**실시예 8: 말레이미드-DEVD-독소루비신(PABC 제외) 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0129]

실시예 5에서 PABC 링커를 연결하는 공정을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 8의 구조를 갖는 말레이미드-DEVD-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 합성하였다. 본 실시예에서 상기 DEVD 펩타이드 링커를 독소루비신의 3'-NH<sub>2</sub>에 직접 연결하여 프로드러그 컨쥬게이트 말레이미드-DEVD-독소루비신을 제조하였다.



[0130]

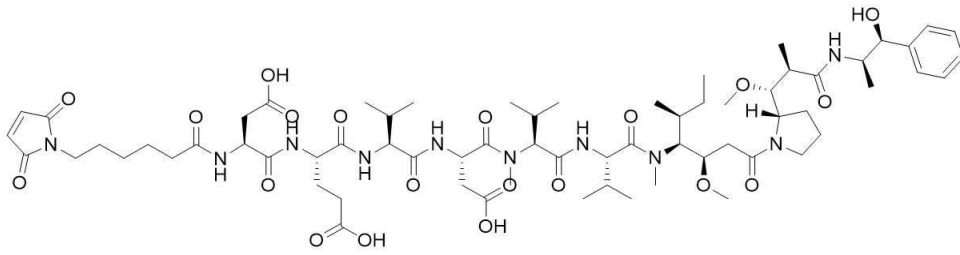
(화학식 8)

[0131]

**실시예 9: 말레이미드-DEVD-MMAE(PABC 제외) 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0132]

실시예 8에서 항암 화학요법제로 독소루비신 대신에 MMAE를 사용한 것으로 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 9의 구조를 갖는 말레이미드-DEVD-MMAE를 제조하였다.



[0133]

[0134] (화학식 9)

[0135] **실시예 10: Pyridyldithiol-KGDEVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0136] 실시예 1에서 말레이미드 대신 피리딜디티올기를 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 10의 구조를 갖는 pyridyldithiol-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다. 피리딜디티올 기능기는 내인성 (endogenous) 알부민과 다이설파이드 결합에 의해 결합하고 프로드러그 컨쥬게이트 혈장 순환시간을 연장한다. 본 실시예에서 3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트와 독소루비신은 각각 카스페이즈-3, 카스페이즈-7, 카스페이즈-9에 의해 절단 가능한 KGDEVD(서열번호 32)의 N-,C-말단에 각각 결합된다, 상기에 예시된 다른 프로드러그 컨쥬게이트와 마찬가지로, 상기 프로드러그 컨쥬게이트는 순환하는 내인성 알부민에 공유결합하고 종양세포에 축적된다. 세포사멸이 유도되고 카스페이즈-3, 또는 카스페이즈-7이 활성화 되었을 때, 카스페이즈에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커가 절단되어 독소루비신이 방출된다.

[0137]

[0138] (화학식 10)

[0139] **실시예 11: 올리에이트-KGDEVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

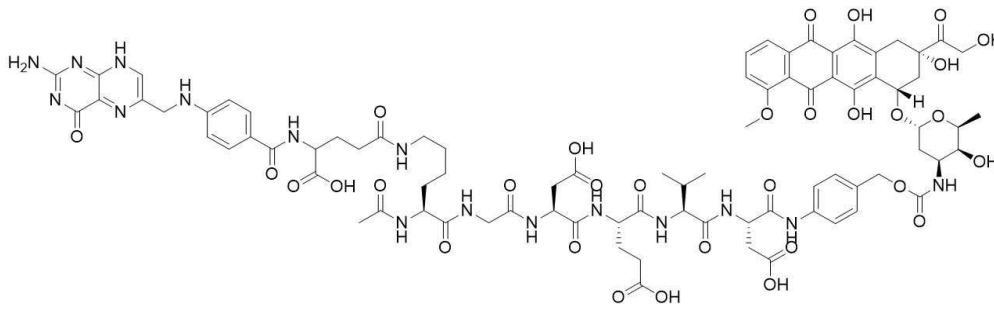
[0140] 실시예 10과 유사한 프로드러그 컨쥬게이트, 특히 올리에이트를 알부민 결합 기능기로 포함하는 하기 화학식 11의 구조를 갖는 올리에이트-KGDEVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다. 상기 올리에이트 기능기는 내인성 알부민과 결합하고 프로드러그 컨쥬게이트 혈장 순환시간을 연장한다.

[0141]

[0142] (화학식 11)

[0143] **실시예 12: 폴레이트-KGDEVD-PABC-독소루비신 프로드러그의 제조**

[0144] 실시예 10과 유사한 프로드러그 컨쥬게이트, 특히 엽산(folate)을 알부민 결합 기능기로 포함하는 하기 화학식 14의 구조를 갖는 폴레이트-KGDEVD-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다.



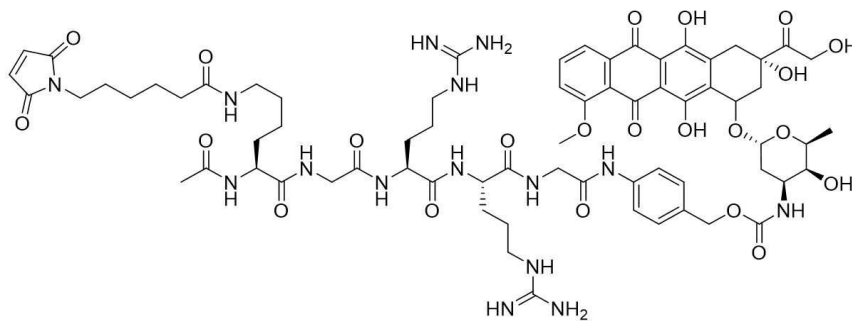
(화학식 12)

[0145]

[0146] **실시예 13: 말레이미드-KGRRG-PABC-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트의 제조**

[0147] 실시예 1에서 펩타이드 링커인 KGDEV(D서열번호 32) 대신 카렙신 D에 의해 절단 가능한 펩타이드 링커 KGRRG(서열번호 40)를 합성한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 하기 화학식 20의 구조를 갖는 말레이미드-KGRRG-독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트를 제조하였다. 상기 KGRRG는 카렙신 D에 의해 절단 가능하다.

[0147]



[0148]

[0149] (화학식 13)

[0150] **실험예 1: HPLC 분석을 통한 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신 인간 혈청 알부민 결합 실험**

[0151] 시판되는 인간 혈청 알부민(HSA, Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 용해시켜 농도가 700 μM 되도록 하였다. 그 후에 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신을 넣어 농도가 100 μM이 되도록 한 후 상온에서 배양하였다. 시료를 분석 HPLC로 분석하였다(도 1).

[0152] 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신과 HSA의 컨쥬게이트 결합은 3분 안에 완료되었으며 결합하지 않은 소량의 물질이 검출되었다. 그러나 HSA가 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신과 배양되기 전에 티올 결합 말레이미드 그룹을 가지고 있는 4-말레이미도부티르산과 미리 배양되었을 때는, 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신과 HSA의 결합은 1시간이 경과하여도 관찰되지 않았다. 이는 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신의 결합은 특별히 EMC 기능기의 말레이미드 관능기를 통해 행해지는 것을 알 수 있다.

[0153] **실험예 2: HPLC 분석을 통한 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신의 혈장 내 인간 혈청 알부민 결합 실험**

[0154] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 프로드러그 컨쥬게이트가 투여시 인간 혈액 내에서도 혈청 알부민과 결합할 수 있는지 조사하기 위해, 인간혈장 시료에 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신을 넣어 농도가 100 μM이 되도록 하고 상온에서 배양한 후, 시료를 분석용 HPLC로 분석하였다(도 2). 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신과 HSA의 컨쥬게이트결합은 3분 안에 완료하였다. 그러나 혈장이 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신과 배양되기 전에 티올 결합 말레이미드 관능기를 갖는 4-말레이미도부티르산과 미리 배양되었을 때, 혈청과의 실험에서처럼 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신과 혈장의 결합은 1시간이 지나도 관찰되지 않았다. 이는 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신의 결합은 특별히 EMC 기능기의 말레이미드 관능기를 통해 행해지는 것을 알 수 있다.

[0155] **실험예 3: HPLC 분석을 이용하여 카스페이즈-3에 의해 말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신(HSA-KGDEV(D)-PABC-독소루비신)에서 방출되는 약물의 확인**

[0156] HSA-말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신을 정제된 카스페이즈-3과 배양한 후 HPLC로 분석하였다(도 3). 독소루비신은 HSA-말레이미드-KGDEV(D)-PABC-독소루비신 컨쥬게이트에서 1시간 이내에 절단되어 분리되었다. 반면 펩타이드 아미노산 서열이 상이한 HSA-말레이미드-KGDEV(D서열번호 32)-PABC-독소루비신 컨쥬게이트에서는 분리되는

현상이 관찰되지 않았다(도 4).

[0157] **실험예 4: 인간 카스페이즈-3 존재 유무 하에서 HSA-KGDEVD-PABC-독소루비신의 농도에 따른 시험관내 항암 효과**

[0158] 상기 HSA-말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 컨쥬게이트는 SCC7과 MDA-MB-231세포에서 100 μM까지 농도를 높여 MTT 분석으로 검사하였을 때 뚜렷한 독성 효과는 나타내지 않았다. 그러나 HSA-말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신이 세포 첨가 전에 정제된 카스페이즈-3와 미리 배양되었을 때 공유결합되지 않은 독소루비신이 SCC7과 MDAMB-231에서 보인 세포독성과 유사한 정도를 나타냈다(도 5).

[0159] **실험예 5: 랫트에서의 약물동태학적 분석**

[0160] 본 발명자들은 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신과 AcKGDEVD-PABC-독소루비신 컨쥬게이트의 약물동태학 프로파일(pharmacokinetic profile)을 스프레그-다우리 랫트에 독소루비신 기준으로 1 mg/kg와 동등한 양으로 정맥투여한 후 분석하였다(도 6). 5, 15, 30, 60, 90분 간격 채혈 후 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 및 144시간 후에 각각 추가적으로 채혈하였다. 채혈한 샘플에 시트르산나트륨을 넣어 안정화시킨 뒤 혈장을 얻기 위해 15분 동안 2000xg 조건에서 냉동 원심 분리하였다. 혈장샘플 200 μl를 96-웰 블랙 마이크로 플레이트에 넣은 뒤 독소루비신의 형광을 485/590 nm에서 측정하였다. 기준점은 깨끗한 혈장으로 준비되었으며 형광은 상기와 동일하게 측정하였다.

[0161] 그 결과, 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신은 30분의 최종 반감기를 나타냈으며 혈장농도는 4시간 안에 검출 한계 5 ng/ml 아래로 감소하였다. 반면 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신은 19시간 이상 증가된 반감기를 나타냈으며 투여 후에 혈장에서 6일 동안 작용하였다.

[0162] **실험예 6: 시노물구스 원숭이에서의 약물동태학적 분석**

[0163] 본 발명자들은 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신과 AcKGDEVD-PABC-독소루비신 컨쥬게이트의 약물동태학 프로파일(pharmacokinetic profile)을 독소루비신 기준으로 1 mg/kg와 동등한 양으로 시노물구스 원숭이에게 정맥투여한 후 분석하였다(도 7). 15, 30, 45, 60, 90분 간격 채혈 후, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 및 168시간 후에도 채혈하였다. 채혈한 샘플에 시트르산나트륨을 넣어 안정화시킨 뒤 혈장을 얻기 위해 15분 동안 2000xg 조건에서 냉동 원심 분리하였다. 혈장샘플 200 μl를 96-웰 블랙 마이크로플레이트에 넣은 뒤 독소루비신의 형광을 485/590 nm에서 측정하였다. 기준점은 깨끗한 혈장에서 준비되었으며 형광은 상기와 동일하게 측정하였다. 상기 AcKGDEVD-PABC-독소루비신은 1시간의 최종 반감기를 나타냈으며 혈장농도는 6시간 안에 검출 한계 5 ng/ml 아래로 감소하였다. 반면 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신은 106시간 이상 증가된 반감기를 나타냈으며 투여 후에 혈장에서 7일 동안 검출되었다.

[0164] **실험예 7: PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 세포군의 파악을 위한 웨스턴 블랏 평가**

[0165] 본 발명자들은 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 세포군을 파악하기 위해 다양한 세포군(유방암: BT549, MDA-MB231, MCF7; 폐암: H1299, H2122, A549; 대장암: HT29, SW480, CT26)에서 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과, BT549 유방암 세포, H1299 폐암 세포, SW480 대장암 세포에서 PTEN 단백질이 확인되지 않아 상기 세포군에서 PTEN 단백질 소실 유전자형이 발현되었음을 확인하였다(도 8)

[0166] **실험예 8: 인간 혈청 알부민의 KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포와 야생형 KRAS 유전자형을 가진 종양 세포로의 세포 내 흡수 유무 평가**

[0167] 야생형 KRAS 유전자형을 가진 종양 세포군(췌장암: BXPC3, Pan02; 전립선암: DU145; 대장암: HT29; 유방암: MCF7)과 KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포군(췌장암: AsPC3, Mia-paca2, Capan-1, panC1, 8988T; 전립선암: PC3; 대장암: CT26, HCT116, SW480; 폐암: H2122, A549)에서 FITC 형광으로 표지된 인간 혈청 알부민을 처리하였을 때, KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포군에서 다량의 세포 내 알부민 흡수를 확인하였다. 반면 야생형 KRAS 유전자형의 종양 세포군에서는 이러한 현상이 발견되지 않았다(도 9 및 10).

[0168] **실험예 9: 말레이미드-KGDEVD-독소루비신의 KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포와 야생형 KRAS 유전자형을 가진 종양 세포로의 세포 내 흡수 유무 평가**

[0169] 야생형 KRAS 유전자형을 가진 종양 세포(췌장암: BXPC3)와 KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포군(췌장암: Mia-paca2)에서 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 컨쥬게이트와 인간 혈청 알부민이 결합된 알부민 결합 프로드러그 컨쥬게이트를 각각 처리하였을 때, KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포에서 알부민이 결합된 상기 프로드러그가 다량 흡수되는 것을 확인하였다(도 11).

- [0170] **실험예 10: 인간 혈청 알부민의 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 세포와 야생형 PTEN 단백질 유전자형을 가진 종양 세포로의 세포 내 흡수 유무 평가**
- [0171] 야생형 PTEN 단백질 유전자형을 가진 종양 세포군(전립선암: DU145; 대장암: HT29)과 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 세포군(유방암: BT579, MDA-MB436; 폐암: H1299)에서 FITC 형광으로 표지된 인간 혈청 알부민을 처리하였을 때, PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 세포군에서 다량의 세포 내 알부민 흡수를 확인하였다. 반면 야생형 PTEN 단백질 유전자형의 세포군에서는 이러한 현상이 발견되지 않았다(도 12 및 13).
- [0172] **실험예 11: KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포와 일반 종양 세포의 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 투여 농도에 따른 세포독성 평가**
- [0173] 본 발명의 일 실시예에 따른 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 컨쥬게이트는 야생형 KRAS 유전자형을 가진 종양 세포군(췌장암: BXPC3, Pan02; 전립선암: DU145; 대장암: HT29; 유방암: Hs578T, MCF7)과 KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포군(췌장암: AsPC3, Mia-paca2, Capan-1, panC1, 8988T; 전립선암: PC3; 대장암: CT26, HCT116, SW480; 유방암: MDA-B231; 폐암: H2122, A549)에서 100  $\mu$ M 까지 농도를 높여 MTT 분석으로 검사하였다(도 14).
- [0174] 그 결과, 도 14에서 확인되는 바와 같이, 야생형 KRAS 유전자형을 갖는 암세포에서는 본 발명의 일 실시예에 따른 프로드러그 컨쥬게이트의 IC<sub>50</sub>이 대체적으로 높게 나타난 반면, KRAS 변이체 유전자형을 갖는 암세포에서는 낮게 나타났다.
- [0175] **실험예 12: PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 세포와 일반 종양 세포의 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 투여 농도에 따른 세포독성 평가**
- [0176] 본 발명자들은 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 컨쥬게이트를 야생형 PTEN 단백질 유전자형을 가진 종양 세포군(전립선암: DU145; 대장암: HT29; 유방암: Hs578T, MCF7)과 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 종양 세포군(대장암: HT29; 유방암: BT579, MDA-MB436; 폐암: H1299)에서 100  $\mu$ M 까지 농도를 높여 MTT 분석으로 검사하였다(도 15).
- [0177] 그 결과 도 15에서 나타난 바와 같이, PTEN 야생형 유전자형을 갖는 암세포에서는 독소루비신 기준으로 IC<sub>50</sub>이 낮게 나타난 반면, PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 종양 세포군에서는 IC<sub>50</sub> 값이 높게 나타났다.
- [0178] **실험예 13: KRAS 변이체 유전자형 유무의 종양을 가진 쥐에게 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 투여 후 종양 성장 프로파일 검사**
- [0179] 본 발명자들은 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신에 의한 종양 성장 억제 정도를 야생형 KRAS 유전자형을 가진 세포군(췌장암: BXPC3, Pan02)과 KRAS 변이체 유전자형을 가진 세포군(췌장암: Mia-paca2, AsPC1; 유방암: MDA-MB231; 대장암: CT26, HCT116; 폐암: H2122, A549)을 접종하여 종양을 유발한 종양 모델 C3H/HeN 쥐들을 이용하여 평가하였다(도 16 및 17). 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 각각 독소루비신 기준으로 1, 5, 10 mg/kg와 동등한 양으로 3일을 주기로 하여 정맥투여한 후 한달간 관찰하였다. 그 결과 도 16에서 확인되는 바와 같이, 야생형 KRAS 유전자형을 가진 암세포가 접종된 실험군보다 KRAS 변이체 유전자형을 가진 암세포가 접종된 실험군에서 보다 우수한 종양성장 억제 효과를 나타냈다. 한편, 도 17에서 확인되는 바와 같이, 그 어떠한 약물도 실험동물의 체중에 유의한 영향을 미치지 않았다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 프로드러그 컨쥬게이트는 큰 부작용은 없는 것으로 추정된다.
- [0180] **실험예 14: PTEN 단백질 소실 유전자형 유무의 종양을 가진 쥐에게 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신 투여 후 종양 성장 프로파일 검사**
- [0181] 본 발명자들은 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신에 의한 종양 성장 억제 정도를 PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 암세포 집단(폐암: H1299; 유방암: MDA-MB436) 접종하여 종양 발생을 유발한 C3H/HeN 쥐들을 가지고 평가하였다(도 18). 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신을 각각 독소루비신 농도 기준으로 1, 5, 10 mg/kg와 동등한 양으로 3일을 주기로 하여 정맥투여한 후 한달간 관찰하였다. 그 결과 도 18에서 확인되는 바와 같이, PTEN 단백질 소실 유전자형을 가진 암세포를 접정한 실험군에서 대조군과 비교하였을 시 더 뛰어난 종양 억제능력을 확인할 수 있었다.
- [0182] **실험예 15: KRAS 변이체 유전자형을 가진 종양 세포에서 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신과 펩타이드 서열이 상이한 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신, 그리고 기존 약물(Aldoxorubicin)간의 투여 후 종양 성장 프로파일**



**비교**

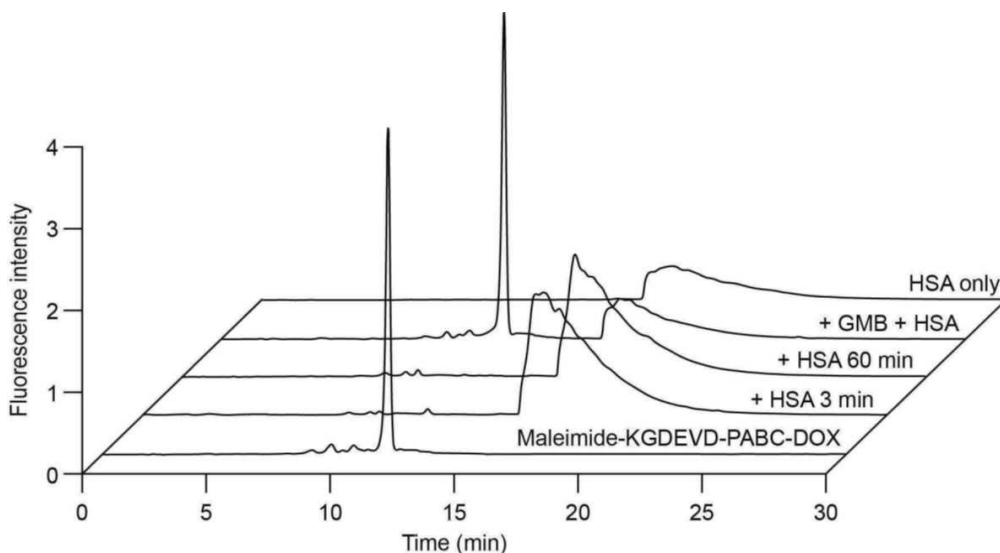
[0183] 기존 사용되고 있는 말레이미드가 연결되어 투여시 혈중에서 알부민과 결합하여 반감기가 증가된 독소루비신 계열 항암제인 Aldoxorubicin과 본 발명의 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신(MPD1), 그리고 펩타이드 서열이 상이한 말레이미드-KGDVED-PABC-독소루비신(EMC-KGDVED-DOX)을 KRAS 변이체 유전자형을 가진 중앙 세포(Mia-paca2)를 이식한 C3H/HeN 쥐들을 가지고 중앙 억제 효능을 비교평가하였다(도 19 및 20). 상기 항암제와 상기 프로드러그 컨쥬게이트를 각각 독소루비신 기준으로 5 mg/kg와 동등한 양으로 3일을 주기로 하여 정맥투여한 후 한달간 관찰하였다.

[0184] 그 결과, 도 19 및 20에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 독소루비신 프로드러그 컨쥬게이트는 기존의 말레이미드 부가 독소루비신 계열의 항암제인 Aldoxorubicin과 유사한 항암 효과를 나타냈다. 이는 Aldoxorubicin의 작용기전과 본원발명의 프로드러그 컨쥬게이트의 작용기전이 유사하다는 점에서 예상할 수 있는 결과였다. 한편, 카스페이즈에 의해 절단되지 않는 펩타이드 링커를 가진 말레이미드-KGDVED-PABC-독소루비신의 경우 실시예 1에서 합성된 말레이미드-KGDEVD-PABC-독소루비신이나 Aldoxorubicin 보다는 다소 떨어지긴 하였으나, 매우 우수한 생체내 항암 효과를 나타냈다. 이는, 본 발명의 일 실시예에 따른 프로드러그 컨쥬게이트가 KRAS 변이체 유전자형을 가진 암세포에 의해 일단 흡수가 되면, 세포 내에서 카스페이즈에 의한 작용 외의 작용 예컨대 엔도솜-라이소솜 경로에서 다양한 엑소프로테아제에 의해 절단되어 유리 독소루비신의 방출을 야기하고 방출된 유리 독소루비신의 작용에 의해 항암효과가 나타남을 시사하는 것이다. 이러한 결과는, KRAS 변이체 유전자형을 갖는 암이나 PTEN 단백질 소실 유전자형을 갖는 암에 대하여는 반드시 카스페이즈와 같은 암세포 특이적 단백질 절단효소에 의해 인식되는 펩타이드 링커를 사용할 필요 없이 다양한 펩타이드 링커 및/또는 화학적 링커를 이용하여 알부민 결합 기능기와 항암 화학요법제를 연결한 프로드러그를 사용하더라도 충분히 효과적인 항암효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

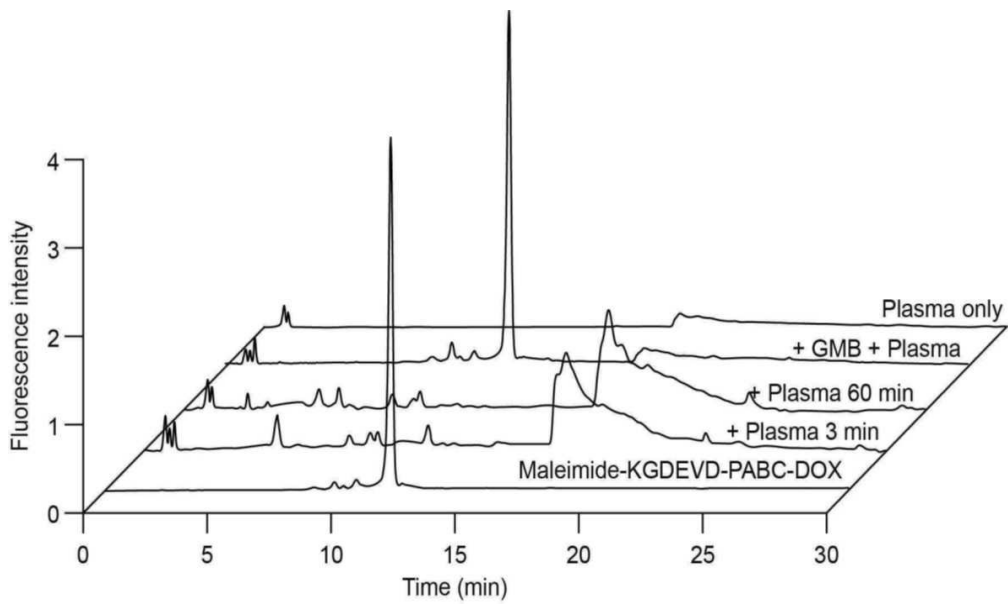
[0185] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

**도면**

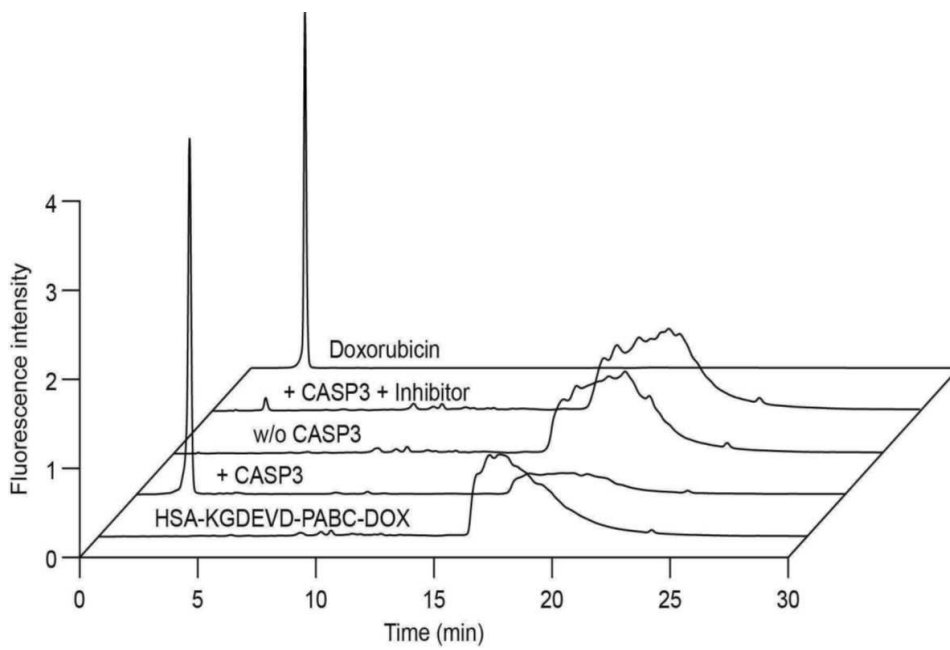
**도면1**



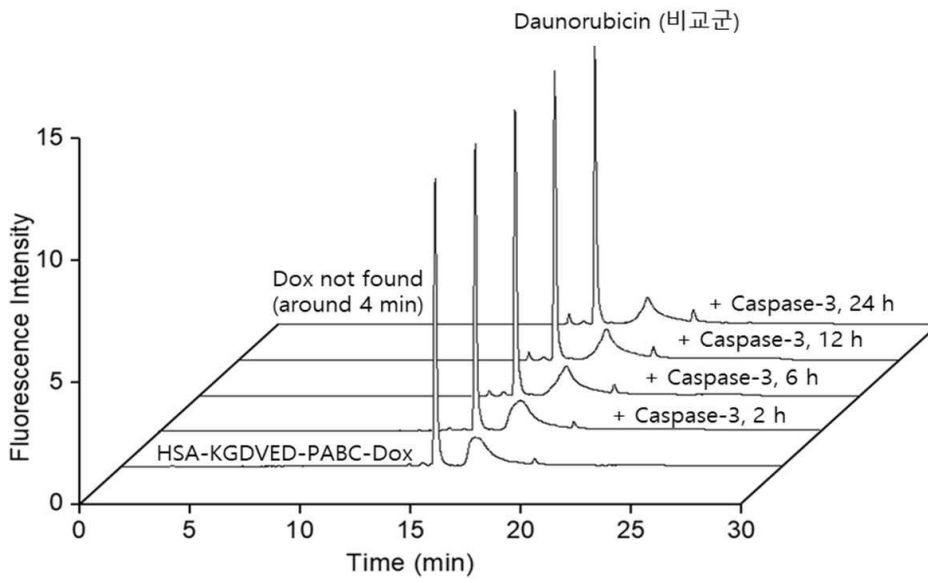
도면2



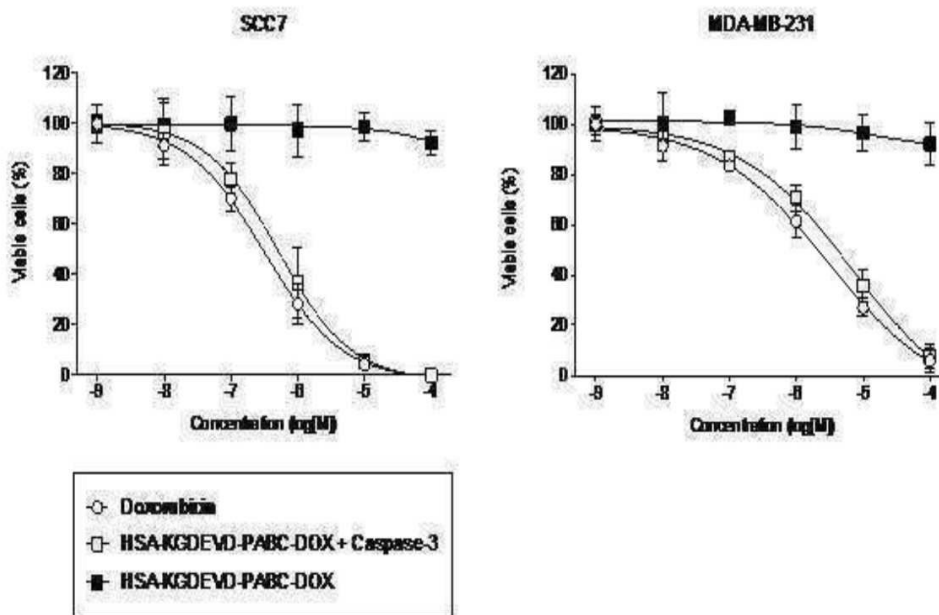
도면3



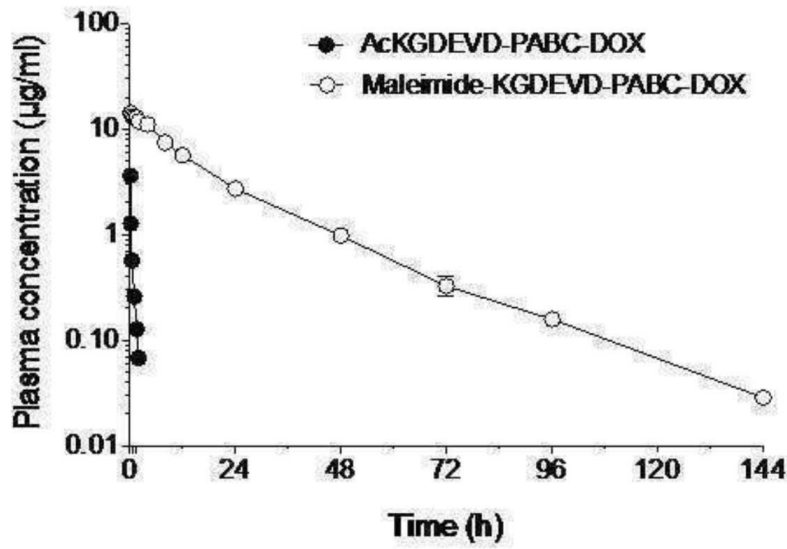
도면4



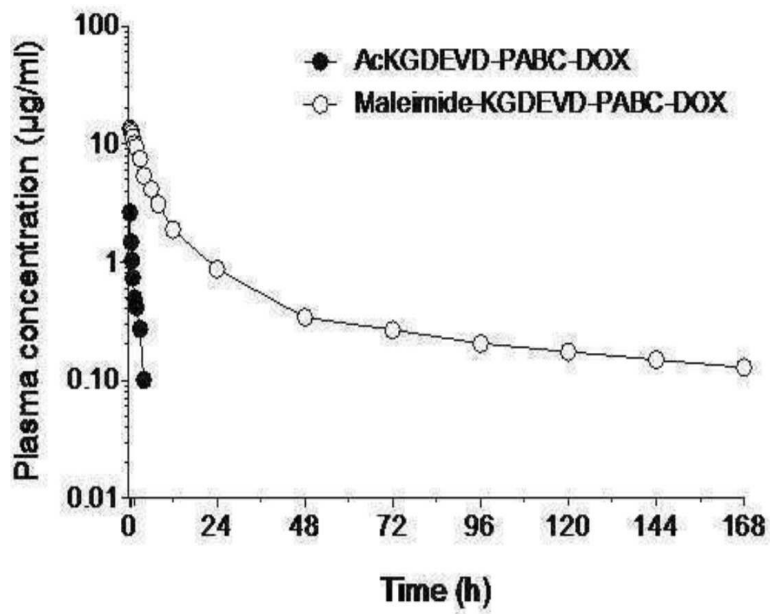
도면5



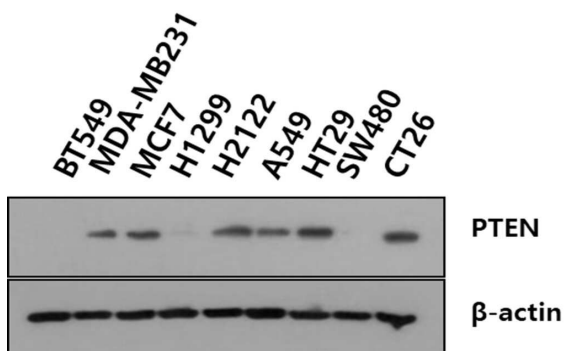
도면6



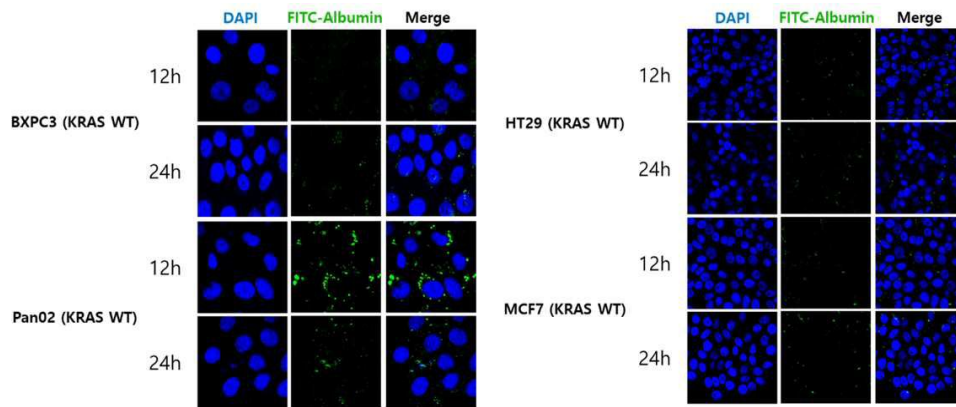
도면7



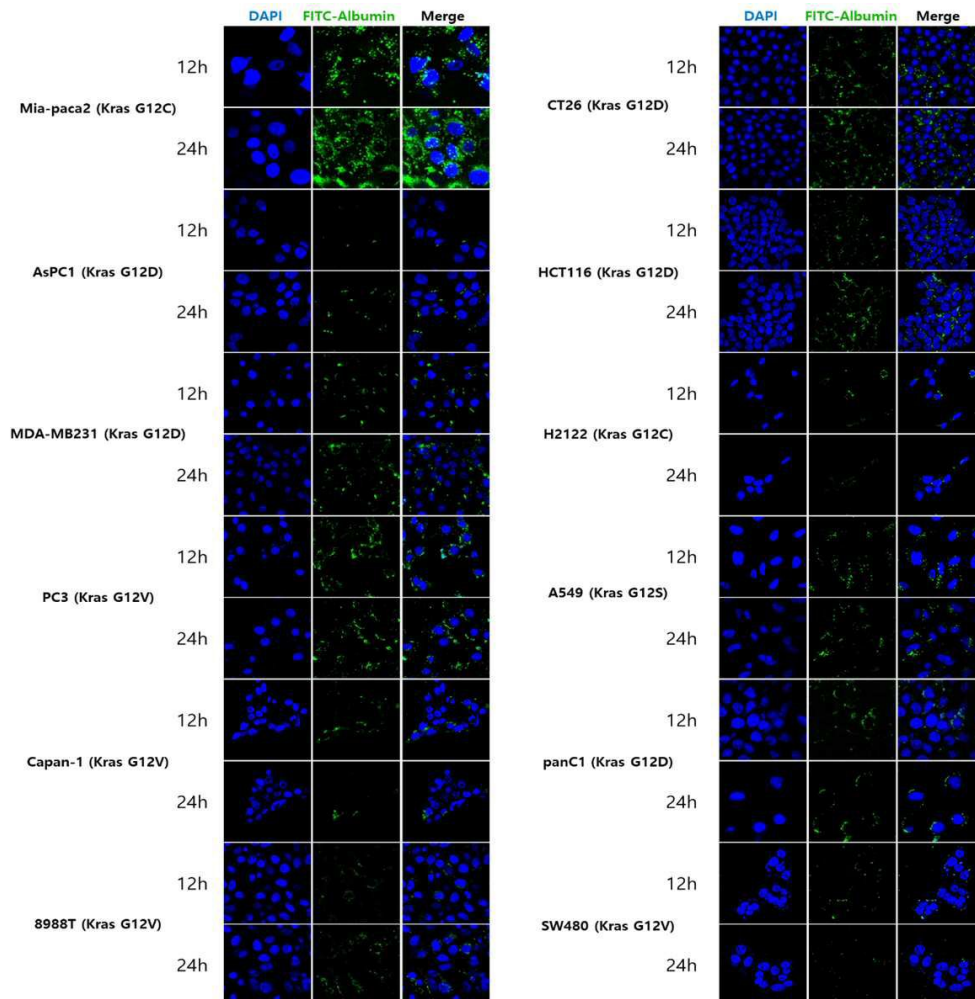
도면8



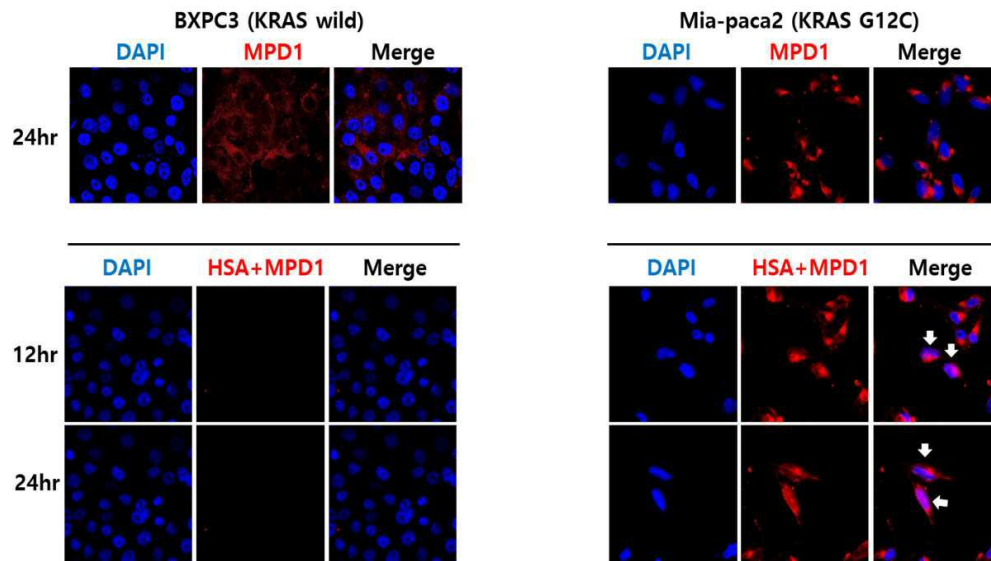
도면9



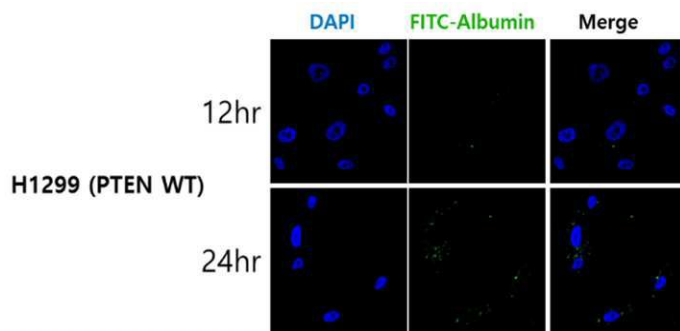
도면10



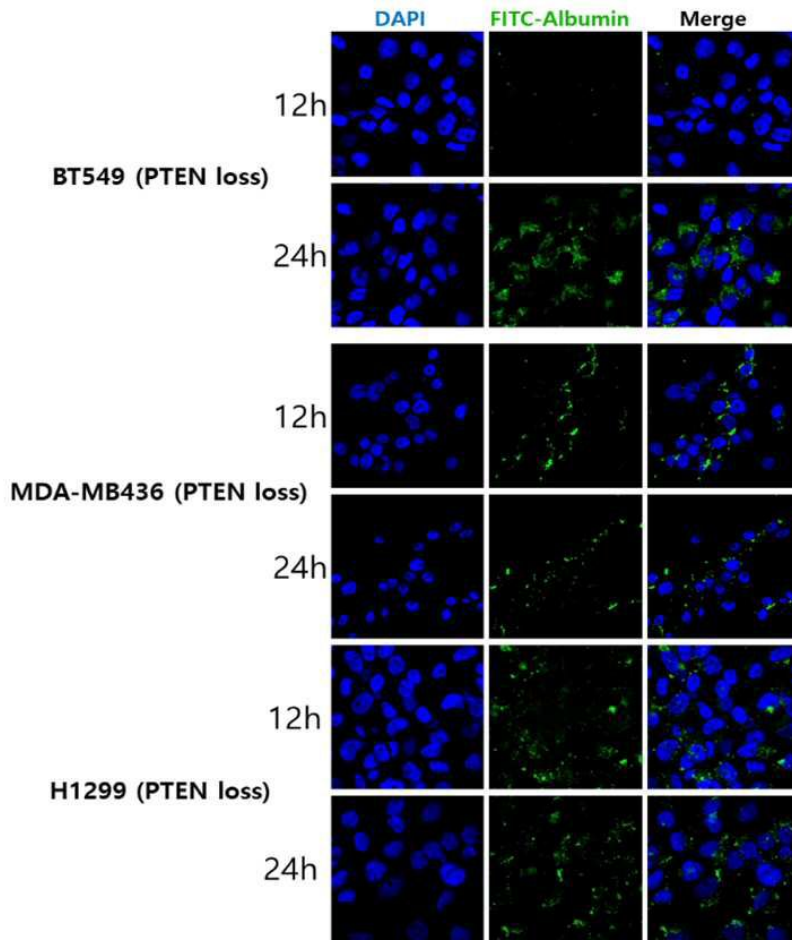
도면11



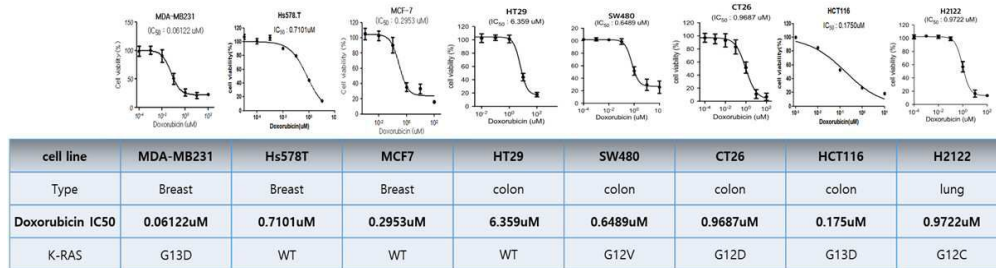
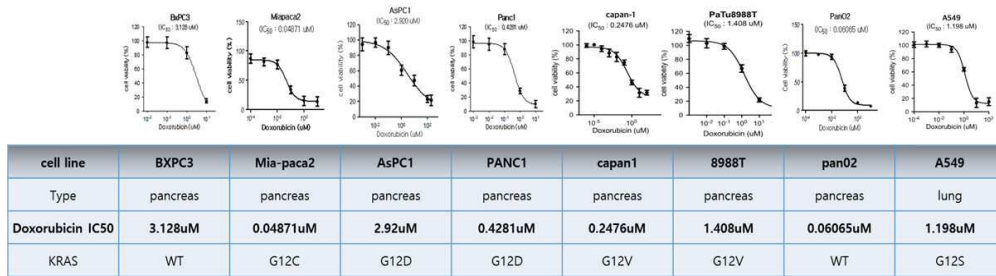
도면12



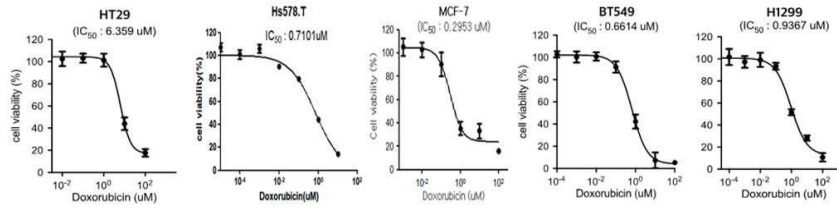
도면13



도면14

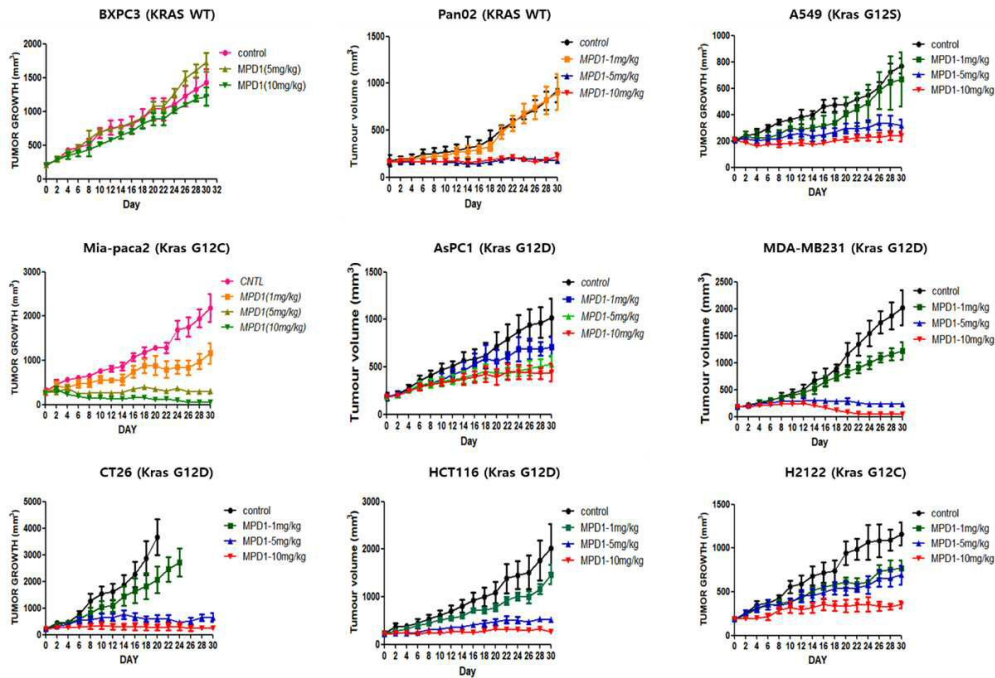


도면15



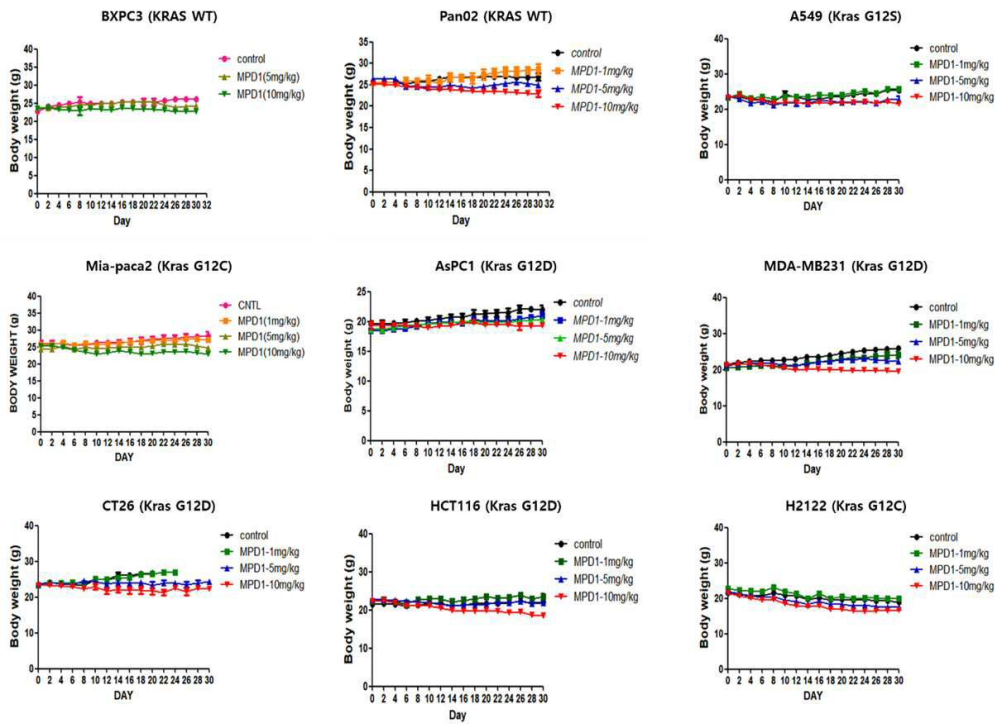
cell line	HT29	Hs578T	MCF7	BT549	H1299
Type	colon	Breast	Breast	Breast	lung
Doxorubicin IC50	6.359uM	0.7101uM	0.2953uM	0.6614uM	0.9367uM
K-RAS	WT	WT	WT	WT	WT
PTEN	WT	WT	WT	loss	loss

도면16

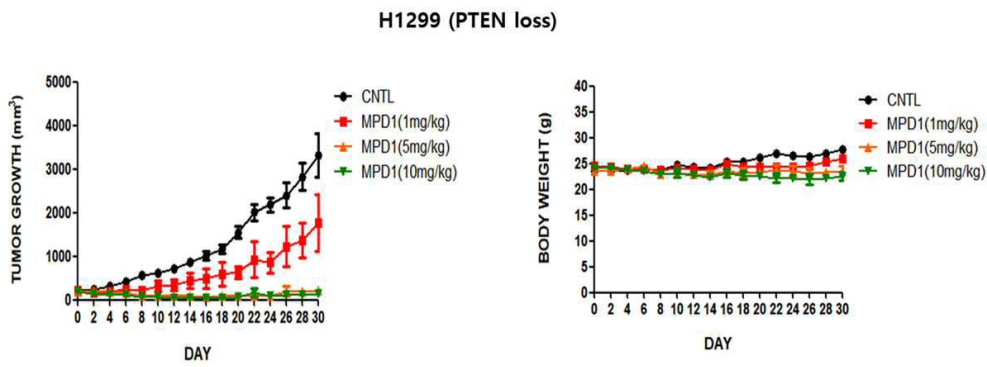




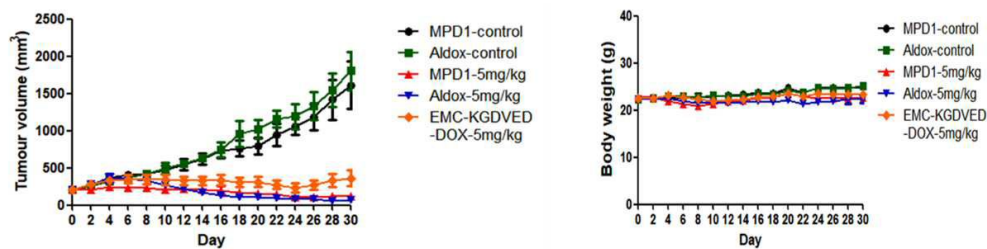
도면17



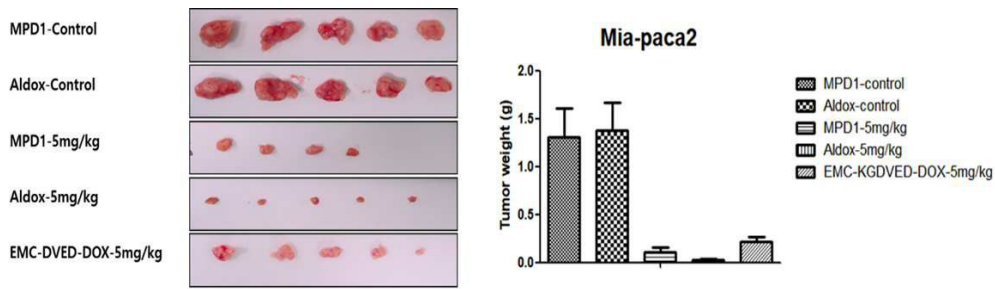
도면18



도면19



도면20



서열 목록

- <110> Pharosgen
- <120> Novel use of chemotherapeutic prodrug conjugate
- <130> PD19-5870
- <160> 44
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Albumin binding peptide (PEP)
- <400> 1
- Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
- 1 5 10
- <210> 2
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> linker peptide
- <400> 2
- Gly Gly Gly Gly Ser
- 1 5
- <210> 3
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> linker peptide

<400> 3

Gly Gly Ser Gly Ser Ser

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker peptide

<400> 4

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 5

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker peptide

<400> 5

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

35 40 45

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker peptide

<400> 6

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker peptide

<400> 7

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker peptide

<400> 8

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe

1 5 10

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> E2A sequence

<400> 9

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F2A sequence

<400> 10

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1                    5                    10                    15  
 Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T2A sequence

<400> 11

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1                    5                    10                    15

Gly Pro

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2A sequence

<400> 12

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1                    5                    10                    15

Pro Gly Pro

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 13

Asp Glu Val Asp

1

<210> 14

<211> 4

<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> caspase cleavage site  
<400> 14  
Asp Leu Asp Val  
1  
<210> 15  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> caspase cleavage site  
<400> 15  
Asp Glu Ile Asp  
1  
<210> 16  
<211> 4  
<212>  
> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> caspase cleavage site  
<400> 16  
Asp Glu His Asp  
1  
<210> 17  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> caspase cleavage site  
<400> 17  
Asp Lys Ala Asp  
1  
<210> 18  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 18

Asp Ser Phe Asp

1

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 19

Asp Ser Ser Asp

1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 20

Asp Gly Lys Asp

1

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 21

Asp Tyr Asn Asp

1

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 22

Asp Arg Pro Asp

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 23

Asp Asn Val Asp

1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 24

Val Gln Val Asp

1

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 25

Leu Glu Thr Asp

1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 26

Leu Glu His Asp



1  
 <210> 27  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 27  
 Trp Glu His Asp

1  
 <210> 28  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 28  
 Glu Leu Gln Thr Asp Gly

1                    5  
 <210> 29  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 29  
 Arg Ile Glu Ala Asp Ser

1                    5  
 <210> 30  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 30  
 Val Asp Val Ala Asp

1                    5  
 <210> 31

<211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 31  
 Asp Phe Arg Asp  
 1  
 <210> 32  
  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 32  
 Lys Gly Asp Glu Val Asp  
 1 5  
 <210> 33  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 33  
 Arg Gly Asp Glu Val Asp  
 1 5  
 <210> 34  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 34  
 Cys Arg Gly Asp Cys Gly Gly Asp Glu Val Asp  
 1 5 10  
  
 <210> 35  
 <211> 5

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 35  
 Asp Glu Val Asp Arg  
   1                  5  
 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> caspase cleavage site  
 <400> 36  
 Cys Gln Arg Pro Pro Arg Asp Glu Val Asp  
   1                  5                  10  
 <210> 37  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cathepsin cleavage site  
 <400> 37  
 Gly Arg Arg Gly  
  
   1  
 <210> 38  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> cathepsin cleavage site  
 <400> 38  
 Phe Arg Arg Gly  
   1  
 <210> 39  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> cathepsin cleavage site

<400> 39

Ala Arg Arg Gly

1

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cathepsin cleavage site

<400> 40

Lys Gly Arg Arg Gly

1

5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cathepsin cleavage site

<400> 41

Arg Gly Asp Arg Arg Gly

1

5

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 42

Asp Xaa Xaa Asp

1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 43

Leu Xaa Xaa Asp

1

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> caspase cleavage site

<400> 44

Val Xaa Xaa Asp

1