

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 2월 10일 (10.02.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/031150 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 47/68 (2017.01) C07F 7/08 (2006.01)  
A61K 47/54 (2017.01) C07H 19/067 (2006.01)  
A61K 31/7068 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)  
A61K 31/706 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(74) 대리인: 특허법인 아이퍼스 (IPUS PATENT & LAW FIRM); 06178 서울시 강남구 삼성로86길 7, 3층, 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, IT, 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, 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).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/010517

(22) 국제출원일: 2021년 8월 9일 (09.08.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2020-0099238 2020년 8월 7일 (07.08.2020) KR

(71) 출원인: 주식회사 피노바이오 (PINOTBIO, INC.) [KR/KR]; 16506 경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층, Gyeonggi-do (KR).

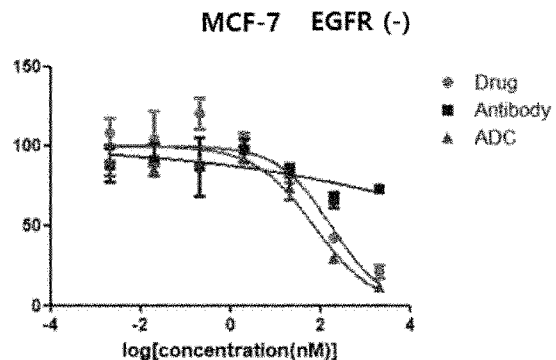
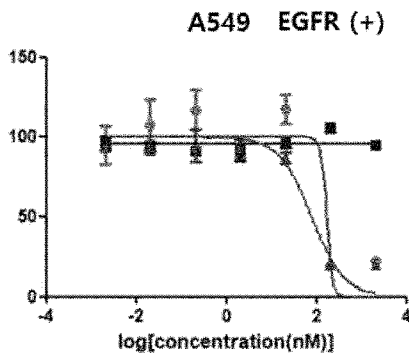
(72) 발명자: 정두영 (JUNG, Doo-young); 16506 경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층, Gyeonggi-do (KR). 이진수 (LEE, Jin-soo); 16506 경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층, Gyeonggi-do (KR). 조현용 (CHO, Hyun-yong); 16506 경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층, Gyeonggi-do (KR). 이병성 (LEE, Byeong-sung); 16506 경기도 수원시 영통구 광고로 156, 8층, Gyeonggi-do (KR).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: CONJUGATE INCLUDING DEOXYCYTIDINE-BASED ANTICANCER AGENT AND SILYL ETHER-CONTAINING LINKER

(54) 발명의 명칭: 테옥시사이티딘계 항암제 및 실릴 에테르 함유 링커를 포함하는 접합체 및 그의 용도



(57) Abstract: The present invention provides a conjugate including: cell-membrane-permeable deoxycytidine activated in a triphosphate form in a cell; and a silyl ether-containing linker of which one end is linked to a hydroxyl group of a drug, wherein the hydroxyl group of the drug linked to the silyl ether group is an acid cleavage site, and in an acidic atmosphere (pH ≤ 7), the silyl ether group linked to the hydroxyl group of the drug is decomposed so that the drug is released in free form.

(57) 요약서: 본 발명은 [세포내에서 삼인산화(triphosphate) 형태로 활성화되는 세포막 투과성 테옥시사이티딘계 항암제]-[일발단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 (silyl ether) 함유 링커]를 포함하는 접합체로서, 실릴 에테르기에 연결된 약물의 수산기가 산절단부위(acid cleavage site)이며, 산성 분위기(pH ≤ 7)에서 약물의 수산기에 결합된 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 방출되는 것이 특징인 접합체를 제공한다.

WO 2022/031150 A1

## 명세서

### 발명의 명칭: 데옥시사이티딘계 항암제 및 실릴 에테르 함유 링커를 포함하는 접합체 및 이의 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 데옥시사이티딘계 항암제 및 실릴 에테르 함유 링커를 포함하는 접합체, 예컨대 항체-약물 접합체 (Antibody Drug Conjugate, ADC) 및 이의 용도에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 암은 소정의 정상 조직으로부터 유래된 비정상 세포 수의 증가, 이들 비정상 세포에 의한 인접 조직의 침윤, 또는 국소 림프절 및 원위 부위로의 악성 세포의 림프성 또는 혈액-감염성(blood-borne) 전파 (전이)를 주된 특징으로 한다. 임상 데이터 및 분자 생물학적 연구는 암이 미미한 전-신생물 (preneoplastic) 변화로 시작되고, 이것이 특정 조건하에서 신생물로 진행될 수 있는 다단계 과정임을 나타낸다. 신생물 병변은, 특히 신생물 세포가 숙주의 면역 감시로부터 벗어나는 조건하에서, 클론성으로 진화하고, 침윤, 성장, 전이, 및 이질성에 대한 능력 증가를 발달시킬 수 있다.
- [3] 의학 문헌에 상세하게 기재되어 있는 매우 다양한 암이 존재한다. 그 예시로는 폐암, 결장암, 직장암, 전립선암, 유방암, 뇌암, 혈액암 및 장암이 포함된다. 암의 발생률은, 전반적인 대중의 고령화, 새로운 암의 발병, 및 민감성 집단(예컨대, AIDS에 감염되거나 일광에 과도하게 노출된 사람들)이 증가함에 따라 계속 상승하고 있다.
- [4] 최근의 암 요법은 환자에서 종양성 세포를 근절하기 위한 수술, 화학요법, 호르몬 요법 및/또는 방사선 치료를 포함할 수 있다.
- [5] 그러나, 암의 치료에 대한 선택은 제한적이다. 예를 들어, 혈액암(예컨대, 다발성 골수종)의 경우에, 특히 통상적인 화학요법이 실패하고 골수 이식이 선택 사항이 아닌 경우에, 이용 가능한 치료 선택은 거의 없다. 따라서 암 환자의 치료에 사용될 수 있는 새로운 방법 및 조성물에 대한 엄청난 수요가 존재한다.
- [6] 암의 치료에 사용할 수 있는 다양한 화학요법제는 DNA 복제 및 수반되는 세포 분열을 방지하기 위해, 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 전구체의 생합성을 직접 또는 간접적으로 억제하여, DNA 합성을 억제함으로써 작용한다.
- [7] 암세포를 포함한 모든 세포는 대사의 과정을 거치는데 이를 통해 DNA를 생산하거나 세포를 분열시켜 성장을 유도하는 기능을 가지고 있다. 이 대사의 과정이 암세포는 정상 세포와 비교하면 매우 높게 나타나는데 이를 화학 요법을 통해 억제할 수 있다.
- [8] Antimetabolite의 일종인, Nucleoside analogue 그룹은 몇몇 잘 알려진 세포독성 항암제들이다. 사이티딘(cytidine)의 analogue으로써 DNA polymerase를 억제하는

Cytarabine은 cytosine arabinoside triphosphate에 빠르게 개입하여 세포의 S phase 때 DNA의 손상을 유도하는 기전을 가지고 있으며, 비호지킨 림프종, 급성 림프구성 백혈병 및 급성 골수 백혈병을 치료하는 데 사용되고 있으나 골수장애를 일으킬 수 있는 부작용을 가지고 있다. Thymidine의 analogue인 Fludarabine은 ribonucleotide reductase와 DNA polymerase의 활성화에 관여하여 DNA 합성을 억제하는 기전을 가지고 있으며, 급성 골수 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병을 치료하는 데 사용되고 있으나 중추신경에 독성이 있으며 면역 T세포의 감소를 유발하고 골수 억제를 유발하는 부작용을 가지고 있다. 사이티딘(cytidine)의 또 다른 analogue로 Cytarabine과 같이 DNA polymerase를 억제하는 Gemcitabine은 DNA 복제 시 핵산의 염기를 치환하여 세포 사멸을 유도하거나 ribonucleotide reductase의 기능을 억제하여 DNA의 복제나 재건을 막는 기전을 가지고 있는데, 비소세포폐암, 췌장암, 방광암, 유방암 등 발병 빈도가 높은 암종에 다양하게 사용되고 있다. Gemcitabine 역시 골수장애를 일으키는 부작용을 가지고 있다. Uracil의 analogue로써 잘 알려진 5-FU와 prodrug인 Capecitabine도 이 계열에 속하는데 thymidylate synthase methylates deoxyuridine monophosphate (dUMP)를 thymidine monophosphate (dTMP)의 형태로 변경시키는 thymidylate 합성효소를 억제하는 기전을 가지고 있으며, 대표적인 대장암 치료제로 사용되고 있지만, 유방암, 췌장암, 피부암, 두경부암의 치료에도 사용되고 있다. 주요 부작용으로는 골수 억제 및 심장 효소치 증가로 인해 심장 기능에 문제를 일으키기도 한다.

[9]

[10] 우리 몸의 유전자는 세포별로 동일한 염기 서열을 가지고 있지만, 우리 몸의 세포들은 특정 조직에 따라서 서로 다른 유전자만을 발현하며 그 외의 유전자들은 발현시키지 않는 식으로 매우 정밀하게 조절되고 있다.

[11] 이러한 후천적 조절을 수행하는 작용 기전을 후생유전학 작용기전 (Epigenetic regulation)이라 하며, 이 기전은 (1) DNA의 변화, (2) DNA와 물리적으로 결합하여 크로마틴 구조를 이루는 히스톤의 변화, (3) 기타 크로마틴 구조를 이루는 다른 성분들의 변화로 이루어져 있다(도 1).

[12] 이 중 DNA 메틸화는 가장 원천적인 후생유전학적 작용기전으로서 Gene Body, Promoter, Enhancer 등 다양한 유전자의 구성요소 중에서 CpG 서열의 C의 염기를 메틸화하여 유전자의 발현 정도를 조절한다. 일반적으로 CpG 서열은 Promoter 지역에 많이 존재하며, Promoter에 CpG 메틸화가 많이 진행된 유전자는 발현이 잘 되지 않는다. 반대로 CpG 메틸화가 덜 진행된 유전자는 활발하게 발현된다(도 1).

[13] 우리 몸에서 DNA 메틸화는 다음의 두 단계로 이루어지는 것으로 알려져 있다: (1) DNA 메틸 트랜스퍼라제 (DNA methyltransferase, DNMT) 3A 또는 3B가 조직의 분화 및 발생 단계에서 de novo DNA를 메틸화하여 각 조직별로 유전자 발현의 패턴을 결정함; (2) DNMT1이 조직을 구성하는 각 세포들이 이미 확립한

DNA 메틸화 패턴을 충실하게 복제하여 DNA를 메틸화함.

- [14] 일반적인 세포에서 DNA 메틸화가 많이 진행된 영역에는 DNMT1이 다른 단백질들, 특히 유전자 발현을 억제하는 히스톤 단백질 및 기타 Repressor 단백질들과 결합하여 유전자 발현이 어려운 구조를 형성하며 이를 통하여 유전자 발현을 억제한다. 반대로 DNA 메틸화가 많이 진행되지 않은 경우에는 유전자 발현이 용이한 구조를 형성하여 유전자 발현을 촉진한다. DNA 메틸화는 이처럼 우리 몸의 각 세포들이 정해진 기능을 잘 수행하도록 세포마다 정해진 유전자 조합을 원활하게 발현하게 하는 데 중요한 역할을 담당한다. 따라서 이들 기능에 이상이 생기면 다양한 질병의 발생으로 이어지게 된다.
- [15] 세포가 성장/분열/생존 유지 과정에서 메틸화 패턴을 그대로 유지해주는 Maintenance DNA methylation machinery인 DNMT1의 활성화를 저해하면 과메틸화 패턴의 해소가 가능하며, 이로 인해 일종의 혈액암인 MDS/AML의 치료 효능을 가져올 수 있는 것이 확인되어 있다.
- [16] 기존 상용화된 2종의 DNMT1 저해제 Dacogen (Decitabine), Vidaza (Azacytidine)는 노령 환자군의 MDS/AML 치료를 위한 표준치료제로서 사용되어 오고 있으나 부족한 효능, 높은 독성, 투여 경로 (IV 또는 피하주사)에 따른 사용 편의성의 문제 등 여러 문제가 지적되었다.
- [17] Decitabine/Azacytidine 두 성분 모두 세포내에서 Decitabine triphosphate 형태로 활성화된 후 DNA에 incorporation되고, 이후 DNMT1 효소를 trapping하여 DNA-DNMT1 covalent adduct를 형성한다. 이후 생성된 adduct의 분해를 통한 DNA damage repair 수리 과정에서 발생하는 다양한 세포 내 신호전달경로에 의하여 과메틸화 제거 및 각종 항암효능을 보이는 기작을 가지고 있으나, (1) Decitabine/Azacytidine 두 성분이 모두 우리 몸에 존재하는 Cytidine Deaminase에 의한 대사에 취약하여 PK profile이 불안정한 문제로 효력이 제한되는 단점이 있고, (2) DNA-DNMT1 adduct의 형성을 통하여 DNA 손상을 주기 때문에 암세포만이 아닌 골수/위장관 점막 등 우리 몸의 정상 조직에도 손상을 주는 문제가 있어 사용량이 제한됨에 따라 항암효력에 한계가 있고, (3) 초기치료 이후 살아남은 암세포에서는 DNA-DNMT1 adduct 형성 후 제거 과정이 과활성화되면서 항암효능이 억제되는 문제가 있어 내성 발생에 취약한 모습을 보이는 등의 문제를 가지고 있다.
- [18] 4'-티오-5-아자-2'-디옥시사이티딘(4'-thio-5-aza-2'deoxyctidine, Aza-T-dC)는 DNA 메틸 트랜스퍼라제 1(DNMT 1) 저해제로서 세포 내에서 강한 DNMT 제거 내지 저해 활성을 보이고 있으나, 혈액암을 비롯한 다양한 동소이식(orthotopic) 동물 모델들에서 높은 독성을 보이는 것으로 확인되어 인간에게 활용 가능한 항암 치료제 용도로의 개발에 난항을 겪고 있다.
- [19] 특히, Aza-T-dC을 포함하여 데시타빈(Decitabine), 아자사이티딘(Azacytidine), 젬시타빈(Gemcitabine) 또는 사이타라빈(Cytarabine) 등과 같은 데옥시사이티딘계 항암제들은 동일한 양을 투여하더라도 어떤 개인에게는

최적의 투여 용량에 해당하는 것이 다른 개인에게는 치료 효과를 보일 수 없는 용량이 되고, 또다른 개인에게는 심각한 독성을 일으키는 용량이 되어 치료 범위(therapeutic window)가 매우 좁아지게 되는 문제점을 가지고 있다.

[20]

[21] 한편, 항암 화학요법이란 약물, 즉 항암제를 사용하여 암을 치료하는 것으로 전신에 퍼져있는 암세포에 작용하는 전신적인 치료 방법이다.

[22]

항암제에는 DNA와 RNA의 합성 과정과 유사분열을 방해하거나, DNA 분자 자체에 해로운 영향을 미쳐서 암세포를 죽인다. 그러나, 항암 화학요법은 암세포뿐만 아니라 정상 세포 중 분열과 증식이 활발한 부분인 위장관의 점막, 머리카락, 골수, 생식계의 세포들에게도 영향을 미친다. 건강한 세포의 손상은 항암 화학요법 부작용의 원인이 될 수 있다. 이와 같이 거의 모든 화학요법제는 독성이며, 화학요법은 심한 메스꺼움, 골수 저하 및 면역억제를 비롯한 중요하고 종종 위험한 부작용을 야기한다. 또한, 화학요법제의 조합을 투여하는 경우에도, 많은 종양세포는 화학요법제에 내성이 있거나 내성이 생긴다. 실제로, 이들 제제가 특정 치료에 사용되는 약물의 기전과는 다른 기전에 의해 작용하는 경우에도, 치료 프로토콜에 사용되는 특정 화학요법제에 내성이 있는 이들 세포는 종종 다른 약물에도 내성이 있음을 입증한다. 이 현상을 다약제 내성이라고 한다. 약물 내성으로 인해, 다수의 암은 표준 화학요법 프로토콜에 대해 난치성인 것으로 판명된다.

[23]

[24]

항암 임상에 사용되는 대부분 화학요법 항암제의 효능은 세포주기를 타겟으로 하므로 독성이 암세포의 증식 정도에 의존적이다. 또한, 임상치료 효과를 얻기 위해 일반적으로 최대 허용량 (maximum tolerated dose) 근처에서 사용되고 있으며, multidrug therapy가 암치료의 표준 치료요법이 되었다. 그러나, 항암제는 빠르게 증식하는 세포를 죽일 뿐, 정상 세포와 종양 세포 또는 종양 조직을 차별화하지 못한다. 이러한 집중적인 화학 요법으로 인한 non-tumor specific 전신 독성 (systemic toxicity)과 세포독성 때문에 항암제의 therapeutic index와 therapeutic window가 낮을 뿐 아니라 암 치료에서 세포독성 약물의 결점이기도 하다. 또한, 장기 치료 시 항암제에 대한 내성을 야기시킬 수 있어 세포독성 약물이 암 세포만 타겟팅하여 사멸시키는 향상된 치료요법이 절실히 요구되고 있다.

[25]

[26]

세포독성 약물과는 달리, 종양 세포의 표면에 있는 특정항원에 결합하는 단클론 항체는 종양에 특이적으로 결합하므로 non-tumor specific 전신 독성을 낮추는 대안 치료요법이다. 실제로, expression profiling 연구를 통해 암 세포의 표면에 우선적 또는 독점적으로 발현되는 항원들이 확인되었고 종양과 관련된 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 제작 및 생산할 수 있으며, 이러한 항체가 종양 세포와 결합되면 cell-killing 효능을 발휘한다. 현재까지 암치료를

위해 FDA 승인받은 8개의 단클론 항체로는 Rituxan (rituximab), Herceptin (trastuzumab), Campath (alemtuzumab), Erbitux (cetuximab), Avastin (bevacizumab), Vectibix (panitumumab), Prolia/Xgeva (denosumab), 그리고 Arzerra (ofatumumab)가 있다.

- [27] 항체는 타겟 항원에 아주 특이적으로 결합하며, 종양 세포에 있는 항원에 결합하였을 시 기능이 활성화되고 혈액 순환 동안 독성을 나타내지 않으며 pharmacokinetic에도 유리한 장점을 보유하고 있다. 이처럼 치료용 약물로서 항체는 세포독성 약물보다 더 유리한 장점을 가지고 있지만, 소수의 항체만이 암 치료용으로 유용한 이유는 대부분의 항체가 암세포를 죽이는 효능이 그리 효율적이지 않기 때문이다. 대부분 기존의 항체 (naked mAb)는 온화한 항종양 활성(modest antitumor activity)을 갖고 있어 종종 항암제와 함께 사용된다.
- [28]
- [29] 항체-약물 접합체 (ADC)는 일종의 특정 세포를 표적화할 수 있는 치료 면역접합체로서, 항체의 장점 (specificity, non-toxicity in circulation과 pharmacokinetics)을 최대한 활용하여 약물이 구체적으로 암 세포만 타겟팅하는데 초점을 맞춘 테크놀로지이다.
- [30] ADC는 약물, 단클론 항체, 그리고 항체와 약물을 연결하는 링커 (linker)를 포함한 세 가지 구성 요소로 구성되어 있으며, ADC 테크놀로지는 암 세포의 표면에 발현된 특정 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 약물을 종양세포에 전달하는 방법이다 (도 4). 대부분 ADC의 세포 내 도입은 clathrin-coated pit 기능으로 진행된다. 세포 내로 이동된 ADC는 clathrin에서 떨어지고 세포 내 다른 vesicles와 융합한 다음 endosome-lysosome 경로로 진행된다. 이어서 endosomes의 산성 환경에 있는 proteases가 링커를 절단하고, 활성화(active)된 “free”약물은 lysosomal membrane을 통과하여 cytoplasm로 이동한 후 약물의 molecular 타겟에 결합함으로써 종양세포의 세포주기는 정지되고 apoptosis로 인해 암세포가 죽게 된다. 이중 일정 양의 약물은 세포에서 수동적 확산 (passive diffusion) 또는 능동적으로 수송되거나(active transport), 또는 죽은 세포를 통해 세포 밖으로 유출된다. 이때, 유출된 약물이 세포막 투과성을 지니면 주변 세포에도 들어가 소위 by-stander cell-killing 현상이 일어날 수도 있다.
- [31] 링커는 혈류에 안정(stable)하여 약물이 항체로부터 분리되는 것을 막아 타겟에 도달할 때까지 전구약물(prodrug) 상태로 유지되어 정상적인 조직에 입히는 피해를 최소화해야 한다. 또한 ADC는 항체가 약물과 결합되기 전의 항체와 같은 친화력을 유지해야 한다. 즉, 항체에 결합된 약물로 인해 항체-항원 결합에 지장이 없어야 한다. 타겟 세포에 결합한 후에는, receptor-mediated endocytosis라는 프로세스에 의해 ADC는 세포 내로 내재화된다. 이때 충분한 농도의 활성약물이 세포 내로 들어가야 하지만, 항원-항체 complex에 의한 내재화(internalization) 과정은 일반적으로 비효율적이고 세포 표면에 있는

항원의 수도 일반적으로  $< 1 \times 10^5$  receptors/cell로 제한되어 있어서, 매우 강력한 약물을 사용하여 낮은 농도의 약물에서도 충분히 종양 세포를 죽일 수 있어야 한다. 따라서 항체에 결합되어 ADC로 사용될 약물은 보편적으로 사용되는 항암제보다 100-1000배 이상 세포독성이 있는 약물을 사용한다.

[32]

[33] 항체 및 약물 모이어티는 치료 효능을 증가시키는 세포내에서 분리가능한 링커(linker)를 통해 연결된다. ADC에서 일반적으로 사용되는 링커로는 acid-labile한 hydrazones, protease-labile한 peptides, 그리고 reducing agent에 민감한 disulfides가 있다.

[34]

문헌 [Trouet 등 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:626-629 (1982))]은 약물과 항체 모이어티에서 특이적 펩타이드 링커를 사용하는 장점을 나타내고, 이는 리소좀에서 절단되어 온전한 약물을 방출한다. 특히, 온화한 산-절단성 링커, 예컨대 하이드라존을 함유하는 것을 사용하여 제조된 MAb-화학치료 약물 접합체가 종양 내의 pH가 종종 정상 생리적 pH보다 더 낮다는 관측에 기초하여 개발되었다 일부 경우에서, MAb-화학치료 약물 접합체는 화학치료 약물과 MAb 사이의 환원적으로 분해성인 힌더드 디설파이드 결합으로 제조되었다 문헌[MAb (Liu 등, Proc Natl Acad Sci USA 93: 8618-8623 (1996))].

[35]

다른 절단성 링커는 Trouet 등의 1 내지 4개의 아미노산을 포함하는 리소좀 분해성 펩타이드 스페이서와 유사한 카텝신 B-분해성 디펩타이드 스페이서, 예컨대 Phe-Lys 또는 Val-Cit를 수반하고, 이는 약물과 디펩타이드 사이의 콜랩시블 스페이서(collapsible spacer)에 추가로 혼입된다 (문헌 [Dubowchik, 등, Bioconjugate Chem. 13:855-869 (2002); Firestone 등, 미국특허 제6,214,345 B1; Doronina 등, NatBiotechnol. 21: 778-784 (2003)]). 탐구되는 또 다른 절단성 모이어티는 항체 및 화학치료 약물 사이의 링커로 혼입되는 에스테르 연결이다. Gillimard 및 Saragovi는 파클리탁셀의 에스테르가 항-rat p75 MAb, MC192, 또는 항-인간 TrkA MAb, 5C3에 접합되는 경우, 접합체는 표적-특이적인 독성을 나타내는 것으로 밝혀내었다. (문헌 [Gillimard and Saragovi, Cancer Res. 61:694-699 (2001)]).

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

[36]

본 발명은 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제가 혈액 순환 동안 독성을 나타내지 않으며 정상 세포와 종양 세포 또는 종양 조직을 차별화할 수 있게 하고 이로 인해 최대 허용량 (maximum tolerated dose)을 높여 임상치료 효과를 얻기 위해, [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]를 사용하고자 한다. 또한, 이러한 약물-링커의 조합을 약물-링커-전달체 포함 접합체, 바람직하게는 ADC에 사용하고자 한다.

[37]

ADC에 사용되는 항체가 그 자체가 치료항체가 아니거나, 충분한 농도의

활성약물이 세포 내로 농축되어야 하지만 항원-항체 complex에 의한 내재화(internalization) 과정은 일반적으로 비효율적이므로, 활성약물이 낮은 양으로 암세포에 들어가면 내성이 발생할 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 (1) 강력한 데옥시사이티딘계 항암제 사용과 함께, (2) 세포 밖에서 링커와 페이로드가 분리되어 작동하는 비내재화 ADC가 될 수 있도록 약물과 링커의 선택 및 온전할 약물을 방출할 수 있는 산민감성 분해부위 설계가 필요한데, 이들 조건들을 모두 충족하는 [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커] 포함 접합체를 제공하고자 한다.

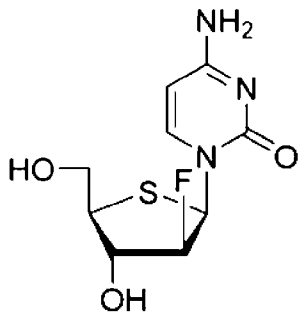
**기술적 해결방법**

[38] 본 발명의 제1양태는 [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]를 포함하는 접합체로서, 실릴 에테르기에 연결된 약물의 수산기가 산절단부위(acid cleavage site)이며, 산성 분위기(pH ≤ 7)에서 약물의 수산기에 결합된 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 방출되는 것이 특징인 접합체를 제공한다.

[39] 이때, 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제는 바람직하게는, 화학식 1의 thio-FAC 또는 화학식 2의 aza-Td-Cyd와 같이 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 뉴클레오사이드(Nucleoside) 유도체일 수 있다.

[40] [화학식 1]

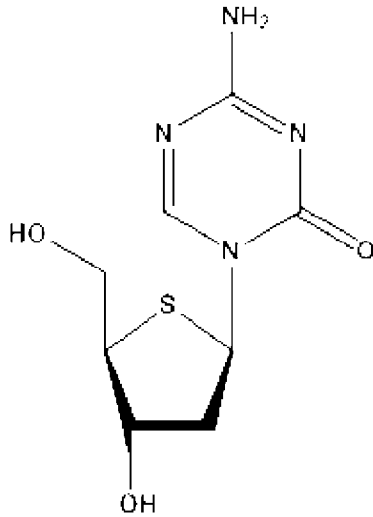
[41]



[42] [화학식 2]



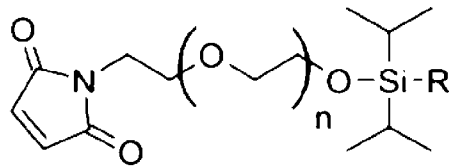
[43]



[44] 이 때, 제1양태의 접합체에서, [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]는 하기 화학식 3으로 표시되는 전구약물 또는 이의 유도체 또는 이로부터 유래된 것일 수 있다.

[45] [화학식 3]

[46]



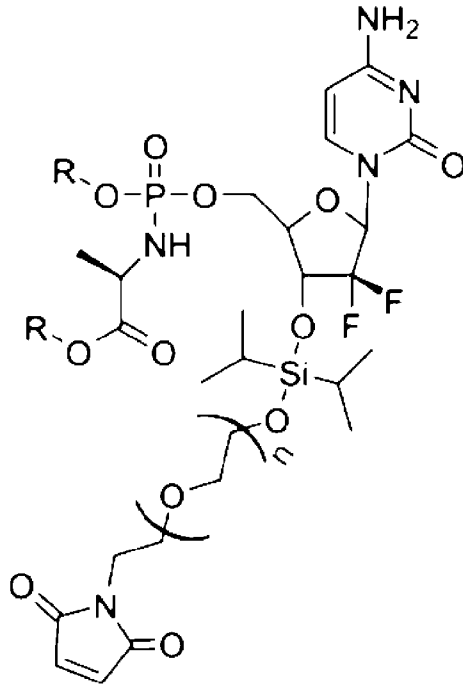
[47] 여기서,  $n=1\sim 10$ , 바람직하게는  $5\sim 10$ , 더욱 바람직하게는  $7\sim 8$ 이고;

[48] R 은 데옥시사이티딘계 항암제, 바람직하게는 aza-Td-Cyd 또는 thio-FAC임.

[49] 또한, 제1양태의 접합체에서, [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]는 하기 화학식 4로 표시되는 전구약물 또는 이의 유도체 또는 이로부터 유래된 것일 수 있다.

[50] [화학식 4]

[51]



[52]

여기서, n=1~10, 바람직하게는 5~10, 더욱 바람직하게는 7-8임.

[53]

제1양태의 접합체는 (i) [약물]-[링커] 접합체이거나, (ii) [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체(carrier)]를 구비한 접합체일 수 있다. 예컨대, [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체]를 포함하는 접합체는 항체-약물 접합체 (ADC)일 수 있다.

[54]

[55]

본 발명의 제2양태는 제1양태의 항체-약물 접합체(ADC); 및 그의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[56]

[57]

본 발명의 제3양태는 질환의 치료를 필요로 하는 인간 포함/비포함 동물에게 유효량의 제2양태의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 포함/비포함 동물에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[58]

[59]

이하, 본 발명을 설명한다.

[60]

“접합체(Conjugate)”란, 2종 이상이 다른 화합물이 공유결합하여 형성된 것(entity)을 의미한다.

[61]

“전구약물(prodrug)”이란, 해당 기술 분야로 이용되고 있는 의미를 가지고 있다. 예를 들면, 생리 활성 물질(physiologically active substance) 또는 치료적 활성 유기 화합물(therapeutically active organic compound)을 화학적으로 수식하고, 생체 내에서 효소적 또는 그 외의 조건하에서 모 화합물(parent compound)을 유리 혹은 방출하도록 설계된 화합물을 의미한다. 전구약물은 투여후에 생체내에서 목적으로 하는 화합물로 변화된다. 유용한 약물임에도 불구하고 부작용, 안정성, 용해성, 흡수성, 작용시간 등에서 적합치 않는 성질을 가지고 있는 것에 화학적 수식을 가해서 임상사용 가능하게 한다.

- [62] 본 발명은 테옥시사이티딘계 약물의 유도체 및/또는 링커의 유도체를 포함한다. 이때, "임의로 치환된", "치환된" 또는 그의 변형은 1개 이상의 치환기, 예를 들어 1, 2 또는 3개로의 다중 치환도를 포함한 임의적인 치환을 나타낸다. 상기 어구는 본원에 기재 및 도시된 치환의 중복으로서 해석되어서는 안 된다. 예시적인 임의적인 치환기는 아실, C1-C6알킬, 술폰닐, 아미노, 술폰아미드, 술폭시드, 알콕시, 시아노, 할로, 우레아, 에스테르, 카르복실산, 아마이드, 히드록시, 옥소, 및 니트로를 포함한다.
- [63]
- [64] 도 4의 A 경로로 도시된 바와 같이, 전통적인 ADC는 세포 표면의 타깃 수용체와 결합하여 내재화되고 엔도솜-리소솜 경로를 거쳐 페이로드를 방출하는 구조이다. 반면에 도 4의 B 경로로 도시된 바와 같이, 비내재화 ADC는 세포 밖에서 링커와 페이로드가 분리되어 작동한다.
- [65] 전통적인 ADC는 타깃 수용체를 통해 세포막을 통과하고 이후 엔도솜-리소솜 트래피킹을 통해 페이로드를 방출하는 과정이 중요하나, 이러한 과정이 생각만큼 효율적이지 않다. 또한, 항체는 치료항체인 것이 바람직하나, 대부분의 항체가 암세포를 죽이는 효능이 그리 효율적이지 않기 때문에 소수의 항체만이 암 치료용으로 유용하다.
- [66] 따라서, 본 발명은 세포막 투과성 테옥시사이티딘계 항암제를 충분한 농도로 세포 내 전달하기 위해, 도 4의 A 경로 및 B 경로를 모두 활용하기 위해서, 즉 전형적인 ADC의 작용기전에 따라 항원-항체 complex가 세포안으로 내재화(internalization)되어 리소솜(lysosomes)에 의해 링커가 분해되어 유리형 약물이 방출되는 것에 더하여, [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]를 사용하여, 암 주변 산성 분위기( $\text{pH} \leq 7$ )에서 약물과 링커의 연결부위인 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 세포밖에서 방출되고, 유리된 세포막 투과성 테옥시사이티딘계 항암제가 세포막 투과를 통해 세포 내로 농축시키는 것이 특징이다.
- [67] 본 발명의 [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴기 함유 링커]는 온화한 산-절단성 링커로서, 정상 생리적 pH 보다 낮은 종양 내 pH에서 일부 온전한 유리형 약물을 분리가능하게 하고, 도 6에 도시된 바와 같이 혈류에 안정(stable)하여 약물이 항체로부터 분리되는 것을 막아 타겟에 도달할 때까지 전구약물 (prodrug) 상태로 유지되어 정상적인 조직에 입히는 피해를 최소화할 수 있어 치료 범위(therapeutic window)를 확장시킬 수 있다. 따라서, 원하는 임상치료 효과가 발휘될 수 있도록 최대 허용량 (maximum tolerated dose)을 높여, 세포 안으로 잘 들어갈 수 있는 페이로드로서 매우 강력한 테옥시사이티딘계 항암제를 고용량으로 투여하여, 암 세포 주변으로 타겟화한 후 고농도로 세포 내 농축시켜 종양 세포의 내성발생 작용기전을 억제할 수 있다.
- [68] 또한, 본 발명에 따른 약물-링커의 조합을 사용하는 경우 내재화가 잘 되지 않은 수용체도 타겟할 수 있고 종양미세환경 내 유력 타겟으로 주목받고 있는

종양 기질(tumor stroma)도 공략할 수 있다.

- [69] 본 발명은 [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴기 함유 링커]를 포함하는 ADC가 도 4의 A 경로 및 B 경로 모두를 통해 작동한다는 것을 확인하고 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다(표 3, 도 10).
- [70] 즉, 본 발명은 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제가 (1) 정상 조직에서도 약물이 작용함에 따라 충분한 치료 범위(therapeutic window)을 확보할 수 없는 안정성 문제를 상당히 개선하여 원하는 임상치료 효과가 발휘될 수 있도록 최대 허용량 (maximum tolerated dose)을 높여 고용량으로 투여가 가능하면서 (2) 내성 발생 기전이 작동되지 않도록 세포내 충분히 농축되어 적절한 임상 치료 효능과 통제된 치료 독성을 유지하도록, [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]와 같은 신규 링커-페이로드 조합을 제공하는 것이 특징이다.
- [71]
- [72] [뉴클레오사이드 유도체의 항암 기전]
- [73] Nucleoside 유도체는 우리 몸을 구성하는 세포의 가장 핵심 기능 (복제/분열을 통한 생명 기능 유지)을 수행하는 DNA와 RNA의 구성 성분과 매우 유사한 구조의 유기 화합물로서 항암화학요법/항바이러스 화학요법 등에서 중심적인 역할을 수행하고 있다.
- [74] 1960년대 이후 Cytarabine, Clofarabine, Fludarabine, 5-Fluorouracil (Capecitabine 포함), Gemcitabine, Decitabine, Azacytidine 등 다양한 Nucleoside계 항암제가 상용화되었고, 이중 다수의 항암제들이 WHO의 Essential Medication List에 속할 정도로 주요 항암제 Class로 분류되고 있다.
- [75] Nucleoside계 항암제는 DNA Incorporation 이후 다양한 작용기전 (DNA 합성/전사 저해, DNA 손상 유도 또는 DNMT1 등 DNA processing 관련 효소 저해를 통한 약리효능 발현)을 통해 항암 효능을 발휘한다(도 2).
- [76] Nucleoside계 항암제 투여 초기에는 DNA에 항암제가 Incorporation된 이후 충분한 약리 효능이 발휘되어 암세포가 효율적으로 사멸하는 모습을 보인다.
- [77] 그러나, Nucleoside계 항암제는 DNA Incorporation 시 정상적인 DNA 구성 성분과 맞지 않는 Base pair를 형성하여 DNA에 이상 구조를 발생시키며, 이를 DNA Damage repair 방법 중 BER (Base Excision Repair)가 인지하여 DNA 손상 복구가 진행된다 (도 3).
- [78]
- [79] [세포내에서 삼인산화(triphosphate) 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘(Deoxycytidine)계 항암제]
- [80] 본 발명에서, 데옥시사이티딘(Deoxycytidine)계 항암제는 암 주변 산성 분위기(pH ≤ 7)에서 약물의 수산기에 결합된 실릴 에테르기가 분해되어 유리형

약물로 세포막에서 방출되고, 세포막 투과 후 세포 내 효소에 의해 삼인산화(triphosphate) 형태로 활성화되는 것이다.

[81] 따라서, 본 발명에서 사용되는 데옥시사이티딘계 항암제는 링커 분해시 유리형 약물로 방출되고, 유리형 약물이 세포 안으로 잘 들어갈 수 있는 세포막 투과성 페이로드이다(표 3 및 도 10).

[82] 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제는 종양 세포와 정상 세포 간 대사 차이로 인해 세포막이 달라 정상 세포 보다 종양 세포의 세포막 투과가 더 유리하여, [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴기 함유 링커]와 함께 조합 사용하면, 암세포에 표적화된 후 암 주변 산성 분위기( $\text{pH} \leq 7$ )에서 약물과 링커의 연결부위인 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 데옥시사이티딘계 항암제가 암세포 내부로 용이하게 투과되어 세포내 고 농축이 가능하여 세포 사멸 효과를 극대화할 수 있다.

[83]

[84] 데옥시사이티딘(Deoxycytidine, dC)은 2-데옥시리보오스(2-deoxyribose)와 사이토신(cytosine) 염기로 구성되어 있는, 데옥시 리보뉴클레오사이드(deoxyribonucleoside)이다. 리보뉴클레오사이드 사이티딘과 유사하지만, 하나의 히드록실기가 2' 위치에서 제거된 것이다.

[85] 데옥시사이티딘 (dC)은 데옥시사이티딘 키나제(Deoxycytidine kinase, dCK)에 의해 C-5에서 인산화될 수 있고, DNA 전구체인 티아민 뉴클레오티드로 전환될 수 있다.

[86]

[87] 암 또는 바이러스 감염의 화학 요법에 사용되는 데옥시사이티딘계 화합물은 활성화되기 위해 세포 효소에 의한 인산화가 필요하다. 이때 데옥시사이티딘 키나아제(deoxycytidine kinase, dCK)에 의한 데옥시사이티딘계 화합물의 인산화는 화합물의 활성화에서 속도-제한 단계인 것으로 간주되고 이인산염(diphosphate) 또는 삼인산염(triphosphate)으로의 추가 인산화가 일어난다.

[88] 따라서, 본 발명의 데옥시사이티딘계 항암제는 삼인산화(triphosphate) 형태로 활성화되기 위해 세포 내 데옥시사이티딘 키나아제(deoxycytidine kinase, dCK)에 의해 인산화가 가능한 것일 수 있다.

[89]

[90] 본 발명에서 실릴 에테르 함유 링커로 수식하고자 하는 데옥시사이티딘계 항암제의 비제한적인 예는 decitabine, azacytidine, gemcitabine, citarabine, troxacitabine, tezacitabine, thiarabine, 5-aza-4'-thiothymine, 4'-thioFAC, NUC-1031(gemcitabine-phosphoramidate) 또는 이들의 조합일 수 있다.

[91]

[92] [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]

[93] ADC에서 강력한 항종양 활성 및 허용되는 치료 지수 둘 다를 얻기 위해, 여러

설계 측면이 최적화될 수 있다. ADC에 적용될 세포독성 약물은 potency가 매우 강하고, 항체에 접합(conjugation)할 수 있는 적합한 기능 기(functional group)와 수용성, 그리고 항체에 사용되는 formulation buffer에도 안전성을 유지하는 링커가 연결되는 것이 중요하다. 특히, 링커의 화학 구조는 ADC의 효능 및 안전성 둘 다에 대해 유의한 영향을 미칠 수 있다. 올바른 링커를 선택하는 것은 암 세포의 의도된 세포 구획에 대한 적절한 약물 전달에 영향을 미친다.

- [94] 산민감성 링커라고 하더라도 결합의 세기 또는 민감한 정도의 차이에 따라 세포 밖에서 약물 방출(drug release)시킬 수도 있다.
- [95] 본 발명은 테옥시사이티딘계 약물에 대해 상기 조건들을 충족하는 온화한 산민감성 링커로 일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커를 사용하는 것이 특징이다.
- [96] 따라서, 본 발명에 따라 [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 테옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]-[암세포 표적 전달체(carrier)]를 구비한 접합체는 암세포의 항원을 표적화하는 암세포 표적 전달체에 의해 암세포로 표적화된 후,
- [97] (a) 암 주변 산성 분위기( $\text{pH} \leq 7$ )에서 약물과 링커의 연결부위인 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 세포밖에서 방출되고, 세포막 투과 후 세포 내 효소에 의해 삼인산화 형태로 활성화되고,
- [98] (b) 선택적(optionally)으로, 세포안으로 내재화(internalization)되어 리소좀(lysosomes)에 의해 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 방출된 후 세포 내 효소에 의해 삼인산화 형태로 활성화될 수 있다.
- [99]
- [100] 산-절단 가능한 링커는 임상 ADC에서 처음 사용되었지만 구조적 다양성(예: 히드라존 및 탄산염)은 여전히 제한적이며 안정성은 일반적으로 불충분하다(도 6).
- [101] 본 발명의 링커 내 실릴 에테르 기는 약물의 수산기(-OH)에 연결될 수 있고, pH 7.4에서는 안정하나, pH 4.5에서는 끊어지면서 활성화형 약물을 방출할 수 있다.
- [102] 따라서, 본 발명의 [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴기 함유 링커]는 혈류에 안정(stable)하여 약물이 항체로부터 분리되는 것을 막아 타겟에 도달할 때까지 prodrug상태로 유지되어 정상적인 조직에 입히는 피해를 최소화할 수 있다(도 6). 또한, 본 발명의 [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴기 함유 링커]는 온화한 산-절단성 링커로서, 정상 생리적 pH 보다 낮은 종양 내 pH에서 일부 온전한 유리형 약물을 분리가능하다.
- [103]
- [104] 약물의 항암 효율, 혈류에서 불안정하여 정상 세포에도 세포독성을 발휘하는 부작용 정도, 세포 안/밖 중 어디에서 약물 분리가 일어나는 것이 유리한지를 복합적으로 고려하면, 본 발명의 [세포내에서 삼인산화(triphosphate) 형태로 활성화되는 세포막 투과성 테옥시사이티딘계 항암제]에는 carbonate에 비해서

pH에서 상대적으로 훨씬 안정적인 링커인 실릴 에테르를 사용하는 것이 바람직하다.

[105] 요컨대, 본 발명의 [일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴기 함유 링커]는, 단독 사용시 치료의 창이 좁은 문제가 있으나, [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체(carrier)]를 구비한 접합체의 최대 허용량 (maximum tolerated dose)을 높여, 고 용량으로 투여 가능하게 할 뿐만 아니라 강력한 세포독성 및/또는 내성 발생기전을 억제할 수 있는 항암제를 페이로드로 사용할 수 있게 하고, 강력한 세포독성 및/또는 내성 발생기전을 억제할 수 있는 항암제의 세포 내 고농축을 강화하여 강력한 세포 사멸 효능을 발휘할 뿐만 아니라 미연에 암세포의 내성 발생 기전이 작동되기 전에 세포 사멸을 유도할 수 있다.

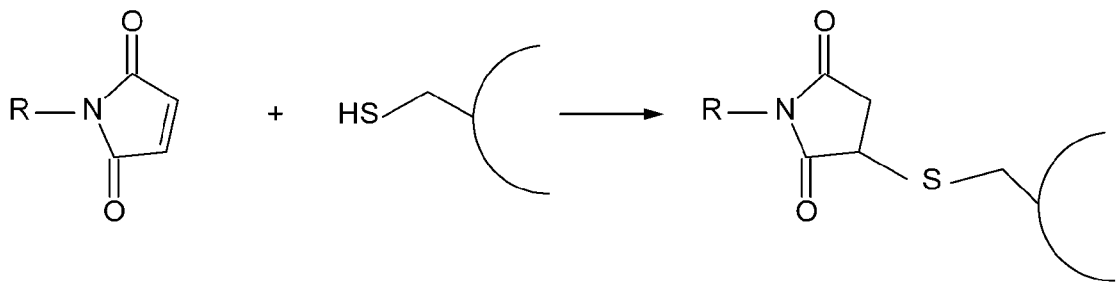
[106]

[107] 본 발명에 따라 일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커는 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 스페이서 및 말레이미드(maleimide)기를 포함하는 것일 수 있다.

[108] 말레이미드(maleimide)기는, thiol-maleimide “click” reaction을 통해 항체와 같은 전달체의 티올기(-SH)와 결합시킬 수 있다(반응식 1).

[109] [반응식 1]

[110]



maleimide

cysteine residue in protein

modified cysteine

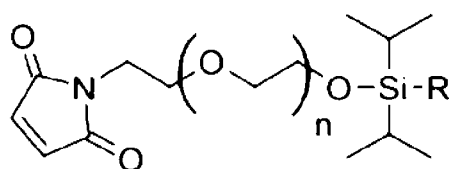
[111] 약물의 용해도는 약물과 전달체 사이에 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 스페이서를 배치하여 향상될 수 있다.

[112] ADC는 항체가 약물과 결합되기 전의 항체와 같은 친화력을 유지해야 한다. 즉, 항체에 결합된 약물로 인해 항체-항원 결합에 지장이 없어야 한다.

[113] 이를 위해, 본 발명에 따른 [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 테옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]는 하기 화학식 3으로 표시되는 전구약물 또는 이의 유도체 또는 이로부터 유래된 것일 수 있다.

[114] [화학식 3]

[115]



- [116] 여기서,  $n=1\sim 10$ , 바람직하게는  $5\sim 10$ , 더욱 바람직하게는  $7\sim 8$ 이고;
- [117] R 은 데옥시사이티딘계 항암제.
- [118]
- [119] 본 발명에서, 링커의 길이, 예컨대 상기 화학식 3에서  $n$ 은  $n=1\sim 10$ 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 위 범위를 벗어나는 경우라도, 링커 길이 변화에 따른 별 다른 효과 차이가 없는 경우에는 당연히 모두 본 발명의 균등 범위 내에 포함된다. 약물의 용해도는 약물과 전달체 사이에 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 스페이서를 배치하여 향상될 수 있으므로, 화학식 3에서 링커는 한정된 수( $n=5$  내지 10)의 PEG 모노머를 포함하는 저분자량 PEG 모이어티를 포함하는 것이 바람직하다.
- [120]
- [121] [암세포 표적 전달체(carrier)]
- [122] 암세포 표적 전달체는 표적 친화성 및/또는 특이성을 가진 전달 플랫폼(delivery platform)인 것이 바람직하다.
- [123] 본 발명에 따라 [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체]를 구비한 접합체에서, 암세포 표적 전달체는 암세포로 표적화시켜 주는 한, 그 종류에 제한이 없다.
- [124] 암세포 표적 전달체는 암세포의 항원을 표적화하는 것일 수 있다.
- [125] 암세포 표적 전달체는 데옥시사이티딘계 항암제가 혈액 순환 동안 독성을 나타내지 않으며 정상 세포와 종양 세포 또는 종양 조직을 차별화할 수 있게 하고 이로 인해 최대 허용량(maximum tolerated dose)을 높여 임상치료 효과를 극대화할 수 있게 한다.
- [126] 암세포 표적 전달체는 바람직하게는 암세포 표면 항원을 표적화하는 항체 또는 이의 항원결합부위 함유 단편, 항체 모방 단백질(antibody-mimetic protein), 압타머(aptamer), 리피바디(repebody) 및 다양한 펩타이드 기반 모달리티 등일 수 있다.
- [127] 암세포 표적 전달체는 암세포로 표적화시켜 주는 기능 이외에, 페이로드를 세포 안으로 보내는 배달부의 역할을 수행할 수도 있다.
- [128] 암세포 표적 전달체는 바람직하게는 작은 크기, 단순한 구조, 안정적이고 높은 가용성을 제공할 수 있으며 표적 친화성 및 특이성 외에도 다양한 분자 특징의 특정한 조정을 가능하게 할 수 있다.
- [129] 항체와 같은 암세포 표적 전달체는 높은 종양 흡수율이나 건강한 조직으로부터의 빠른 제거율 같은 향상된 효능을 지니는 것일 수 있다.
- [130]
- [131] 압타머(Aptamer)는 DNA/RNA 기반의 생체 고분자로 항체와 마찬가지로 수 nM 수준의 항원 결합 친화도(Binding Affinity)를 가지고 있어, 약물의 암 조직 선택적 전달체로 사용될 수 있다.
- [132] 리피바디(Repebody)는 대외 항원에 대한 적응 면역 반응으로 매우 다양한 leucine-rich repeat(LRR) 모듈로 구성된 새로운 인공 결합 scaffold다. 리피바디는



항원을 인식할 수 있으며, 항원에 대하여 수 nM 수준의 항원 결합 친화도(Binding Affinity)를 가지고 있어, 약물의 암 조직 선택적 전달체로 사용될 수 있다. 특히, 면역원성이 없어 약물의 전달체로 사용될 수 있으며 동시에 낮은 분자량으로 암세포 침투력을 높일 수 있고, 균일한 품질의 리피바디를 지속적으로 생산하기에 용이하여 암 조직 침투력을 높인 약물 복합체의 제조에 적합하다. 즉, 리피바디는 가용성 표현 수준이 높고, 라이브리리를 쉽게 만들 수 있으며, modular engineering을 이용한 결합 특성의 설계가 용이하다. 리피바디 라이브리리는 phage display로 구성되어 있다.

[133]

[134] [4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 뉴클레오사이드(Nucleoside) 유도체]

[135] 전술한 바와 같이, Nucleoside계 항암제 투여 초기에는 DNA에 항암제가 Incorporation된 이후 충분한 약리 효능이 발휘되어 암세포가 효율적으로 사멸하는 모습을 보이나, 항암제 투여가 계속되며 BER이 과활성화되어 이 항암제들이 충분한 효력을 내기 전에 제거되면서 항암제에 대한 내성이 발생하게 된다.

[136] 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 뉴클레오사이드 유도체는 기존 Nucleoside계 항암제와 동등 이상의 효율로 DNA에 Incorporation되고 원하는 약리 효능을 잘 발현하면서도 BER에 저항성을 갖춘 Nucleoside계 화합물로서, 기존 항암제 대비 강한 효능을 보일 수 있다(실시예 5 및 실시예 6).

[137] BER의 첫 단계는 Nucleoside/Nucleotide에 있는 Glycosidic bond를 끊어서 Base가 없는 자리를 만들어주고, Endonuclease를 통하여 DNA 손상의 수선이 진행되는 자리를 만들어주는 것이며, 이후 다양한 효소들이 반대편 염기 정보를 통해 상보적인 다른 염기 성분을 채워줌으로써 DNA의 손상이 수선된다(도 3).

[138] BER 복구 과정의 속도 및 효율을 결정하는 것은 비정상적인 base pair를 인식한 후 C-N 결합을 끊어주는 단계와 AP-endonuclease에 의하여 비어있는 Nucleotide의 자리를 만들어주는 단계이므로, 이 단계 중 하나 이상의 진행을 어렵게 만든다면 BER의 효율을 낮추어 BER의 과활성화에 의한 내성 발생을 억제할 수 있다.

[139] 4-thio-modified oligo-deoxynucleotides는 endonuclease S1에 의한 분해에 대해 높은 내성을 가지는 것으로 다수 문헌(*Nucleic Acids Research vol. 24, p. 4117, (1996)*)을 통해 밝혀진 바 있으며, 그 예로 4-thio-modified oligo-deoxynucleotides인 21과 unmodified oligo-deoxynucleotides인 18에 대해 Nuclease에 대한 민감도를 비교 확인한 결과, 4-thio-modified oligo-deoxynucleotides는 이에 상응하는 unmodified oligo-deoxy nucleotides 보다 100배 이상의 nuclease S1에 대한 저항성이 있는 것으로 확인되었다.

[140] 따라서, 본 발명에 따라 Endonuclease에 강한 저항성을 가지고 있는 Thio-deoxyribose 골격 기반의 Nucleoside 유도체를 페이로드로 사용하면 BER의 효율을 낮출 수 있다.

- [141] 한편, BER 작용 기전은 암세포에서는 내성 발생의 기전으로 작용하지만, 반대로 정상 조직(특히 골수 등 조혈 조직)에서는 항암제에 의한 독성을 방지하는 안전장치로 작동하기 때문에 BER을 저해하는 항암제는 암세포에만 선택적으로 전달되어야 할 필요성이 높다.
- [142] Nucleoside계 항암제는 세포에 들어간 이후, 다양한 Nucleoside Kinase에 의해 활성화되어 세포 내에 축적되게 되며, 적당한 시간 내에 활성화되지 않은 Nucleoside 화합물은 빠르게 제거된다. 정상 세포와 암세포에서의 활성화 속도의 차이를 극대화할 수 있으면 암세포에만 약물의 활성형을 축적시킴으로써 우수한 안전성을 확보할 수 있다.
- [143] 기존 문헌 보고에 따르면 다양한 헤테로 원자로 치환된 Nucleoside의 경우 서로 다른 속도로 활성화되거나 대사를 통하여 제거될 수 있는데, 이중 Thio-deoxyribose의 경우 정상 세포에서는 상대적으로 느리게 활성화되는 것에 비하여 유독 암세포에서는 일반 Deoxyribose 기반 Nucleoside와 동등 이상의 속도로 활성화되어 DNA 합성 시 사용될 수 있다는 것이 확인되었다. 이는 정상 세포에 비해서 암세포에 상대적으로 많이 축적되는 선택적 약물전달 효과를 보일 수 있다.
- [144] 문헌[J. Med. Chem., vol. 34, p. 2361, (1991), Biochemical Pharmacol., vol. 60, p. 1925 (2000), Nucleic Acids Research, vol. 25, p. 2773 (1997), Cancer Chemother. and Pharmacol., vol. 74, p. 291 (2014)]은, 방사성동위원소가 라벨링된 [5-3H]dCyd, [5-3H]T-dCyd, [5-3H]araC 및 [5-3H]T-araC를 CEM 세포에 각각 처리한 후 시간별로 DNA에 radiolabel incorporation 된 정도를 측정한 실험에서, Deoxyribose 기반 Nucleoside인 ara-C와 dCyd에 비해 Thio-deoxyribose 기반 Nucleoside인 T-dCyd가 암세포 DNA에 더 빠르게 많이 incorporation 하는 결과를 확인하였다. 이로부터, Thio-deoxyribose 기반 Nucleoside 화합물은 암세포에서 빠르게 활성화되어 DNA에 잘 incorporation되는 것을 알 수 있다.
- [145] 즉, 암세포에서의 빠른 활성화 및 DNA incorporation과는 반대로 정상세포 및 정상 골수조직 (in vivo 실험을 통하여 확인)에서는 이들 방사성 동위원소 표지 thio-nucleoside들이 세포/조직 내에 잘 축적되지 않는 것을 통하여 thio-nucleoside 화합물들은 암세포에서 강한 세포독성 효능을 발휘할 수 있다.
- [146] 따라서, DNMT1 효소를 잘 trapping할 수 있는 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 Nucleoside 유도체를 페이로드로 사용하면(실시에 5 및 실시에 6), 기존 DNMT1 저해제와는 차별화된 효능과 안전성을 발휘할 수 있다.
- [147] 본 발명자들은 Aza-T-dCyd의 경우 동일한 종류의 Nucleoside 골격변화 (Deoxyribose → 4'-Thio-deoxyribose)를 통하여 다른 Nucleoside 화합물들도 BER 내성기전을 극복 가능하며 암세포 선택적 약물전달 특성을 가질 수 있다는 것을 확인하였다.
- [148] 그 결과, Aza-T-dCyd은 기존 Deoxyribose 골격을 개선한 Thio-deoxyribose 골격 활용으로 기존 Decitabine 등 Deoxyribose 기반 Nucleoside 대비 암세포에서는

빠르게 활성화되어 DNA에 효율적으로 incorporation되지만, 정상 골수세포를 포함한 정상적인 기관에서는 느리게 활성화됨으로써 암세포 선택적인 약물 전달이 가능해지고; Cytidine Deaminase라는 Nucleoside 항암제의 주 대사 효소에 상대적으로 느리게 영향을 받음으로써 대사 관련 내성의 극복 가능성을 확보할 수 있을 뿐만 아니라, DNMT1 효소를 잘 trapping할 수 있는 Thio-deoxyribose 골격을 통해 DNA Incorporation 및 DNMT1 Trapping 이후, 더 오래 지속되는 DNA-DNMT Adduct를 형성하여 더 강하고 차별화된 효력을 확보하였다. 따라서, Aza-T-dCyd와 같은 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 Nucleoside 유도체는 주 약물 표적인 DNMT1의 강력한 저해와 기존 내성발생 기전인 endonuclease에 의한 가수분해를 동시에 차단하여 강력한 항암 효능을 나타내는 well-designed multi-target inhibitor이 될 수 있다.

- [149] 요컨대, Aza-T-dCyd과 같이, deoxyribose 구조를 thio-deoxyribose 구조로 변경한 thio-nucleoside 화합물을 페이로드로 사용하는 경우 하기와 같은 특징이 부가될 수 있다.
- [150] (1) Thio-nucleoside 구조로 인하여 더 오래 지속되는 DNMT1 trapping complex를 형성함으로써 Decitabine (상품명: Dacogen), Azacytidine (상품명: Vidaza)에 비해 차별화된 강력한 항암 효능 및 내성 환자에서 내성 극복 가능성 확보;
- [151] (2) Thio-nucleoside 구조로 인하여 정상 세포에서 dCK (deoxycytidine kinase)에 의한 활성화 속도가 현저히 낮아짐으로써 암 세포에 선택적으로 약물의 활성 성분을 전달하게 되어 우수한 safety profile 확보; 및
- [152] (3) 기존 Decitabine/Azacytidine에 비하여 Cytidine Deaminase에 의하여 분해되는 속도가 느려 암 세포 내에서 대사로 인한 내성 극복 가능성 확보.
- [153]
- [154] 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 Nucleoside 유도체(예, thio-FAC, Aza-T-dCyd)은 Decitabine/Azacytidine에 비하여 현저히 개선된 약물효력 마커 (PD 마커)의 변화를 유도하여 Decitabine/Azacytidine보다 강력하게 암세포의 사멸을 유도하고 Decitabine에 내성을 보이는 세포주에서도 탁월한 암세포 사멸 유도 효력을 유지할 수 있으며, Decitabine/Azacytidine이 전혀 치료 효능을 보이지 않는 다양한 동물 모델에서 탁월한 항암 효능을 보일 수 있다.
- [155] 아울러, 임상시험에서 Aza-T-dCyd은 매우 낮은 투여용량에서도 암 환자의 질환 진전을 늦추는 효능이 관찰되어 기존 약물 대비 우수한 효력을 보였다.
- [156] DNA-DNMT1 부가체의 형성을 통해 DNA 손상을 주기 때문에 암세포만이 아닌 골수/위장관 점막 등 우리 몸의 정상 조직에도 여러 손상을 주는 문제가 있어 사용량이 제한됨에 따라 항암 효력에 한계가 있고, 초기 치료 이후 살아남은 암세포에서는 DNA-DNMT1 부가체의 형성 후 제거 과정이 과활성화되면서 항암 효능이 억제되는 문제가 있어 내성 발생에 취약한 모습을 보이는 등의 문제들은 본 발명에서 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 Nucleoside 유도체를 페이로드로 사용함으로써 해결할 수 있다.

[157]

[158] **[F 함유 테옥시사이티딘계 항암제 및 gemcitabine의 문제점 해결]**

[159] 테옥시사이티딘계 항암제가 thio-FAC, gemcitabine, NUC-1031(gemcitabine-phosphoramidate)인 경우, F가 있어서 혈액 중에서 안정한다(도 5).

[160]

[161] 신체를 구성하고 있는 기본 단위인 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 조절하는데 이 중에서 능동적인 죽음을 세포사멸(apoptosis) 또는 programmed cell death라고 한다. 이러한 세포사멸은 세포내에 본래부터 존재하고 있던 자살 기작이 세포 내부와 외부의 자극에 의하여 활성화되어 계획한 대로 스스로 죽는 현상으로, 세포의 괴사(necrosis)와는 달리 죽어가는 세포의 내용물이 세포 외로 유리되지 않아 다른 세포에 손상을 주지는 않는다. 형태학적으로는 세포의 비중 감소와 세포막의 파괴 및 염색체의 응축과 더불어 사멸체(apoptotic body) 형성과 함께 식세포 작용을 거치는 작용을 의미하며, 생화학적으로는 염색체 DNA가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 DNA fragmentation을 의미한다.

[162] 일반적으로 세포사멸 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해효소에 의해 세포내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는 일련의 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포사멸과 관련되어 있다. Caspase-8은 TNF- $\alpha$  또는 Fas ligand와 같은 세포사멸 유도 물질에 의해 활성화되며 일련의 다른 caspase를 활성화시키면서 세포사멸을 유발시킨다. 한편 세포사멸 과정에서 cytochrome c는 미토콘드리아 막에 존재하는 통로를 통해 방출되며 통로를 구성하고 있는 Bcl-2계 단백질들에 의해 조절된다. 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9을 활성화시키고 caspase-9에 의해 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어 있다.

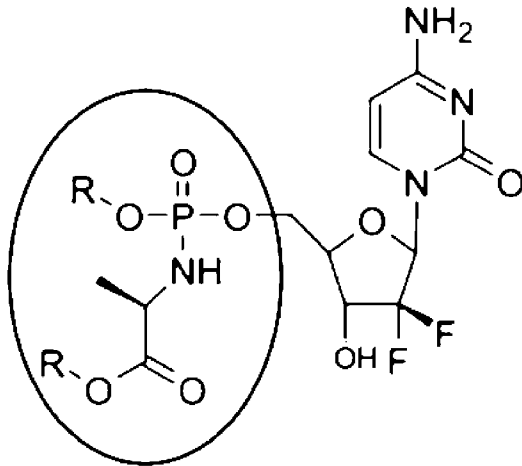
[163] Gemcitabine HCl [2'-deoxy-2', 2'-difluorocytidine monohydrochloride]은 다양한 고형암(solid tumors)에 대해 세포사멸 효과를 가지는 새로운 pyrimidine nucleoside analog로, 세포내에서 deoxycytidine kinase에 의해 인산화되어 활성형인 gemcitabine diphosphate, gemcitabine triphosphate로 전환되며, DNA 합성과 복구과정에서 다수의 억제작용을 나타낸다. 연구에 따르면 비소세포폐암에서 이러한 gemcitabine의 세포 독성효과는 세포사멸을 유도하고 p53의 기능을 결정하는데 중요하며, 부분적으로 Bcl-2에 관련되어 세포사멸을 일으킨다는 것을 보여주었다. 또한 gemcitabine에 의한 세포 사멸의 후기에는 세포사멸의 억제 인자로 알려진 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)의 활성 증가와 관련해 antiapoptotic protein인 inhibitor of apoptosis-1(IAP-1)의 발현이 유사하게 증가된다는 것을 보여주었다. 그러나, gemcitabine에 대한 내성 문제가 발생하여 이에 대한 해결책이 요구되고 있다.

[164] 이에 대해, 본 발명은 화학식 4-1의 화합물과 같은 gemcitabine 유도체를

페이로드로 사용할 수 있다.

[165] [화학식 4-1]

[166]

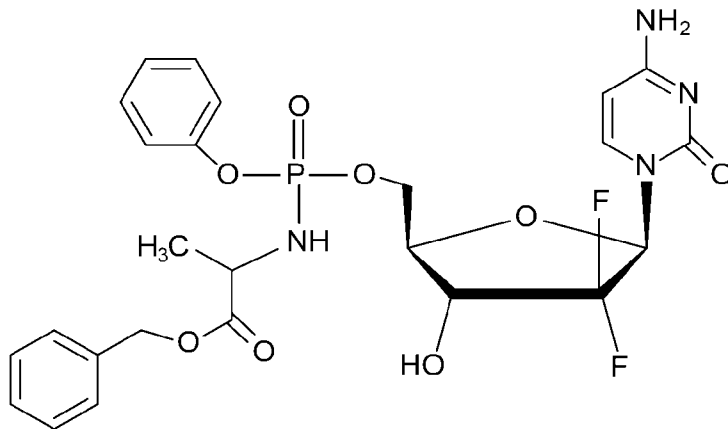


[167] 여기서, R은 각각 독립적으로 H 또는 다양한 치환기임.

[168] 화학식 4-1의 화합물의 비제한적인 예로, 하기 화학식 4-2의 화합물(gemcitabine-phosphoramidate NUC-1031)이 있다.

[169] [화학식 4-2]

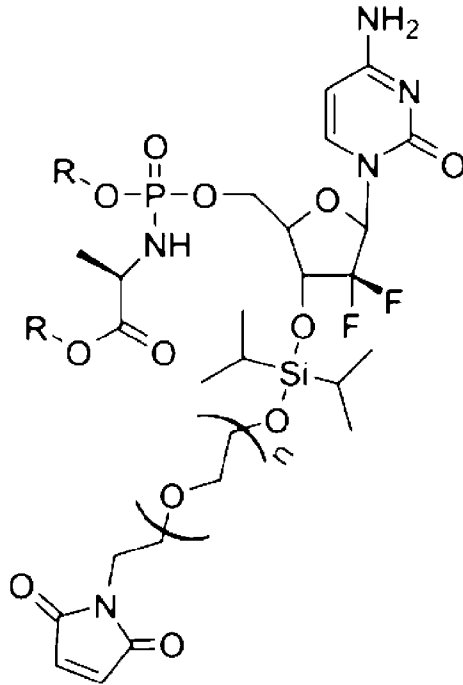
[170]



[171] 따라서, gemcitabine에 대한 내성 문제를 해결하기 위해, 본 발명은 gemcitabine 대신 화학식 4-1의 화합물을 사용하여, [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 대옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]는 하기 화학식 4로 표시되는 전구약물 또는 이의 유도체 또는 이로부터 유래된 것일 수 있다.

[172] [화학식 4]

[173]



[174] 여기서, n=1~10, 바람직하게는 5~10, 더욱 바람직하게는 7-8이고, R은 각각 독립적으로 H 또는 다양한 치환기임.

[175]

[176] 인산화되지 않는 gemcitabine의 내성 문제를 극복하기 위해, 인산화된 gemcitabine을 테옥시사이티딘계 항암제로 사용하면서 암세포 표적 전달체는 gemcitabin 약물에 내성이 있는 세포를 표적화할 수 있는 것일 수 있다.

[177]

[178] [항체-약물 접합체 (Antibody Drug Conjugate, ADC)]

[179] 본 발명에 따라 [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체]를 포함하는 접합체는 항체-약물 접합체 (ADC)일 수 있다.

[180] 독성 제어와 관련한 ADC 플랫폼의 핵심 기술로는, 항체 site specific 약물 conjugate 기술, 타겟 specific 약물 방출과 관련한 cleavable linker 기술 등이 있다.

[181] 일반적으로 항체-약물 접합체(ADC)는 화학식 (I)으로 표시될 수 있다.

[182] Ab-(L-D)<sub>p</sub> (I)

[183] 여기서,

[184] Ab는 항체이고;

[185] p는 1-8이고;

[186] L은 링커이고;

[187] D는 약물일 수 있다.

[188]

[189] 항체-약물 접합체 제조시 구체적으로는 링커가 약물과 연결될 때 약물의 효능(potency)을 제거하는 반응을 피해야 한다. 또한, 올바른 링커를 선택하는 것은 암 세포의 의도된 세포 구획에 대한 적절한 약물 전달에 영향을 미친다.

[190]

[191]

본 명세서에서, "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 이량체, 다량체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항체 단편을 포괄한다 (Miller et al. (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). 항체는 무린, 인간, 인간화, 키메라, 또는 다른 종으로부터 유래된 것일 수 있다. 항체는 특이적 항원을 인식하고 그에 결합할 수 있는, 면역계에 의해 생성된 단백질이다. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). 표적 항원은 일반적으로 다중 항체 상의 CDR에 의해 인식되는, 에피토프로도 칭하는 수많은 결합 부위를 갖는다. 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 각각의 항체는 상이한 구조를 갖는다. 따라서, 1종의 항원은 1종 초과와 상응하는 항체를 가질 수 있다. 항체는 전장 이뮤노글로불린 분자 또는 전장 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 관심 표적의 항원 또는 그의 일부에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함하며, 이러한 표적은 암 세포 또는 자가면역 질환과 연관된 자가면역 항체를 생산하는 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이뮤노글로불린은 이뮤노글로불린 분자의 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA), 클래스 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위클래스의 것일 수 있다. 이뮤노글로불린은 임의의 종으로부터 유래할 수 있다. 그러나, 한 측면에서, 이뮤노글로불린은 인간, 무린 또는 토끼 기원의 것이다.

[192]

"항체 단편(들)"은 전장 항체의 일부분, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 미니바디 (Olafsen et al. (2004) *Protein Eng. Design & Sel.* 17(4):315-323), Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편, 항-이디오타입 (항-Id) 항체, CDR (상보성 결정 영역), 및 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원에 면역특이적으로 결합하는 상기 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편, 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[193]

"모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉 집단을 구성하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 게다가, 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 그의 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 이들이 다른 항체에 의해 오염되지 않도록 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득됨에 따른 항체의 특징을 나타내며, 어떠한 특별한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al. (1975) *Nature*, 256:495]에 의해 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, US 4816567; US 5807715 참조)에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al. (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

- [194] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정한 종으로부터 유래하거나 또는 특정한 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 상동성이면서, 쇠(들)의 나머지가 또 다른 종으로부터 유래하거나 또는 또 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 이러한 항체의 단편을 포함한다 (US 4816567; 및 Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855). 본원에서 관심 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열, 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.
- [195] "무손상 항체"는 VL 및 VH 도메인, 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (CL) 및 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 항체의 Fc 불변 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 이들 생물학적 활성을 지칭하는 1종 이상의 "이펙터 기능"을 가질 수 있다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합; 보체의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 및 세포 표면 수용체 예컨대 B 세포 수용체 및 BCR의 하향 조절을 포함한다.
- [196] "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부분을 함유하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 의미한다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실-말단으로 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같은 EU 인덱스로도 칭하는 EU 넘버링 시스템에 따른다.
- [197] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 서열: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4로 나타난다.



- [198] 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 무손상 항체는 상이한 "클래스"에 할당될 수 있다. 무손상 이뮤노글로불린 항체의 5종의 주요 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하며, 이들 중 몇몇은 "하위클래스" (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 추가로 구분될 수 있다. 항체의 상이한 클래스에 반응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 칭한다. 이뮤노글로불린의 상이한 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 널리 공지되어 있다. Ig 형태는 힌지-변형 또는 힌지 없는 형태를 포함한다 (Roux et al. (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310).
- [199] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 이용하는 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 것에 반응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체를 지칭한다. 인간 항체의 이러한 정의는 구체적으로 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다.
- [200] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택 시에 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크를 지칭한다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3*]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우, 하위군은 카바트 등의 상기 문헌에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우, 하위군은 카바트 등의 상기 문헌에서와 같은 하위군 III이다.
- [201] "인간화 항체"는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 실질적으로 모든 적어도 1개, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 것들에 반응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것들에 반응한다. 인간화 항체는 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부분을 임의로 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.
- [202] "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열에 있어서 초가변이고/이거나 구조적으로 정의된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH에서 3개 (H1, H2, H3) 및 VL에서 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 가장 높은 서열 가변성의 것이고/거나 항원 인식에 수반된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및

96-101 (H3)에서 발생한다. (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987).) 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)은 하기 아미노산 잔기에서 발생한다: L1의 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65, 및 H3의 95-102. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) VH에서의 CDR1을 제외하고는, CDR은 일반적으로 추가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 항원을 접촉시키는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 또한 포함한다. SDR은 단축된-CDR 또는 a-CDR로 칭하는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 및 a-CDR-H3)은 하기 아미노산 잔기에서 발생한다: L1의 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58, 및 H3의 95-102. (문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조.) 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인에서의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 카바트 등의 상기 문헌에 따라 본원에서 넘버링된다.

[203] "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는데 수반되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 여기서 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 추가변 영역 (HVR)을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 게다가, 특정한 항원에 결합하는 항체는 상보적 VL 또는 VH 도메인 각각의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 항원에 결합하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[204] "벡터"는 연결되어 있는 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 벡터 뿐만 아니라 도입된 숙주 세포의 게놈에 혼입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다.

[205] "유리 시스테인 아미노산"은 모 항체 내로 조작되었고, 티올 관능기 (-SH)를 갖고, 분자내 또는 분자간 디설피드 가교로서 쌍형성되지 않은 시스테인 아미노산 잔기를 지칭한다.

[206]

[207] 항체는, 예를 들어 US 4816567에 기재되고 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 제조방법 및 조성물을 사용하여 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 진핵 숙주 세포 (예를 들어, 포유동물 숙주 세포)에서 생산된다. 일부 실시양태에서, 항체는 원핵 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli))에서

생산된다.

[208] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어, Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc 영역 변이체는 1개 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[209] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모두는 아니지만 일부 이펙터 기능을 보유하는 항체 변이체를 고려하며, 이는 이것을 항체의 생체내 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불충분하거나 또는 해로운 적용에 바람직한 후보로 만든다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정은 항체에 FcγR 결합이 결합되어 있지만 (따라서 ADCC 활성이 결합될 가능성이 있음), FcRn 결합 능력을 유지하는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다.

[210]

[211] 본 발명의 ADC는 야생형 또는 모 항체의 1개 이상의 아미노산이 시스테인 아미노산으로 대체된 시스테인 조작된 항체를 포함하는 항체-약물 접합체를 포함한다. 임의의 형태의 항체는 이렇게 하여 조작, 즉 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 모 Fab 항체 단편은 본원에서 "티오Fab"로 지칭되는 시스테인 조작된 Fab를 형성하도록 조작될 수 있다. 유사하게, 모(母) 모노클로날 항체는 "티오Mab"를 형성하도록 조작될 수 있다. 단일 부위 돌연변이는 티오Fab에서 단일의 조작된 시스테인 잔기를 산출하며, IgG 항체의 이량체 성질로 인해, 단일 부위 돌연변이는 티오Mab에서 2개의 조작된 시스테인 잔기를 산출한다는 것에 유의해야 한다. 대체된 ("조작된") 시스테인 (Cys) 잔기를 갖는 돌연변이체는 새로이 도입된 조작된 시스테인 티올 기의 반응성에 대해 평가된다. 티올 반응성 값은 0 내지 1.0 범위의 상대적, 수치 항이며, 임의의 시스테인 조작된 항체에 대해 측정될 수 있다. 본 발명의 시스테인 조작된 항체의 티올 반응성 값은 0.6 내지 1.0; 0.7 내지 1.0; 또는 0.8 내지 1.0 범위이다.

[212] 돌연변이유발에 의해 시스테인 조작된 항체를 제조하기 위해, 출발 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 DNA는 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들 방법은 폴리펩티드를 코딩하는 더 먼저 제조된 DNA의 부위-지정 (또는 올리고뉴클레오티드-매개) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 재조합 항체의 변이체는 또한 제한 단편 조작에 의해 또는 합성 올리고뉴클레오티드를 사용한 중복 연장 PCR에 의해 구성될 수 있다. 돌연변이유발 프라이머는 시스테인 코돈 치환(들)을 코딩한다. 표준 돌연변이유발 기술이 이러한 돌연변이체 시스테인 조작된 항체를 코딩하는 DNA를 생성하는데 사용될 수 있다. 일반적인 지침은 문헌 [Sambrook et al.

Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 및 Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993]에서 찾아볼 수 있다.

- [213] 시스테인 아미노산은 항체에서의 반응성 부위에서 조작될 수 있으며, 이는쇄내 또는 분자간 디설피드 연결을 형성하지 않는다 (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al. (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen et al. (2012) Nature Biotech., 30(2):184-191; Junutula et al. (2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52). 조작된 시스테인 티올은 티올-반응성, 친전자성 기 예컨대 말레이미드 또는 알파-할로 아미드를 갖는 본 발명의 링커 시약과 반응하여 시스테인 조작된 항체 (티오Mab) 및 약물 (D) 모이어티와 함께 ADC를 형성할 수 있다. 따라서, 약물 모이어티의 위치는 설계, 제어, 및 공지될 수 있다. 약물 로딩은 조작된 시스테인 티올 기가 전형적으로 전형적으로 티올-반응성 링커 시약과 높은 수율로 반응하기 때문에 제어될 수 있다. 항체를 조작하여 중쇄 또는 경쇄 상의 단일 부위에서 치환에 의해 시스테인 아미노산을 도입하는 것은 대칭 항체 상에 2개의 새로운 시스테인을 제공한다. 거의 2의 약물 로딩 및 접합 생성물 ADC의 거의 동질성이 달성될 수 있다.
- [214] 본 발명의 시스테인 조작된 항체는 바람직하게는 그의 야생형, 모 항체 대응부의 항원 결합 능력을 유지한다. 따라서, 시스테인 조작된 항체는 항원에 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 항원은, 예를 들어 종양-연관 항원 (TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 다른 세포 표면 분자, 막횡단 단백질, 신호전달 단백질, 세포 생존 조절 인자, 세포 증식 조절 인자, 조직 발생 또는 분화와 연관된 (예를 들어, 그에 기능적으로 기여하는 것으로 공지 또는 추측된) 분자, 림포카인, 시토카인, 세포 주기 조절에 수반된 분자, 혈관생성에 수반된 분자 및 혈관신생과 연관된 (예를 들어, 그에 기능적으로 기여하는 것으로 공지 또는 추측된) 분자를 포함한다. 종양-연관 항원은 클러스터 분화 인자 (즉, CD 단백질)일 수 있다. 시스테인 조작된 항체가 결합할 수 있는 항원은 상기 언급된 카테고리 중 1종의 하위세트의 구성원일 수 있으며, 여기서 상기 카테고리의 다른 하위세트(들)는 (관심 항원에 대해) 별개의 특징을 갖는 다른 분자/항원을 포함한다.
- [215] 시스테인 조작된 항체는쇄내 디설피드 기의 환원 및 재산화에 의한 링커-약물 중간체와의 접합을 위해 제조된다.
- [216] 본 발명의 항체-약물 접합체(ADC) 중 항체는 트라스투주맙(trastuzumab), 세톡시맙(cetuximab), 또는 사시투주맙 (sacituzumab)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [217]
- [218] [ADC의 약물 로딩]

- [219] 약물 로딩은 항체당 약물 모이어티의 평균 수이다. 약물 로딩은 항체 (Ab)당 1 내지 8개의 약물 (D) 범위일 수 있으며, 즉 여기서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8개의 약물 모이어티가 항체에 공유 부착된다. ADC의 조성물은 1 내지 8개 범위의 약물과 접합된 항체의 집합을 포함한다. 접합 반응으로부터 ADC의 제제 중 항체당 약물의 평균 수는 통상적인 수단 예컨대 질량 분광분석법, ELISA 검정, 전기영동, 및 HPLC에 의해 특징화될 수 있다. 또한, ADC의 정량적 분포가 p 면에서 결정될 수 있다. ELISA에 의해, ADC의 특정한 제제에서의 p의 평균 값이 결정될 수 있다 (Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). 그러나, p (약물) 값의 분포는 항체-항원 결합 및 ELISA의 검출 한계에 의해 식별불가능하다. 또한, 항체-약물 접합체를 검출하기 위한 ELISA 검정은 약물 모이어티가 항체, 예컨대 중쇄 또는 경쇄 단편, 또는 특정한 아미노산 잔기에 부착되는 위치를 결정하지는 않는다. 일부 경우에, p가 다른 약물 로딩을 갖는 ADC로부터의 특정 값인 균질 ADC의 분리, 정제 및 특징화는 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.
- [220] 일부 항체-약물 접합체의 경우, p는 항체 상의 부착 부위의 수에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 항체는 단지 1개 또는 여러 개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 또는 링커가 부착될 수 있는 단지 1개 또는 여러 개의 충분히 반응성인 티올기를 가질 수 있다. 더 높은 약물 로딩, 예를 들어  $p > 5$ 는 특정 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성, 또는 세포 투과성 상실을 유발할 수 있다.
- [221] 전형적으로, 이론적 최대치보다 적은 약물 모이어티가 접합 반응 동안 항체에 접합된다. 항체는, 예를 들어 링커-약물 중간체 (X-L-D) 또는 링커 시약과 반응하지 않는 많은 리신 잔기를 함유할 수 있다. 단지 가장 반응성인 리신기가 아민-반응성 링커 시약과 반응할 수 있다. 또한, 단지 가장 반응성인 시스테인 티올기가 티올-반응성 링커 시약 또는 링커-약물 중간체와 반응할 수 있다. 일반적으로, 항체는 약물 모이어티에 연결될 수 있는 유리 및 반응성 시스테인 티올기가 있더라도 많이 함유하지는 않는다. 화합물의 항체에서의 대부분의 시스테인 티올 잔기는 디설피드 가교로서 존재하며, 부분 또는 완전 환원 조건 하에 환원제 예컨대 디티오프레이트 (DTT) 또는 TCEP를 사용하여 환원되어야 한다. ADC의 로딩 (약물/항체 비, "DAR")은 (i) 항체에 대해 몰 과량의 약물-링커 중간체 또는 링커 시약을 제한하는 것, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도를 제한하는 것, 및 (iii) 시스테인 티올 변형을 위한 부분 또는 제한 환원 조건을 포함한 여러 상이한 방식으로 제어될 수 있다.
- [222] 항체의 1개 초과인 친핵성 또는 친전자성기가 약물-링커 중간체 또는 링커 시약에 이어서 이량체 약물 모이어티 시약과 반응하는 경우에, 생성된 생성물은 항체에 부착된 약물 모이어티의 분포가, 예를 들어 1, 2, 3 등인 항체-약물 접합체의 혼합물이다. 중합체 역상 (PLRP) 및 소수성 상호작용 (HIC)과 같은 액체 크로마토그래피 방법은 혼합물 중 화합물을 약물 로딩 값에 의해 분리할 수 있다. 단일 약물 로딩 값 (p)을 갖는 ADC의 제제가 단리될 수 있지만, 이들 단일

로당 값 ADC는 약물 모이어티가 링커를 통해 항체 상의 상이한 부위에서 부착될 수 있기 때문에 여전히 불균질 혼합물일 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체-약물 접합체 조성물은 항체가 1개 이상의 약물 모이어티를 가지며 약물 모이어티가 다양한 아미노산 잔기에서 항체에 부착될 수 있는 항체-약물 접합체 화합물의 혼합물을 포함한다.

[223]

[224] [제약 조성물]

[225] 본 발명의 ADC의 제약 제제는 전형적으로 제약상 허용되는 비경구 비히클과 함께 단위 투여 주사가 가능한 형태로, 비경구 투여, 즉 볼루스, 정맥내, 및 종양내 주사를 위해 제조된다. 원하는 정도의 순도를 갖는 ADC는 제약상 허용되는 희석제, 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.)와 함께 동결건조 제제 또는 수용액 형태로 임의로 혼합된다.

[226] 본원에 사용된 용어 "치료"는 명시된 상태를 완화하거나, 상태의 1종 이상의 증상을 제거 또는 감소시키거나, 상태의 진행을 저속화 또는 제거하는 것을 지칭한다.

[227] 본원에 사용된 용어 "유효량"은, 예를 들어 연구원 또는 임상 의사가 추구하는 조직, 계, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 도출할 약물 또는 제약 작용제의 그 양을 의미한다.

[228] 본원에 사용된 용어 "치료 유효량"은 이러한 양을 투여받지 않았던 상응하는 대상체와 비교하여 장애 또는 부작용의 치료, 또는 질환 또는 장애의 진행 속도에서의 감소를 유발하는 임의의 양을 의미한다. 상기 용어는 정상적인 생리학적 기능을 증진시키기에 효과적인 양을 그의 범주 내에 또한 포함한다. 요법에 사용하기 위해, 치료 유효량의 화합물, 뿐만 아니라 그의 염은 미가공 화학물질로서 투여될 수 있다. 추가적으로, 활성 성분은 제약 조성물로서 제시될 수 있다.

[229] "제약상 허용되는 염"은 약물의 제약상 허용되는 유기 또는 무기 염을 지칭한다. 예시적인 염은 술페이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 니트레이트, 비술페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토테네이트, 비타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레에이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포르메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄술포네이트, 에탄술포네이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 및 파모에이트 (즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-히드록시-3-나프토에이트)) 염을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 제약상 허용되는 염은 또 다른 분자 예컨대 아세테이트 이온, 숙시네이트 이온 또는 다른 반대이온의 포함을 수반할 수 있다. 반대이온은 모

화합물 상의 전하를 안정화시키는 임의의 유기 또는 무기 모이어티일 수 있다. 게다가, 제약상 허용되는 염은 그의 구조 내에 1개 초과 하전된 원자를 가질 수 있다. 다중 하전된 원자가 제약상 허용되는 염의 일부인 경우에는 다중 반대이온을 가질 수 있다. 따라서, 제약상 허용되는 염은 1개 이상의 하전된 원자 및/또는 1개 이상의 반대이온을 가질 수 있다.

[230] 제약상 허용되지 않는 다른 염이 본 발명의 항암제 또는 접합체의 제조에 유용할 수 있으며, 이들은 본 발명의 추가 측면을 형성하는 것으로 간주되어야 한다. 이들 염, 예컨대 옥살산 또는 트리플루오로아세테이트는 그 자체로 제약상 허용되지 않지만, 본 발명의 화합물 및 그의 제약상 허용되는 염을 수득함에 있어서 중간체로서 유용한 염의 제조에 유용할 수 있다.

[231] 본 발명의 화합물은 고체 또는 액체 형태로 존재할 수 있다. 고체 상태에서, 이는 결정질 또는 비결정질 형태로, 또는 그의 혼합물로서 존재할 수 있다. 통상의 기술자는 결정질 또는 비-결정질 화합물에 대해 제약상 허용되는 용매화물이 형성될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 결정질 용매화물에서, 용매 분자는 결정화 동안 결정질 격자에 혼입된다. 용매화물은 비-수성 용매 예컨대 비제한적으로 에탄올, 이소프로판올, DMSO, 아세트산, 에탄올아민 또는 에틸아세테이트를 수반할 수 있거나, 또는 이들은 결정질 격자에 혼입된 용매로서 물을 수반할 수 있다. 물이 결정질 격자에 혼입된 용매인 용매화물은 전형적으로 "수화물"로서 지칭된다. 수화물은 화학량론적 수화물 뿐만 아니라 가변량의 물을 함유하는 조성물을 포함한다. 본 발명은 모든 이러한 용매화물을 포함한다.

[232] 통상의 기술자는 결정질 형태로 존재하는 그의 다양한 용매화물을 포함한 본 발명의 특정 화합물이 다형성 (즉, 상이한 결정질 구조로 발생하는 능력)을 나타낼 수 있다는 것을 추가로 인지할 것이다. 이들 상이한 결정질 형태는 전형적으로 "다형체"로서 공지되어 있다. 본 발명은 모든 이러한 다형체를 포함한다. 다형체는 동일한 화학적 조성을 갖지만, 패킹, 기하학적 배열, 및 결정질 고체 상태의 다른 서술적 특성에 있어서 상이하다. 따라서, 다형체는 상이한 물리적 특성 예컨대 형상, 밀도, 경도, 변형성, 안정성, 및 용해 특성을 가질 수 있다. 다형체는 전형적으로 상이한 용점, IR 스펙트럼, 및 X선 분말 회절 패턴을 나타내며, 이는 확인에 사용될 수 있다. 통상의 기술자는, 예를 들어 화합물의 제조에 사용되는 반응 조건 또는 시약을 변화 또는 조정함으로써 상이한 다형체가 제조될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 온도, 압력 또는 용매에서의 변화는 다형체를 생성할 수 있다. 추가로, 1종의 다형체는 특정 조건 하에 또 다른 다형체로 자발적으로 전환될 수 있다.

[233] 본 발명의 접합체 또는 그의 염은 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다 (예를 들어, 이것은 1개 이상의 비대칭 탄소 원자를 함유함). 개별 입체이성질체 (거울상이성질체 및 부분입체이성질체) 및 이들의 혼합물은 본 발명의 범주 내에 포함된다. 마찬가지로, 본 발명의 접합체 또는 염은 호변이성질체 형태로 존재할 수 있고, 이들은 또한 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 이해된다. 본 발명은

상기 본원에 정의된 특정한 기의 모든 조합 및 하위세트를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 범주는 입체이성질체의 혼합물뿐만 아니라 정제된 거울상이성질체 또는 거울상이성질체적으로/부분입체이성질체적으로 풍부한 혼합물을 포함한다. 본 발명은 상기 본원에 정의된 특정한 기의 모든 조합 및 하위세트를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[234]

[235] [적응증 및 치료 방법]

[236] 본 발명의 항체-약물 접합체 (ADC)는, 예를 들어 종양 항원의 과다발현을 특징으로 하는 다양한 질환 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 예시적인 상태 또는 과다증식성 장애는 양성 또는 악성 고형 종양 및 혈액 장애 예컨대 백혈병 및 림프성 악성종양을 포함한다. 다른 것은 뉴런, 신경교, 성상세포, 시상하부, 선상, 대식세포, 상피, 기질, 포배강, 염증성, 혈관신생 및 면역 (자가면역 포함) 장애를 포함한다.

[237] 특정 실시양태에서, 본 발명의 ADC는 고형 종양, 예를 들어 난소를 치료하는 방법에 사용된다.

[238] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 ADC는 B-세포 관련 암 및 증식성 장애를 포함한, 혈액 악성종양 예컨대 비-호지킨 림프종 (NHL), 미만성 대 조혈 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병 (AML), 및 골수 세포 백혈병 (MCL)을 치료하는 방법에 사용된다. 그 내용이 참조로 포함되는 US 8226945; 문헌 [Li et al. (2013) Mol. Cancer. Ther. 12(7):1255-1265; Polson et al. (2010) Leukemia 24:1566-1573; Polson et al. (2011) Expert Opin. Investig. Drugs 20(1):75-85]을 참조한다.

[239] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 ADC는 난소암, 유방암 및 췌장암을 치료하는 방법에 사용된다. 암은 MUC16/CA125/O772P 폴리펩티드의 발현 또는 활성과 연관되어 있을 수 있다. 그 내용이 참조로 포함되는 WO 2007/001851; US 7989595; US 8449883; US 7723485; 문헌 [Chen et al. (2007) Cancer Res. 67(10): 4924-4932; Junutula, et al., (2008) Nature Biotech., 26(8):925-932]을 참조한다.

[240] 특정 실시양태에서, 본 발명의 ADC는 암, 예를 들어 유방암 또는 위암, 보다 구체적으로 HER2+ 유방암 또는 위암의 치료를 필요로 하는 환자에게 이러한 ADC를 투여하는 것을 포함하는, 상기 암을 치료하는 방법에 사용된다. 하나의 이러한 실시양태에서, ADC는 항-HER2 항체 트라스투주맙 또는 페르투주맙을 포함한다.

[241] 일반적으로, 치료될 질환 또는 장애는 과다증식성 질환 예컨대 암이다. 본원에서 치료될 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병 또는 림프성 악성종양을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평 세포암 (예를 들어 상피 편평 세포암), 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종을 포함한 폐암, 복막암, 간세포성암, 위장암을 포함한 위 또는 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암,



간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 뿐만 아니라 두경부암을 포함한다.

- [242] 질환의 예방 또는 치료를 위한, ADC의 적절한 투여량은 상기 정의된 바와 같은 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 분자가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 분자는 환자에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의한 것이든지 연속 주입에 의한 것이든지 간에, 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 15  $\text{mg}/\text{kg}$  (예를 들어 0.1-20  $\text{mg}/\text{kg}$ )의 분자가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 100  $\text{mg}/\text{kg}$  또는 그 초과 범위일 수 있다. 환자에게 투여될 ADC의 예시적인 약 0.1 내지 약 10  $\text{mg}/\text{kg}$  환자 체중 범위이다.

### 발명의 효과

- [243] 본 발명에 따라 [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 테옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]를 포함하는 접합체는 혈액 순환 동안 독성을 나타내지 않으며 정상 세포와 종양 세포 또는 종양 조직을 차별화할 수 있고 이로 인해 최대 허용량 (maximum tolerated dose)을 높여 고 용량으로 투여 가능하게 하고 항암제의 세포 내 고농축을 강화시킴으로써, 암세포의 내성 발생 기전이 작동되기 전에 세포 사멸을 유도하고 같은 임상치료 효과를 얻을 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

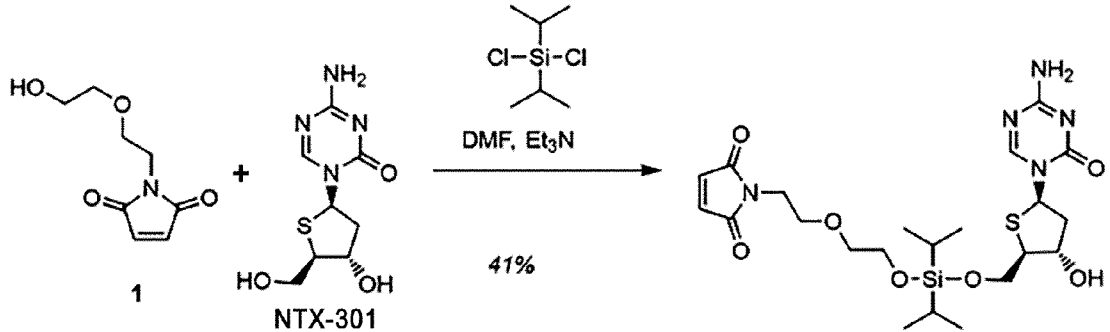
- [244] 도 1은 후생유전학 작용기전을 나타낸 모식도이다.
- [245] 도 2는 Nucleoside계 항암제의 작용기전이다.
- [246] 도 3은 BER 작용기전에 의한 Nucleoside계 항암제 DNA 손상수리 프로세스이다.
- [247] 도 4는 세포 표면의 타깃 수용체와 결합하여 내재화되고 엔도솜-리소솜 경로를 거쳐 페이로드를 방출하는 전통적인 ADC의 경로(A) 및 세포 밖에서 링커와 페이로드가 분리되어 작동하는 비내재화 ADC의 경로(B)를 도시한 것이다. (출처: Bargh, J. D., et al. (2019))
- [248] 도 5는 다양한 테옥시사이티딘계 항암제를 예시한 것이다.
- [249] 도 6은 다양한 산민감성 링커의 혈류 반감기를 비교한 것이다.
- [250] 도 7은 실시예 3에서 제조된 ADC를 SEC(size-exclusion chromatography)를 통해 정제한 결과이다.
- [251] 도 8은 실시예 3에서 제조된 ADC의 SDS-PAGE 분석결과이다.
- [252] 도 9는 실시예 3에서 제조된 ADC에 대해 HIC(Hydrophobic interaction chromatography)로 분석한 결과이다.

- [253] 도 10은 EGFR positive cell line (A549)과 EGFR negative cell line (MCF-7)에 대해 2000 ~ 0.002nM로 4-thio-FAC 단독 처리, 세톡시맵(Ab) 단독 처리, 실시예 3의 ADC(DAR=2.37) 처리시 각 세포주에 대한 세포 독성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- [254] 도 11는 MV4-11 (AML세포주) 세포에 NTX-301 (Aza-T-dCyd) 및 Decitabine을 농도별 처리 시 DNMT1을 저해함을 확인한 결과이다.
- [255] 도 12은 KG-1a (AML세포주) 세포에 NTX-301 (Aza-T-dCyd) 및 T-dCyd 처리 시 DNMT1 저해함을 확인한 결과이다.
- [256] 도 13은 CCRF-CEM (ALL 세포주) 세포에 NTX-301 (Aza-T-dCyd) 및 T-dCyd 처리시 DNMT1 저해함을 확인한 결과이다.
- [257] 도 14는 NCI-H23 (Lung carcinoma cells), HCT-116 (Colon carcinoma cells), and IGROV-1 (Ovarian carcinoma cells) 세포주에 NTX-301 (Aza-T-dCyd) 및 T-dCyd 처리 시 DNMT1 저해함을 확인한 결과이다.
- [258] 도 15는 MV4-11 세포에 NTX-301 (Aza-T-dCyd) 처리 시 DNMT1 저해로 인한 p15 tumor suppressor gene의 re-expression을 확인한 결과이다.
- [259] 도 16은 MV4-11 세포에 NTX-301 (Aza-T-dCyd) 및 Decitabine 처리 시 DNMT1 저해로 인한 p15 tumor suppressor gene의 re-expression 양상을 비교 분석한 것이다.
- [260] 도 17은 THP-1 세포에 NTX-301(Aza-T-dCyd)을 농도별로 처리 시 유도되는 CEBP/epsilon 발현 양상을 확인한 결과이다.
- [261] 도 18은 다양한 AML 세포주 (MV4-11, HL-60, KG-1a)에 NTX-301 (Aza-T-dCyd)를 처리하여 세포 내 DNMT1, CEBP/epsilon, CDKN1B 수치를 확인한 결과이다.
- [262] 도 19은 혈액암 세포주에 대한 NTX-301 (Aza-T-dCyd)의 성장억제 효과를 보여주는 도표이다.
- [263] 도 20은 혈액암 세포주에 대한 NTX-301 (Aza-T-dCyd)과 Decitabine의 성장억제 효과 비교 도표이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [264] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.
- [265]
- [266] 실시예 1: [Si-Linker]- [aza-Td-Cyd] 접합체 합성

[267]



[268] 질소 하에, 디클로로다이소프로필실란(0.222 ml, 1.228 mmol)을 0 °C에서 N,N-디메틸포름아미드(건조)(2 ml)에 용해시켰다. 이 용액에 0°C에서 N,N-디메틸포름아미드(건조)(4 ml) 중 1-(2-(2-하이드록시에톡시)에틸)-1H-피롤-2,5-디온(227 mg, 1.228 mmol) 및 트리에틸아민(0.171 ml, 1.228 mmol)의 용액을 적가하였다. 30분 후, N,N-디메틸포름아미드(건조)(4ml) 중의 aza-Td-Cyd (300mg, 1.228mmol) 및 트리에틸아민(0.171ml, 1.228mmol)을 적가하였다. 반응 혼합물을 2시간 내에 실온으로 천천히 가온하였다. 반응 혼합물을 35-40°C에서 증발 건조시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트 150mL로 희석하고 2 x 75mL 물로 세척하였다. 수층을 합하고 50mL 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 합하고, 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공에서 증발시켜 무색 오일을 얻었다. 컬럼 크로마토그래피(40g Si, DCM 중 0-10% 메탄올)로 원하는 생성물을 백색 발포체로 수득하였다.

[269] Yield: 276 mg, 41%, purity: >95%

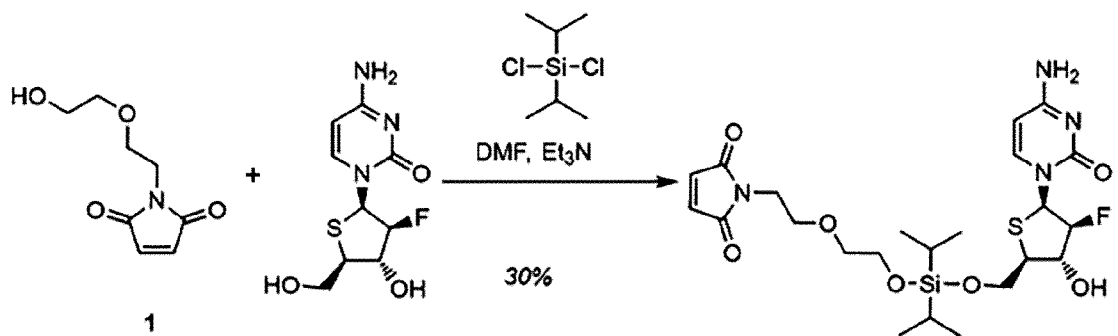
[270] UPLC\_AN\_ACID: m/z 542.2 [M+H]<sup>+</sup>, 564.2 [M+Na]<sup>+</sup>

[271] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.61 (s, 1H), 7.56 (s, 2H), 7.02 (s, 2H), 6.07 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.40 - 4.31 (m, 1H), 4.00 - 3.90 (m, 1H), 3.89 - 3.81 (m, 1H), 3.81 - 3.72 (m, 2H), 3.62 - 3.51 (m, 4H), 3.51 - 3.43 (m, 2H), 3.39 - 3.34 (m, 1H), 2.38 - 2.19 (m, 2H), 0.98 (s, 14H).

[272]

[273] 실시예 2: [Si-Linker]- [thio-FAC] 접합체 합성

[274]



[275] 질소 하에, 디클로로다이소프로필실란(0.166ml, 0.918mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(건조)(4ml)에 용해시키고 0°C로 냉각시켰다.

1-(2-(2-히드록시에톡시)에틸)-1H-피롤-2,5-디온(200mg, 0.918mmol) 및 트리에틸아민(0.128ml, 0.918mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(건조)(4 ml)에 용해하고, 0°C에서 적가하였다. 50분 후, 4'-ThioFAC(240mg, 0.918mmol) 및 트리에틸아민(0.128ml, 0.918mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 감압하에 증발시켜 DMF를 제거하였다. 잔류물을 디클로로메탄에 녹이고, 여과하고 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔, DCM/MeOH 0-10%)로 정제하여 생성물(248 mg)을 백색 고체로서 수득하였다. 분석 결과 잔류 Et<sub>3</sub>N-HCl 염이 나타났다. 생성물을 에틸 아세테이트 10mL에 용해시키고 P4 유리 필터로 여과하였다. 여액을 진공에서 증발시켜 170mg의 탁한 오일을 얻었다. 이것을 에틸 아세테이트 5mL에 용해시키고 2mL의 물로 세척하였다. 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고 진공에서 증발시켜 맑고 걸쭉한 오일을 얻었다.

[276] Yield: 153 mg, 30%, purity >94%.

[277] UPLC\_AN\_ACID: m/z 559.4 [M+H]<sup>+</sup>

[278]

[279] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.95 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.46 (dd, *J* = 13.1, 5.4 Hz, 1H), 5.94 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.95 (dt, *J* = 51.2, 5.9 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 283.5 Hz, 1H), 4.05 - 3.88 (m, 2H), 3.83 - 3.76 (m, 2H), 3.61 - 3.52 (m, 4H), 3.52 - 3.45 (m, 2H), 3.31 - 3.26 (m, 1H), 1.00 (s, 14H).

[280]

[281] 실시예 3: Cetuximab-4-thio-FAC 면역접합체의 제조

[282] 3-1. TCEP로 세특시맙의 이황화 결합 환원

[283] 세특시맙(Cetuximab)의 버퍼를 25 mM 붕산나트륨 완충액 (sodium borate buffer, pH 8.0; degassed)로 교환(100 MWCO Centricon; 7회 반복)하였다. 항체의 2.5배 물 비의 TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine)을 4 mg/mL 세특시맙 용액에 첨가하고 25°C에서 3시간 동안 환원시켰다. 반응하지 않은 TCEP은 PBS (pH8.0, supplemented with 5mM DTPA; diethylenetriaminepentaacetic acid)로 버퍼 교환(100 MWCO Centricon; 7회 반복)을 통해서 제거하였다.

[284]

[285] 3-2. 환원된 세특시맙과 4'-티오-FAC-Si-링커의 접합

[286] 실시예 1에서 준비한 4'-Thio-FAC-Si-linker는 DMSO로 용해시켜 2 mM 용액으로 보관하였다. 2 mg/mL 세특시맙과 7배 물 비의 4'-Thio-FAC-Si-linker를 혼합하고, conjugation 반응은 4°C에서 1시간 동안 진행하였다. Conjugation 반응에 사용한 4'-Thio-FAC-Si-linker의 2배 물 비의 cysteine을 사용하여 반응을 종결하였다. 반응물은 하기 표 1의 분석조건에서 SEC(size-exclusion chromatography)를 통해서 정제하였고(도 7), 정제한 conjugate는 SDS-PAGE를 통해서 분석하였다(도 8). ADC를 농축(100 MWCO Centricon, 2 mg/ml 이상)하여

- 20 °C에서 보관하였다.

[287] [표1]

Equipment	NGC Quest 10 Chromatography System
Column	Superdex 200 increase 10/300 GL
Elution buffer	Phosphate buffer saline pH 7.4, 150mM NaCl
Flow rate	0.5 ml/min (100% Elution buffer)
Injection volume	500 ul
Detection	UV 280nm

[288] SEC를 통해서 항체의 분자량에 따른 분리가 가능하다. 또한, Conjugation 과정동안 응집(aggregation)으로 유발된 multimer가 생성되었는지 확인이 가능하다. 도 7에 나타난 바와 같이, 하나의 peak만 검출된 것으로 보아 aggregation 없이 monomer의 형태로만 ADC가 만들어졌음을 확인하였다. 따라서, [링커 연결 부위로 수산기를 가진 약물]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴기 함유 링커]가 연결된 항체는 체액 내에서 응집없이 콜로이달 안정성을 발휘한다는 것을 유추할 수 있다.

[289] 도 8은 실시예 3에서 합성된 면역접합체의 SDS-PAGE 분석결과이다. TCEP을 이용한 partial reduction으로 B lane에 disulfide bond가 끊어져 heavy/light chain이 분리된 band들이 검출되었다. B의 각 chain에서 4-thio-FAC이 conjugation 된 만큼 band가 위로 shift되겠지만 (C lane), 4-thio-FAC의 분자량은 매우 작아 그 차이가 미세하게 보인다. SEC 정제 후에도 C의 band와 큰 차이 없이 정제되었음을 확인할 수 있다.

[290] 보다 정확한 분석을 위해서는 표 2의 조건 하에 HIC(Hydrophobic interaction chromatography)를 수행하였다(도 9).

[291] [표2]

Equipment	Shimadzu Prominence modular HPLC
Column	Thermo Scientific mAbPac HIC-Butyl column, 5 µm, 4.6 x 100 mm
Buffer	A : 50 mM sodium phosphate, 1.5 M ammonium sulfate, pH 7, 5% isopropanol B : 50 mM sodium phosphate, pH 7, 25% isopropanol
Method	0 to 100% buffer B in 22mins, 100% buffer B in 22~30mins
Flow rate	1mL/min
Sample injection	10uL

[292] 도 9에 나타난 바와 같이, ADC는 Maleimide-silyl-4-thio-FAC의 hydrophobicity로

인해, HIC 상에서 peak shift가 일어났다. A 위치는 cetuximab 위치로 DAR 0이며, 순서대로 B는 DAR 2, C는 DAR 4, D는 DAR 6, F는 DAR 8이다. 각 peak의 area와 DAR 값을 곱한 값을 모두 더해 평균을 내면 2.37의 DAR이 나온다.

[293]

[294] 실시예 4 : 시험관 내 (*in vitro*) 세포 독성

[295] WST-1 어세이 방법을 사용하여, EGFR positive cell line (A549)과 EGFR negative cell line (MCF-7)에 대해 2000 ~ 0.002nM로 4-thio-FAC 단독 처리, 세톡시맵(Ab) 단독 처리, 실시예 3의 ADC(DAR=2.37) 처리하였다.

[296] 각 세포 독성 효과는 하기 식으로 대조군 웰 (cell only)에서 얻은 발광 값과 비교하여 계산하였다.

[297] 
$$\text{세포 독성 \%} = 100 \times (V_{\text{cell only}} - V_{\text{sample}}) / V_{\text{cell only}}$$

[298] GraphPad Prism 5.0 소프트웨어를 사용하여 세포 독성에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 얻기 위해 4 개 매개 변수 비선형 회귀 분석을 사용하였다.

[299] 각 세포주에 대한 세포 독성 분석 결과는 하기 표 3 및 도 10에 나타내었다.

[300] [표3]

in vitro cell cytotoxicity			
IC50(nM)	Drug (1)	Antibody (2)	ADC (3)
A549 (+)	175	-	64.3
①	①-1	①-2	①-3
MCF-7 (-)	966	-	734
②	②-1	②-2	②-3

[301] 표 3에 나타난 바와 같이, EGFR positive cell line (A549)에서 4-thio-FAC 단독 처리 시 175nM, 실시예 3의 ADC 처리 시 64.3nM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냈다. 실시예 3의 ADC는 DAR이 2.37로, 4-thio-FAC 단독에 비해 2.37배 많은 4-thio-FAC을 보유하고 있으므로 더 낮은 IC<sub>50</sub>이 나타난 것으로 보인다. 하지만, EGFR negative cell line (MCF-7)에서도 ADC가 독성을 보였다 (IC<sub>50</sub>=734nM). 이는 실릴 에테르 링커(silyl ether linker)의 산민감성 cleavage mechanism(낮은 pH에서 약물을 방출)의 특성에 따라 세포 배양 시 배지의 pH가 낮아져서 세포 밖에서 약물이 방출되어 독성을 나타낸 것이다.

[302]

[303] 한편, A549 (+) 및 MCF-7(-)에서 세톡시맵 (Ab)만 처리시 모두 세포 독성(cell cytotoxicity)을 발휘하지 못하였다. 항체는 그 자체가 항암효과를 갖는 경우도 있지만, 대부분 그 효력은 상당히 미약한데, 여기에 사용된 세톡시맵 자체는 A549 (+)에서 후자에 해당하는 것을 알 수 있다.

[304] A549 (+) 및 MCF-7(-)에서 4-thio-FAC만 처리시 IC<sub>50</sub>(nM)가 각각 175, 966로 크게 차이가 나며, A549 (+)가 MCF-7(-) 보다 5.52 배 (175 vs. 966)로

4'-ThioFAC에 더 민감하였다. 반면, A549 (+) 및 MCF-7(-)에서 실시예 3의 ADC 처리시  $IC_{50}$ (nM)가 각각 64.3, 734 로 크게 차이가 나며, A549 (+)가 MCF-7(-) 보다 11.4 배 (64.3 vs. 734)로 실시예 3의 ADC에 더 민감하였다. 4-thio-FAC만 처리시 단순한 세포주에 의한 차이(5.52배 민감도) 대비 ADC로 만들었을 때의  $IC_{50}$ 의 차이(11.4배 민감도)가 더 크다는 in vitro 실험의 결과만으로도, 본 발명의 ADC가 항원-항체 결합 및 Endocytosis (internalization)을 통한 전형적인 ADC로서 잘 작동한다는 것을 알 수 있다. 즉, 본 발명의 ADC가 EGFR positive인 A549 세포주에서는 전형적인 ADC로서 잘 작동하고, EGFR negative인 MCF-7에서는 ADC의 효력이 상대적으로 매우 낮다는 것을 알 수 있다.

[305]

[306] EGFR negative인 MCF-7에는 EGFR 항원이 없어 EGFR 항원과 결합하는 실시예 3의 ADC가 정상적인 ADC로서 작용하지 못한다. 여기서, 정상적인 ADC라고 함은, 전형적인 ADC로서 항원-항체 결합, Endocytosis (internalization), Enzymatic or pH cleavage에 의한 drug release (본 발명의 ADC의 경우 pH에 의한 cleavage), 세포사멸이라는 일련의 과정을 수행하는 것이다.

[307]

그러나, 세포주 표면에 항원이 없다고 하더라도 세포주는 시간이 지남에 따라 일정수준의 pH 저하가 일어나기 때문에 느리기는 하지만 세포 바깥에서 drug release가 일어나기 때문에, 실시예 3의 ADC가 EGFR negative인 MCF-7 세포와 항원-항체 결합이 없다고 하더라도 734 nM 수준의  $IC_{50}$ 를 갖는다. 이에 반해 A549(+)에서는 전술한 바와 같이 실시예 3의 ADC가 정상적인 ADC로서 작동하기 때문에 4'-ThioFAC 약물만 사용한 경우에 비해서 2.72배 낮은  $IC_{50}$  (64.3)를 갖는다. 이는 실시예 3의 ADC가 DAR이 2.37 수준임을 고려할 때, drug only와 ADC가 in vitro상에서  $IC_{50}$ 의 차이가 크지 않다고 할 수 있다.

[308]

[309] EGFR negative인 MCF-7에서 실시예 3의 ADC의  $IC_{50} = 734$  nM이고, 실시예 3의 ADC가 DAR이 2.37 수준임을 고려할 때, 734nM의 ADC는  $734 \times 2.37 = 1740$ nM의 4-thio-FAC을 공급할 수 있음에도 불구하고 이중 966 nM의 유리형 4-thio-FAC (대략 1740nM의 4-thio-FAC 56%에 해당)만이 MCF-7의 세포주 배양 pH에서 ADC로부터 방출시킬 수 산민감성 링커라는 것을 알 수 있다. 또한, 실시예 3의 ADC는 항체에 의해 암세포에 타겟팅되면, 세포막 산성 분위기(pH ≤ 7)에서 유리형 약물 4-thio-FAC가 방출되고 세포막 투과하여 세포 안으로 농축될 수 있고 이로 인해 세포 독성을 발휘하는 것을 간접적으로 알 수 있다.

[310]

따라서, 전형적인 ADC로서 항원-항체 결합 → Endocytosis (internalization) → Enzymatic or pH cleavage에 의한 drug release (이 ADC의 경우 pH에 의한 cleavage) → 세포사멸)을 유도하는 항원/ 항체 반응이 없더라도, 항체가 치료항체 역할을 하지 못하더라도, 또한 충분한 농도의 활성약물이 세포 내에 농축되어야 하지만 항원-항체 complex에 의한 내재화(internalization) 과정이 비효율적이더라도(즉, 전통적인 ADC와 달리, 비내재화 ADC이더라도), ADC에 의해 암세포에

타겟팅만 하면 실릴 에테르 (Silyl Ether) 함유 링커에 의해 암 세포 밖에서 방출될 수 있는 유리형 테옥시사이티딘계 항암제가 세포막을 투과 및 세포 내 농축을 통해 암 세포 사멸가능하다는 것을 알 수 있다.

[311]

[312] **실시예 5: DNMT1 Inhibition**

[313] Decitabine 등 Cytidine 유사 구조 nucleoside DNMT1 저해제는 DNA에 incorporation되어 DNMT1을 비가역적으로 trap하고 단백질 분해효소 복합체를 통해 분해를 유도한다고 알려져 있으며, 이러한 DNMT1 단백질의 손실은 분화 유도/항암 유전자의 발현을 촉진하게 된다는 것이 다양한 기초 및 임상 연구, 환자에서의 DNMT1 저해제의 활용을 통하여 확립되어 있다.

[314] 약물 표적인 DNMT1의 저해 및 DNMT1 단백질의 세포 내 양 감소는 Aza-T-dCyd의 중요한 약물효력 마커(PD 마커)이다.

[315] **5-1-1. AML cell line에서의 세포 내 DNMT1 단백질 감소 확인**

[316] AML cell line에서 Aza-T-dCyd의 DNMT1 저해 효능을 평가하기 위하여 표준 AML 세포주인 MV4-11(도 11)과 KG-1a (도 12)에 Aza-T-dCyd과 양성 대조 물질인 Decitabine을 처리하고 DNMT1 단백질에 대한 Western blotting을 수행하였다. Aza-T-dCyd은 두 세포주 모두에서 농도 의존적으로 DNMT1 단백질을 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 매우 낮은 농도인 20nM 수준에서도 DNMT1을 완전히 감소시키는 것을 확인하였다.

[317] **5-1-2. ALL cell line/고형암 세포주**

[318] 동일한 DNMT1 저해 효능 평가를 다른 혈액암 세포주인 ALL cell line과 고형암 세포주에서 진행하였으며, CCRF-CEM (ALL) (도 13) 및 고형암 세포주(도 14)에서 Aza-T-dCyd이 농도 의존적으로 DNMT1 저해를 할 수 있음을 확인하였다.

[319]

[320] **5-2. Cellular Pharmacodynamics**

[321] **5-2-1. p15 Tumor Suppressor Gene의 재발현 확인.**

[322] MDS 및 AML 환자 조혈모세포의 DNA에는 다수의 tumor suppressor gene의 발현 promoter 부분의 cytosine의 다수가 메틸화되어 이들의 발현이 억제되고 이로 인하여 DNA damage repair, Cell cycle checkpoint 등 중요한 기능이 정상에 비해 억제되는 문제가 야기된다.

[323] 다수의 tumor suppressor genes의 비정상적인 DNA 메틸화는 AML을 포함한 많은 종류의 Leukemia에서 보고되었으며, 특히 p15 tumor suppressor genes의 CpG island 과메틸화로 인한 비활성화로 인해 비정상적인 세포증식이 유도된다.

[324] Decitabine과 같이 DNA의 메틸화를 정상화할 수 있는 후생유전학 조절 약물 처리로 인해 메틸화 패턴을 정상화할 경우 이들 조혈모세포가 분화 또는 사멸하여 MDS/AML 환자의 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 이때 세포 내 PD 마커인 p15의 재발현이 유도된다. 기존 Decitabine/Azacitidine 임상시험 및



환자치료를 통하여 p15가 silencing된 암세포 및 암환자에서의 p15 re-expression은 DNMT1 저해제의 Pharmacodynamic 반응을 모니터링하는 PD 마커로 확립되었다.

[325] 따라서, Aza-T-dCyd 처리 시 DNMT1 저해로 인한 후생유전학적 조절 기전을 통해 tumor suppressor genes의 re-expression 양상을 확인하기 위하여 AML 세포주를 대상으로 AML cell line인 MV4-11 세포에 NTX-301을 농도별로 처리하였다. DNMT1 저해로 인해 유도되는 PD 마커인 p15 tumor suppressor gene의 re-expression을 확인하였으며, RT-PCR을 통하여 p15 mRNA의 강력한 재발현을 확인하였다 (도 15).

[326] MV4-11 세포에서의 DNMT1 저해제의 효능을 비교하기 위해 Aza-T-dCyd 및 Decitabine 처리 시 p15 tumor suppressor gene의 발현을 확인하고자 Quantitative RT-PCR을 수행한 결과, Aza-T-dCyd 을 60 nM, 200 nM의 농도로 처리한 조건에서 p15 tumor suppressor gene의 발현량이 유의하게 증가함을 확인하였다 (도 16과 표 4). 또한, Aza-T-dCyd에 의해 Decitabine보다 더 우수한 p15 upregulation이 유도됨을 확인할 수 있었다.

[327] 따라서, Aza-T-dCyd 처리 시 DNMT1 감소 및 p15 tumor suppressor gene의 재발현을 확인한 결과는 Aza-T-dCyd 이 새로운 표적항암제로서의 개발 가능성이 높다.

[328] 하기 표 4는 AML 세포인 MV4-11 세포주에서 DNMT1 저해제 (Aza-T-dCyd /Decitabine) 처리 후 p15 mRNA re-expression 정도를 비교한 것이다(0 nM 기준으로 증가한 배수 표시).

[329] [표4]

	0 nM	6 nM	20 nM	60 nM	200 nM
NTX-301	1.0 ± 0.23	1.4 ± 0.19	1.7 ± 0.38	2.6 ± 0.89	6.1 ± 0.86
Decitabine	1.0 ± 0.15	1.3 ± 0.27	1.7 ± 0.85	2.2 ± 0.52	4.3 ± 0.83

[330]

[331] **5-2-2. 추가 PD 마커 (CEBP/epsilon, CDKN1B)의 변화 확인**

[332] MDS/CMML/AML 환자의 악성 세포의 경우 lineage commitment Master TF인 CEBP/alpha, Pu.1, GATA factors를 높은 수준으로 발현하는 반면, CEBP/epsilon을 포함한 후기 발달 단계 전사인자들의 발현은 각 유전자의 과메틸화로 인해 낮게 유지되고 있다는 문제가 있다.

[333] CEBP/epsilon은 미성숙 혈구 세포의 성숙을 유도하고, 비정상적인 증식을 억제하는 단백질로서, 이 단백질의 발현이 유도됨에 따라 CDKN1B와 Myc antagonists (MAD)의 발현 증가가 유도된다. CDKN1B은 CDK 저해 단백질로서 세포 주기상 증식을 중단시키거나 분화를 유도하는 기능을 담당한다고 알려져 있다. 이러한 CEB/epsilon과 CDKN1B 발현은 AML 악성 세포의 분화를 유도하여

강력한 항암효능을 나타낸다.

[334] Decitabine 약물 처리 시 DNMT1을 저해하여 DNA 탈메틸화 유도과 함께 CEBP/epsilon의 re-expression을 유도하여 세포사멸 및 세포분화를 야기하고, 이를 통해 우수한 항암 효능을 나타낸다는 것이 보고된 바 있다.

[335] 다양한 AML 세포주를 대상으로 NTX-301 처리 시 DNMT1 저해로 인해 유도되는 target engagement 양상을 확인하고자 CEBP/epsilon 및 CDKN1B 발현 확인 및 비교 분석하였다(도 17).

[336]

[337] AML 세포주인 THP-1 세포에 농도별로 NTX-301 처리 시, 용량 의존적으로 DNMT1 저해가 유도되고, CEBP/epsilon 발현 및 CDKN1B 발현이 증가하는 상관관계를 확인함으로써 Aza-T-dCyd의 미성숙 혈구 세포의 성숙유도 및 분화유도 기능을 확인하였다.

[338] AML 세포주인 MV4-11, HL-60, KG-1a 세포에 Aza-T-dCyd을 72시간 동안 처리한 다음 세포 내 단백질 발현 수치를 확인한 결과, DNMT1의 발현은 저해되고 CEBP/epsilon 및 CDKN1B의 발현은 증가함을 확인하였다. 특히 MV4-11과 HL-60 세포에서 가장 크게 발현 증가함을 확인하였다(도 18).

[339]

### [340] 5-3. Target engagement

[341] 기존 실험을 통해, Aza-T-dCyd에 대한 responsive 세포주로 확인된 MV4-11 세포에 DNMT1 knock-out (siRNA) 처리 시 세포의 생존, 분열 및 성장에 영향을 주지 않는 KO 세포주를 제작하였다.

[342] 제작한 DNMT1 knock-out 세포주에 NTX-301을 농도별로 처리 시 cytotoxicity가 감소함을 확인할 수 있었으며, 이는 MV4-11 세포에 대한 약리작용이 약해지는 결과라 판단된다. 이를 통해, Aza-T-dCyd은 DNMT1을 통해서 강력한 약물 효력을 가짐을 확인하였다.

[343]

### [344] 5-4. Cellular cytotoxicity

[345] Leukemia 세포주를 대상으로 DNMT1 저해제인 Aza-T-dCyd의 세포증식에 대한 저해 효과를 확인하기 위해 growth-inhibitory activity를 측정하였다.

#### [346] 5-4-1. AML

[347] 다양한 AML 세포주에서 Aza-T-dCyd (SRI-9639)은 도 19과 같은 IC<sub>50</sub> 값을 가지며 탁월한 세포 생존 저해 효능을 보였다.

#### [348] 5-4-2. Leukemia 세포주의 세포 증식에 대한 DNMT1 저해제의 효과 비교

[349] Leukemia 세포주를 대상으로 DNMT1 저해제인 Aza-T-dCyd 및 Decitabine의 세포증식에 대한 효과를 확인하기 위해 growth-inhibitory activity를 측정하였다. DNMT1 저해제를 각 72시간 동안 처리한 결과, Leukemia cell growth를 억제하는데 효과가 있다고 알려진 Decitabine의 GI<sub>50</sub> 값 (half maximal growth inhibitory concentrations)은 0.024 $\mu$ M ~ 4.3 $\mu$ M였고, Aza-T-dCyd은 GI<sub>50</sub> 값은

0.014 $\mu$ M ~ 0.69 $\mu$ M로 측정되었다. 전반적으로 세포증식에 대한 저해 효능을 비교하였을 때, Decitabine 대비 Aza-T-dCyd의 효능이 상당히 우수함을 확인하였다(도 20).

[350] **5-4-3. 암종별 세포주에서 Aza-T-dCyd의 IC50값 결과**

[351] Aza-T-dCyd에 대한 바이오마커를 확보하기 위해 200개 세포주에 대한 세포 독성 평가를 수행한 약물 활성 profiling 분석하였다.

[352] 200개 세포주에 대한 약물 활성 profiling 및 유전체 분석 결과를 통한 Aza-T-dCyd의 약물 responsiveness 분석 결과, 다양한 고형암에서 강력한 효력 확보 가능함을 확인하였다(표 5).

[353] [표5]

세포주	암 종류	Aza-T-dCyd IC50 (uM)
NALM-6	ALL	0.0338
RS4;11	ALL	0.0203
Jurkat	ALL	0.0695
MOLT-16	ALL	0.0182
CCRFCEM	ALL	0.119
MOLT-4	ALL	0.035
HL-60	AML	0.514
KG-1	AML	0.461
MV-4-11	AML	0.183
Thp1	AML	5.12
MC116	B-cell lymphoma	0.0297
JeKo-1	B-cell lymphoma	0.0385
DB	B-cell lymphoma	0.135
DOHH-2	B-cell lymphoma	0.609
HT	B-cell lymphoma	1.03
NU-DUL-1	B-cell lymphoma	0.0245
SU-DHL-10	B-cell lymphoma	0.0366
SU-DHL-4	B-cell lymphoma	0.0175
SU-DHL-8	B-cell lymphoma	0.0706
ARH-77	B-cell lymphoma	0.413
BC-1	B-cell lymphoma	0.338
IM-9	B-cell lymphoma	1.05
MHH-PREB-1	B-cell lymphoma	0.0389
RPMI 8226	B-cell myeloma	3.27
SKO-007	B-cell myeloma	4.29
CA46	Burkitt's lymphoma	0.0255
Daudi	Burkitt's lymphoma	0.451
GA-10	Burkitt's lymphoma	0.0335

NAMALWA	Burkitt's lymphoma	0.0109
Raji	Burkitt's lymphoma	0.0752
EB2	Burkitt's lymphoma	8.19
MEG01	CML	1.07
BV-173	CML	0.00532
CML-T1	CML	0.109
EM-2	CML	0.255
TF-1	Erythroleukemia	0.733
L-428	Hodgkin's lymphoma	0.365
RPMI 6666	Hodgkin's lymphoma	1.05
H9	T-cell Lymphoma	0.468
J-RT3-T3-5	T-cell Lymphoma	0.106
OE33	Head and Neck	0.161
A-673	Sarcoma	0.698
A375	Skin (Melanoma)	0.0667
C32	Skin (Melanoma)	>10
H4	CNS (Glioma)	0.0801
U-118 MG	CNS (Glioma)	>10
5637	Bladder	0.296
HT-1197	Bladder	7.13
HT1376	Bladder	3.28
J82	Bladder	1.98
T24	Bladder	1.53
TCCSUP	Bladder	1.18
UM-UC-3	Bladder	0.289
SCaBER	Bladder	0.187
647-V	Bladder	0.408
BFTC-905	Bladder	0.119
Hs 821.T	Sarcoma	>10
AU565	Breast	>10
CAMA-1	Breast	>10

MDA MB 231	Breast	0.21
MDA MB 415	Breast	>10
MDA MB 453	Breast	1.89
MDA MB 468	Breast	1.34
SK-BR-3	Breast	9.32
EFM-19	Breast	3.95
ChaGoK1	Lung (NSCLC)	3.41
LS1034	Colon	1.41
LS411N	Colon	0.265
NCI-H508	Colon	0.542
NCI-H747	Colon	0.319
Caki-1	Kidney	0.0856
HCT-15	Colon	1.02
SW1417	Colon	>10
SW403	Colon	0.619
SW480	Colon	1.58
SW620	Colon	0.234
HCT-116	Colon	0.1
SK-MEL-28	Skin (Melanoma)	2.5
Daoy	CNS (Medulloblastoma)	3.61
A204	Sarcoma	0.157
Hs 729	Sarcoma	>10
RL95-2	Female GU (Uterus)	0.705
OE19	Head and Neck	>10
OE21	Head and Neck	0.152
HT-1080	Sarcoma	0.12
AGS	Stomach	0.0584
Hs 746T	Stomach	0.666
A172	CNS (Glioma)	>10
DBTRG-05MG	CNS (Glioma)	>10
DK-MG	CNS (Glioma)	>10

T98G	CNS (Glioma)	1.39
U-87 MG	CNS (Glioma)	1.64
HepG2	Liver	0.892
OVCAR3	Female GU (Ovary)	3.44
FaDu	Head and Neck	0.208
HuCCT1	Liver	0.105
BT20	Breast	>10
BT474	Breast	>10
Hs 578T	Breast	>10
MCF7	Breast	6.47
ZR-75-1	Breast	>10
COR-L23	Lung (NSCLC)	0.0944
A549	Lung (NSCLC)	0.19
COR-L105	Lung (NSCLC)	2.24
D283 Med	CNS (Medulloblastoma)	0.0688
G-361	Skin (Melanoma)	1.08
Hs 688(A).T	Skin (Melanoma)	>10
Hs 852.T	Skin (Melanoma)	>10
MALME3M	Skin (Melanoma)	7.45
MeWo	Skin (Melanoma)	1.04
RPMI-7951	Skin (Melanoma)	0.527
SH-4	Skin (Melanoma)	0.698
SK-MEL-3	Skin (Melanoma)	0.522
WM-266-4	Skin (Melanoma)	0.429
TT	Endocrine (Thyroid)	>10
SK-N-AS	CNS (Neuroblastoma)	1.17
SK-N-FI	CNS (Neuroblastoma)	2.71
MG-63	Bone (Osteosarcoma)	0.99
SKOV3	Female GU (Ovary)	2.92
HuP-T4	Pancreas	0.321
Hs 766T	Pancreas	9.4

PSN-1	Pancreas	0.191
YAPC	Pancreas	1.05
AsPC-1	Pancreas	2.12
BxPC-3	Pancreas	0.699
CFPAC-1	Pancreas	1.75
Capan-1	Pancreas	3.32
HPAF-II	Pancreas	0.737
Mia PaCa-2	Pancreas	0.881
NCIH441	Lung (NSCLC)	1.3
ACHN	Kidney	0.231
Caki-2	Kidney	0.363
Detroit 562	Head and Neck	0.0811
22Rv1	Prostate	2.71
DU145	Prostate	0.432
PC-3	Prostate	0.441
NCI-H292	Lung (NSCLC)	0.194
SW1463	Colon	0.303
SW837	Colon	0.354
HT-29	Colon	0.323
769-P	Kidney	0.0657
786-O	Kidney	0.249
A498	Kidney	0.0738
A-704	Kidney	>10
A-253	Head and Neck	0.601
KATO III	Stomach	0.807
DMS114	Lung (SCLC)	2.2
DMS273	Lung (SCLC)	5.66
DMS53	Lung (SCLC)	4.22
NCIH446	Lung (SCLC)	3.04
NCI-H69	Lung (SCLC)	>10
SKMES1	Lung (NSCLC)	0.314



SW579	Endocrine (Thyroid)	1.05
BHT-101	Endocrine (Thyroid)	0.235
Cal 27	Head and Neck	0.319
SCC-25	Head and Neck	0.126
SCC-4	Head and Neck	2.86
SCC-9	Head and Neck	1.83
Calu6	Lung (NSCLC)	0.289
639-V	Bladder	1.57
SK-UT-1	Sarcoma	0.343
MES-SA	Sarcoma	0.135
A388	Skin (Head and Neck)	0.19
A427	Lung (NSCLC)	0.0775
A431	Skin (Head and Neck)	0.256
A7	Skin (Melanoma)	1.19
BE(2)C	CNS (Neuroblastoma)	0.373
BM-1604	Prostate	4.41
C32TG	Skin (Melanoma)	0.953
C-33A	Female GU (Cervix)	0.497
C-4 II	Female GU (Cervix)	0.773
CGTH-W-1	Endocrine (Thyroid)	0.143
Colo 205	Colon	0.0811
Colo 320DM	Colon	0.0923
DLD-1	Colon	0.221
HeLa	Female GU (Cervix)	1.81
Hs 936.T(C1)	Skin (Melanoma)	0.398
HT-3	Female GU (Cervix)	0.818
JAR	Placenta	0.296
KHOS-240S	Bone (Osteosarcoma)	0.254
LS-174T	Colon	>10
MS751	Female GU (Cervix)	>10
NCI-H295R	Endocrine (Adrenal gland)	>10

NTERA-2 cl.D1	Testis	0.0427
PA-1	Female GU (Ovary)	0.0392
PFSK-1	CNS (Glioma)	7.61
SJRH30	Sarcoma	0.291
SK-NEP-1	Kidney	>10
SK-PN-DW	Sarcoma	0.847
SNB-19	CNS (Glioma)	0.17
SU.86.86	Pancreas	0.508
SW872	Sarcoma	0.73
SW900	Lung (SCLC)	1.98
SW962	Female GU (Vulva)	>10
SW982	Sarcoma	0.171
T47D	Breast	>10
U-138MG	CNS (Glioma)	>10
VA-ES-BJ	Sarcoma	0.241
WiDr	Colon	0.263
D341 Med	CNS (Medulloblastoma)	NA

[354]

[355] 실시예 6: Aza-T-dCyd의 작용기전

[356] Aza-T-dCyd은 BER 등 DNA damage response의 활성화를 저해함으로써 Decitabine과 비교 시 더욱 오래 지속되는 DNA-DNMT1 adduct를 형성하여 더욱 강한 DNA damage를 유도하며 이를 통하여 CHK1-p53 pathway를 강하게 활성화함으로써 Decitabine 대비 더욱 강한 항암 효능을 보인다.

[357] **6-1. DNA damage response 유도**

[358] ① DNA incorporation 및 Pyrimidine metabolism 저해

[359] Aza-T-dCyd은 pyrimidine analog로서 세포 내에서 다양한 pyrimidine metabolism 관련 효소에 의해 대사가 진행된다.

[360] 세포에 Aza-T-dCyd 처리 시 dNTP de novo 합성에 중요한 ribonucleotide reductase인 RRM1 단백질 발현이 억제되고, 세포 내 dCTP, dTTP 양의 감소를 통해, 세포 내 pyrimidine 대사과정에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 암세포가 DNA를 복제할 때 중요한 precursor로서 작용하는 dCTP, dTTP의 감소는 replication stress를 유발하며 강한 DNA damage response를 발생시킬 수 있다.

[361] Aza-T-dCyd의 대사산물인 aza-T-dCTP의 DNA 삽입은 base excision repair,

mismatch repair를 일으키고 DNA 복제를 지연시킴으로서 replication stress를 유발하고 DNA damage response를 가중시킬 수 있다.

[362]

[363]     **② DNMT1-DNA adduct 형성을 통한 DNA damage response 유도**

[364]     Aza-T-dCyd 처리 시 세포 내 DNA로 삽입된 Aza-T-dCyd은 DNMT1과의 공유결합을 통해서 trap되며 DNMT1-DNA adduct를 형성한다.

[365]     형성된 adduct는 bulky한 구조를 통해 DNA replication fork의 진행을 방해함으로써 replication fork를 붕괴시키고, double-strand break를 일으켜 강한 DNA damage response를 야기할 수 있다.

[366]     Pyrimidine metabolism, DNA incorporation, DNMT1 adduct 형성은 결과적으로 강한 DNA damage response를 일으킨다.

[367]     Aza-T-dCyd 처리 시 형성된 DNA adduct로 인해 DNA replication stress 관련 유전자들의 발현 증가 및 세포주 별 약물에 대한 효능을 확인하였다.

[368]

[369]     **③ DDR-p53 pathway 활성화로 인한 DNA damage response 촉진**

[370]     Aza-T-dCyd 처리 시 DNA damage response 마커인 H2AX 인산화를 증가시키고, 동시에 DNA damage sensor인 Chk1의 인산화 증가, DNA damage 반응에서 세포 주기/사멸을 조절하는 p53 단백질 발현의 증가를 일으켜 DNA damage response를 촉진시켜 결과적으로 혈액암의 tumorigenic activity를 억제함을 확인하였다.

[371]

[372]     **6-2.DNA demethylation**

[373]     Aza-T-dCyd을 처리하면 강한 DNMT1 depletion을 유도하며 전반적인 DNA 메틸화 레벨의 감소를 유발한다.

[374]     Decitabine은 유전체 영역 전반적인 디메틸화를 유발시키는 반면, Aza-T-dCyd은 early replication 동안 복제되는 DNA 영역, 유전자 발현에 중요한 promoter 지역, DNMT1-binding 지역, replication stress 지역 등으로 편향되고 선택적인 디메틸화를 유도한다.

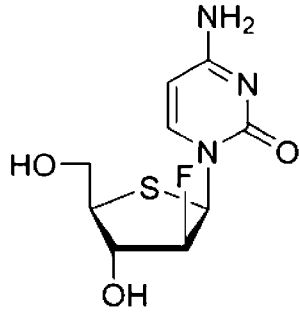
[375]     Aza-T-dCyd 처리로 인한 DNA 디메틸화를 통해, 억제되어 있던 다양한 tumor suppressor gene 및 AML 세포의 분화 유도에 필요한 유전자가 재활성되었으며, RNA-seq 데이터 분석을 통해 해당 유전자들의 재활성화된 발현패턴을 확인하였다.

[376]

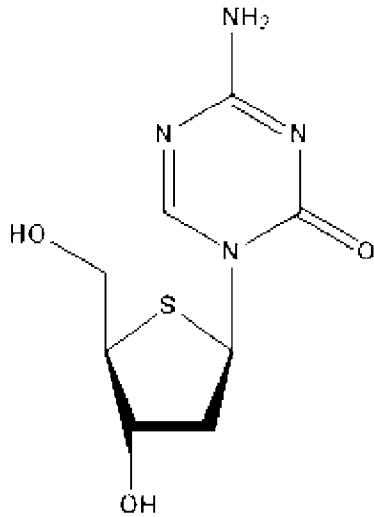
[377]     요컨대, 실시예 5 및 실시예 6에는 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 Nucleoside 유도체가 단독 처리시에도 우수한 항암효력을 발휘하는 것을 알 수 있다.

## 청구범위

- [청구항 1] [세포내에서 삼인산화(triphosphate) 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 (silyl ether) 함유 링커]를 포함하는 접합체로서, 실릴 에테르기에 연결된 약물의 수산기가 산절단부위(acid cleavage site)이며, 산성 분위기( $\text{pH} \leq 7$ )에서 약물의 수산기에 결합된 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 방출되는 것이 특징인 접합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 암 주변 산성 분위기( $\text{pH} \leq 7$ )에서 약물의 수산기에 결합된 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 세포밖에서 방출되고, 세포막 투과 후 세포 내 효소에 의해 삼인산화 형태로 활성화되는 것이 특징인 접합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, (i) [약물]-[링커] 접합체이거나, (ii) [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체(carrier)]를 구비한 접합체인 것이 특징인 접합체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체(carrier)]를 구비한 접합체는 암세포의 항원을 표적화하는 암세포 표적 전달체에 의해 암세포로 표적화된 후,  
 (a) 암 주변 산성 분위기( $\text{pH} \leq 7$ )에서 약물과 링커의 연결부위인 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 세포밖에서 방출되고, 세포막 투과 후 세포 내 효소에 의해 삼인산화 형태로 활성화되고,  
 (b) 선택적(optionally)으로, 세포안으로 내재화(internalization)되어 리소좀(lysosomes)에 의해 실릴 에테르기가 분해되어 유리형 약물이 방출된 후 세포 내 효소에 의해 삼인산화 형태로 활성화되는 것이 특징인 접합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제는 4'-Thio-deoxyribose 골격을 가진 뉴클레오사이드(nucleoside) 유도체인 것이 특징인 접합체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제는 DNA 메틸 트랜스퍼라제 1(DNMT 1) 저해제인 것이 특징인 접합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제는 화학식 1의 thio-FAC 또는 화학식 2의 aza-Td-Cyd인 것이 특징인 접합체.  
 [화학식 1]



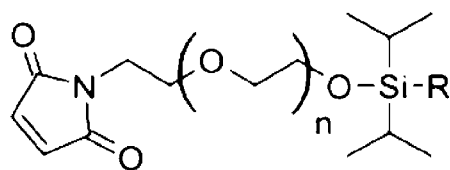
[화학식 2]



[청구항 8] 제1항에 있어서, 일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커는 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 스페이서 및 말레이미드(maleimide)기를 포함하는 것이 특징인 접합체.

[청구항 9] 제1항에 있어서, [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]는 하기 화학식 3으로 표시되는 전구약물 또는 이의 유도체 또는 이로부터 유래된 것이 특징인 접합체.

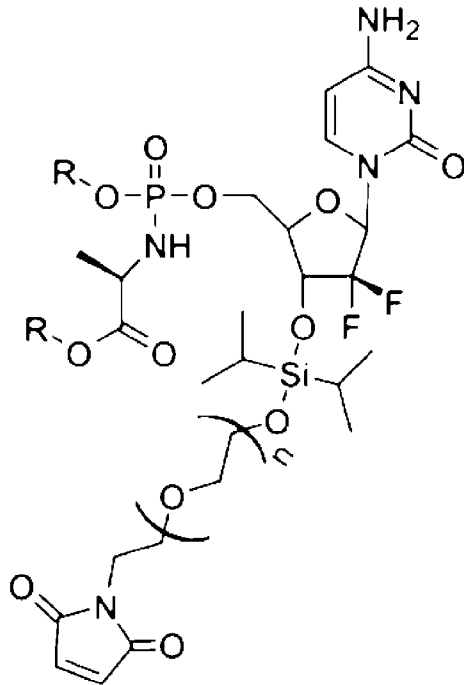
[화학식 3]



여기서, n=1~10이고; R 은 데옥시사이티딘계 항암제임.

[청구항 10] 제1항에 있어서, [세포내에서 삼인산화 형태로 활성화되는 세포막 투과성 데옥시사이티딘계 항암제]-[일말단이 약물의 수산기에 연결된 실릴 에테르 함유 링커]는 하기 화학식 4로 표시되는 전구약물 또는 이의 유도체 또는 이로부터 유래된 것이 특징인 접합체.

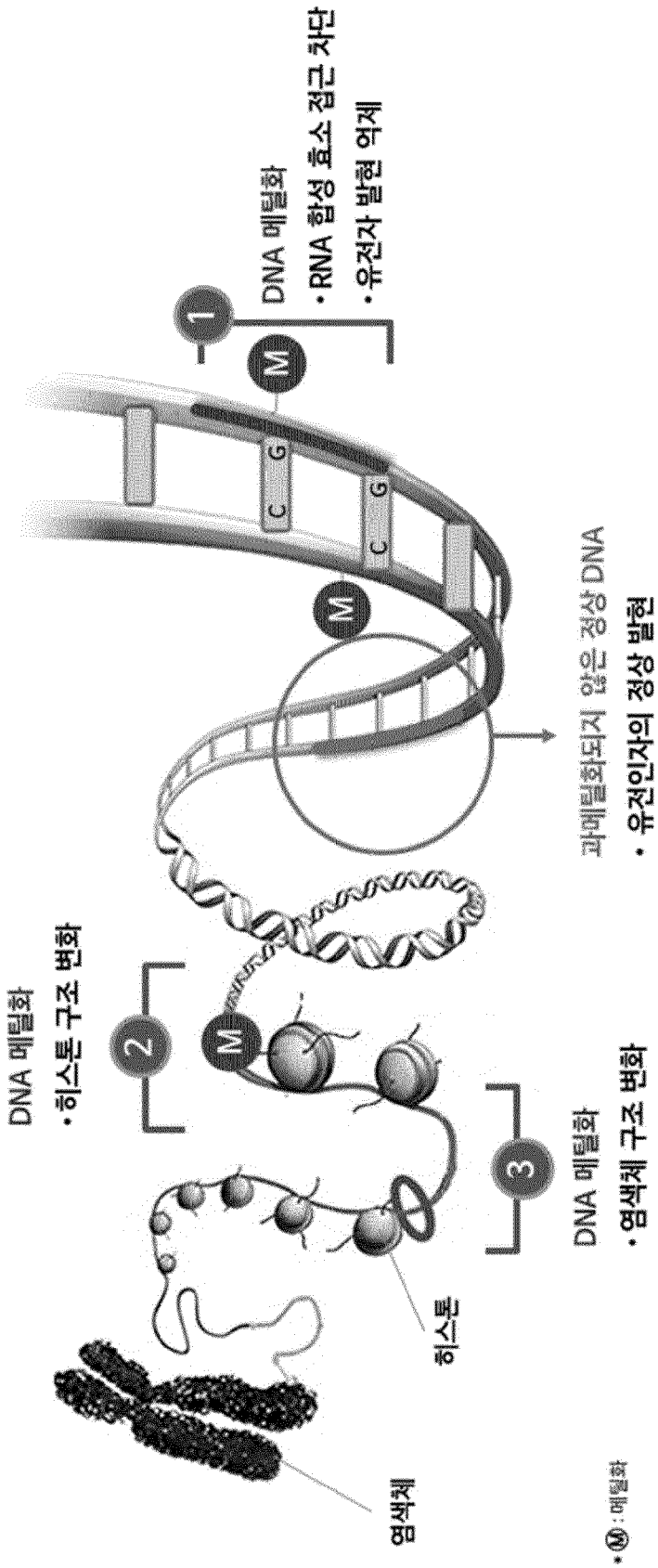
[화학식 4]



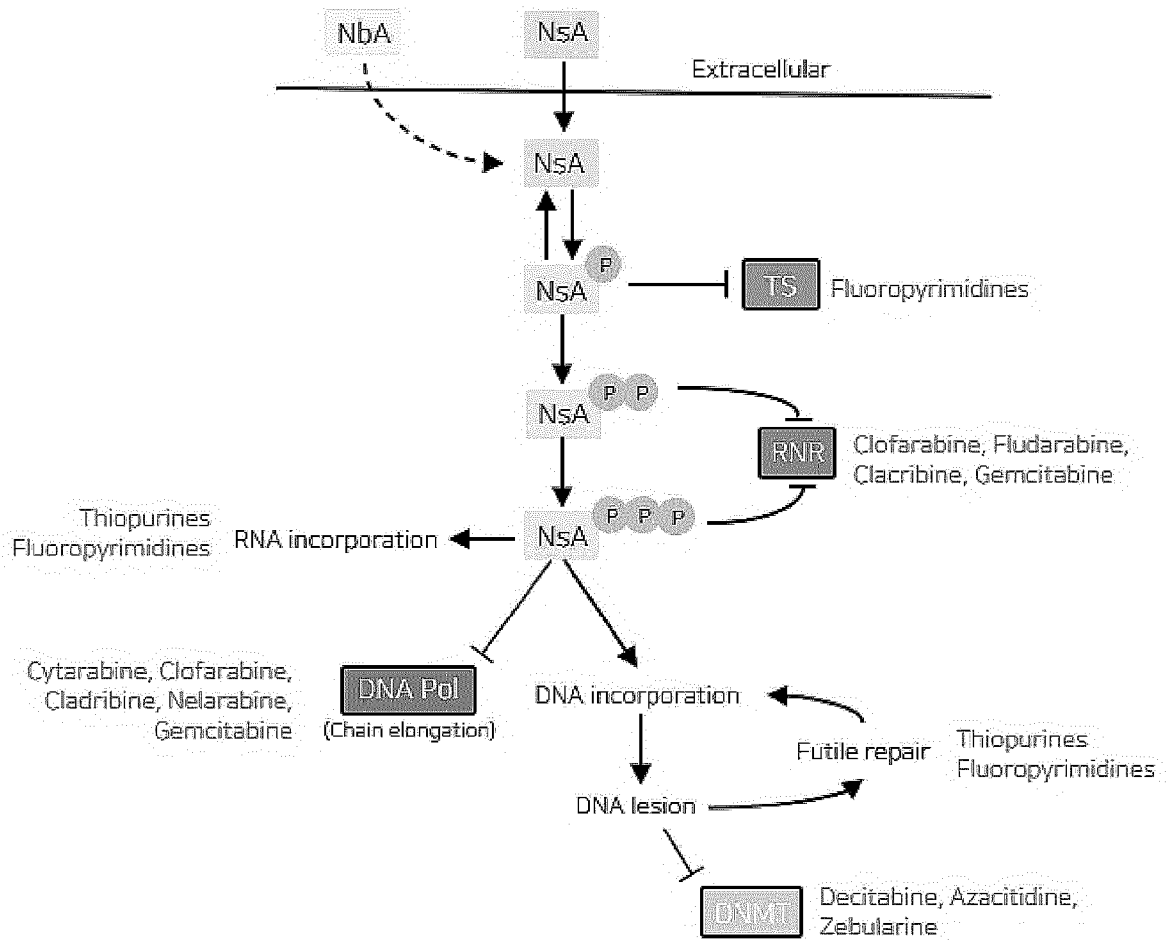
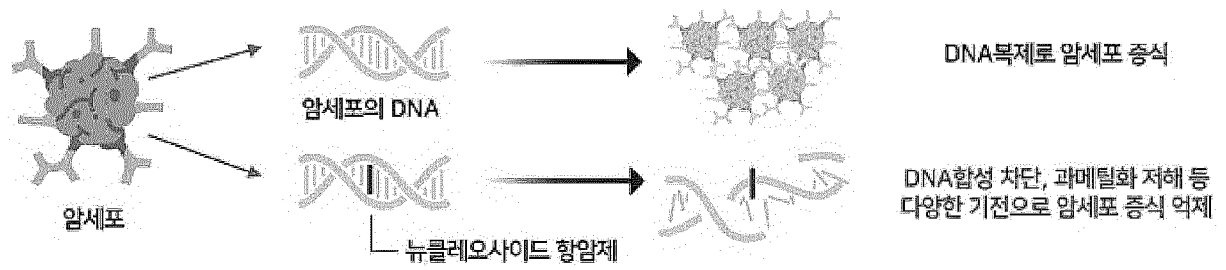
여기서, n=1~10, R은 각각 독립적으로 H 또는 다양한 치환기임.

- [청구항 11] 제3항에 있어서, 암세포 표적 전달체는 암세포 표면 항원을 표적화하는 항체 또는 이의 항원결합부위 함유 단편, 항체 모방 단백질(antibody-mimetic protein), 압타머(aptamer), 리피바디(repebody) 또는 펩타이드 기반 모달리티인 것이 특징인 접합체.
- [청구항 12] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, [약물]-[링커]-[암세포 표적 전달체(carrier)]를 포함하는 면역 접합체로서 항체-약물 접합체 (Antibody Drug Conjugate, ADC) 인 것이 특징인 접합체.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 항체-약물 접합체(ADC) 중 항체는 트라스투주맵(trastuzumab), 세톡시맵(cetuximab), 또는 사시투주맵(sacituzumab)인 것이 특징인 접합체.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 항체-약물 접합체(ADC) 중 항체는 gemcitabin 약물에 내성이 있는 세포를 표적화할 수 있는 항체인 것이 특징인 접합체.
- [청구항 15] 제12항의 항체-약물 접합체(ADC); 및 그의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.
- [청구항 16] 질환의 치료를 필요로 하는 인간 포함/비포함 동물에게 유효량의 제15항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 포함/비포함 동물에서 질환을 치료하는 방법.

[도 1]

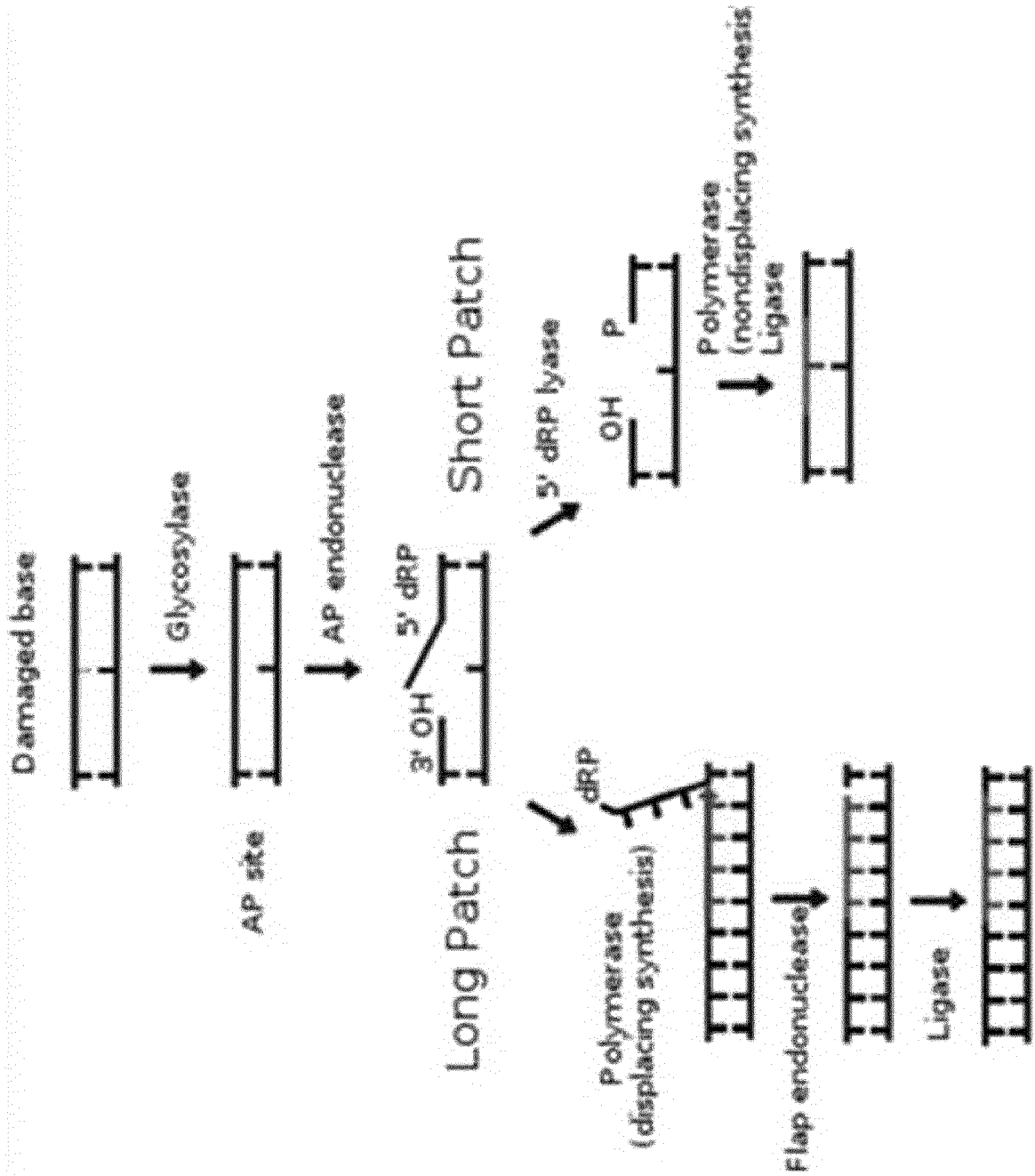


[도2]

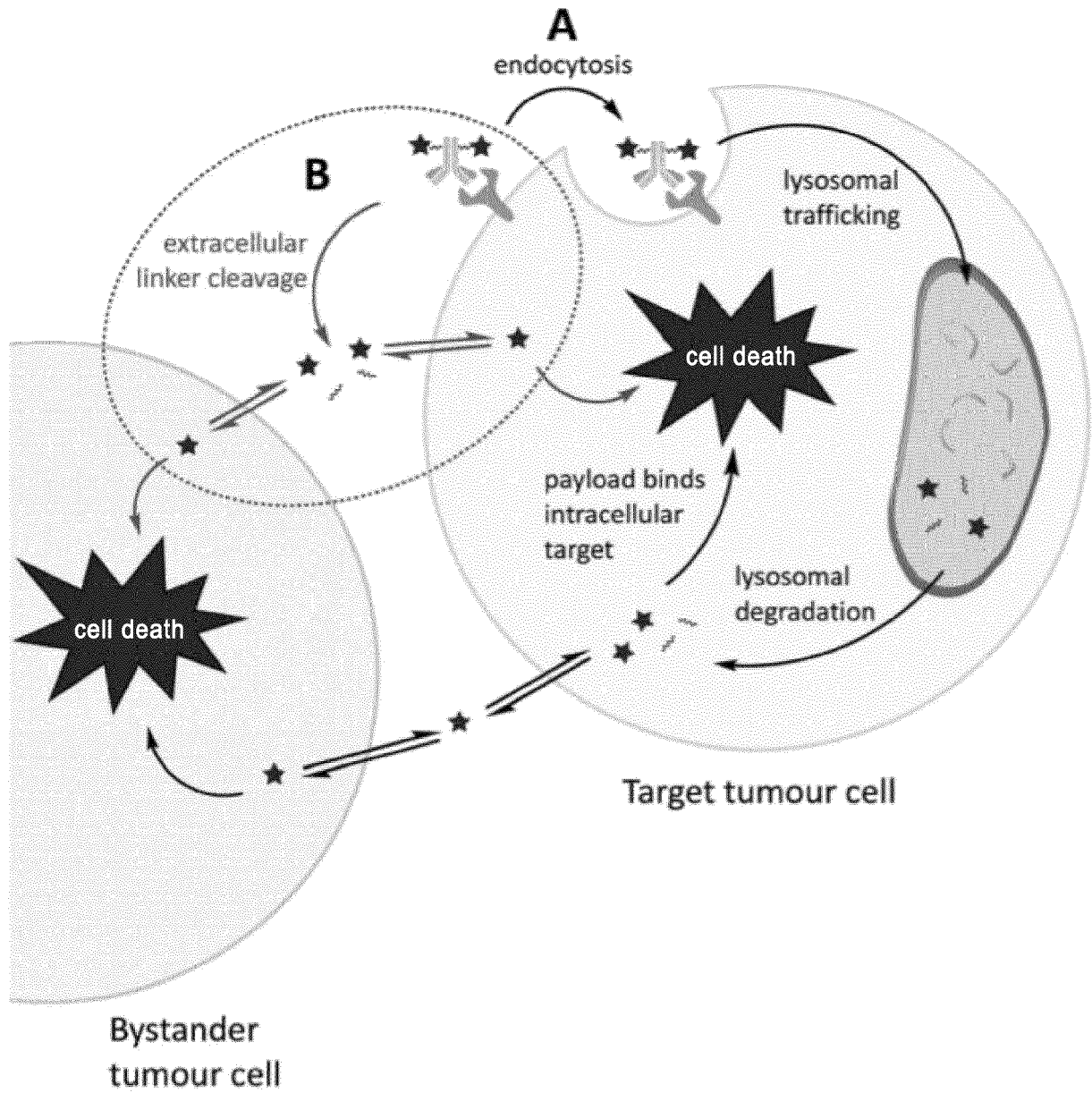




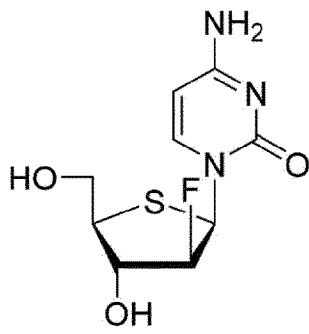
[도3]



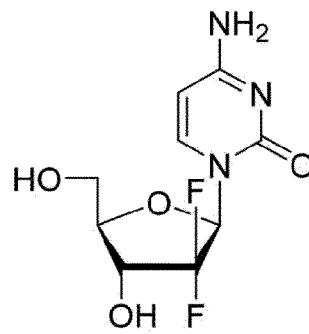
[도4]



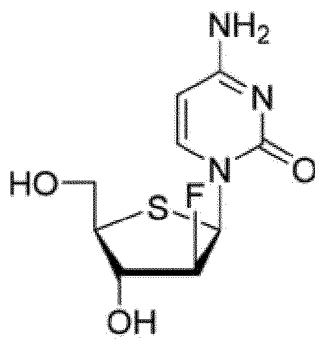
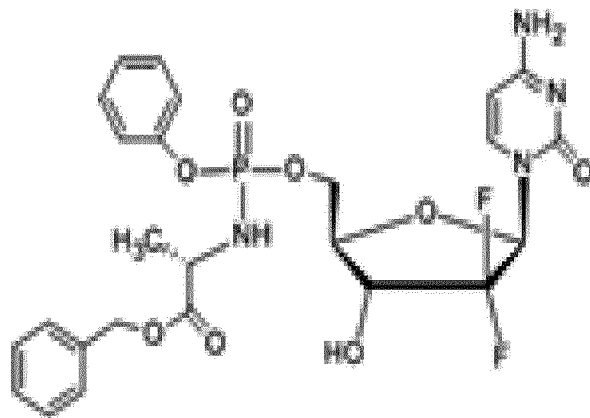
[도5]



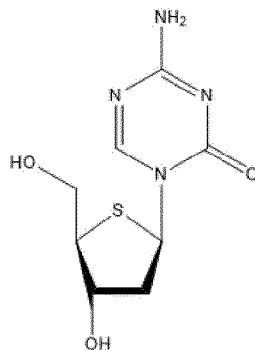
FF-10502



Gemcitabine

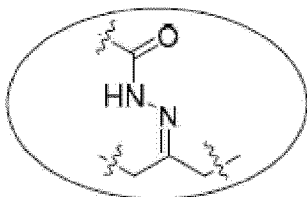


thio-FAC

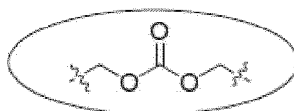


aza-Td-Cyd

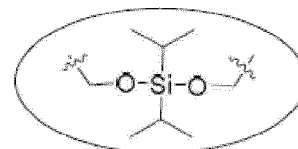
[도6]



**pH-sensitive hydrazone**  
(plasma half-life: 2~ 3 d)

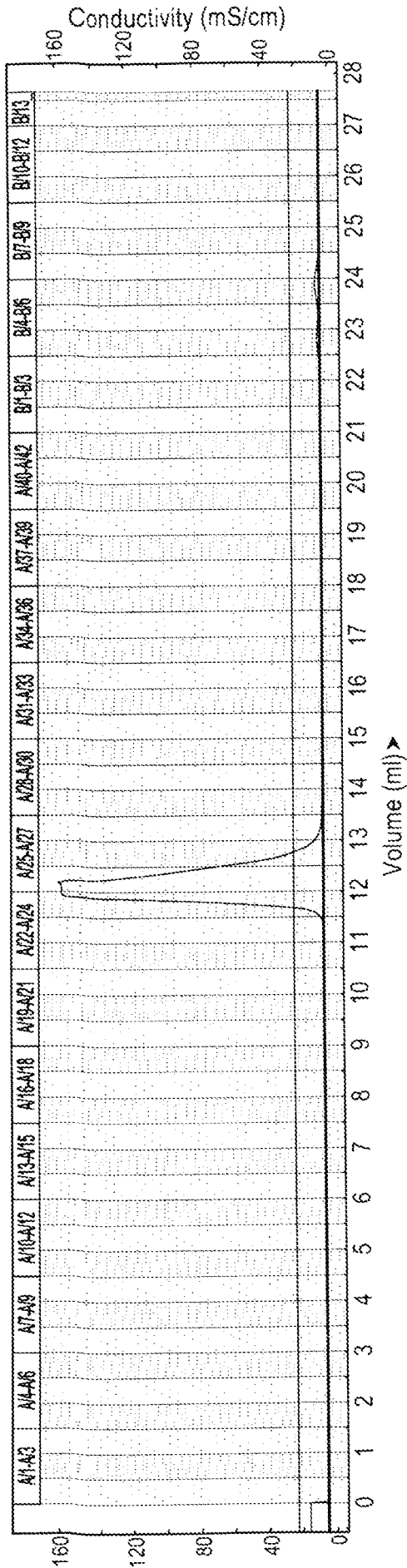


**pH-sensitive carbonate**  
(plasma half-life: < 1 d)

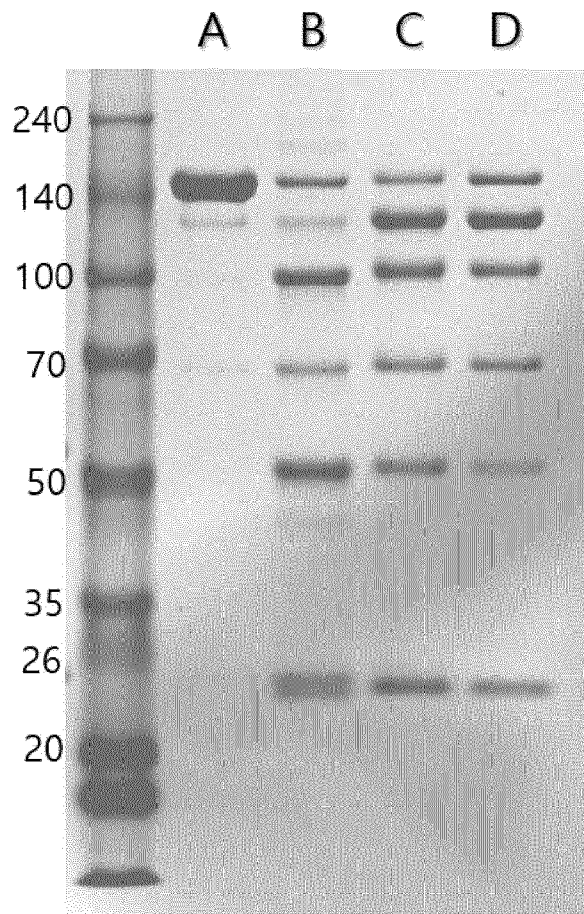


**pH-sensitive silyl ether**  
(plasma half-life: > 7 d)

[57]



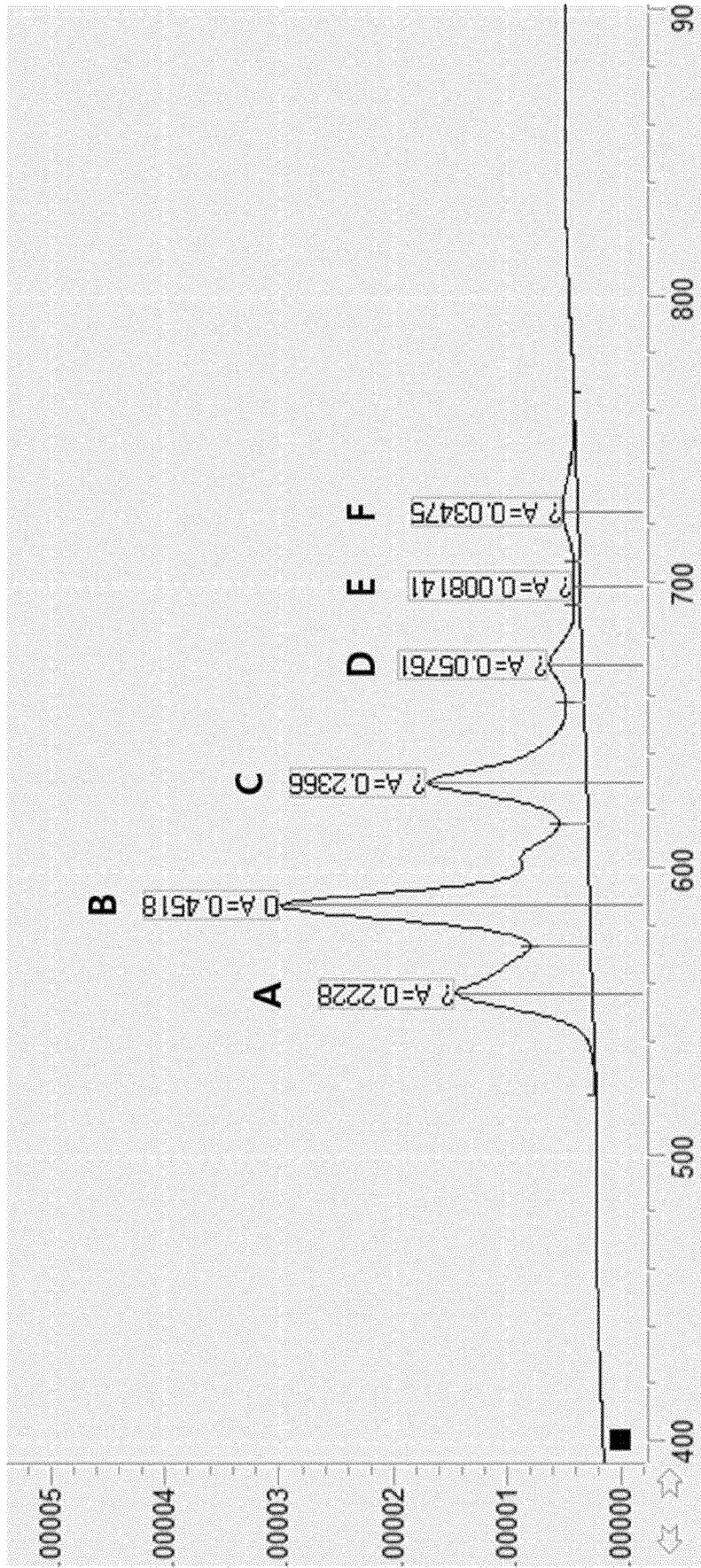
[도8]



Non-reduced gel

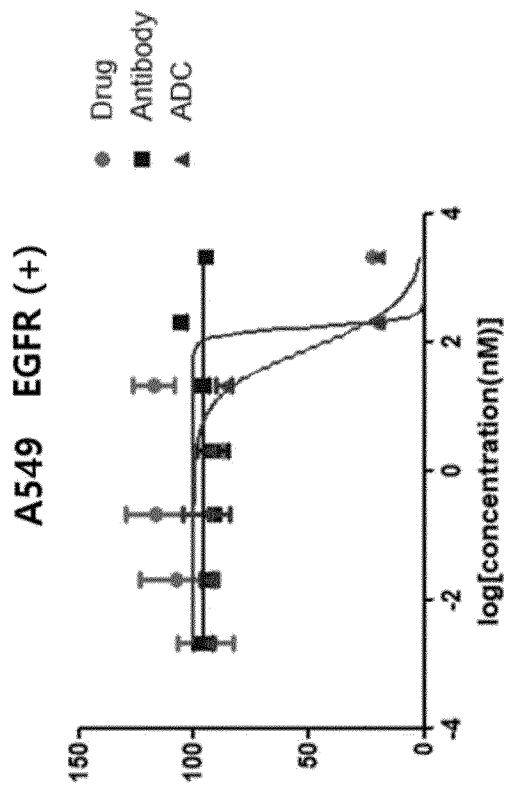
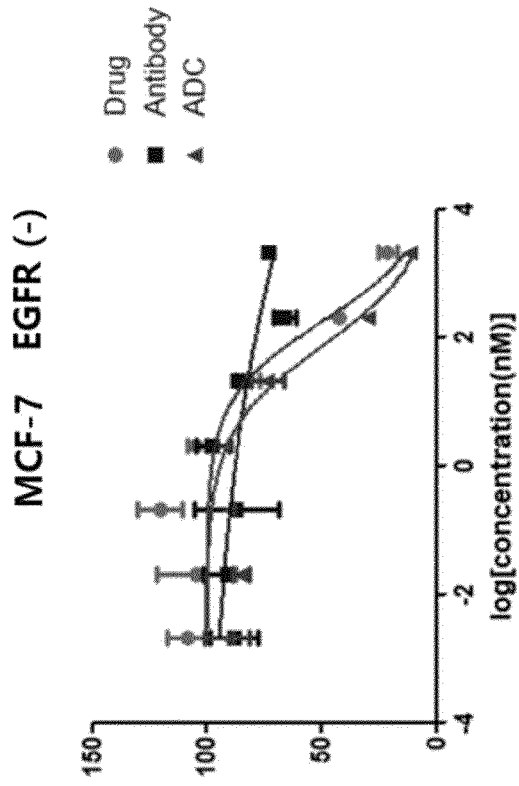
<b>A</b>	Intact Cetuximab
<b>B</b>	Cetuximab after reduction
<b>C</b>	Cetuximab after conjugation
<b>D</b>	After SEC purification

[도9]

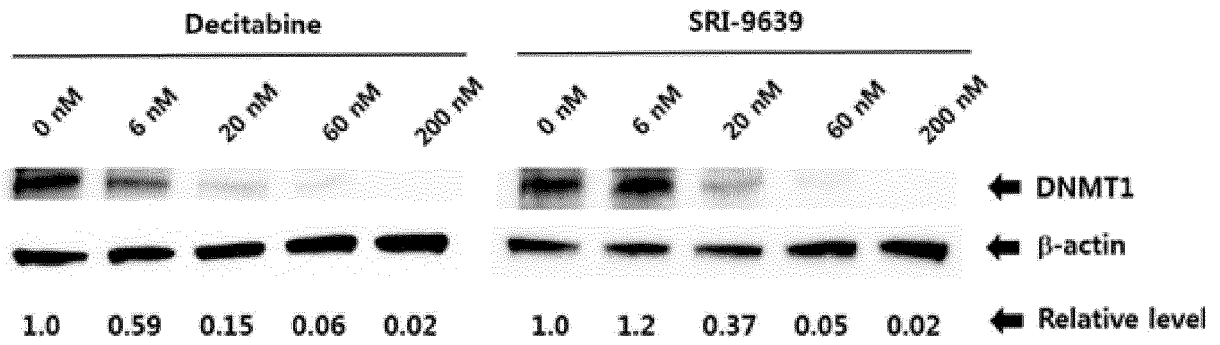


	Peak A	Peak B	Peak C	Peak D	Peak E	Peak F
Area	0.2228	0.4201	0.2056	0.0470	0.0064	0.0270
예상 DAR	0	2	4	6	7?	8
						DAR 2.37

[도 10]

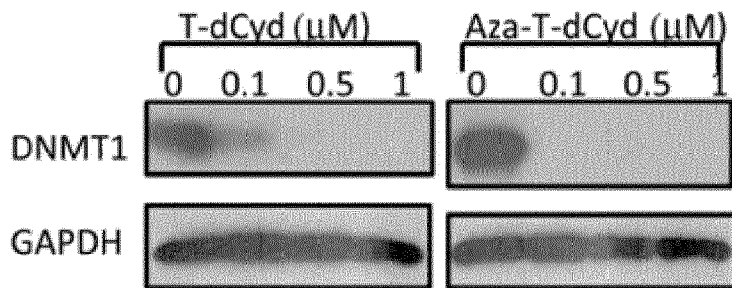


[도11]



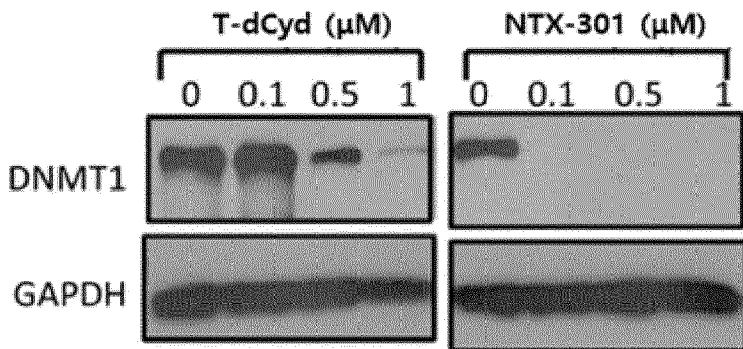
[도12]

**KG1a**



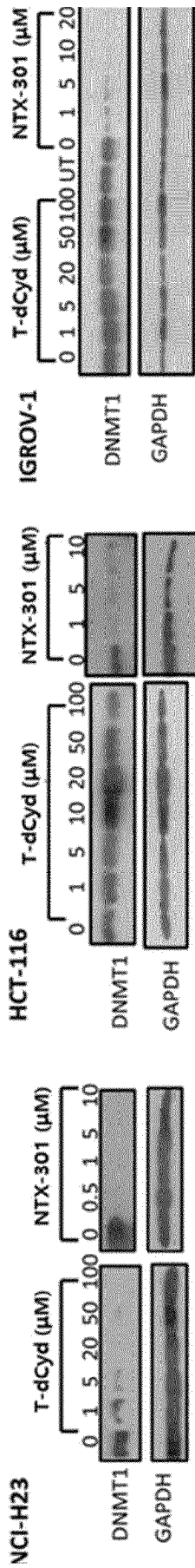
[도13]

**CCRF-CEM**

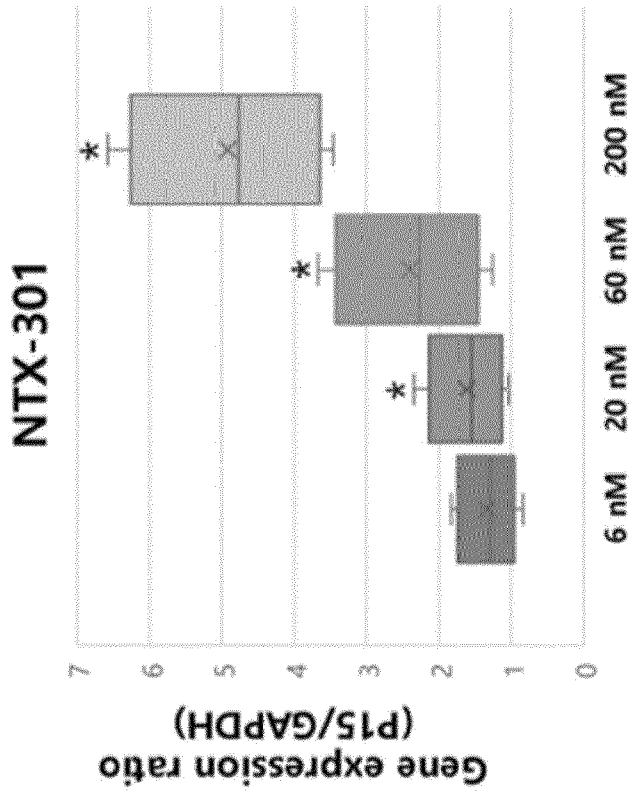




[도 14]

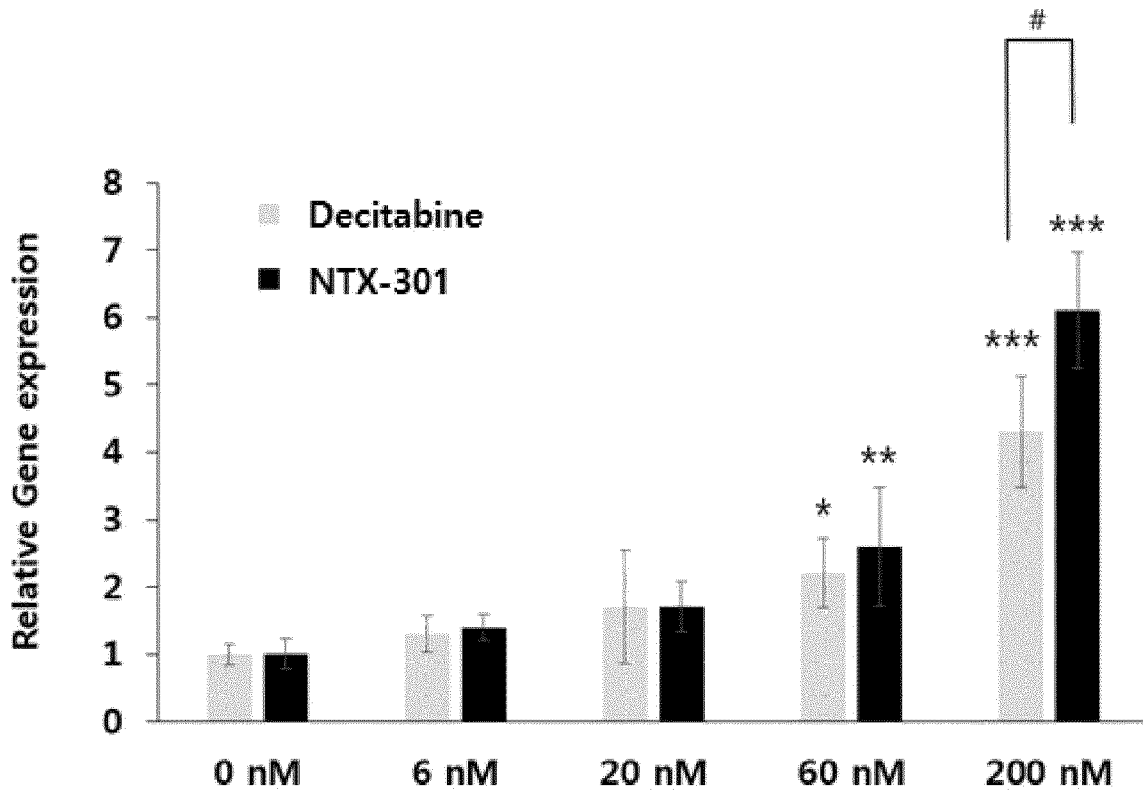


[도 15]



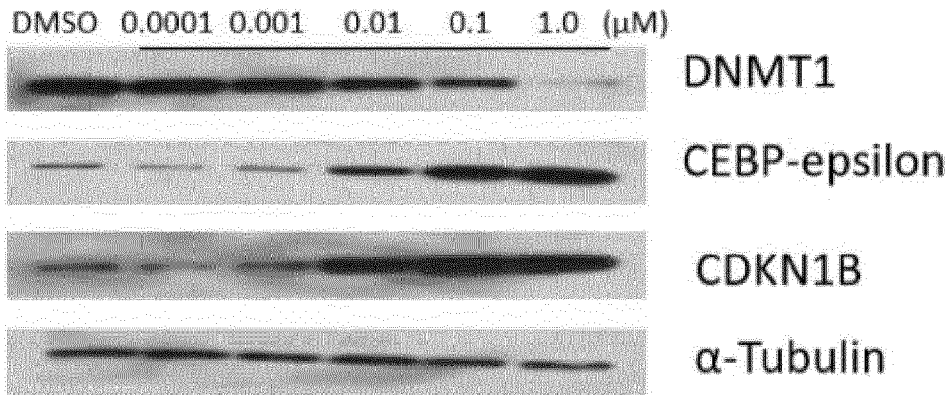
Treatment	Expt. Ratio	Std. Error	95% Confidence	P Value	Result
NTX-301_6nM <sup>□</sup>	1.292	1.073 - 1.684	0.834 - 1.833	0.1175	No Difference
NTX-301_20nM	1.548	1.228 - 1.928	1.039 - 2.342	0.0455	Up
NTX-301_60nM	2.269	1.641 - 3.185	1.263 - 3.670	0.0170	Up
NTX-301_200nM <sup>□</sup>	4.768	3.825 - 5.948	3.459 - 6.577	0.0350	Up

[도16]

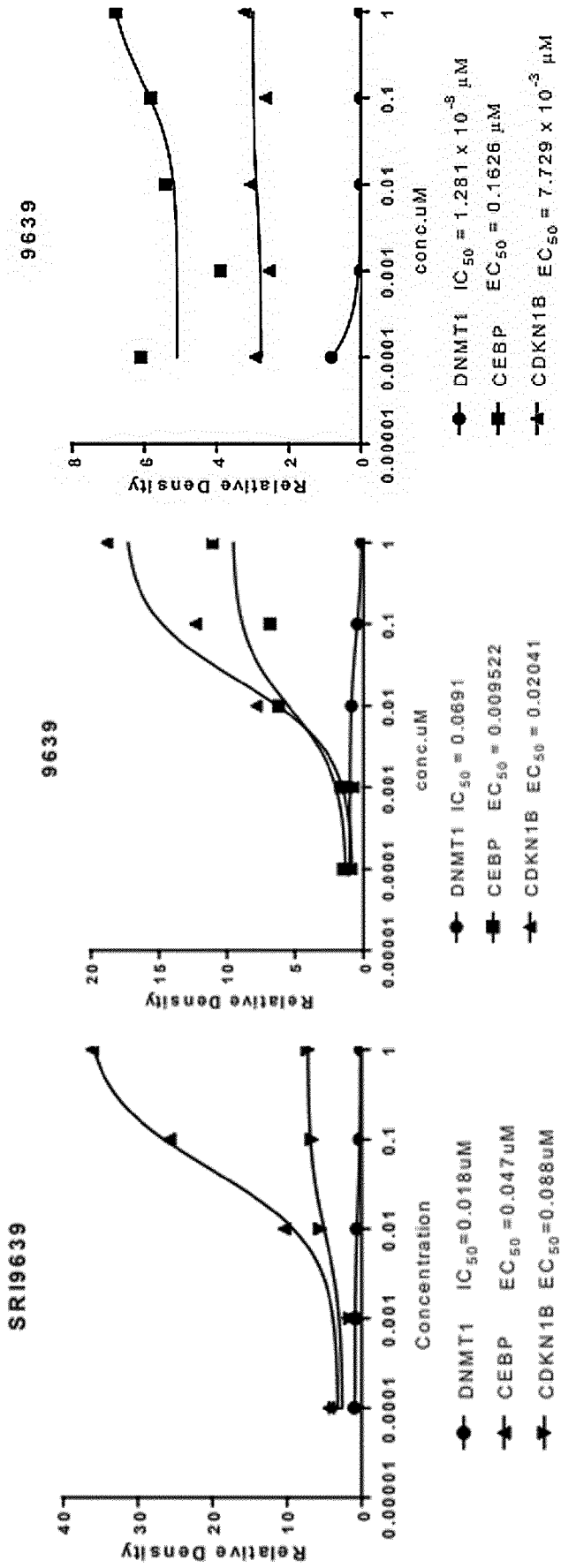


[도17]

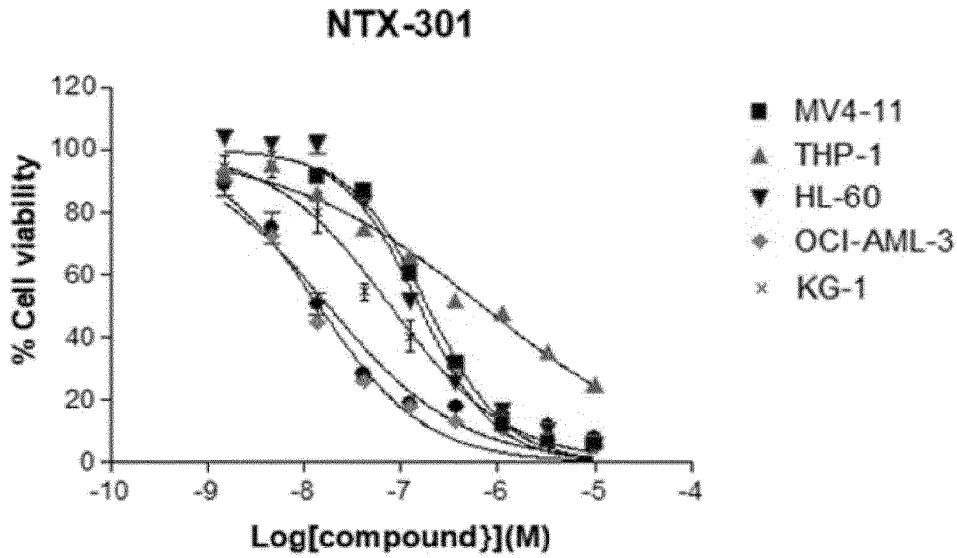
**NTX-301**



[도 18]

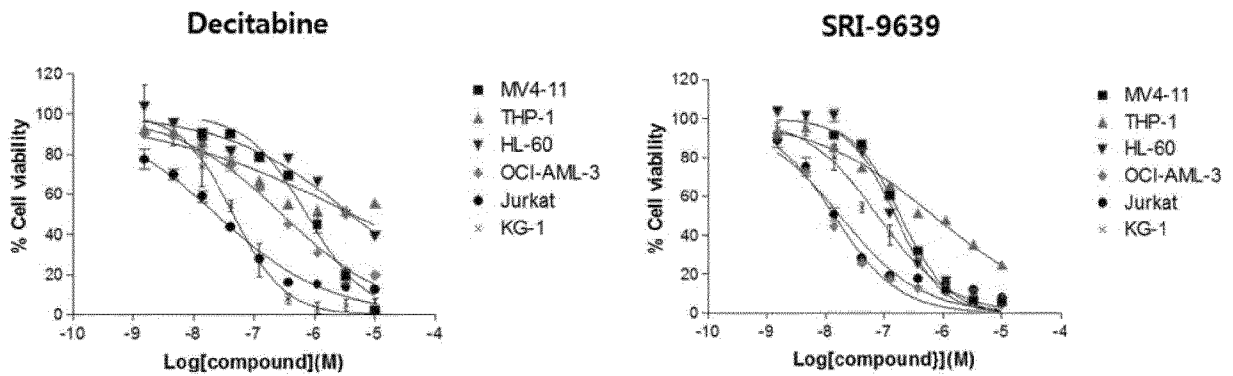


[도19]



Cell line	MV4-11	THP-1	HL-60	OCI-AML-3
NTX-301 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	0.19	0.69	0.15	0.014

[도20]



혈액암 세포주에 대한 Aza-T-dCyd과 Decitabine의 성장억제 효과 비교		
Cell line	GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
	Decitabine	Aza-T-dCyd
MV4-11	0.75	0.19
THP-1	4.3	0.69
HL-60	4.0	0.15
OCI-AML-3	0.29	0.014
Jurkat	0.024	0.018
KG-1	0.045	0.077

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2021/010517**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 31/7068(2006.01)i; A61K 31/706(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07F 7/08(2006.01)i; C07H 19/067(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 47/68(2017.01); A61K 31/7068(2006.01); A61K 47/65(2017.01); A61P 35/00(2006.01); C07H 19/10(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Pubchem, google & keywords: 테옥시사이티딘계 항암제 (deoxycytidine based anticancer agent), 실릴에테르 (silyl ether), 항체-약물 접합체 (antibody-drug conjugate)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FINNISS, M. C. et al. A versatile acid-labile linker for antibody–drug conjugates. Medicinal chemistry communications. 2014, vol. 5, no. 9, pp. 1355-1358. See abstract; pages 1355-1356; and scheme 1.	1-15
Y	MINI, E. et al. Cellular pharmacology of gemcitabine. Annals of oncology. 2006, vol. 17, appendix 5, pp. v7–v12. See abstract; and page v7.	1-15
Y	US 2011-0218170 A1 (THOTTASSERY, J. et al.) 08 September 2011 (2011-09-08) See paragraphs [0002], [0005] and [0009].	5-7
Y	KR 10-2018-0115330 A (EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.) 22 October 2018 (2018-10-22) See paragraphs [0017], [0018] and [0245]; and claim 1.	8-10
Y	WO 2005-012327 A2 (UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS LIMITED) 10 February 2005 (2005-02-10) See pages 1-4 and 70.	10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>23 November 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>23 November 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/KR <b>Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208</b> Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer  Telephone No.

**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.: **16**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (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).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2021/010517**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2011-0218170	A1	08 September 2011	WO	2011-109012	A1	09 September 2011
				WO	2011-109383	A1	09 September 2011
KR	10-2018-0115330	A	22 October 2018	AR	107787	A1	06 June 2018
				AU	2017-225982	A1	16 August 2018
				BR	112018067379	A2	15 January 2019
				CA	3013791	A1	08 September 2017
				CL	2018002456	A1	21 December 2018
				CL	2021000048	A1	28 May 2021
				CL	2021000049	A1	28 May 2021
				CN	108883198	A	23 November 2018
				CO	2018008667	A2	31 August 2018
				DK	3423105	T3	26 July 2021
				EP	3423105	A1	09 January 2019
				EP	3423105	B1	05 May 2021
				EP	3824909	A1	26 May 2021
				HR	P20211125	T1	15 October 2021
				HU	E054726	T2	28 September 2021
				JP	2019-516664	A	20 June 2019
				JP	2020-019787	A	06 February 2020
				JP	2020-128413	A	27 August 2020
				JP	6599019	B2	30 October 2019
				JP	6870051	B2	12 May 2021
				LT	3423105	T	10 September 2021
				MA	45280	A	09 January 2019
				MA	45280	B1	31 August 2021
				MX	2018010562	A	20 February 2019
				PE	20181953	A1	17 December 2018
				PH	12018501847	A1	15 May 2019
				PT	3423105	T	19 July 2021
				RS	62108	B1	31 August 2021
				RU	2018134331	A	02 April 2020
				RU	2018134331	A3	14 August 2020
				RU	2754369	C2	01 September 2021
				SG	10202007520	WA	29 September 2020
				SG	11201806515	RA	27 September 2018
				TW	201800110	A	01 January 2018
				US	10322192	B2	18 June 2019
				US	10548986	B2	04 February 2020
				US	2017-0252458	A1	07 September 2017
				US	2018-0193478	A1	12 July 2018
				US	2020-0297860	A1	24 September 2020
				WO	2017-151979	A1	08 September 2017
WO	2005-012327	A2	10 February 2005	AU	2004-261455	A1	10 February 2005
				AU	2004-261455	B2	23 December 2010
				CA	20053993	C	20 March 2012
				CA	2518115	A1	10 February 2005
				CY	1117960	T1	17 May 2017
				CY	1120202	T1	12 December 2018
				CY	1121218	T1	29 May 2020
				DK	1646639	T3	12 September 2016



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2021/010517**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		DK 2955190 T3	22 May 2018
		DK 3040340 T3	25 February 2019
		EP 1646639 A2	19 April 2006
		EP 1646639 B1	17 August 2016
		EP 1646639 B8	21 December 2016
		EP 2955190 A2	16 December 2015
		EP 2955190 A3	16 March 2016
		EP 2955190 B1	28 March 2018
		EP 3040340 A1	06 July 2016
		EP 3040340 B1	14 November 2018
		EP 3486251 A1	22 May 2019
		ES 2589738 T3	16 November 2016
		ES 2667698 T3	14 May 2018
		ES 2708570 T3	10 April 2019
		HU E030374 T2	29 May 2017
		HU E042282 T2	28 June 2019
		JP 2006-528162 A	14 December 2006
		JP 4923216 B2	25 April 2012
		MX PA20053993 A	08 February 2006
		NO 20053993 L	02 November 2005
		NO 333603 B1	22 July 2013
		NZ 20053993 A	31 March 2009
		PL 1646639 T3	30 December 2016
		PL 2955190 T3	28 September 2018
		PL 3040340 T3	31 May 2019
		PT 20053993 T	05 September 2016
		PT 20053993 T	07 May 2018
		PT 20053993 T	06 February 2019
		SI 2955190 T1	31 August 2018
		SI 3040340 T1	29 March 2019
		TR 201901246 T4	21 February 2019
		US 2006-0142238 A1	29 June 2006
		US 7951787 B2	31 May 2011
		US RE475789 E	03 September 2019
		WO 2005-012327 A3	21 April 2005

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> <b>A61K 47/68(2017.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 31/7068(2006.01)i; A61K 31/706(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07F 7/08(2006.01)i; C07H 19/067(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i</b>		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 47/68(2017.01); A61K 31/7068(2006.01); A61K 47/65(2017.01); A61P 35/00(2006.01); C07H 19/10(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN (Registry, Caplus), Pubchem, google & keyword: 데옥시사이티딘계 항암제 (deoxycytidine based anticancer agent), 실릴에테르 (silyl ether), 항체-약물 접합체 (antibody-drug conjugate)		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	FINNISS, M. C. 등, "A versatile acid-labile linker for antibody–drug conjugates", Medicinal chemistry communications, 2014, 5권, 9호, 페이지 1355-1358 초록; 페이지 1355-1356; 스킴 1	1-15
Y	MINI, E. 등, "Cellular pharmacology of gemcitabine", Annals of oncology, 2006, 17권, 부록 5, 페이지 v 7-v12 초록; 페이지 v7	1-15
Y	US 2011-0218170 A1 (THOTTASSERY, J. 등) 2011.09.08 단락 [0002], [0005], [0009]	5-7
Y	KR 10-2018-0115330 A (에자이 알앤트디 배너지먼트 가부시키키가이사) 2018.10.22 단락 [0017], [0018], [0245]; 청구항 1	8-10
Y	WO 2005-012327 A2 (UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS LIMITED) 2005.02.10 페이지 1-4, 70	10
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 <b>2021년11월23일(23.11.2021)</b>		국제조사보고서 발송일 <b>2021년11월23일(23.11.2021)</b>
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: **16**  
 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
 청구항 16은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
  
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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0218170 A1	2011/09/08	WO 2011-109012 A1	2011/09/09
		WO 2011-109383 A1	2011/09/09
KR 10-2018-0115330 A	2018/10/22	AR 107787 A1	2018/06/06
		AU 2017-225982 A1	2018/08/16
		BR 112018067379 A2	2019/01/15
		CA 3013791 A1	2017/09/08
		CL 2018002456 A1	2018/12/21
		CL 2021000048 A1	2021/05/28
		CL 2021000049 A1	2021/05/28
		CN 108883198 A	2018/11/23
		CO 2018008667 A2	2018/08/31
		DK 3423105 T3	2021/07/26
		EP 3423105 A1	2019/01/09
		EP 3423105 B1	2021/05/05
		EP 3824909 A1	2021/05/26
		HR P20211125 T1	2021/10/15
		HU E054726 T2	2021/09/28
		JP 2019-516664 A	2019/06/20
		JP 2020-019787 A	2020/02/06
		JP 2020-128413 A	2020/08/27
		JP 6599019 B2	2019/10/30
		JP 6870051 B2	2021/05/12
		LT 3423105 T	2021/09/10
		MA 45280 A	2019/01/09
		MA 45280 B1	2021/08/31
		MX 2018010562 A	2019/02/20
		PE 20181953 A1	2018/12/17
		PH 12018501847 A1	2019/05/15
		PT 3423105 T	2021/07/19
		RS 62108 B1	2021/08/31
		RU 2018134331 A	2020/04/02
		RU 2018134331 A3	2020/08/14
		RU 2754369 C2	2021/09/01
		SG 10202007520 WA	2020/09/29
		SG 11201806515 RA	2018/09/27
TW 201800110 A	2018/01/01		
US 10322192 B2	2019/06/18		
US 10548986 B2	2020/02/04		
US 2017-0252458 A1	2017/09/07		
US 2018-0193478 A1	2018/07/12		
US 2020-0297860 A1	2020/09/24		
WO 2017-151979 A1	2017/09/08		
WO 2005-012327 A2	2005/02/10	AU 2004-261455 A1	2005/02/10
		AU 2004-261455 B2	2010/12/23
		CA 20053993 C	2012/03/20
		CA 2518115 A1	2005/02/10
		CY 1117960 T1	2017/05/17
		CY 1120202 T1	2018/12/12
		CY 1121218 T1	2020/05/29
		DK 1646639 T3	2016/09/12

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		DK 2955190 T3	2018/05/22
		DK 3040340 T3	2019/02/25
		EP 1646639 A2	2006/04/19
		EP 1646639 B1	2016/08/17
		EP 1646639 B8	2016/12/21
		EP 2955190 A2	2015/12/16
		EP 2955190 A3	2016/03/16
		EP 2955190 B1	2018/03/28
		EP 3040340 A1	2016/07/06
		EP 3040340 B1	2018/11/14
		EP 3486251 A1	2019/05/22
		ES 2589738 T3	2016/11/16
		ES 2667698 T3	2018/05/14
		ES 2708570 T3	2019/04/10
		HU E030374 T2	2017/05/29
		HU E042282 T2	2019/06/28
		JP 2006-528162 A	2006/12/14
		JP 4923216 B2	2012/04/25
		MX PA20053993 A	2006/02/08
		NO 20053993 L	2005/11/02
		NO 333603 B1	2013/07/22
		NZ 20053993 A	2009/03/31
		PL 1646639 T3	2016/12/30
		PL 2955190 T3	2018/09/28
		PL 3040340 T3	2019/05/31
		PT 20053993 T	2016/09/05
		PT 20053993 T	2018/05/07
		PT 20053993 T	2019/02/06
		SI 2955190 T1	2018/08/31
		SI 3040340 T1	2019/03/29
		TR 201901246 T4	2019/02/21
		US 2006-0142238 A1	2006/06/29
		US 7951787 B2	2011/05/31
		US RE475789 E	2019/09/03
		WO 2005-012327 A3	2005/04/21