(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 7 월 3 일 (03.07.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/143279 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/706 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A23K 20/137* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/021623

(22) 국제출원일: 2023 년 12 월 26 일 (26.12.2023)

(25) 출원언어: 한국어

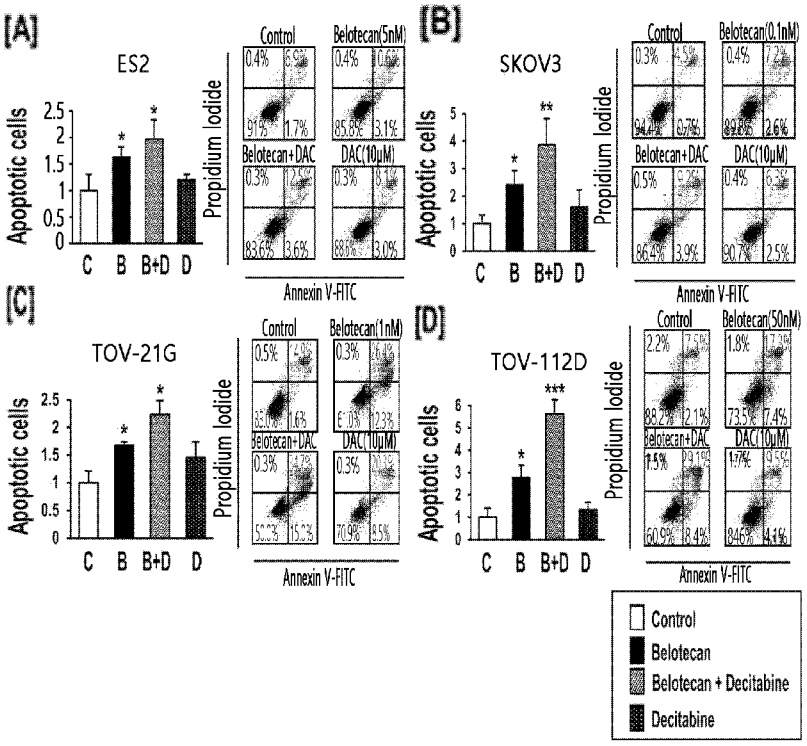
(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0191683 2023 년 12 월 26 일 (26.12.2023) KR

(71) 출원인: **서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL)** [KR/KR]; 03080 서울특별시 종로구 대학로 101 (KR). **드림팩 주식회사 (DREAMPAC CORPORATION)** [KR/KR]; 26311 강원특별자치도 원주시 태장공단길 42-10, 1동 112호 (KR). **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (KR). **서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1 (KR). **성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (KR). **경상국립대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501 (KR). **복막암종증정밀의료협동조합 (PRECISION MEDICINE FOR PERITONEAL METASTASIS COOPERATIVE)** [KR/KR]; 26353 강원특별자치도 원주시

(54) **Title:** COMBINATION REGIMEN OF DECITABINE AND BELOTECAN FOR PREVENTING OR TREATING OVARIAN CANCER

(54) **발명의 명칭:** 난소암 예방 또는 치료를 위한 데시타빈 및 벨로테칸의 병용 요법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a combination regimen of Decitabine and Belotecan for preventing or treating ovarian cancer, and provides a pharmaceutical composition for preventing or treating ovarian cancer, the pharmaceutical composition being characterized by comprising Decitabine or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof as an active ingredient, wherein the pharmaceutical composition is administered in combination with Belotecan or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof.

(57) **요약서:** 본 발명은 난소암 예방 또는 치료를 위한 데시타빈(Decitabine) 및 벨로테칸(Belotecan)의 병용 요법에 관한 것으로, 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 난소암의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 약학적 조성물은 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물과 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물을 제공한다.

WO 2025/143279 A1

[다음 쪽 계속]

지정면 신지정로 250, 508동 504호 (KR). **계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY)** [KR/KR]; 42601 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호 (KR).

(72) 발명자: 김희승 (KIM, Hee Seung); 06603 서울특별시 서초구 서초중앙로24길 57, 101동 1001호 (KR). **박수진 (PARK, Soo Jin)**; 04315 서울특별시 용산구 백범로90길 74, 102동 302호 (KR). **이승미 (LEE, Seungmee)**; 42242 대구광역시 수성구 범안로 40, 203동 1101호 (KR). **송권화 (SONG, Gwonhwa)**; 31175 충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호 (KR). **임화선 (LIM, Whasun)**; 16420 경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호 (KR). **박선우 (PARK, Sunwoo)**; 52820 경상남도 진주시 가호로 26, 205동 206호 (KR). **박원형 (PARK, Wonhyoung)**; 57936 전라남도 순천시 삼산로 135-5, 4동 902호 (KR).

(74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울특별시 송파구 법원로 135, 6층 (KR).

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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 난소암 예방 또는 치료를 위한 데시타빈 및 벨로테칸의 병용 요법

기술분야

[1] 본 발명은 난소암 예방 또는 치료를 위한 데시타빈 및 벨로테칸의 병용 요법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 난소암 (Ovarian cancer)은 전 세계적으로 가장 치명적인 부인 암 중 하나이다. 미국에서 2019년 난소암으로 인한 암 사망 건수는 13,980 명 (여성 암 사망의 4.9 %)으로 추정되며, 한국에서는 난소암의 발생이 점차 증가하고 있는 추세이다. 그러나 난소암에 대한 효과적인 진단 방법이 없어 대부분의 난소암은 치료가 어려운 단계에서 진단되어 높은 재발 및 사망률을 보인다.

[4] 난소암의 예후가 좋지 않은 이유는 난소암 발병 초기에 증상이 거의 없기 때문에 조기 진단이 어렵고 진행성 난소암의 경우 항암제 내성을 가지고 있기 때문이다. 난소암이 초기에 진단되었을 때 5년 생존율이 90% 이상에 달하지만, 후기에 발견되어 전이가 진행된 상태라면 5년 생존율이 30% 이하로 급감하게 된다.

[5]

[6] 하지만, 난소암을 진단받은 환자들의 75% 이상이 난소 근처 또는 복강으로 전이가 일어난 뒤에야 난소암을 진단받고 있고, 난소암 치료 후 약 70% 정도의 환자들은 항암제 내성과 함께 재발을 나타낸다. 파클리탁셀과 시스플라틴 병용 화학 요법은 1996년 난소암 환자 치료의 표준으로 도입된 이래 지속적으로 사용되며, 개선된 수술, 보조 치료 및 화학 요법 약물의 조합에도 불구하고 난소암은 지속적으로 재발하고 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 현재까지 난소암에 어느 정도 효과가 있는 화합물로서 벨로테칸(Belotecan)을 사용하고 있으나, 보다 효과가 우수한 약물을 개발할 필요성이 대두되어 왔다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 본 발명의 목적은 데시타빈(Decitabine), 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸(Belotecan), 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 병용하는, 난소암 예방, 개선 또는 치료를 위한 요법을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 함유하는, 난소암 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물과 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 함유하는, 난소암 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물과 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 하나의 목적은, 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는, 조합물을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 하나의 목적은, 상기 조합물을 포함하는 난소암 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 하나의 목적은, 상기 조합물을 포함하는 난소암 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 키트를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 하나의 목적은, 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 이를 필요로 하는 개체에 투여 및/또는 사용하는 단계를 포함하는, 난소암 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 하나의 목적은 데시타빈 또는 식품학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 식품학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 하나의 목적은 데시타빈 또는 사료학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 사료학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 예방 또는 개선용 사료용 조성물을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 하나의 목적은 데시타빈 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 세포주의 증식 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 또 하나의 목적은 데시타빈 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 전이 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 또 하나의 목적은, 약학적 유효량의 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 병용 투여 및/또는 병용 사용하는 단계를 포함하는, 난소암 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[22] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트의 난소암의 예방, 개선 또는 치료 용도, 및/또는 난소암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 용도를 제공하는 것이다.

[23]

발명의 효과

[24] 본 발명의 병용 투여 요법은 단일 투여 요법에 비해 향상된 효과를 가져, 난소암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[25]

도면의 간단한 설명

[26] 도 1은 5개의 난소암 세포주의 정보에 관한 것이다. 구체적으로 각 세포주에서 TP53 및 ARID1A의 조직학적 유형, 기원 및 돌연변이 유형을 나타낸다.

[27] 도 2는 인간 및 마우스 난소 암종 세포주의 세포 생존 가능성을 나타낸 것이다. 세포를 표시된 용량의 벨로테칸 또는 토포테칸으로 처리한 결과를 나타내며 열린 원은 벨로테칸을 나타내고 닫힌 원은 토포테칸 치료군을 나타낸다(n=3). 벨로테칸과 토포테칸은 ES-2[A] 및 TOV-112D[D] 세포에서 나노 몰 용량으로 처리되었고 SKOV3[B], TOV-21G[C] 및 ID8[E] 세포에서 마이크로 몰 용량으로 처리되었다. 통계적 유의성은 별표로 표시된다(***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$).

[28] 도 3은 다양한 용량의 데시타빈으로 처리한 후 인간 및 마우스 난소 암종 세포주의 세포 생존율을 나타낸 것이다. 선 그래프는 ES-2[A], TOV-21G[C], SKOV3[B], TOV-112D[D] 및 ID8[E] 세포에서 수행된 MTT 분석 결과를 나타낸다. 통계적 유의성은 별표로 표시된다(***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$).

[29] 도 4는 벨로테칸과 다양한 용량의 데시타빈을 병용 처리한 후, 인간 난소 암 세포주에서 세포 생존 가능성을 검증한 것이다. 막대 그래프는 ES-2[A], SKOV3[B], TOV-21G[C] 및 TOV-112D[D] 세포의 생존율에 대한 벨로테칸과 데시타빈의 추가 효과를 나타낸다. 그래프는 3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균 ± 표준 편차로 표현된다. 대조군과 비교한 통계적 유의성은 별표로 표시된다(***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$). 소문자 a는 벨로테칸 단독요법과의 통계적 차이를 나타낸다.

[30] 도 5는 48시간 동안 벨로테칸 및/또는 데시타빈으로 처리한 후, 인간 난소암 세포주 ES-2[A], SKOV3[B], TOV-21G[C] 및 TOV-112D[D]의 세포사멸을 나타낸 것이다. 도트 플롯은 Annexin V 및 PI로 염색된 세포에 대한 유세포 분석 결과를 보여준다. 막대 그래프는 Annexin V- 및 PI- 이중 양성 세포의 상대 값을 나타낸다. 그래프는 3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균 ± 표준 편차로 표현된다. 통계적 유의성은 별표로 표시된다(***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$). 소문자 a는 벨로테칸 단독요법과의 통계적 차이를 나타낸다.

[31] 도 6은 24시간 동안 데시타빈으로 처리한 후 TNF 및 TGFB1의 전사 발현을 나타낸 것이다. 막대 그래프는 ES-2[A 및 F], SKOV3[B 및 F], TOV-21G[C 및 G] 및 TOV-112D [D와 H]에서 데시타빈 처리 후 TNF 및 TGFB1 mRNA의 상대적 발현 수준을 나타낸다. 그래프는 3개의 독립적인 생물학적 복제물의 평균 ± 표준 편

차로 표현된다. 통계적 유의성은 별표로 표시된다(***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

[32] 도 7은 데시타빈 처리 후 마우스 비장의 림프구에 대한 유세포 분석을 나타낸 것이다. 데시타빈(0.25 mg/kg)을 1일 5회, 2일에 6회, 2일에 10회 복강내 투여하였다. SSC-A/FSC-A 등고선 플롯은 림프구 크기에 따른 게이팅을 나타낸다. 이중선을 제거하기 위해 세포를 FSC-A/FSC-H에서 게이팅하였다. 세 번째 행의 플롯은 대조군[A], 5회[B], 6회[C] 및 10회[D] 처리된 마우스(n=1)에서 CD3+CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다. 통계적 유의성은 별표로 표시된다(***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

[33] 도 8은 [A] 수술, 그룹화, 치료 및 희생을 포함한 실험 절차의 타임라인을 나타낸 것이다. 구체적으로, 마우스의 피하로 ID8 세포(100 μl 중 1.0 x 10^7)를 이식하였다. 마우스에게 벨로테칸(0.17 mg/kg) PBS 또는 벨로테칸(0.17 mg/kg)과 데시타빈(0.25 mg/kg)의 조합을 주사하였다. 데시타빈은 2일 간격으로 6회 주사하였고, 최종 치료 2주 후에 데이터를 측정하였다. [B] 표는 각 처리군(n=5)에서 마우스의 피하 종양 크기와 질량을 측정한 결과를 나타낸다. [C] 그래프는 피하 종양의 부피를 나타낸다(n=5). [D] 막대 그래프는 마우스 비장(n=3)의 CD3+ T 세포 비율의 상대 값을 나타낸다. [E 및 F] 막대 그래프는 각 치료군(n=3)에서 마우스 비장의 CD8+PD-1+ T 세포 및 CD8+CTLA4+ T 세포 비율의 상대값을 나타낸다. 막대 그래프의 데이터는 평균 ± SD로 표시된다. 통계적 유의성은 별표로 표시된다(***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

[34]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[35] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[36] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[37] 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[38]

[39] 본 발명의 하나의 양태는 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 병용하는, 난소암 예방, 개선 또는 치료를 위한 요법이다.

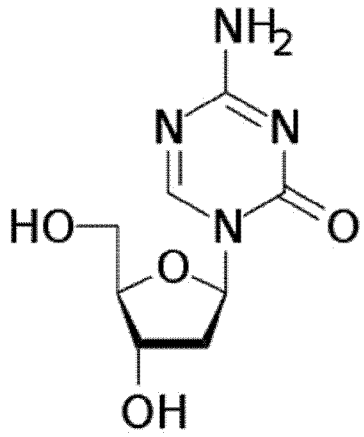
[40] 본 발명의 다른 하나의 양태는 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 함유하는, 난소암 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물과 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물이다.

[41] 본 발명의 다른 하나의 양태는 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 함유하는, 난소암 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물과 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물이다.

[42]

[43] 본 발명의 '데시타빈(Decitabine)' 핵산 합성 억제제 역할을 하며, 특정 혈액 세포가 기능을 발휘하지 못하는 상태인 골수이형성 증후군과 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료를 위한 약물로 사용된다. 상기 데시타빈의 IUPAC Name은 4-Amino-1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-1,3,5-triazin-2(1H)-one이며, 본 발명에서 데시타빈은 시판되는 것 또는 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것 어느 것을 이용하여도 무방하며, 5-아자-2'-디옥시사이티딘(5-aza-2'-deoxycytidine)으로도 지칭되며 Dacogen이라는 상품명을 가지며, 하기 화학식 1로 기재되는 화학식을 가진다.

[44] [화학식 1]

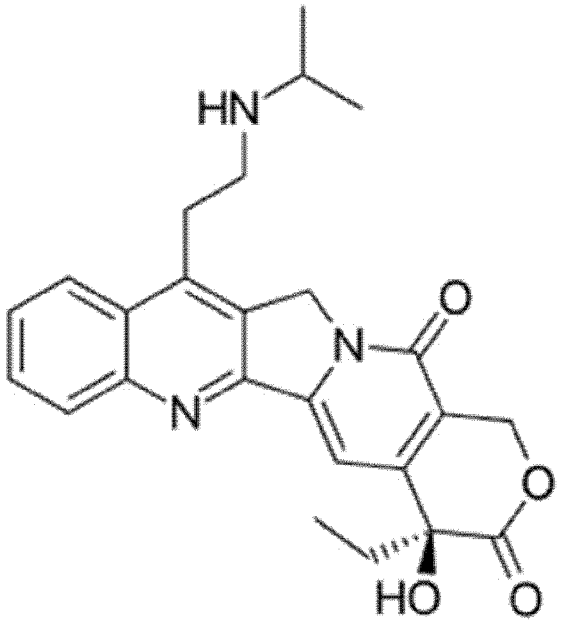
[45] 

[46]

[47] 본 발명의 '벨로테칸(Belotecan)'은 벨로테칸은 화학요법에 사용되는 약물로서, 소세포 폐암 및 난소암에 사용되는 반합성 캄토테신 유사체이다. 상기 벨로테칸의 IUPAC Name은 (4S)-4-Ethyl-4-hydroxy-11-[2-(isopropylamino)ethyl]-1H-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14(4H,12H)-dione이며, 본 발명에서 벨로테칸은 시판되는 것 또는 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것 어느 것을 이용하여도 무방하다. 상기 벨로테칸은 Camtobell이라는 상표명을 가지며, 하기 화학식 2의 구조를 갖는다.

[48] [화학식 2]

[49]



[50]

[51] 한편, 본 발명의 화합물들은 특정 구조식을 갖는 화합물뿐만 아니라, 이의 클라드레이트(clathrates), 수화물, 용매화물, 또는 다형체를 포함하는 의미이다. 또한 본 발명의 화합물은 이의 약학적으로 허용가능한 염이 언급되지 않을 경우 본 발명 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염도 포함하는 의미이다. 일 실시예에 본 발명의 화합물은 입체이성질체적으로 순수한 화합물들(예를 들어, 다른 입체이성질체가 실질적으로 없는(예를 들어, 85% ee 이상, 90% ee 이상, 95% ee 이상, 97% ee 이상, 또는 99% ee 이상)) 로 존재할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[52] 용어 "수화물(hydrate)"은 비공유 분자간의 힘에 의해 결합된 화학량론적 또는 비-화학량론적인 양의 물을 포함하는 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 의미한다.

[53] 용어 "클라드레이트(clathrate)"은 게스트 분자(예를 들어, 용매 또는 물)를 가두어 놓은 공간(예를 들어, 채널(channel))을 포함한 결정 격자의 형태의 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다.

[54] "약학적으로 허용" 또는 "약제학적으로 허용"된다는 어구는 약학적 제제로 사용하기에 적합한 것을 의미하며, 건전한 의학적 판단 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비율을 갖는 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 사용될 수 있다.

[55] 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염" 또는 "약제학적으로 허용가능한 염"은 모(parent) 화합물이 이의 산 또는 염기 염을 제조함으로써 변형되는 개시된 화합물의 유도체를 지칭한다. 약학적으로 허용되는 염의 예는 아민과 같은 염기성 잔기의 미네랄 또는 유기산 염; 카복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는

유기 염 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 약학적으로 허용가능한 염의 예시로, 염산염, 브롬화 수소산염, 요오드화 수소산염, 불화 수소염, 황산염, 설폰산염, 시트르산염, 캄포린산염, 말레산염, 아세트산염, 락트산염, 니키틴산염, 질산염, 숙신산염, 인산염, 말론산염, 말린산염, 살리실산염, 페닐아세트산염, 스테아르산염, 포른산염, 푸마르산염, 우레아, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 아연, 리튬, 신남산염, 메틸아미노, 메탄설폰산염, 피크린산염, p-톨루엔설폰산염, 나프탈렌설폰산염, 타르타르산염, 트리에틸아미노, 디메틸아미노 및 트리(하이드록시메틸)아미노메탄과 같은 제약분야에서 통상 사용되는 염을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[56] 본 발명의 약학적으로 허용가능한 염은 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이어티를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로 이러한 염은 유리 산 또는 염기 형태의 상기 화합물을 물에서 또는 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴 또는 이들의 혼합물과 같은 유기 희석제에서 충분한 양의 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

[57] 용어 "용매화물" 또는 "약학적으로 허용가능한 용매화물"은 하나 이상의 용매 분자와 화합물의 결합으로부터 형성된 용매화물이다. 용매화물이란 용어는 수화물(예를 들어, 헤미수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물, 사수화물 등)을 포함한다.

[58]

[59] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 화합물의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.

[60] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[61] 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 병용성분의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의

해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 구체적으로는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[62] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여 또는 직장 내 투여에 의해서 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[63]

[64] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[65] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 각 구성 성분은 약학적으로 유효한 양으로 약학적 조성물에 포함될 수 있다.

[66] "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[67] 상기 약학적 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 예를 들어 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[68] 상기 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[69] 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[70] 상기 약학적 조성물은 난소암이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서 상기 동물은 인간을 제외한 동물일 수 있다.

[71]

[72] 본 발명에서, "병용 투여", "병용되는" "병용하는"은 단지 동시의 투여를 의미하는 것뿐만이 아니라, 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물이 개체에 함께 작용하여 각 물질이 본연의 기능과 동등하거나 그 이상의 수준을 수행할 수 있는 투여 형태일 수 있다. 따라서, 본원에서, "병용"이란 용어가 사용될 경우 이는 동시, 개별, 순차, 또는 역순 투여를 나타내는 것으로 그 순서가 무제한 인 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차, 역순 또는 개별적인 경우, 투여의 순서는 특별히 제한되지 않고 다만 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.

[73] 본 발명에서 (i) 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물 및 (ii) 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물은 다음과 같은 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[74] a) (i) 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 (ii) 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물이 혼합된 하나의 혼합물(mixture)로 투여; 또는

[75] b) (i) 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 (ii) 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물이 분리된 형태로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[76] (i) 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 (ii) 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물이 분리된 형태일 경우, 상기 (i) 및 (ii)는 별개의 제제로 제제화되어 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있는 것일 수 있다.

[77] 병용 투여 시 사용되는 각각의 활성 성분의 치료상 유효한 투여량은 사용되는 특정 화합물 또는 제약 조성물, 투여 모드, 치료하고자 하는 증상, 치료하고자 하는 증상의 심각도, 온혈 동물의 종, 체중, 성별, 식이상태 및 연령에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물들을 사용하는 투여 섭생은 투여 경로, 및 환자의 신장 및 간 기능을 비롯한 다양한 인자에 따라 선택된다. 당업계의 외과의사, 임상학자 또는 수의사는 증상 진행을 예방, 대응 또는 저지하는 데 요구되는 유효량의 약물을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 독성없이 효율을 얻는 범위 내의 약물 농도를 달성하는데 최적의 정확도는, 부위를 표적으로 하는 약물의 사용가능성의 역학을 근거로 하는 섭생을 요구한다. 이것은 약물의 분포, 평형 및 제거를 고려하는 것을 포함한다. 따라서 투여량 섭생, 즉 본 발명의 임의의 개별

구성성분의 투여 수준 및 투여 빈도는 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다.

[78] 본 발명의 상기 조성물은 데시타빈 또는 벨로테칸의 단독 투여에 비하여 난소암 세포주의 증식능력을 억제하는 것일 수 있으며, 데시타빈 또는 벨로테칸의 단독 투여에 비하여 난소암 세포주의 사멸효과를 향상시키는 것일 수 있다.

[79] 본 발명의 일 실시예에서는 데시타빈과 벨로테칸의 병용 투여시 데시타빈 또는 벨로테칸의 단독 투여에 비하여 아폽토시스(apoptosis)가 증가함을 확인하였으며, 마우스 동종이식 모델에서 데시타빈과 벨로테칸의 병용 투여시 데시타빈 또는 벨로테칸의 단독 투여에 비하여 종양 성장이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 데시타빈과 벨로테칸의 병용 투여시의 난소암 치료에 대한 현저한 시너지 효과를 확인한 것이다.

[80] 본 발명의 다른 하나의 양태는 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조합물이다.

[81] 본 발명에서 용어 "조합물(combination)"은 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물의 병용 투여 용도를 갖는 것으로, 병용 용도(combined used)와 같은 의미로 이해될 수 있다. 이는 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물이 병용되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물 및 약학적 키트 형태도 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[82]

[83] 본 발명의 다른 하나의 양태는 (i) 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 (ii) 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 난소암의 예방 또는 치료용 키트이다. 본 발명에서 "키트"는 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 병용 투여하기 위해, 본 발명에 따른 조합물 또는 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로 본 발명의 키트에는 하나의 제제로 제제화된 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물, 또는 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물 각각의 개별 제제를 포함할 수 있다. 상기 키트는 두 물질의 병용 투여에 필요한 물질을 추가적으로 포함할 수 있다. 그러나 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[84] 본 발명에서 용어, "키트"는 조립을 해서 무엇을 바로 만들 수 있도록 부품들을 모아 놓은 것으로서, 본 발명에서는 상기 난소암 질환을 예방 또는 치료할 수 있도록 제공한 실험적 용품을 모아둔 것을 의미한다.

[85]

[86] 본 발명의 용어 “난소암 (Ovarian cancer)”은 전 세계적으로 가장 치명적인 부인 암 중 하나이다. 대다수의 난소암은 난소 상피세포로부터 유전적 변이 발생에 따라 악성 종양으로 발생되어 상피성 난소암으로 명명된다. 상피성 난소암은 조직병리학적 분석을 통해 장액성 난소암(serous carcinoma), 점액성 난소암(mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암(endometrioid carcinoma), 투명세포암(clear cell carcinoma)으로 분류된다 (Kaku T et al., Med Electron Microsc, 36:9-17, 2003). 한국에서는 난소암의 발생이 점차 증가하고 있는 추세이다. 그러나 난소암에 대한 효과적인 진단 방법이 없어 대부분의 난소암은 치료가 어려운 단계에서 진단되어 높은 재발 및 사망률을 보인다.

[87] 본 발명의 용어, "치료"는 치료하고자 하는 대상체 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 것을 지칭하고, 이는 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물의 투여로 난소암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미하고, "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여로 난소암의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[88] 본 발명의 용어 "개선" 은 본 발명의 조성물 투여에 의해 난소암과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[89]

[90] 본 발명의 다른 하나의 양태는 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 이를 필요로 하는 개체에 투여 및/또는 사용하는 단계를 포함하는, 난소암 예방, 개선 또는 치료 방법이다.

[91] 본 발명의 다른 하나의 양태는 약학적 유효량의 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 병용 투여 및/또는 병용 사용하는 단계를 포함하는, 난소암 예방, 개선 또는 치료 방법이다.

[92] 본 발명의 다른 하나의 양태는 약학적 유효량의 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 약학적 조성물, 또는 약학적 키트의 난소암의 예방, 개선 또는 치료 용도, 및/또는 난소암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 용도이다.

[93] 본 발명의 다른 하나의 양태는 약학적 유효량의 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 난소암의 전이억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[94]

[95] 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물, 난소암, 예방 및 치료에 대해서는 상기 다른 양태에서 상술한 바와 같다.

[96]

[97] 본 발명의 다른 하나의 양태는 데시타빈 또는 식품학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 식품학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물이다.

[98] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[99] 또한, 상기 언급한 바와 같이 식품 보조 첨가제를 추가로 첨가할 수도 있는바 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함한다.

[100] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 다이사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[101] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[102] 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함한다.

[103] 상기 건강 기능(성) 식품 (functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에

는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품 조성물은 난소암의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[104]

[105] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 데시타빈 또는 사료학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 사료학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 예방 또는 개선용 사료용 조성물이다.

[106] 상기 사료 조성물에는 데시타빈, 벨로테칸 외에도 약학적, 식품학적 또는 사료용으로 허용되는 공지의 담체, 안정화제, 또는 첨가제가 포함될 수 있다. 예를 들어, 품질 저하를 방지하기 위하여 첨가하는 결착제, 유화제, 보존제 등이 있고, 효용 증대를 위하여 사료에 첨가하는 아미노산제, 비타민제, 효소제, 향미제, 비단백질태질소화합물, 규산염제, 완충제, 추출제, 올리고당 등이 있다. 그 외에도 사료 혼합제 등을 추가로 포함할 수 있으며 이에 한정된 것은 아니다. 상기 사료 조성물은 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제 및 기타의 첨가제 등을 포함할 수도 있으며, 그 형상으로서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료 조성물은 단위 동물에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다. 본 발명의 사료는 특별히 한정되는 것은 아니고, 개, 고양이, 말, 소 등 동물용이면 제한이 없으며, 분말 사료, 고형 사료, 건사료, 습식사료, 모이스트 펠릿 사료, 드라이 펠릿 사료, EP(Extruder Pellet) 사료, 날먹이 등 어떠한 사료라도 무방하다.

[107]

[108] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 데시타빈 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 세포주의 증식 억제용 조성물이다.

[109] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 데시타빈 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 전이 억제용 조성물이다.

[110] 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 포함하는 조성물; 및 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물, 및 난소암에 대해서는 상기 다른 양태에서 상술한 바와 같다.

[111]

발명의 실시를 위한 형태

[112] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[113]

[114] **제조예 1: 시약**

[115] 벨로테칸(Belotecan)(Camtobel®)은 종근당 제약회사(서울, 한국)로부터 공급받았으며, 데시타빈(Decitabine)(Decilid®)은 삼양바이오팜(한국, 성남)으로부터 공급받았다. 토포테칸 염산염 수화물(Cat. T2705)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하였다. *In vitro* 실험을 위해 벨로테칸(2mM)과 토포테칸(Topotecan)(5mM) 및 데시타빈(20mM)의 스톡 용액을 UPW에 용해시켜 제조하였다.

[116]

[117] **제조예 2: 세포 배양**

[118] ES-2 인간 난소 투명세포암종 세포주(Cat. CRL-1978, ATCC), TOV-21G 인간 난소 선암종 세포주(Cat. CRL- 11730, ATCC), TOV-112D 인간 난소 자궁내막암종 세포주(Cat. CRL-11731, ATCC)는 American Type Culture Collection(ATCC)(Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, SKOV3 인간 난소 선암종 세포주(Cat. 30077, KCLB)는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하였다. 또한, ID8 마우스 난소 표면 상피 세포주(Cat. SCC145, Merck Millipore)는 Merck Millipore(Temecula, CA, USA)에서 구입하였다.

[119] ES-2세포는 10% 소태아혈청(FBS)이 보충된 McCoy's 5A 배지(Cat. 16600082, Gibco)에서 유지시켰다. TOV-21G 및 TOV-112D 세포는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM/고농도 글루코스에서 유지시켰다. SKOV3 세포는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640(HEPES 포함) 배지(Cat. SH30255.01, Hyclone)에서 유지시켰다. ID8 세포는 4% FBS, 5μg/ml의 인슐린, 5μg/ml의 트랜스페린(transferrin), 5ng/ml의 나트륨 셀레나이트(sodium selenite) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM/고농도 글루코스에서 유지시켰다. 모든 세포는 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 성장시켰고, 단층 세포(monolayer cells)는 실험에 사용하기 위해 70-80% confluence까지 배양하였다.

[120]

[121] **제조예 3: 세포 생존 가능성 평가**

[122] MTT 검출 키트(Cat. 11465007001, Roche)를 사용하여 세포 생존성을 확인하였다. 생존력 평가를 위해 세포를 96웰 배양 플레이트에 접종하고, 다양한 농도의 토포테칸, 벨로테칸 및 데시타빈을 세포에 48시간 동안 처리하였다. MTT 표지 시약을 세포에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양액을 제거하지 않고 세포에 가용화 용액을 첨가하였다. 37℃에서 밤새 배양한 후, 분광광도계를 사용한 비색 분석으로 반응 웰을 검출하였다.

[123]

[124] **제조예 4: 세포 사멸 분석**

[125] 난소암 세포주에서의 세포사멸 분석을 위해 Annexin V 검출 키트(Cat. 556547, BD Biosciences)를 사용하였다. 생존율 분석 결과를 바탕으로 각 세포주에 대한 벨로테칸의 농도를 결정하였다. 세포를 벨로테칸 및/또는 데시타빈으로 48시간 동안 처리하였다. 그런 다음 세포를 수집하고 Annexin V와 요오드화 프로피듐(PI)으로 실온에서 15분간 염색하였다. 유세포 분석법 검출을 위해 염색된 세포 현탁액을 1X 결합 완충액으로 희석하였다. Accuri C6 Plus(BD Biosciences)를 사용하여 형광 신호를 분석하였다.

[126]

[127] **제조예 5: RNA 분리 및 RT-PCR**

[128] 전체 RNA 분리를 위해 세포를 5 및 10 μM의 데시타빈으로 24시간 동안 처리하였다. 24시간 처리 후, 세포를 PBS로 세척하고 Transzol-Up(Cat. ET111-01, TransGen Biotech)을 사용하여 용해시켰다. 전체 RNA 농도와 순도는 나노드롭(nanodrop) 분광광도계를 사용하여 결정되었다. StepOnePlus Real-Time PCR System(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 목적 유전자의 발현 수준을 측정 및 분석하였다. 상대적인 유전자 발현 수준을 정량화하기 위해 2-ΔΔCT 방법을 사용하였다. 모든 샘플의 유전자 발현 수준은 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소(GAPDH) 발현 수준에 의해 정규화되었다. 각 프라이머는 NCBI GenBank 데이터베이스의 mRNA 서열을 참조하여 설계하고 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 합성하였다. 표적 유전자의 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

[129]

[130] [표1]

RT-PCR용 프라이머 서열

Gene s ymbol	**GenBank no.**	**Forward primer (5′→3')**	**Reverse primer (5′→3')**
TNF	NM_000594.4	CCCGACTATC TCGACTTTGC	GGGGGTAATA AAGGGATTGG
TGFB1	NM_000660.7	CCCTGGACAC CAACTATTGC	TGCGGAAGTC AATGTACAGC
GAPDH	NM_001 289745.3	GGCTCTCCAG AACATCATCC	TTTCTAGACG GCAGGTCAGG

[131] **제조예 6: 동물**

[132] 실험 절차는 고려대학교 동물기관관리위원회(KUIAUCC-2019-0055)의 승인을 받았으며 실험동물 관리 원칙을 준수하였다. 4주령 암컷 C57BL/6(J) 마우스를 DBL(인천, 한국)에서 구입하여 적응을 위해 1주일 동안 사육하였다. 모든 마우스는 통제된 환경(12/12시간 명/암 주기, 23℃, 습도 50%)에 사육되었으며 음식과

물을 자유롭게 섭취하게 하였다. ID8 동종 이식 마우스 모델은 ID8 세포 (100 μl 중 5.0 x 10^7)를 마우스에 피하 주사하였다. 세포의 안정적인 성장을 위해 ID8 세포를 주입 전에 PBS와 Matrigel의 1:1 혼합물에 재현탁하였다. 피하 종양 크기가 50 mm^3에 도달하면 마우스를 무작위로 세 그룹(n=5)으로 나누었다. 종양 길이와 폭은 캘리퍼로 측정되었다.

[133]

[134] **제조예 7: 약물 투여**

[135] 데시타빈(0.25mg/kg)을 PBS에 희석하고 12일 동안 격일로 6회 복강내 주사하였다. 데시타빈의 용량은 인간의 데시타빈 표준 용량(20mg/m2)을 기준으로 결정되었다. 데시타빈 주사 다음날부터 벨로테칸(0.17mg/kg)을 5일간 연속 복강투여하였다. 벨로테칸을 PBS에 희석하고, 마우스에 대한 투여량은 인간에 대한 표준 치료법(0.5mg/m2)을 기준으로 결정되었다. 대조군 마우스에는 PBS만 주사하였다. 마우스 투여에 대한 항암제의 투여량은 하기 식에 기초하여 계산하였다: B = A/(37×0.081) (A: 사람 투여량, B: 마우스 투여량).

[136]

[137] **제조예 8: 마우스 비장에서 림프구의 유세포 분석**

[138] 비히클, 벨로테칸 및 벨로테칸과 데시타빈을 모두 처리한 마우스로부터 비장을 분리하였다. 신선한 비장 조직을 70 μm 세포 여과기를 통해 여과하여 비장 세포를 얻었다. 원심분리에 의해 세포를 침전시키고 RBC Lysis Buffer(Cat. 42031, BioLegend)에 재현탁하여 적혈구를 제거하였다. 5% FBS를 함유한 새로운 RPMI-1640 배지에 세포를 재현탁시킨 후, 1.0 x 10^6개의 세포를 계수하고 염색을 위해 새로운 Eppendorf 튜브로 옮겼다. 유세포 분석을 위해 세포를 FITC 항-마우스 CD3ε 항체(Cat. 100305, BioLegend), APC Rat Anti-Mouse CD8a (Cat. 553035, BD Biosciences), PE-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD45 (Cat. 552848, BD Biosciences), PE Hamster Anti-Mouse CD152 (CTLA4) (Cat. 553720, BD Biosciences) 및 PE Hamster Anti-Mouse CD279 (PD-1) (Cat. 561788, BD Biosciences)와 함께 배양하였다. 항-CD152 및 항-CD279 염색은 별도의 튜브에서 수행되었다. 20분 후에 염색 용액을 제거하고 세포를 5% FBS-PBS에 재현탁시켰다. 염색된 세포를 FACSVerse(BD Biosciences)로 검출하고 분석하였다.

[139]

[140] **제조예 9: 통계 분석**

[141] SAS 소프트웨어(Cary, NC, USA)의 General Linear Model Procedure를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 통계적 유의성은 Tukey's post hoc test를 통한 one-way ANOVA로 분석되었다. 데이터는 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시하였다. P 값이 0.05 미만이면 차이가 유의미한 것으로 간주된다.

[142]

[143] **실시예 1: 5가지 유형의 난소암 세포주에서 벨로테칸과 토포테칸의 세포 생존율 효과 확인**

[144] 난소암 세포에서 항암제인 벨로테칸과 토포테칸의 치료 반응을 조사하기 위해 ES-2, SKOV3, TOV21G 및 TOV112D를 포함한 다양한 유형의 인간 난소암 세포주와 마우스 난소암 세포주 ID8을 사용하였다. 모든 세포주는 도 1에 나타낸 바와 같이, TP53과 ARID1A의 서로 다른 돌연변이 유형을 가지고 있다.

[145] 두 시약(벨로테칸과 토포테칸)의 차이를 보다 명확하게 보여주기 위해 사전 실험을 통해 난소암 세포주별 벨로테칸과 토포테칸의 실험 농도 범위를 결정하였다. 벨로테칸과 토포테칸의 세포독성 효과를 비교하기 위해 MTT 분석을 사용하여 세포 생존율을 평가하였다.

[146] 그 결과, 벨로테칸은 ES-2(도 2A), TOV-21G(도 2C) 및 ID8(도 2E)세포주에서 토포테칸에 비해 모든 실험 용량에서 세포 생존력을 더 효과적으로 손상시키는 것으로 나타났다. TOV-112D 세포에서 벨로테칸과 토포테칸은 모두 5μM 미만의 농도에서 세포 생존력에 약간만 영향을 미쳤다. 그러나 8μM보다 높은 용량에서 벨로테칸은 토포테칸에 비해 TOV-112D 세포 생존력을 더 크게 감소시켰다(도 2D). 대조적으로, SKOV3 세포주에서는 벨로테칸과 토포테칸을 처리한 경우 세포 생존율의 감소가 거의 동일하였다(도 2B).

[147] 상기 결과는 SKOV3를 제외한 난소암 세포에서 벨로테칸의 세포 생존 억제 효과가 토포테칸보다 더 효과적임을 시사한다.

[148]

[149] **실시예 2: 5가지 유형의 난소암 세포주의 생존율에 대한 데시타빈의 영향**

[150] 다음으로 4가지 유형의 인간 난소암 세포주와 1가지 유형의 마우스 난소암 세포주에서 데시타빈의 항암 효과를 확인하였다.

[151] 그 결과, ES-2 세포에서 100 μM 데시타빈 처리로 세포 생존력이 약 0.86배($P < 0.01$) 감소하였다(도 3A). TOV-21G 세포는 100μM 데시타빈에서 약 0.73배($P < 0.001$ 및 $P < 0.05$) 생존율의 유사한 감소를 나타냈다(도 3C). SKOV3 및 TOV-112D 세포는 100μM 데시타빈에서 0.97배 및 0.92배($P < 0.05$) 감소를 나타내어 생존력에 거의 영향을 미치지 않았다(도 3B 및 도 3D). 반면, 데시타빈은 ID8 세포의 생존력을 유의하게 억제했습니다. 구체적으로, 1 μM에서 0.4배 감소($P < 0.001$), 50 μM에서 0.33배 감소($P < 0.001$)를 나타냈다(도 3E).

[152]

[153] **실시예 3: 인간 난소암 세포주에서 벨로테칸과 데시타빈 병용요법의 효과**

[154] 난소암 세포주에서 벨로테칸과 병용투여시 세포생존율에 직접적인 영향을 미치지 않는 데시타빈 농도를 확인하고자 하였다. 따라서 ES-2, SKOV3, TOV-21G, 및 TOV-112D 세포에서 벨로테칸과 다양한 농도의 데시타빈을 병용 투여했을 때 세포 생존율을 검증하였다. 각 세포주에 대한 벨로테칸의 농도는 생존력 분석의 이전 결과를 기반으로 결정되었다. 생존력의 40-50% 감소를 유도하는 용량을 병용 치료용으로 선택하였다.

[155] 그 결과, ES-2(도 4A), SKOV3(도 4B) 및 TOV-112D(도 4D) 세포에서 데시타빈은 10μM 고농도에서만 세포 생존력을 감소시키는 부가적인 효과를 나타냈다. TOV-21G 세포에서는 벨로테칸 단독 처리에 비해 데시타빈 농도 0.1~10 μM에서 생존율이 통계적으로 감소했다(도 4C).

[156]

[157] **실시예 4: 인간 난소암 세포주에서 벨로테칸과 데시타빈의 병용치료가 세포사멸 유도에 미치는 영향**

[158] 실시예 3의 결과를 바탕으로 벨로테칸과 10μM 데시타빈을 처리한 후 인간 난소암 세포주에서 세포사멸 유도를 확인하고자 하였다.

[159] 그 결과, 모든 세포주에서 데시타빈은 단독으로 치료했을 때 세포사멸을 유도하지 않았다. 그러나 벨로테칸 처리는 모든 세포주에서 세포사멸 세포의 비율을 통계적으로 증가시켰다. ES-2세포에서 데시타빈과의 병용 치료는 벨로테칸 단독 치료와 유사한 세포사멸 증가를 보여주었다(도 5A). 반면, SKOV3(도 5B), TOV-21G(도 5C), TOV-112D(도 5D)에서는 벨로테칸과 데시타빈을 병용 투여한 경우 벨로테칸 단독 투여에 비해 아폽토시스(apoptosis)가 증가하였다.

[160]

[161] **실시예 5: 데시타빈의 인간 난소암 세포주에서 염증 관련 유전자의 전사 수준 조절 확인**

[162] 데시타빈 처리 후 TNF와 TGFB1의 발현 수준을 조사하고자 하였다.

[163] 그 결과, TNF의 발현은 ES-2(도 6A)에서 통계적 변화를 나타내지 않았으며 데시타빈 처리에 의해 SKOV3 및 TOV-21G 세포에서 최대 1.71배($P < 0.01$) 및 1.18배($P < 0.05$)까지 유의하게 증가하였다(도 6B 및 도 6C). 그러나 데시타빈은 TOV-112D에서 TNF의 전사 수준을 약 0.49배($P < 0.01$) 감소시켰다(도 6D).

[164] 또한, TGFB1의 발현은 5 및 10 μM의 데시타빈 처리에 의해 ES-2(도 6E), SKOV3(도 6F) 및 TOV-112D(도 6H)에서 증가하였다. 그러나 TOV-21G에서는 TGFB1 수준이 5μM의 데시타빈에서 약간 증가한 것으로 나타났으며 10μM에서는 통계적으로 감소하였다(도 6G).

[165]

[166] **실시예 6: 벨로테칸과 데시타빈의 병용 치료에 의한 마우스 동종이식 모델에서 종양 성장 효과 확인**

[167] 데시타빈의 면역조절 효과를 검증하기 위한 최적의 주사횟수와 투여시간을 결정하기 위해 마우스를 대상으로 예비실험을 진행하였다. 구체적으로, 데시타빈(0.25 mg/kg)을 1일 5회 또는 격일로 6회 또는 10회 복강내 주사를 통해 투여하였다.

[168] 그 결과, CD3+CD8+ T 세포 집단은 대조군 마우스에서 10.7%(도 7A), 데시타빈을 하루 5회 처리한 마우스에서 13.0%(도 7B)인 것으로 나타났다. 격일로 데시타빈을 6회 및 10회 투여한 생쥐에서 CD3+CD8+ T 세포 집단은 각각 16.8%와 15.6%인 것으로 나타났다(도 7C 및 7D).

[169] 상기 결과를 토대로, 12일 동안 데시타빈을 6회 전처리하도록 설계하였다. *In vetro*에서 데시타빈과 벨로테칸의 병용 치료의 항암 및 면역 조절 효과를 평가하기 위해 ID8 동종이식 마우스 모델에 비히클 또는 벨로테칸 또는 벨로테칸과 데시타빈을 투여하였다(도 8A). ID8 동종이식 종양의 종양 성장을 평가하였다(도 8B). 그 결과, 벨로테칸 치료군에서는 종양 부피가 약 0.72배 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았고, 벨로테칸과 데시타빈 병용 치료군에서는 0.63배 통계적으로 유의하게 ($P < 0.05$) 감소하였다(도 8C).

[170] 또한, 마우스 비장의 T 세포 하위 집단의 변화를 평가하였다. 그 결과, 벨로테칸과 데시타빈의 병용 치료가 T 세포 수를 약 1.98배 증가시킨 반면($P < 0.05$), 벨로테칸 단독 치료는 T 세포 수에 어떠한 변화도 일으키지 않았다는 것을 확인하였다(도 8D).

[171] 또한, 세포독성 T 세포에서 PD-1과 CTLA4의 발현을 조사하였다. 그 결과, PD-1 및 CTLA4를 발현하는 세포독성 T 세포의 집단이 대조군과 비교하여 벨로테칸 및 병용 치료군 모두에서 유의하게 변화되지 않았음을 확인하였다(도 8E 및 도 8F).

[172]

[173] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 데시타빈(Decitabine), 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 난소암의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로서,
상기 조성물은 벨로테칸(Belotecan), 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물과 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 데시타빈 또는 벨로테칸의 단독 투여에 비하여 난소암 세포주의 증식능력을 억제하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 데시타빈 또는 벨로테칸의 단독 투여에 비하여 난소암 세포주의 사멸효과를 향상시키는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물은 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물과 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여 및 직장 내 투여로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 투여방법으로 투여되는, 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] (i) 데시타빈, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물; 및
(ii) 벨로테칸, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 난소암의 예방 또는 치료용 키트.

[청구항 8] 데시타빈 또는 식품학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 식품학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[청구항 9] 데시타빈 또는 사료학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 사료학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 예방 또는 개선용 사료용 조성물.

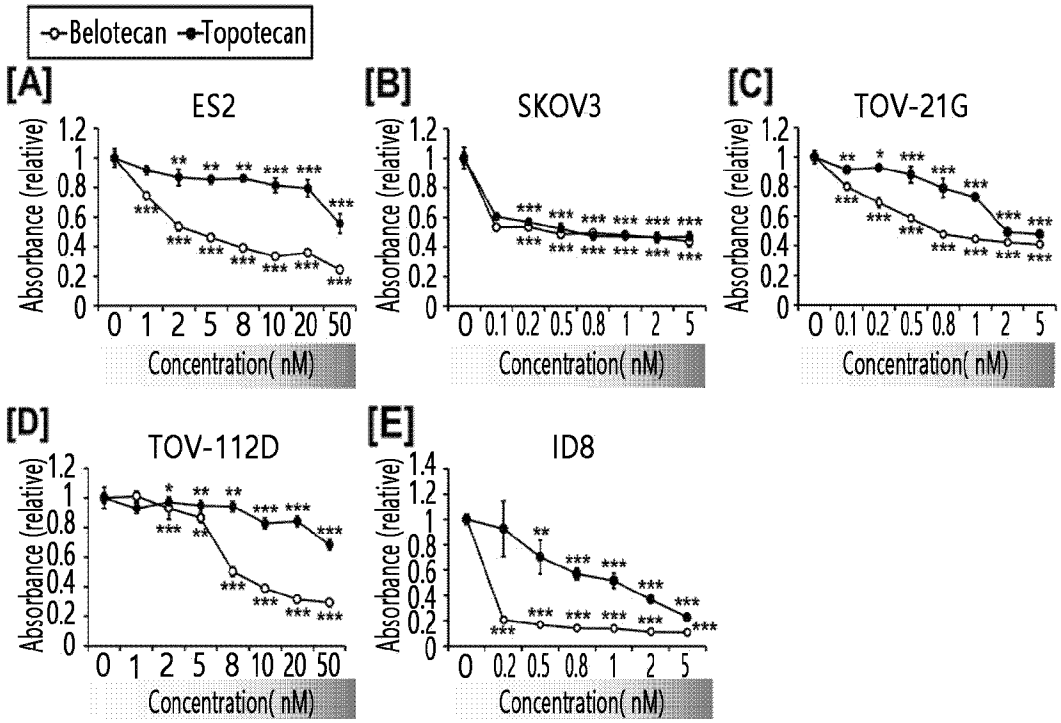
[청구항 10] 데시타빈 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 세포주의 증식 억제용 조성물.

[청구항 11] 데시타빈 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 및 벨로테칸 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 난소암 전이 억제용 조성물.

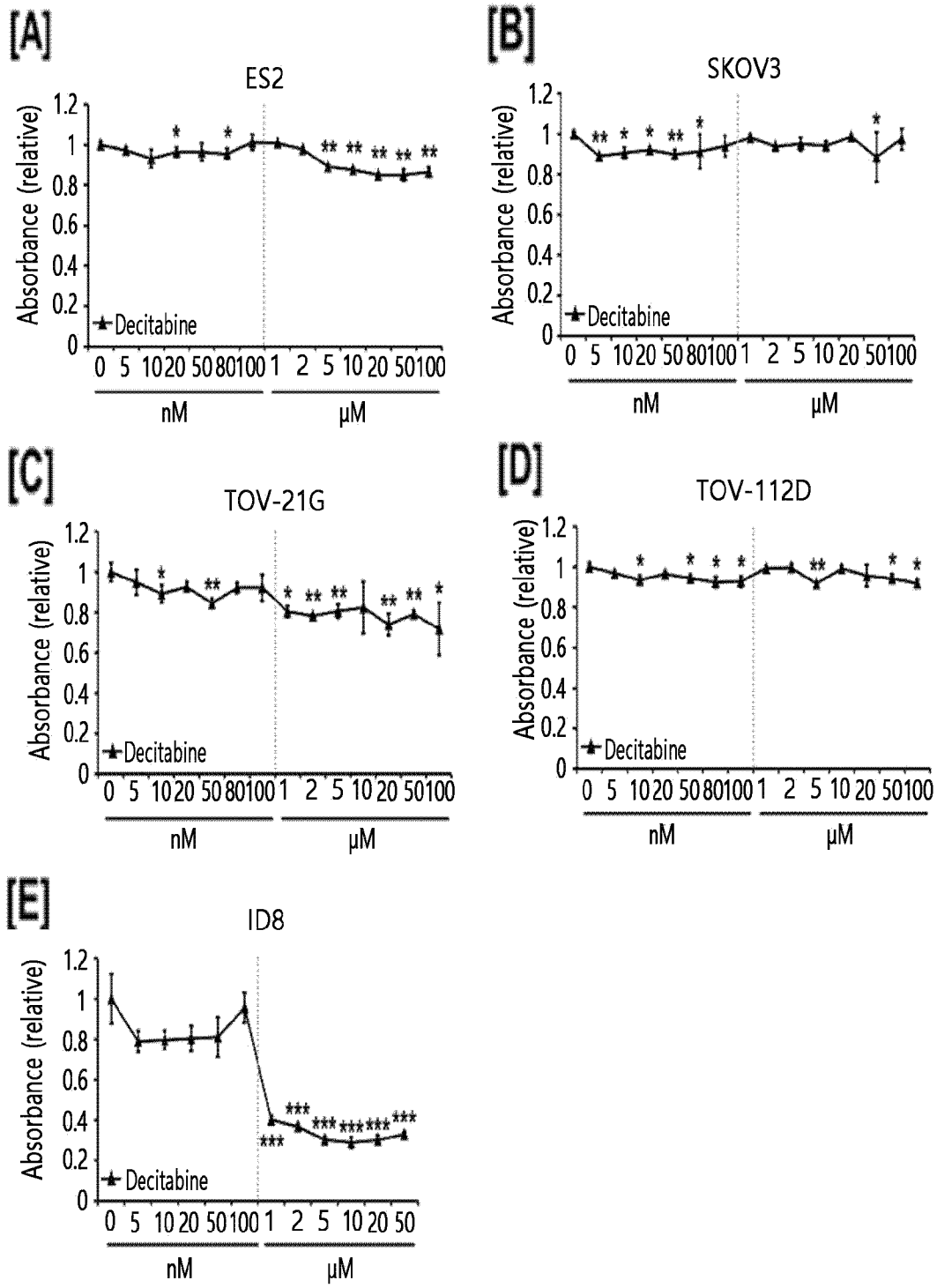
[도1]

Cell line	Histotype	Origin	*TP53*	*ARID1A*
ES2	Clear cell	Human	mut	WT
SKOV3	HGSOC	Human	mut	mut
TOV-21G	Clear cell	Human	WT	mut
TOV-112D	Endometrioid	Human	mut	WT
ID8	HGSOC (like)	Mouse	WT	WT

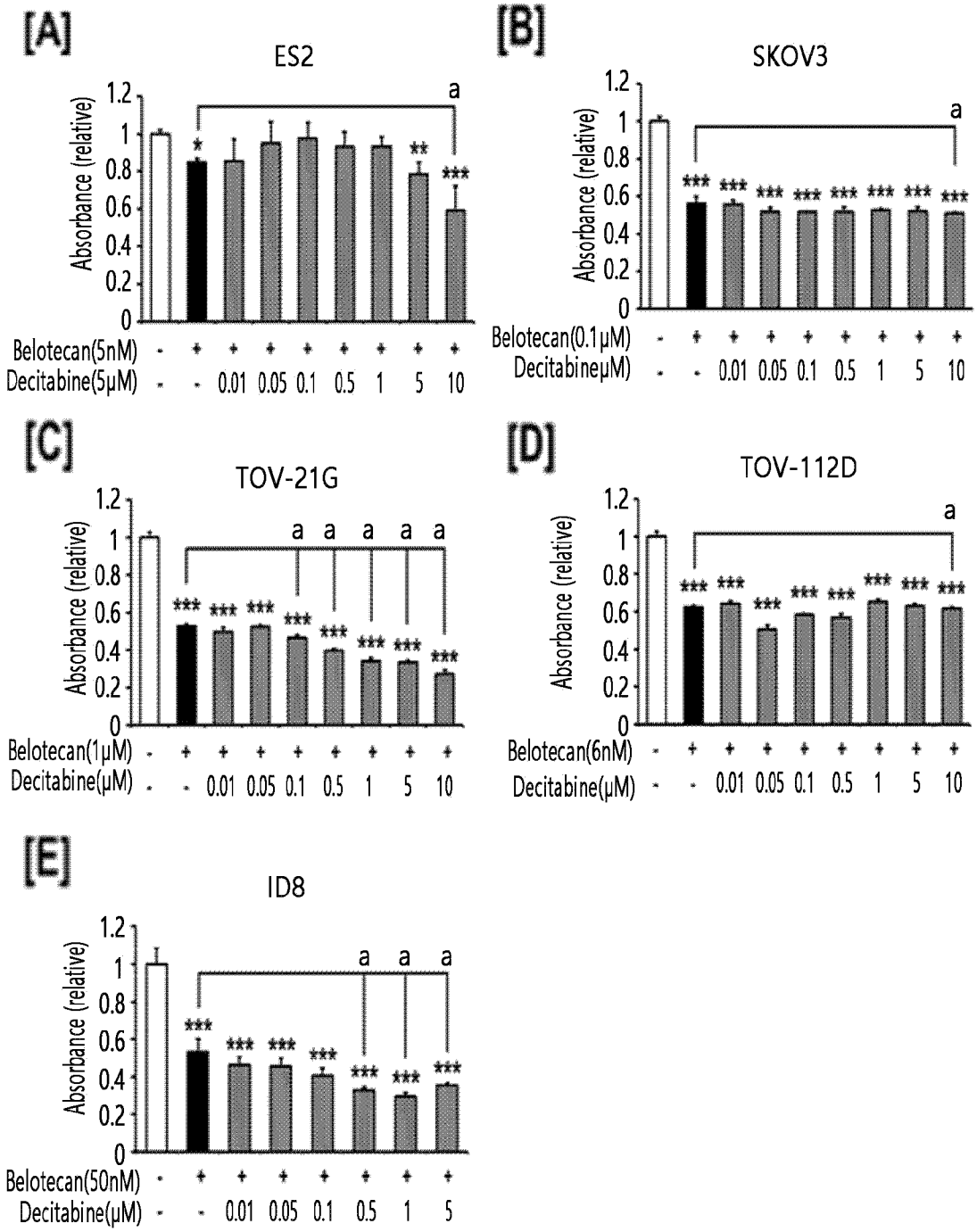
[도2]



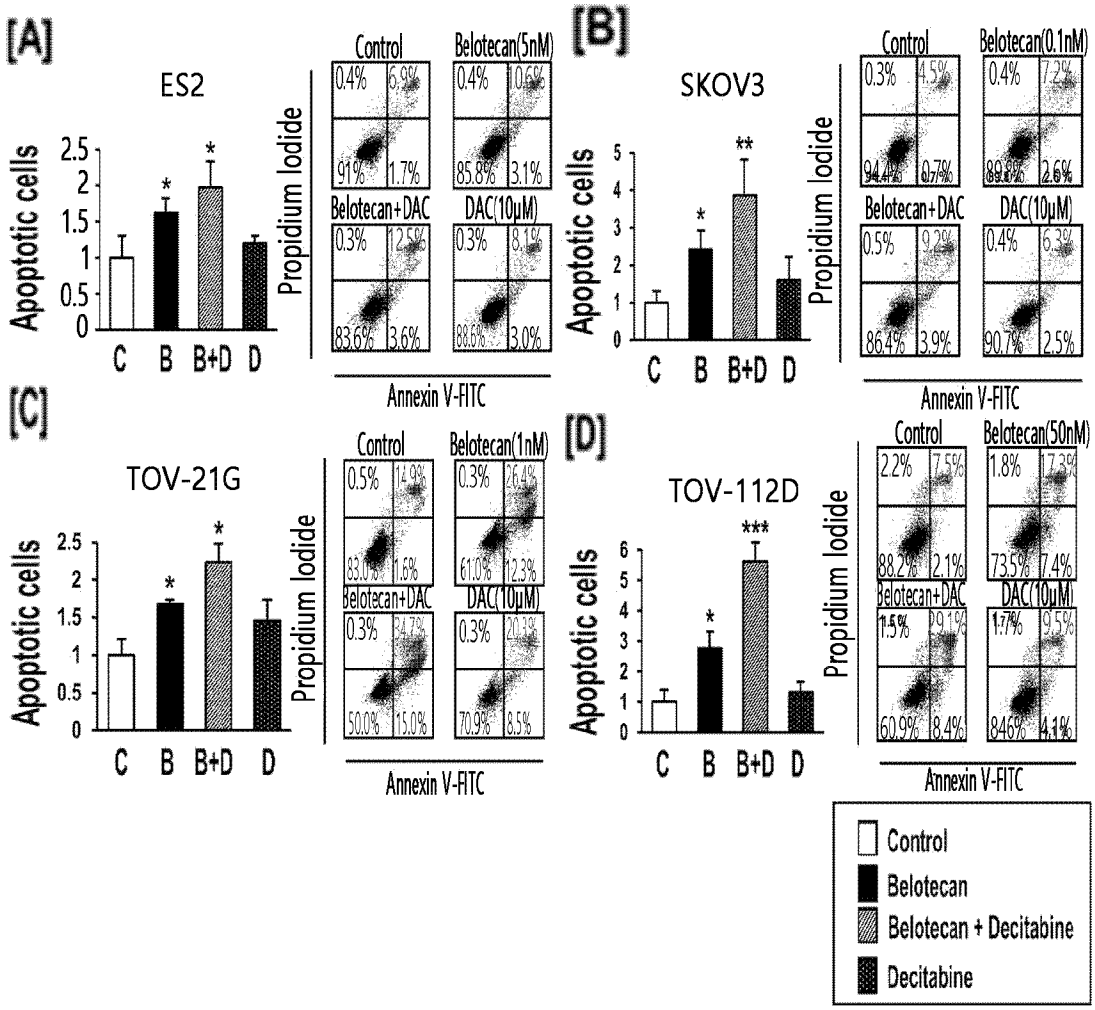
[도3]


[A]
ES2
[B]
SKOV3
[C]
TOV-21G
[D]
TOV-112D
[E]
ID8
Absorbance (relative)
Decitabine
0 5 10 20 50 80 100 1 2 5 10 20 50 100
nM
μM

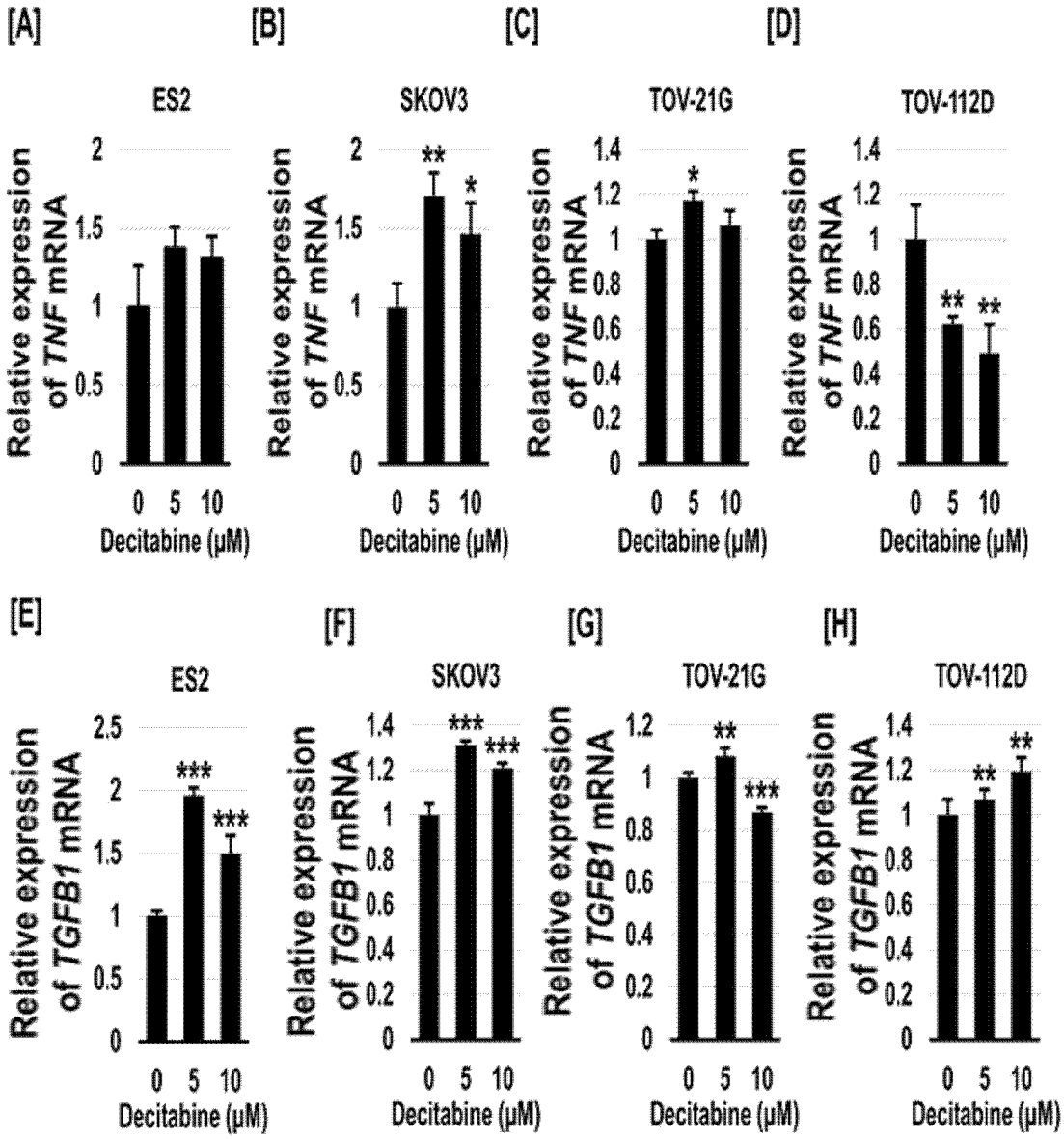
[도4]


[A]
ES2
Absorbance (relative)
Belotecan(5nM)
Decitabine(5μM)
[B]
SKOV3
Belotecan(0.1μM)
DecitabineμM)
[C]
TOV-21G
Belotecan(1μM)
Decitabine(μM)
[D]
TOV-112D
Belotecan(6nM)
Decitabine(μM)
[E]
ID8
Belotecan(50nM)
Decitabine(μM)

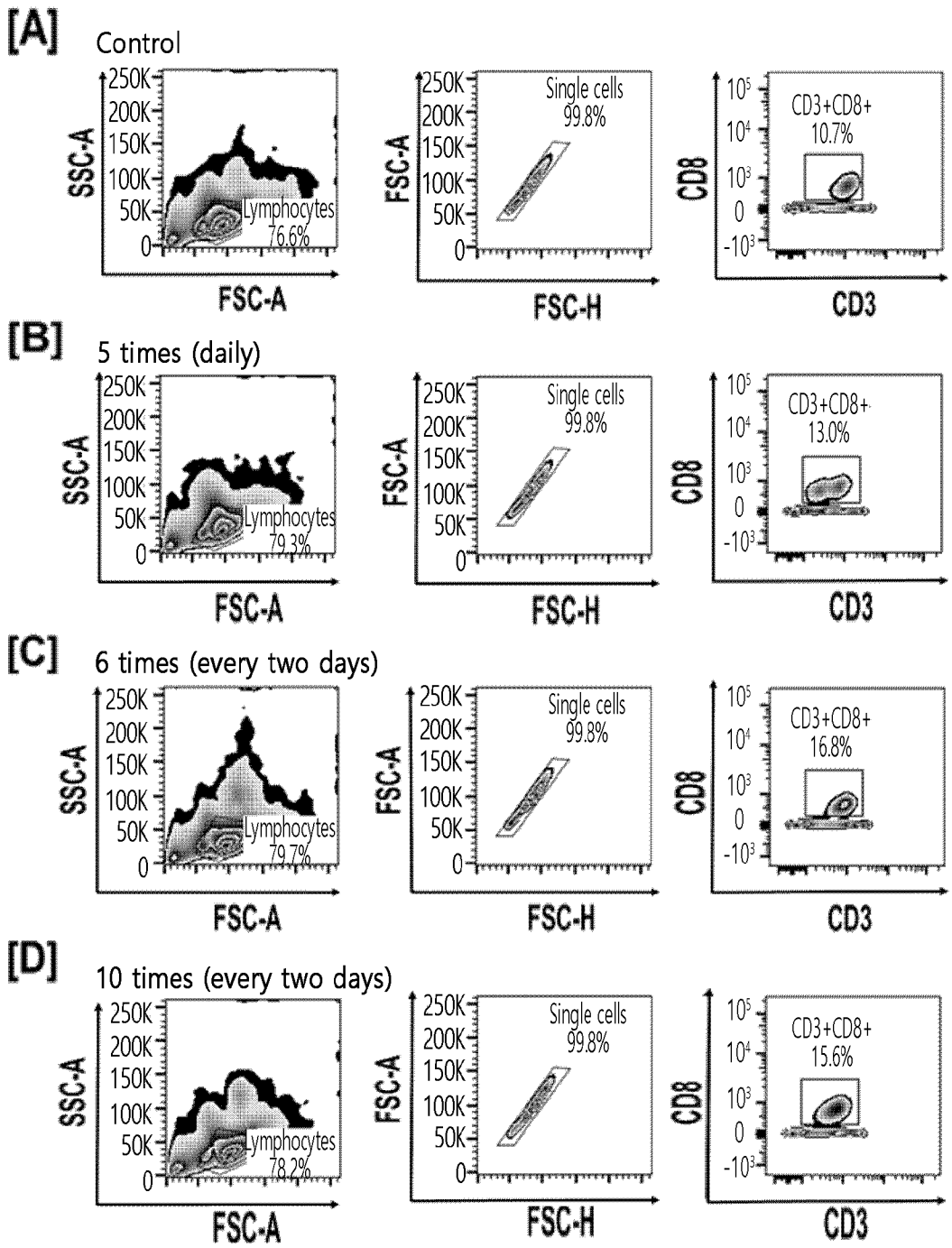
[도5]


[A]
ES2
Apoptotic cells
Propidium Iodide
Annexin V-FITC
Control
Belotecan(5nM)
Belotecan+DAC
DAC(10μM)
C B B+D D
[B]
SKOV3
Belotecan(0.1nM)
[C]
TOV-21G
Belotecan(1nM)
[D]
TOV-112D
Belotecan(50nM)
Control
Belotecan
Belotecan + Decitabine
Decitabine

[도6]

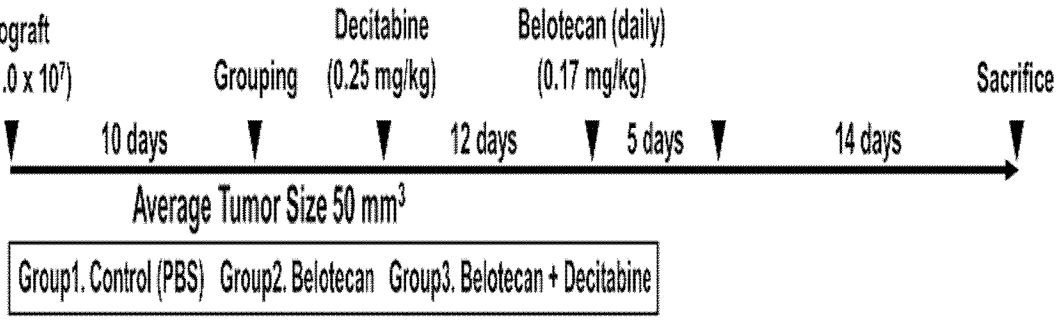

[A]
ES2
Relative expression of TNF mRNA
Decitabine (μM)
[B]
SKOV3
[C]
TOV-21G
[D]
TOV-112D
[E]
ES2
Relative expression of TGFB1 mRNA
[F]
SKOV3
[G]
TOV-21G
[H]
TOV-112D

[도7]


[A]
Control
SSC-A
FSC-A
Lymphocytes
76.6%
FSC-A
FSC-H
Single cells
99.8%
CD8
CD3
CD3+CD8+
10.7%
[B]
5 times (daily)
Lymphocytes
79.3%
Single cells
99.8%
CD3+CD8+
13.0%
[C]
6 times (every two days)
Lymphocytes
79.7%
Single cells
99.8%
CD3+CD8+
16.8%
[D]
10 times (every two days)
Lymphocytes
78.2%
Single cells
99.8%
CD3+CD8+
15.6%

[도8]

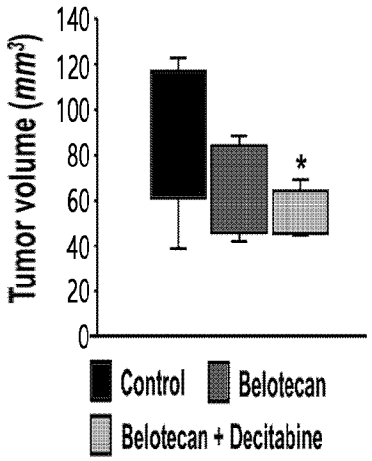
[A]



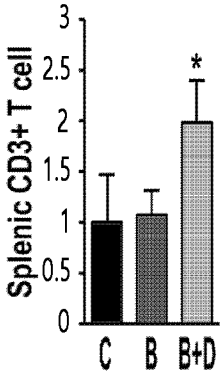
[B]

Control					Belotecan					Belotecan + Decitabine				
Mouse	Tumor length (mm)	Tumor Width (mm)	Tumor Volume (mm^3)	Mass (mg)	Mouse	Tumor length (mm)	Tumor Width (mm)	Tumor Volume (mm^3)	Mass (mg)	Mouse	Tumor length (mm)	Tumor Width (mm)	Tumor Volume (mm^3)	Mass (mg)
1	8.38	5.15	111.129	17	1	5.02	4.44	49.481	22	1	6.49	4.26	58.889	29
2	4.94	3.95	38.538	39	2	6.81	5.09	88.217	36	2	6.8	4.18	59.406	27
3	6.59	6.1	122.607	44	3	6.98	4.78	79.741	26	3	5.13	4.24	46.113	26
4	6	5.41	87.804	27	4	5.39	3.95	42.049	13	4	5.43	5.04	68.965	15
5	7.2	4.82	83.637	27	5	5.97	4.44	58.845	28	5	5.03	4.22	44.788	26
	Average		88.743	30.8		Average		63.667	25		Average		55.632	24.6

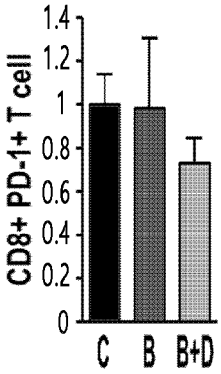
[C]



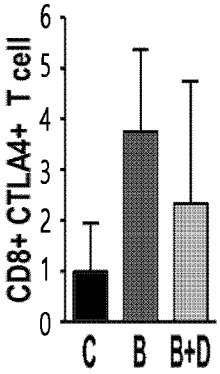
[D]



[E]



[F]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/021623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/706(2006.01)i; **A61K 31/4745**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61P 35/04**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i; **A23K 20/137**(2016.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/706(2006.01); A61K 31/475(2006.01); A61K 31/635(2006.01); A61K 31/7068(2006.01); A61K 9/00(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) & keywords: 데시타빈(decitabine), 벨로테칸(belotecan), 난소암(ovarian cancer)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK, Soo Jin et al. Effect of decitabine combined with belotecan on T-cell mediated immunity in ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer. 07 November 2023, vol. 33 (Suppl 4), pp. A1-A278. DOI: 10.1136/ijgc-2023-IGCS.145. See page A89, right column.	1-11
A	KR 10-2019-0019489 A (DONG WHA PHARM. CO., LTD. et al.) 27 February 2019 (2019-02-27) See entire document.	1-11
A	KR 10-2017-0054997 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 18 May 2017 (2017-05-18) See entire document.	1-11
A	US 2023-0263818 A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 24 August 2023 (2023-08-24) See entire document.	1-11
A	KR 10-2023-0024402 A (GLYCOMIMETICS, INC.) 20 February 2023 (2023-02-20) See entire document.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 September 2024	**13 September 2024**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/021623

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2019-0019489 A	27 February 2019	None	
KR 10-2017-0054997 A	18 May 2017	KR 10-1902355 B1	01 October 2018
US 2023-0263818 A1	24 August 2023	CN 115151261 A	04 October 2022
		EP 4069254 A1	12 October 2022
		EP 4069254 A4	29 November 2023
		JP 2023-518162 A	28 April 2023
		KR 10-2022-0145815 A	31 October 2022
		US 11963971 B2	23 April 2024
		US 2023-0089147 A1	23 March 2023
		WO 2021-173598 A1	02 September 2021
KR 10-2023-0024402 A	20 February 2023	CN 116033907 A	28 April 2023
		EP 4164655 A1	19 April 2023
		JP 2023-529485 A	10 July 2023
		US 2023-0218649 A1	13 July 2023
		WO 2021-257398 A1	23 December 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/021623

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/706(2006.01)i; **A61K 31/4745**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i; **A61P 35/04**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i; **A23K 20/137**(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/706(2006.01); A61K 31/475(2006.01); A61K 31/635(2006.01); A61K 31/7068(2006.01); A61K 9/00(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) & 키워드: 데시타빈(decitabine), 벨로테칸(belotecan), 난소암(ovarian cancer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PARK, SOO JIN 등, "Effect of decitabine combined with belotecan on T-cell mediated immunity in ovarian cancer", Int J Gynecol Cancer, 2023.11.07, 33권(Suppl 4), 페이지 A1-A278, DOI: 10.1136/ijgc-2023-IGCS.145 페이지 A89, 우측 컬럼 참조.	1-11
A	KR 10-2019-0019489 A (동화약품주식회사 등) 2019.02.27 전체 문헌 참조.	1-11
A	KR 10-2017-0054997 A (서울대학교산학협력단) 2017.05.18 전체 문헌 참조.	1-11
A	US 2023-0263818 A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2023.08.24 전체 문헌 참조.	1-11
A	KR 10-2023-0024402 A (글리코미메틱스, 인크.) 2023.02.20 전체 문헌 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년09월12일(12.09.2024)	**2024년09월13일(13.09.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/021623

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0019489 A	2019/02/27	없음	
KR 10-2017-0054997 A	2017/05/18	KR 10-1902355 B1	2018/10/01
US 2023-0263818 A1	2023/08/24	CN 115151261 A	2022/10/04
		EP 4069254 A1	2022/10/12
		EP 4069254 A4	2023/11/29
		JP 2023-518162 A	2023/04/28
		KR 10-2022-0145815 A	2022/10/31
		US 11963971 B2	2024/04/23
		US 2023-0089147 A1	2023/03/23
		WO 2021-173598 A1	2021/09/02
KR 10-2023-0024402 A	2023/02/20	CN 116033907 A	2023/04/28
		EP 4164655 A1	2023/04/19
		JP 2023-529485 A	2023/07/10
		US 2023-0218649 A1	2023/07/13
		WO 2021-257398 A1	2021/12/23