

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 31일 (31.12.2014)



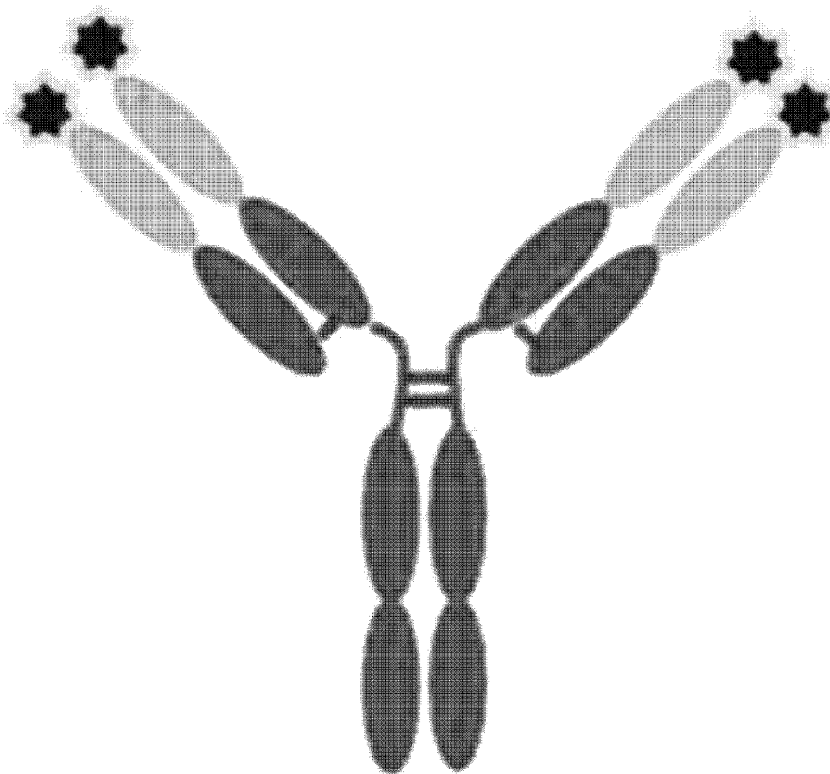
(10) 국제공개번호
WO 2014/208987 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 47/48* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005589
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 24일 (24.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2013-0072686 2013년 6월 24일 (24.06.2013) KR
- (71) 출원인: 한화케미칼 주식회사 (HANWHA CHEMICAL CORPORATION) [KR/KR]; 100-797 서울시 중구 청계천로 86, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김영민 (KIM, Young Min); 450-130 경기도 평택시 현신 3길 75 105동 801호, Gyeonggi-do (KR). 코민지 (KO, Min Ji); 305-742 대전시 유성구 배울 1로 13, 211동 502호, Daejeon (KR). 김재용 (KIM, Jae Yong); 143-210 서울시 광진구 광장로 83, Seoul (KR). 김주희 (KIM, Ju Hee); 305-741 대전시 유성구 배울 2로 6, 106동 1704호, Daejeon (KR). 문경덕 (MOON, Kyung Duk); 305-340 대전시 유성구 대덕대로 596, 306호, Daejeon (KR). 송대해 (SONG, Dae Hae); 305-330 대전시 유성구 노은서로 210번길 32, 411동 1204호, Daejeon (KR). 엄재현 (EOM, Jae Hyun); 339-014 세종시 누리로 27 608동 1803호, Sejong (KR). 정진원 (JUNG, Jin Won); 302-740 대전시 서구 만년로 45, 103동 504호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-855 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTIBODY-DRUG CONJUGATE HAVING IMPROVED STABILITY AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 안정성이 개선된 항체-약물 결합체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: an antibody-drug conjugate having drug conjugated to an N-terminal amino acid residue of a heavy chain or a light chain of an antibody; a preparation method therefor; and a use thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 아미노산 잔기에 약물이 결합된 항체-약물 결합체, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.



WO 2014/208987 A1

KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 안정성이 개선된 항체-약물 결합체 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 아미노산 잔기에 약물이 결합된 항체-약물 결합체, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 다양한 질환에 대하여 항체를 이용한 진단 또는 치료 방법이 연구되고 있다. 특히, 항체의 표적 특이성 때문에 항체를 이용한 다양한 치료 방법이 개발되고 있으며, 항체를 포함하는 다양한 형태의 의약, 예를 들어 항체-약물 결합체(Antibody-Drug Conjugate, ADC)등이 개발되고 있다. 이에, 항체 또는 항체-약물 결합체에 대하여 생체 내 안정성을 증가시키고, 치료 효과를 극대화하는 방법이 계속적으로 연구되고 있다.
- [3] 이 중 항체-약물 결합체는 일반적으로 천연 항체에 비해서 생체 내 안정성이 낮은 단점이 있으나, 천연 항체가 가진 단점인 낮은 치료 효과를 약물과의 결합을 통하여 개선하고자 개발되었다. 표적 특이적 항체에 싸이토크신 등 특정 약효를 가지는 약물이 다양하게 결합한 형태로 개발되고 있으며, 특히 암세포 특이적 항체에는 싸이토크신을 결합시켜 암세포 사멸을 유도하는 방법은 실제로 현재 상용화된 방법이다.
- [4] 그러나, 이러한 항체-약물 결합체는 천연 항체에 비하여 생체 내 안정성이 낮아지는 경향이 있으며, 더욱이 치료 효과를 높이기 위해 약물의 결합 비율(Drug Antibody Ratio, DAR)을 높이는 경우, 해결해야 할 다양한 기술적 문제가 존재한다. 먼저, 표적 특이적 치료를 위하여 항체의 항원 결합능 및 Fc 기능을 방해하지 않아야 하며, 항체 대 약물의 결합 비율을 높임으로써 치료 효과도 증대되는 효과가 나타나야 하고, 항체 대 약물의 결합 비율에 따라 항체-약물 결합체의 생체 내 안정성, 즉 혈중 반감기가 감소되지 않도록 해야 한다. 상기의 기술적 문제를 고려하여 최대한 높은 항체 대 약물 비율을 유지하는 것이 현재 항체-약물 결합체 제조 분야의 목표이다. 특히, 암세포 표면 항원의 발현 정도가 낮은 경우를 고려하면 높은 세포 독성을 유지하기 위해서는 최대한 높은 DAR을 유지해야 하나, DAR이 8에 이른 경우, 항체에 결합한 소수성 약물의 영향으로 혈중 반감기가 감소하여 독성은 증가하고 생체 내 효과(*in vivo efficacy*)가 감소할 수 있는 단점이 있다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 모 항체의 항원 결합력을 동등하게 유지하고 우수한 항암 효과를 나타내면서도 약물에 의한 독성이 적고 생체 내 효능이

우수한 항체-약물 결합체를 제조할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 약물을 결합시키는 경우, 기존 보고된 항체-약물 결합체와 비교하여서도 생체 내 독성이 적으면서도 혈중 안정성 및 항암 활성이 우수함을 규명하여, 본 발명을 완성하였다.

[7]

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 하나의 목적은 항체의 중쇄 또는 경쇄 N-말단 아미노산 잔기에 약물이 결합된 항체-약물 결합체를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체-약물 결합체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체-약물 결합체를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체-약물 결합체를 암 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체-약물 결합체를 자가면역질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체-약물 결합체로 제조하기에 적합한 항체를 선별하는 방법을 제공하는 것이다.

[14]

발명의 효과

- [15] 본 발명의 항체-약물 결합체를 제조하는 방법을 통하여, 보다 높은 생체 내 효능, 안정성 및 낮은 독성을 가지는 항체-약물 결합체를 제조할 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 알테하이드 링커가 말단에 연결된 독소 MMAF(Monomethyl Auristatin F)의 구조식이다.
- [18] 도 2는 유전자조작 되지 않은 단일클론 항체-싸이토톡신 결합체로서, 결합된 개수와 위치가 동질성을 가지는 구조를 보여주는 모식도이다.
- [19] 도 3은, T-N-MMAF의 LC/MS 프로파일을 나타낸 도이다.
- [20] 도 4는, 제조된 Trastuzumab-N-MMAF(T-N-MMAF 결합체)에서 약물이 결합된 위치를 펩티드 맵핑으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 5는, 제조된 T-N-MMAF의 SEC-HPLC 크로마토그램 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 6은, 전체 항체(Total antibody)들의 랫트에서의 시간에 따른 혈중 농도 변화를 확인한 도이다.
- [23] 도 7은, 결합 항체(Conjugated Antibody)들의 시간에 따른 혈중 농도 변화를 확인한 도이다.
- [24] 도 8은, 각 ADC별 total/conjugate의 PK 프로파일 서로 비교한 결과를 나타낸 도이다.

- [25] 도 9는, 누드 랫트 이종이식 모델에서의 HCC1954 세포주에 의해 형성된 종양성장곡선을 나타낸 도이다.
- [26] 도 10은, 종양 크기를 endpoint로 설정한 누드 랫트 이종이식 모델 실험에서의 생존 곡선을 나타낸 도이다.
- [27] 도 11은, 각 ADC별 투여에 따른 체중의 변화 및 상대 변화량을 나타낸 도이다.
- [28] 도 12는, 각 ADC별 투여에 따른 간독성 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 13은, 각 ADC별 투여에 따른 호중구 및 혈소판의 변화를 나타낸 도이다.
- [30] 도 14는, T-N-MMAE LC/MS 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 15는, T-N-MMAE의 Rat PK 프로파일을 나타낸 도이다.
- [32] 도 16은, Brentuximab-N-MMAF(B-N-MMAF)의 LC/MS 프로파일을 나타낸 도이다.
- [33] 도 17은, B-N-MMAF의 항원 결합력을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [34] 도 18은, Lorvotuzumab-N-MMAF(L-N-MMAF)의 conjugation profile을 나타낸 도이다.
- [35] 도 19는, L-N-MMAF의 항원 결합력을 나타낸 도이다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 하나의 양태로서, 본 발명은 항체의 중쇄 또는 경쇄 N-말단 아미노산 잔기에 약물이 결합된 항체-약물 결합체를 제공한다.
- [38]
- [39] 본 발명에서 용어, "항체-약물 결합체(antibody-drug conjugate, ADC)"란 항체와 약물의 생물학적 활성을 저하시키지 않으면서 약물과 항체를 화학적으로 연결한 형태를 지칭한다. 본 발명에서 상기 항체-약물 결합체는 항체의 중쇄 또는/및 경쇄의 N-말단의 아미노산 잔기에 약물이 결합된 형태, 구체적으로는 항체의 중쇄 또는/및 경쇄의 N-말단 α -아민기에 약물이 결합된 형태를 말한다. 본 발명에서는, 항체의 여러 부위 중에서도 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 약물을 위치 특이적으로 결합시키는 경우, 기존에 보고된 시스테인 결합으로 형성된 항체-약물 결합체, 티올 결합으로 형성된 항체-약물 결합체 및 라이신 결합으로 형성된 항체-약물 결합체와 비교하였을 때, 생체 내 효능 및 안정성 모두가 우수하고 독성이 적음을 확인하여, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단이 효능, 안정성 및 저독성의 이점을 모두 갖춘 위치가 될 수 있음을 규명하였다. 이러한 본 발명에 따른 항체-약물 결합체에 대한 모식도를 도 2에 나타내었다.

[40]

- [41] 본 발명에서 용어, "N-말단"이란 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노 말단, 즉 N-말단으로, 본 발명의 목적상 약물과 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로 이에 제한되지는 않으나, N-말단의 최말단의 아미노산 잔기뿐 아니라 N-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 항체의 중쇄 또는

경쇄의 첫 번째 아미노산 잔기를 말하며, 더욱 구체적으로는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 첫 번째 아미노산의 α -아민기를 말하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[42]

[43] 본 발명의 항체-약물 결합체는 항체와 약물의 위치 특이적 결합 또는/및 개수 특이적 결합을 통하여 동질성을 보장할 수 있는 장점을 가질 수 있다. 특히, 본 발명의 최적화 과정을 통하여, 각 항체마다 N-말단 아미노산 잔기에 가장 최적의 DAR(drug-antibody ratio)에 해당하는 수, 그 예로 1 내지 8개의 약물이 결합할 수 있다.

[44]

본 발명에서 용어, "동질성"은 두 물질이 결합되어 형성되는 결합체에 있어서 두 물질의 결합 비율 및 결합 위치가 균질한 경우를 말한다. 다만, 결합 비율 및 결합 위치가 완전히 동일한 경우만을 포함한다는 의미로 제한 해석되는 것은 아니며, 특정 결합 비율 및 결합 위치가 우세하게 존재하는 경우도 포함한다. 결합체가 동질성을 갖게 되면 전체적으로 균질하게 되고 투여량에 따른 효능을 정확하게 측정할 수 있어 이의 투여량, 투여 횟수 등을 표준화 할 수 있게 된다.

[45]

[46]

본 발명에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 가지는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 항원의 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전장(full-length) 항체 및 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 단편을 모두 포함한다. 전장 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 상기 항체 단편은 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, Fab' F(ab')₂, scFv 및 Fv 등을 포함한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중쇄Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[47]

또한, 본 발명의 항체는 천연형 항체 또는 재조합 항체일 수 있다. 천연형

항체란 유전자 조작을 가하지 않은 항체를 뜻하며, 생체 내에서 유전자 조작된 항체가 지닐 수 있는 면역원성(immunogenicity)의 위험성이 현저히 낮을 수 있다. 재조합 항체란 유전자 조작된 항체를 의미하며, 유전자 조작을 통하여 항원 결합력이나 원하는 특징을 추가할 수 있는 특징이 있다.

- [48] 본 발명에서 용어, "유전자 조작"이란 아미노산 서열을 변화시키는 행위로서, 해당 아미노산 서열을 코딩하는 본래 서열 폴리펩타이드와 어느 정도 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드에 대한 조작을 포함한다. 아미노산 서열 변이체는 본래 아미노산 서열 내의 특정 위치에서 아미노산이 치환, 결실되거나 외부 삽입된 아미노산 서열을 함유하게 된다.
- [49] 본 발명의 항체는 특이적으로 결합하는 항원으로, 항체와 결합시 세포 내로 내재화(internalization)되는 세포 표면 항원을 인식하는 것일 수 있다. 본 발명의 목적상 항원이 항체와의 결합에 의하여 세포 내로 내재화되는 경우에는, 해당 특성에 의하여, 항체에 결합된 약물, 구체적으로 세포독성 약물이 세포 내로 유입되어 약물의 효능이 높을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 또한, 본 발명의 항체는 암세포 표면 항원 또는 자가면역 질환이 발생된 조직 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [51] 본 발명에서 용어, "암세포 표면 항원"이란 정상세포에는 생성되지 않거나 생성되더라도 세포 표면에 노출되어 있지 않은 물질이 암세포에서만 특이적으로 세포 표면에 노출되어 있는 물질 또는 정상세포에 비해 암세포의 표면에 보다 많이 존재하는 물질을 일컫는다. 해당 물질이 항체에 의해 인식되는 경우 이를 항원이라고 표현한다.
- [52] 구체적으로는, 본 발명의 암세포 표면 항원은 본 발명의 항체가 특이적으로 인식할 수 있는 암세포 표면 물질은 제한없이 포함하나, 그 예로 CD19, CD20, CD30, CD33, CD37, CD22, CD56, CD70, CD74, CD138, Muc-16, mesothelin, HER2, HER3, GPNMB(glycoprotein NMB), IGF-1R, BCMA(B cell maturation antigen), PSMA(prostate-specific membrane antigen), EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule) 및 EGFR (epidermal growth factor receptor)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 HER2, CD30, CD56 및 GPNMB로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 Her2, CD56, 및 GPNMB를 인식하는 항-HER2 항체의 일종인 트라스투주맙(Trastuzumab), 항-CD56 항체의 일종인 로보투주맙(Lorvotuzumab), 항-CD30 항체의 일종인 브렌투시맙(Brentuximab), 그리고 항-GPNMB 항체의 일종인 글렘바투무맙(Glembatumumab)을 모델 항체로 사용하였다.
- [53]
- [54] 본 발명에서 용어, "약물"이란 세포에 특정 생물학적 활성을 가지는 임의의 물질을 의미할 수 있으며, 이는 화합물, DNA, RNA, 펩타이드 등을 모두 포함하는 개념이다. 이는 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기를 포함하는 형태일 수 있으며, α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기를

포함하는 링커가 연결되어 있는 형태 역시 포함한다. 이 경우 링커에 의하여 약물이 상기 항체의 N 말단 아미노산 잔기에 위치 특이적으로 결합할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [55] 상기 링커는 항체에 약물을 공유 결합시키는 원자쇄를 포함하는 화학적 부분을 말한다. 링커는 약물과 연결된 형태로 제조되며, 링커 말단에는 항체와 연결시킬 수 있는 반응기를 갖는다.
- [56] 상기 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기의 예로는, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단의 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있다면 그 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 아민기와 반응하는 종류를 모두 포함하나, 그 예로 아이소티오시아네이트(isothiocyanate), 아이소시아네이트(isocyanates), 아실 아자이드(acyl azide), NHS 에스터(NHS ester), 설폰일 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데하이드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭사이드(epoxide), 옥시레인(oxirane), 칼보네이트(carbonate), 아릴 할라이드(aryl halide), 이미도에스터(imidoester), 카보이미드(carbodiimide), 안하이드라이드(anhydride) 및 플루오로페닐 에스터(fluorophenyl ester) 등을 들 수 있으며, 보다 바람직한 반응기로는 알데하이드 및 NHS 에스터이나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 이러한 반응기들은 아민기와 아실화 또는 알킬화 반응으로 결합될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [57] 특히, 본 발명의 항체-약물 결합체는 항체의 N 말단의 아미노산 잔기에, 알데하이드 반응기를 가지는 링커와 연결된 약물을 위치 특이적 및 개수 특이적으로 결합한 면역결합체일 수 있다.
- [58] 알데하이드 반응기는 비특이적 반응을 최소화하여 항체의 N 말단의 아미노산 잔기, 특히, α -아민에 약물을 위치 특이적으로 결합시키기에 효과적이다. 알데하이드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데하이드는 낮은 pH에서 N 말단 α -아민과 선택적으로 반응하는 특성을 가진다. 이를 통해, 본 발명의 결합체는 항체의 N-말단 α -아민에 위치 특이적으로 약물이 연결된 동질성을 가지게 된다. 따라서, 기존 항체와 약물의 결합체의 결합의 개수 및 위치의 이질성 때문에 생기는 일률적인 약효 및 질을 담보할 수 없다는 문제점을 극복하였으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [59] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명자들은 항체의 α -아민에 위치 특이적으로 세포독성 약물을 연결하기 위하여 결합 반응 시 pH 6.0 이하로 반응시킬 경우, 세포독성 약물이 라이신 잔기에 존재하는 ϵ -아민과 결합하는 것을 최소화할 수 있음을 확인하였다.
- [60]
- [61] 본 발명에서 약물은 세포에 세포 사멸, 세포 증식, 면역 활성화, 면역 억제를 포함하여 특정 신호전달의 활성화, 또는 특정 신호전달의 억제 등을 일으킬 수 있는 물질을 모두 포함하며, 상기 약물은 특히 세포독성 약물 또는 면역

억제제일 수 있다.

[62] 본 발명에서 용어, "세포독성 약물"이란 세포독성 또는 세포증식 억제 효과를 갖는 임의의 물질, 예컨대 화합물을 지칭한다. "세포독성"이란 세포의 기능을 억제하거나 저하시켜 세포의 파괴를 야기시키는 효과를 의미하며, "세포증식 억제"란 세포성장 또는 세포 증식의 제한 등과 같이 세포성장 기능을 제한하는 효과를 의미한다.

[63] 본 발명에서 세포독성 약물은 마이크로튜블린(microtubulin) 구조 형성 억제제, 유사분열(meiosis) 억제제, RNA 중합효소 억제제, 토포아이소머라아제(topoisomerase) 억제제, DNA 인터칼레이터(DNA intercalators), DNA 알킬레이터(DNA alkylator), 리보솜 억제제 등의 기능을 할 수 있는 화학요법제, 효소적으로 기능할 수 있는 단백질 독소 및 방사선 동위원소를 포함한다. 그 예로, 메이탄시노이드(maytansinoid), 오리스타틴(auristatin), 돌라스타틴(dolastatin), 튜브라이신(tubulysin), 칼리케아미신(calicheamicin), 피롤로벤조디아제피네스(pyrrolobenzodiazepines), 독소루비신(doxorubicin), 듀오카마이신(duocamycin), 카보플라틴(파라플라틴)[Carboplatin(paraplatin)], 시스플라틴(cisplatin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 니드란(nidran), 질소머스타드(메클로에타민 염산염)[nitrogen mustar(mechlorethamine HCL)], 블레오마이신(bleomycin), 미토마이신 C(mitomycin C), 시타라빈(cytarabine), 플루로우라실(flurouracil), 젬시타빈(gemcitabine), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 메토크렉세이트(methotrexate), 에토포시드(etoposide), 빈블라스틴(vinblastine), 비노렐빈(vinorelbine), 알림타(alimta), 알트레타민(altretamine), 프로카바진(procarbazine), 탁솔(taxol), 탁소텔(taxotere), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 트리코테센(trichothecene), CC1065, 알파-아마니틴(alpha-amanitin), 다른 에네디인 항생제, 균체 외 독소 및 식물 독소일 수 있다. 또한 화합물인 경우 이의 입체이성질체, 유도체의 형태도 포함한다. 또한 상기 오리스타틴은 모노메틸 오리스타틴 E(Monomethyl auristatin E) 또는 모노메틸 오리스타틴 F(Monomethyl auristatin F)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[64] 본 발명에서 용어, "면역 억제제"란 면역 반응을 감소시키는 효과를 갖는 임의의 화합물을 지칭한다. 이는 면역 원인이 되는 물질을 길항하거나, 면역 반응에 관여하는 물질들(인터루킨 등의 사이토카인)을 억제할 수 있는 물질을 의미한다.

[65] 본 발명의 실시예에서는, 대표적인 항체로서 트라스투주맵(Trastuzumab), 로보투주맵(Lorvotuzumab), 브렌투시맵(Brentuximab), 및 글렘바투무맵(Glembatumumab)을 모델 항체로 사용하고, 이의 N-말단에 결합시킬 대표적인 세포독성 약물로서 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF) 및 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE)를 각각 사용하였다(실시예 1 및 2). pH 6.0의

조건에서 트라스투주맙과 MMAF 또는 MMAE를 반응시켜 이의 N-말단에 상기 약물이 결합된 항체-약물 결합체를 제조하였고, 이러한 항체-약물 결합체는 약물 결합 후에도 항체의 항원 결합능 및 세포독성 효능이 유지됨을 확인하였다(실시예 3 내지 5). 특히, 이러한 항체-약물 결합체는 *in vitro* 인간 혈청에서도 시스테인 결합 또는 라이신 결합을 가진 다른 항체-약물 결합체(비교 결합체)에 비해 안정성이 우수하며, 랫트를 이용한 약물동태학 실험에서도 우수한 약물 동태를 나타내었다(실시예 6). 또한, 항암 동물 모델에서도 다른 비교 결합체에 비하여 항암능이 우수하였고, 반면 체중, 간독성, 혈액 등에서 독성 수치를 검출하였을 때는 독성이 대조군과 유사한 정도로 낮은 독성을 보이는 결과를 나타내었다(실시예 7 및 8). 또한, 이러한 결과는 MMAE와 같은 다른 약물을 사용하거나, 다른 항체, 즉 로보투주맙(Lorvotuzumab), 브렌투시맙(Brentuximab), 및 글렘바투무맙(Glembatumumab)를 사용한 경우에도 항원 결합능, 세포 독성 등의 결과에서 유사한 결과를 나타내어(실시예 9), 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 약물을 결합시키는 본 발명에 따른 기술이 항체-약물 결합체의 제조에 있어 플랫폼 기술이 될 수 있음을 확인하였다.

[66]

[67] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항체-약물 결합체의 제조방법을 제공한다.

[68] 상기 항체-약물 결합체 및 이의 구성요소에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[69] 구체적으로, 상기 제조방법은 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기를 포함하는 약물과 항체를 반응시켜, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단의 α -아민기에 약물을 연결시키는 단계를 포함한다.

[70] 또한, 상기 제조방법은 추가로 결합체를 형성하지 않은 항체 및 약물을 포함하는 반응 산물로부터 항체-약물 결합체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[71] 구체적으로 상기 제조방법에서 항체와 약물은 pH 4.0 이상 pH 6.5 이하, 보다 구체적으로는 pH 5.5 이상 pH 6.5 이하에서 연결될 수 있으며, 보다 더 구체적으로는 pH 6.0에서 연결될 수 있다. 상기에서 서술한 바와 같이, 낮은 pH에 의해서 약물, 혹은 이의 링커에 존재하는 알데하이드기와 항체의 N-말단 α -아민간의 결합이 특이적으로 일어날 수 있는 이점을 가진다.

[72] 상기 항체-약물 결합체의 분리 과정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 수행될 수 있으며, 예컨대 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 크로마토그래피 공정을 통하여 수행될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[73]

[74] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항체-약물 결합체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[75] 상기 조성물은 상기 항체-약물 결합체를 포함하는 암 또는 자가면역 질환 치료용 약학적 조성물의 형태를 포함한다. 이 경우, 상기 항체는 특히 암세포 표면 항원 또는 자가면역 질환이 발생된 조직 표면 항원에 특이적으로 결합하는

것일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

- [76] 상기 항체, 약물, 암세포 표면 항원 및 자가면역 질환이 발생된 조직 표면 항원은 상기 설명한 바와 동일하다.
- [77] 본 발명에서 용어, "암"은 암의 종류를 제한 없이 포함하나, 그 예로 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁 내막체암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환, 림프종, 또는 다발성 골수종혈액암일 수 있다. 상기 암세포 표면 항원에 특이적인 항체의 종류에 따라 치료할 수 있는 암을 선택할 수 있다.
- [78] 본 발명에서 용어, "자가면역질환"은 본 발명의 항체-약물 결합체가 표적으로 하는 자가면역질환이라면 그 종류에 관계없이 포함되나, 그 예로 류마티스성 관절염, 전신성 경피증, 전신 홍반성 낭창, 아토피 피부염, 건선, 원형탈모증, 천식, 크론씨병, 베체시병, 쇼그렌 증후군, 길리아-바레 증후군, 만성 갑상선염, 다발성 경화증, 다발성 근염, 강직성 척추염, 섬유조직염 또는 결절성 다발성 동맥염일 수 있다.
- [79] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [80] 상기 담체는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [81] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [82] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이

사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 율활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [83] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [84] 또한, 상기 조성물은 약학적 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 제제, 바람직하게는 펩타이드 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [85] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산 (ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제 (antioxidants), 킬레이팅 물질 (chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제 (stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [86]
- [87] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항체-약물 결합체 또는 상기 조성물을 이용하여 암 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 항체는 특히 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으며, 상기 약물은 암치료 약물일 수 있다. 또한, 상기 항체는 자가면역 질환이 발생된 조직 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으며, 상기 약물은 자가면역 질환치료 약물일 수 있다.
- [88] 상기 항체 및 약물은 상기 설명한 바와 동일하다.
- [89] 상기 방법은 치료를 필요로 하는 개체에 상기 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법일 수 있으며, 이때, 사용되는 항체-약물 결합체 및 담체의 종류는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [90] 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 단백질인 항체는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의

약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

- [91] 본 발명의 상기 항체-약물 결합체를 포함하는 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[92]

- [93] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 항체-약물 결합체로 제조하기에 적합한 항체를 선별하는 방법을 제공한다.

- [94] 본 발명에 따른 항체-약물 결합체의 제조에 있어서, 항체의 N-말단, 구체적으로는 α -아민에 약물을 결합시켜 항체-약물 결합체를 효과적으로 제조하기에 적합한 항체를 검색하여 선별할 수 있다.

[95]

발명의 실시를 위한 형태

- [96] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[97]

실시예 1: 모델 항체의 선정

- [99] 본 발명의 항체-약물 결합체에 대해 대표적으로 항체-사이토톡신 결합체를 제조하기 위하여, 링커가 존재하는 사이토톡신이 위치 선택적(Site selective)으로 항체에 결합하는지 확인하기 위해 항-HER2 항체인 트라스투주맙(Trastuzumab), 항-CD56 항체인 로보투주맙(Lorvotuzumab), 항-CD30 항체인 브렌투시맙(Brentuximab), 및 항-GPNMB(glycoprotein NMB) 항체인 글렘바투무맙(Glembatumumab)을 모델 항체로 사용하였다.

[100]

- [101] 상기의 항체들은 공지의 아미노산 서열 정보를 이용하여 발현 벡터를 구축하고 CHO 세포주에서 stable cell line 구축, 혹은 임시 발현을 통해 발현 시키고 배양, 정제하였다.

[102]

실시예 2: 독신(Toxin)의 합성

- [104] 알데하이드 링커가 말단에 연결된 모노메틸 오리스타틴 F(Monomethyl Auristatin F, MMAF) 독소를 합성하였다(레고켄바이오사이언스 또는

XcessBioscience)(도 1). 또한, MMAF 외에 다른 종류의 독소에도 본 발명에 따른 N-말단 컨쥬게이션 방법의 적용 가능성을 확인하기 위하여 모노메틸 오리스타틴 E(Monomethyl Auristatin E, MMAE)를 합성하여 비교하였다(XcessBioscience, 미국).

[105]

[106] 실시예 3: 단일클론 항체-싸이토톡신 결합체 제조

[107]

[108] 3-1. 본 발명에 따른 단일클론항체-약물 결합체의 제조

[109] 항체를 100mM 인산칼륨 pH5.49 완충 용액으로 교환하여 약 7.1mg/ml로 농축하였다. 이후 알데하이드 반응기를 가지는 링커와 연결되어 있는 MMAF(레고켄바이오사이언스, 한국)를 50% DMSO(Dimethyl sulfoxide) 용매에 녹여 2.5mg/ml이 되도록 하였다. 그리고 나서 최종 70mM 인산칼륨 pH6.0, 항체농도 5.0mg/ml, 14% DMSO, MMAF 농도 0.3mg/ml, 항체의 α -아민과 MMAF의 몰비가 약 1:2.3(또는 항체와 MMAF의 몰비가 1:9)가 되도록 준비된 항체 용액과 MMAF 용액을 혼합하였다. 상기 반응 용액에 NaCNBH₃(Sigma사, 미국)를 최종 20mM이 되도록 첨가한 후, 4°C에서 12시간 동안 서서히 교반시키면서 반응시켰다. 반응하지 않은 항체 및 링커와 연결된 MMAF를 분리하기 위하여 세파텍스 G-25컬럼(GE 헬스케어, 미국) 또는 리소스페닐컬럼(Resource Phe, GE 헬스케어, 미국)을 사용하였다. 이러한 과정으로 항체 한 분자에 약 3개의 MMAF 독소가 항체의 아미노 말단에 선택적으로 결합된 형태를 제조하였다(도 2).

[110]

[111] 3-2. 대조군 항체-약물 결합체의 제조

[112] 기존 기술로 제조한 대조군 항체-약물 결합체는 시스테인 결합(Cys conjugation, Thiomab(HC-A114C) + Mal-C6-MMAF), 티올 결합(Mal-C6-MMAF), 및 라이신 결합(SMCC 링커, SH-C6-MMAF)을 통하여 구현하였다.

[113] 티올 결합 항체는 pH 8.0에서 TCEP로 항체를 환원시킨 후 Mal-C4-MMAF를 넣어 0°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 시스테인을 넣어 추가로 반응시킨 후, 반응을 종결시키고, G25 Desalting 컬럼 (GE healthcare, 미국)을 사용하여 1X PBS로 치환하여 반응을 종료했다.

[114] 시스테인 결합 항체는 정제된 항체의 시스테인을 활성화시킨 후, Mal-C6-MMAF를 넣어 티올 결합 항체와 유사한 과정을 수행하여 컨쥬게이션을 수행하였다.

[115] 라이신 결합 항체의 결합체는 Immunogen 사 특허(WO2005037992)를 참고하여 제조하였다. 먼저 항체와 SMCC 링커를 반응시키고 반응하지 않은 SMCC를 버퍼교환을 통해 제거하였다. 항체-SMCC 결합체는 다시 티올기를 포함하는 SH-C4-MMAF(Concortis bioscience, 미국)와 반응시켜 항체-SMCC-MMAF 결합체를 제작하였다.

[116]

[117] 본 발명에 해당하는 α -아민 결합을 통해 제조된 항체-사이토톡신 결합체를 포함하여 정리하면, 하기 표 1과 같다.

[118] 표 1

[Table 1]

항체-약물 결합체		
결합 종류	결합 조건	결합체 명칭 (Trastuzumab, MMAF 사용 시)
Cys 결합	Thiomab(HC A114C), Mal-C6-MMAF	Thiomab-MMAF
Thiol 결합	Mal-C6-MMAF	T-C-MMAF
Lys 결합	SMCC 링커, SH-C6-MMAF	T-K-MMAF
Amine 결합	ALD-C6-MMAF (약산성 pH 조건)	T-N-MMAF

[119]

[120] 상기 방법을 통하여 제조한 4개의 물질을 분석하여, DAR(Drug antibody ratio) 및 결합 위치를 확인하였다. 이는 LC-MS 및 펩타이드 맵핑을 통하여 확인하였다.

[121]

[122] **실시예 4: 물리화학적 특성 및 생물학적 활성**

[123]

[124] **4-1. 분자량 분석**

[125] 항체-약물 결합체(T-N-MMAF)의 분자량을 LC-MS 분석을 통해 확인하였다. 사용한 약물(MMAF)의 결합 시 분자량의 이론값은 824.54 Da이고, 트라스투주맙의 분자량은 145 kDa이다. 따라서, 질량 분석을 통해 약물의 항체 결합 여부와 항체 한 분자에 결합한 약물의 개수도 동시에 확인할 수 있었다.

[126] 실시예 3에 따라 제조한 T-N-MMAF에 대해 DAR을 결정하기 위해 LC/MS로 분자량을 분석하였다. 제조된 시료는 PNGaseF로 당사슬을 제거한 후 ACQUITY UPLC BEH 200 SEC 컬럼을 통해 분리 후 Waters Synapt G2-S 시스템에 시료를 주입하여 질량을 분석하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[127] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 약물이 하나도 결합하지 않은 화학종(D0)에서부터 최고 7개가 붙은 화학종(D7)까지 검출이 되었으며 부착된 약물의 개수는 각 피크간 분자량차이가 약물의 분자량과 일치하거나 유사함을 바탕으로 판단하였고, 그 상대함량은 하기 표 2에 나타낸 바와 같았다. DAR는 각 화학종의 가중평균으로 구하였으며 그 값은 DAR=3.2였다.

[128] 표 2

[Table 2]

No. of bound drug	Mass (Da)	Relative intensity(%)	Da
0	145179.5	1.8	-
1	146005.3	10.7	825.8
2	146833.2	21.2	827.9
3	147661.1	25.4	827.9
4	148488.9	21.0	827.8
5	149317.0	12.5	828.1
6	150145.5	5.0	828.5
7	150964.2	2.3	818.7
DAR		3.219	
DAR = Sum(Intensity(%) x No. of Drug / 100)Drug moiety mass :			
828 Da			

[129]

[130]

4-2. 약물 결합위치

[131]

제조된 T-N_MMAF 결합체에서 약물이 결합된 위치는 펩티드 맵핑을 통해 확인하였다. 실시예 3에서 제조한 DAR 3.2의 T-N-MMAF ADC를 Rapigest(Waters)로 변성시킨 후 트립신(Roche)으로 반응시켜 절편을 만들었다. 반응물은 ACQUITY UPLC PST (BEH) C18 컬럼으로 분리하였고 분리된 각 피크는 Waters Synapt G2-S Q/TOF 시스템을 통해 질량 분석하여 어느 서열에 해당되는지 결정하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[132]

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 컨쥬게이션(conjugation) 되지 않은 모 항체에서는 발견되지 않는 피크들이 크로마토그램에서 검출이 되었다. 질량 분석 결과 해당 절편들은 중쇄 N-말단, 경쇄 N-말단, 중쇄 일부분, 그리고 그 외의 작은 절편들로 확인되었으며 그 비율은 아래 표 3에 나타낸 바와 같다. 따라서 전체 약물 중 75%가 N-말단에 결합되어 있으며 92%가 명확히 정의할 수 있는 세 지점인 N-말단과 중쇄-CH2 영역에 선택적으로 결합되어 있다고 할 수 있다.

[133]

표 3

[Table 3]

	트립신 단편(Trypsin fragment)	Ratio
중쇄-N말단	EVQLVESGGGLVQPGGSLR (서열번호 1)	46%
경쇄-N말단	DIQMTQSPSSLSASVGDR (서열번호 2)	29%
중쇄-CH2	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (서열번호 3)	17%
그외	-	8%

[134]

[135] 4-3. 순도 분석

[136] 제조한 T-N-MMAF 결합체의 응집체(aggregate) 함량을 확인하기 위해 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 분석을 통해 순도 분석을 진행하였다. TSK-Gel3000SWXL 컬럼에 PBS를 이동상으로 하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였으며 Novex NuPAGE 4-12% 겔을 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 크로마토그래피 결과에 대하여 도 5에 나타내었다.

[137] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 단량체의 순도는 98.8%로서 효력시험에 적합한 순도를 확인하였고 단편화나 교차 결합(cross-linking) 등은 관찰되지 않았다.

[138]

[139] 4-4. 항원결합력

[140] 약물 결합 후에도 항원결합력이 유지되는지를 확인하기 위하여, 비아코어™ (Biacore™)를 이용한 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 측정하는 방법으로 약물이 결합된 항체의 항원 결합력을 측정하였다. 대조항체는 천연형 항체를 사용하였다. 항원(ErbB2) 결합력은 비아코어 T200을 이용하여 분석하였으며 CM5 센서 칩(GE healthcare)에 각 항체를 아민 커플링 키트를 이용하여 고정화 시킨 후 ErbB2(R&D systems)를 50, 16.67, 5.56, 1.85, 0.62, 0.21 nM의 농도로 30uL/min 속도로 주입하며 on/off 속도를 측정, 분석하여 kD(M)를 구하였다.

[141] 표 4

[Table 4]

시료	항원 결합력		
	Test 1 (10 ⁻¹⁰ M)	Test 2 (10 ⁻¹⁰ M)	평균 (10 ⁻¹⁰ M)
트라스투주맙	1.3	2.2	1.8
T-N-MMAF (DAR 1.6)	1.2	0.9	1.1
T-N-MMAF (DAR 3.2)	1.1	0.7	0.9

[142]

[143] 그 결과, 하기 표 4에 정리된 바와 같이, DAR과 상관없이 약물 결합 후에도 천연형 항체와 유사한 0.1nM 정도의 항원결합력이 유지됨을 확인하였다.

[144]

[145] 실시예 5: *In vitro* 세포독성 분석

[146] 제조한 항체-싸이토톡신 결합체의 *in vitro* 효능을 확인하기 위하여 HER2 발현 종양 세포주인 BT474, HCC1954, SKOV-3, JIMT-1 세포주를 이용하여 항-증식 어세이를 수행하였다. 각 세포를 배양하여 1*10⁵ 세포/ml로 서스펜션하여 96웰 플레이트에 100 μl씩 로딩한다. 세포 배양기에서 3시간 배양 후, 웰 당 다양한 농도구간의 항체-싸이토톡신 결합체를 각각 100 μl씩 넣고 세포 배양기에서 4일간 배양한다. CCK-8(Dojindo)를 1:10으로 희석하여 각 웰에 처리 후, 호일에 싸서 세포 배양기에 2~5시간 반응시킨 후 SpectraMax 190 마이크로플레이트 리더 (Molecular Device)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[147] 표 5

[Table 5]

Cell line	Cytotoxicity (IC ₅₀ (pM))		
	T-N-MMAF(DAR 3.2)	T-C-MMAF(DAR 3.6)	T-K-MMAF(DAR 3.9)
HCC1954	40	22	45
SKOV-3	104	59	N.D.
JIMT1	253	98	727
BT474	116	49	77

[148]

[149] 그 결과, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, T-N-MMAF의 세포독성은 총 4종의 암 세포주 모두에서 T-C-MMAF 보다 약간 낮은 세포독성을 보였지만, 생체 내 효력에 영향을 줄 수 있는 의미 있는 세포독성 감소는 없었다.

[150]

[151] 실시예 6: 안정성 시험

[152]

[153] 6-1. In vitro 인간 혈청 안정성

[154] 실시예 3에서 제조한 T-N-MMAF와 천연형 항체, T-C-MMAF, Thiomab-MMAF 등의 대조구를 사용하여 In vitro 인간 혈청 안정성 시험을 수행하였다. 항체-싸이토톡신 결합체를 1x PBS로 완충액 교환하여 3.33mg/ml로 농축한 후, 항체-싸이토톡신 결합체와 인간 혈청(Sigma사, 미국)의 비율(v/v)을 1:9로 혼합하여 37°C에서 7일간 정치하였다. 7일 후, 보관시료는 MabSelectSure (GE 헬스케어, 미국)을 사용하여 시료에 포함된 항체-싸이토톡신 결합체 이외의 단백질을 제거하여 LC/MS 분석 시 간섭을 최소화하였다. 시험관 조건에서 인간 혈청에서의 안정성은 LC/MS로 분석하여 결과를 아래 표 6에 나타내었다.

[155] 표 6

[Table 6]

시료	단일클론항체의 상대적 함량(보관 7일, %)	결합체의 상대적 함량(보관 7일, %)	DAR의 상대적 함량(보관 7일, %)
Trastuzumab	90.0	-	-
T-N-MMAF	89.3	90.5	101.4
T-C-MMAF	49.2	32.3	65.6
Thiomab-MMAF	69.9	59.5	85.1

[156]

[157] 그 결과, 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, 7일 보관 후 대조구인 천연형 항체와 비교해서 T-N-MMAF의 함량 및 DAR 변화가 관찰되지 않았다. 반면, 비교 항체-약물 결합체인 T-C-MMAF 및 Thiomab-MMAF의 경우는 전체 항체 함량 및 DAR이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[158]

[159] 6-2. 랫트 약물동력학(Rat PK)

[160] 랫트 PK 실험을 통해 생체 내 안정성을 비교 및 확인하였다. 3종 ADCs(T-K-MMAF, T-C-MMAF, T-N-MMAF)와 트라스투주맙을 2.5mg/kg 용량으로 암컷 Sprague-Dawley 랫트에 1회 정맥 주사하였다. 물질투여 후 0.05시간, 0.5 시간, 1시간, 6시간, 24시간, 72시간, 168시간, 240시간, 336시간 후에 채혈하였다. 혈액 내 ErbB2에 결합하는 모든 항체를 분석하는 전체 항체(Total antibody) 분석법과 약물 결합이 유지되고 있는 항체를 분석하는 결합 항체(Conjugated antibody) 분석법을 ELISA 방법으로 실시하였다.

[161]

[162] 전체 항체의 함량은 아래와 같은 ELISA법으로 분석하였다:
 [163] 96 웰 마이크로플레이트를 ErbB2(R&D systems)로 코팅한 후, 시료를 플레이트에 넣고 37°C의 온도에서 1시간 동안 반응하였다. PBST를 사용하여 고정되지 않는 모든 잔여물을 세척한 후에 HRP 결합된 항-인간 카파 경쇄 항체(HRP-conjugated anti-Human kappa light chain antibody)와 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB, Sigma, T0440)을 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 시료 내 전체 항체 량을 결정하였다.

[164]

[165] 결합 항체 분석법은 상기 기술한 방법과 유사한 방법으로 진행하여 항-MMAF 항체(영인프론티어)로 96-웰 마이크로플레이트를 코팅한 후, 시료를 플레이트에 넣고 37°C의 온도에서 1시간 동안 반응하였다. 이후 바이오티닐화된 ErbB2 (ACROBIOSYSTEMS, 미국), 스트렙트아비딘-HRP, TMB를 차례로 넣어 발색 후 450nm에서 흡광도를 측정하여 결합 항체의 농도를 결정하였고, 그 결과를 도 6 내지 8 및 하기 표 7에 나타내었다.

[166] 표 7

[Table 7]

랫트에 ADC를 2.5mg/kg 용량으로 투여한 다음, 측정된 PK 파라미터						
Treatment (n=5, each)2-compartment modeling	Total Ab			Conjugated Ab		
	AUC(hr* μ g/ml)	T _{1/2} (hr)	C _{max} (μ g/ml)	AUC(hr* μ g/ml)	T _{1/2} (hr)	C _{max} (μ g/ml)
Trastuzumab	6964.9	115.7	128.1	-	-	-
T-N-MMAF	6795.7	122.1	111.2	6813.2	118.3	112.4
T-C-MMAF	5933.5	111.6	94.3	4315.4	84.6	93.7
T-K-MMAF	4324.3	65.1	157.5	3781.7	53.2	190.0

[167]

[168] **실시예 7: 항암모델동물에서 항암효과 확인실험**

[169] 서로 다른 기술로 제작된 3종의 ADC의 효력과 약물-항체 비율 (DAR)에 의한 효력차이를 비교하기 위해 누드 랫트를 이용한 유방암 (HCC 1954) 이종이식 모델에서 *in vivo* 효능 테스트를 수행하였다.

[170] 4종의 ADC, 즉 T-N-M (DAR 약 1.6, 3.2), T-C-M(DAR 약 3.7), T-K-M(DAR 약 3.9)를 HCC1954 세포가 이식된 랫트에 각각 1 mg/kg의 용량으로 단회 정맥 투여한 후 각 시험군 간의 이식종양 성장억제 정도를 비교하였고, 그 결과를 하기 도 9 및 10에 나타내었다.

[171] 그 결과, 도 9 및 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 항체는 대조군 및 비교 항체 결과와 비교하여 항암 효과가 우수하였다.

[172]

[173] 실시예 8: 독성시험

[174] ADC의 제조기법에 따라 달라지는 안정성이 독성에 영향을 주는지 SD 랫트를 이용한 단회 투여 독성 시험을 수행하였다. 세 종류의 ADC를 각각 고용량인 200mpk로 정맥을 통해 단회 투여하였다. 비교군으로 단독항체와 MMAF도 200mpk의 용량의 노출에 맞춰 투여하였다. 체중은 시험물질 투여 시점부터 실험종료 시(12일)까지 매일 측정하였다. 혈액, 생화학 분석은 투여 후 5일에 진행하였다. 측정항목은 간독성과 대표적인 혈액학적 독성 확인을 위해 AST와 ALT, 호중구(Neutrophil), 혈소판(Platelet)이다.

[175]

[176] 8-1. 체중변화

[177] 체중변화에 대한 결과를 도 11에 나타내었다. 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, T-C-MMAF, T-K-MMAF군은 T-N-MMAF 군 및 나머지 군에 비해 뚜렷한 체중 감소를 보였다. 특히 T-C-MMAF 투여군은 8일차 이후 한마리를 제외한 모든 개체가 폐사하였다.

[178]

[179] 8-2. 생화학검사 (간독성)

[180] 간독성 유발 여부를 비교해 보기 위해 투여 후 5일차에 채취한 혈액에 대해 혈액 생화학분석을 수행하였다. Au480 (Beckman coulter, 미국) 화학분석기를 이용하여 수행하였으며 그 중 간독성의 지표가 되는 AST(Aspartate Aminotransferase), ALT(Alanine Aminotransferase)의 역가를 도 12에 표시하였다.

[181]

그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 T-N-MMAF군은 PBS를 포함한 다른 대조군과 크게 차이가 나지 않는 변화를 보여 급격하거나 심각한 간독성을 유발하지 않았음을 관찰할 수 있었다. 그러나 T-C-MMAF, T-K-MMAF 군에서는 상당한 증가가 관찰되어 약물 투여로 인한 간독성의 발생을 관찰할 수 있었다.

[182]

[183] 8-3. 혈액학검사 (호중구감소증, 혈소판감소증)

[184] 현재 허가 받은 ADC들의 주요 임상적 독성이 혈액학적 특성으로 나타나므로, 투여 후 5일차에 채취한 혈액에 대해서 Hemavet 950 FS (Drew Scientific Inc., 미국) 혈액학분석기를 이용하여 혈액학적 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 13에 표시하였다.

[185]

그 결과, 호중구(Neutrophil)의 숫자의 경우, T-N-MMAF 투여군은 PBS를 포함한 대조군에 비해 두드러진 변화를 보이지는 않아 급격하고 심각한 혈액학적 독성은 유발되지 않았다고 볼 수 있었다. 그러나 T-C-MMAF 군에서는 현저한 감소를 보였고 T-K-MMAF 군의 경우는 현격히 증가된 수치를 보였는데, 투여 직후 감소하였다가 재상승한 것으로 추정되었다. 따라서, 이 두 군에 대해서는 약물 투여로 인해 급격한 혈액학적 독성이 유발되었다고 결론 내릴 수

있었다.

[186] 혈소판수치의 경우, T-N-MMAF 투여군은 PBS를 포함한 다른 대조군에 비해 차이를 확인할 수 있는 정도로 소폭 감소하였다. 그러나 T-C-MMAF, T-K-MMAF 군의 경우는 현격한 감소를 보여 투여물질에 의해 급격한 독성이 발생하였음을 보여주었다.

[187]

[188] 실시예 9: 플랫폼 기능 확인

[189]

[190] 본 발명의 항체-약물 결합체 제조방법이 다양한 항체-약물 결합체에 사용될 수 있는지 가능성을 확인하였다. 이를 위해, 다양한 약물 또는 다양한 항체 및 다양한 항체 형태에 적용하여 기능을 확인하고자 하였다.

[191]

[192] 9-1. 약물 종류에 따른 기능 확인

[193] 다양한 약물에 대하여 상기 본 발명의 항체-약물 결합체 제조방법이 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 대표적으로 모델 항체로서 트라스투주맙 항체를 이용하여, 다양한 약물로 N 말단 결합을 진행하였다. 구체적으로는 MMAF와 MMAE 2종의 약물을 사용하였으며 MMAF를 사용하여 얻은 결과들은 앞서 여러 실시예에 기술하였다. 실시예 3에서 기술한 방법에 따라 항체-약물 결합체를 제조하였으며 각각 제조한 항체-약물 결합체를 수득하여 DAR 분석 및 *in vitro* 안정성, Rat PK를 전술한 실시예의 방법에 따라 실시하였다.

[194]

[195] 9-1-1. T-N-MMAE의 제조

[196] 실시예 3의 방법에 따라, MMAE(XcessBioscience, 미국)와 항체 간의 결합체를 만들었고, DAR을 결정하기 위해 LC/MS로 분자량을 분석한 결과를 도 14 및 하기 표 8에 나타내었다.

[197] 표 8

[Table 8]

T-N-MMAE의 DAR별 화학종 분포도 및 평균 DAR			
No. of drug	Mass (Da)	Relative content (%)	Delta mass
D0	N/D	N/D	
D1	146061.05	6.3	
D2	146863.77	14.3	802.72
D3	147672.80	23.3	809.03
D4	148484.33	24.2	811.53
D5	149297.30	16.5	812.97
D6	150112.25	8.6	814.95
D7	150922.84	6.8	810.59
DAR		3.83	

[198]

[199] 9-1-2. T-N-MMAE의 인간 혈청 내 안정성 확인

[200] 실시예 6의 방법에 따라, T-N-MMAE ADC의 혈청내 안정성을 평가하였다. 각 시료에서의 ADC의 농도는 ELISA를 이용한 전체 항체 분석법에 따라 측정하였으며 DAR의 변화는 LC/MS를 이용하여 측정하였다.

[201] 표 9

[Table 9]

	$\mu\text{g/ml}$	%	DAR	%
Day 0	364.8	100%	3.17	100%
Day 3	346.9	95%	3.33	105%
Day 7	294.8	81%	3.28	103%

[202]

[203] 9-1-3. T-N-MMAE의 Rat PK

[204] 제조된 MMAE 결합체의 체 내 안정성을 평가하기 위해서 SD 랫트를 이용한 PK 측정시험을 전술한 실시예 6과 유사하게 수행하였다. 약술하면 2.5mg/pk의 ADC를 암컷 SD 랫트에 투여하였고 12분, 30분, 1시간, 6시간, 24시간, 3일, 7일, 10일, 14일, 17일, 21일 후에 채혈을 하여 그 농도를 ELISA 기법을 사용하여 전체 항체 및 결합 항체로 나누어 전술한 방법에 따라 측정하였다.

[205] 표 10

[Table 10]

T-N-MMAE 의 rat PK 파라미터.				
Group	AUC(hr* μ g/ml)	Conjugate/Total ratio	half-life (hr)	Conjugate/Total ratio
trastuzumab	5868.83		169.6	
T-N-MMAF (T)	6688.95		191.8	
T-N-MMAF (C)	6871.71	103%	203.3	106%
T-N-MMAE (T)	5639.24		173.9	
T-N-MMAE (C)	5690.96	101%	163.7	94%

* 시험간 비교를 위해 trastuzumab과 T-N-MMAF를 포함하였다.

[206]

[207] 그 결과, 도 15 및 상기 표 10에 나타낸 바와 같이, T-N-MMAE는 전체 항체 및 결합 항체 모두 모항체와 차이가 크게 나지 않는 프로파일을 보이고 있어 MMAE로 항체-약물 복합체를 제작하여도 MMAF와 유사한 안정성을 기대할 수 있었다.

[208]

[209] 9-1-4. T-N-MMAE의 활성

[210] 제작된 MMAE의 생물학적 활성을 확인하기 위해서 4종의 종양세포주를 사용하여 그 활성을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 11에 나타내었다. 사용한 방법은 실시예 5와 유사하였다.

[211] 표 11

[Table 11]

Her2 발현 종양 세포주에 대한 T-N-MMAE의 세포 독성			
	IC ₅₀ [nM]		
	#1	#2	Average
HCC1954	0.39	0.26	0.33
SKOV-3	3.04	2.62	2.83
JIMT1	4.00	3.51	3.76
BT474	0.56	0.70	0.63

[212]

[213] 그 결과, 측정된 IC₅₀는 0.33-3.76nM 범위였으며 이는 문헌상으로 보고된 트라스투주맙/MMAE 티올 결합체의 BT474 세포주에 대한 활성(0.47nM)과 유사하였다. 따라서 본 발명에 따른 α -아민을 이용한 N 말단 선택적 결합 방법이

다른 형태의 약물에도 적용할 수 있다고 할 수 있다.

[214]

[215] 9-2. 항체 종류에 따른 기능 확인

[216] 다양한 항체에 대하여 상기 본 발명의 항체-약물 결합체 제조방법이 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 3종의 항암 항체(Brentuximab, Lorvotuzumab, Glembatumumab)에 N 말단 결합을 진행하여, DAR 분석 및 *in vitro* 안정성을 측정하였다.

[217]

[218] 9-2-1. 브렌투시맙(Brentuximab)

[219]

[220] 9-2-1-1. 브렌투시맙-N-MMAF의 제조

[221] CHO 세포주로부터 발현시킨 브렌투시맙을 가지고 실시예 3의 방법에 따라 브렌투시맙-N-MMAF(B-N-MMAF)를 제조하였다. 제조된 ADC는 도 16 및 하기 표 12와 같은 LC/MS 프로파일을 나타내었으며, D0-D6까지의 화학종이 검출되었고, DAR은 2.90으로 계산되었다.

[222] 표 12

[Table 12]

No. of bound drug	Mass (Da)	Relative content (%)	Delta mass(Da)
D0	145208.6	3.1	
D1	146034.9	14	826.3
D2	146863.3	24.4	828.4
D3	147692	26.4	828.7
D4	148520.7	18.2	828.7
D5	149349.7	9.3	829
D6	150177.5	4.7	827.8
DAR		2.90	

[223]

[224] 9-2-1-2. 리간드 결합 어세이

[225] 컨쥬게이션(Conjugation)에 의해 항체의 특성이 변하는지를 판단하기 위해 항원에 대한 결합력을 ELISA 방법으로 측정, 비교하였다. 항원인 CD30(R&D systems)을 96 웰 마이크로플레이트에 100µg 코팅한 후, 1% BSA로 37°C 1시간 블로킹하였다. 블로킹 용액을 제거한 후 시료를 플레이트에 넣고 37°C 1시간 반응하였다. PBST (PBS + 0.05% 트윈 20)으로 5번 세척 후 HRP 컨쥬게이션된 항-인간 카파(kappa) 경쇄 항체를 1000배 희석하여 플레이트에 넣고 37°C 1시간

반응하였다. PBST로 5번 세척 후 TMB(Sigma)를 넣고 10분 발색하였다. 1N H₂SO₄를 넣어 반응을 정지 시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 17에 나타내었다. 도 17에서, 동그라미(○)로 표시한 선은 컨쥬게이션을 수행하지 않은 브렌투시맙에 대한 결과, 사각형(◇)으로 표시한 선은 DAR 2.90의 B-N-MMAF에 대한 결과, 그리고 삼각형(△)으로 표시한 선은 DAR 4.22의 B-N-MMAF에 대한 결과를 나타낸 것이다. 결과에서 보여지는 바와 같이 컨쥬게이션 수행 후에도 DAR 값에 상관없이 항원에 대한 결합력은 변하지 않았다.

[226]

[227] 9-2-1-3. In vitro 세포독성

[228] 제조한 항체-싸이토톡신 결합체의 *in vitro* 효능을 확인하기 위하여 CD30 발현 세포주인 Karpas-299, L-540 세포주를 이용하여 항-증식 어세이를 수행하였다.

[229] 구체적으로, 각 세포를 배양하여 1*10⁵ 세포/ml로 서스펜션하여 96 웰 플레이트에 100 μ l씩 로딩하였다. 세포 배양기에서 3시간 배양 후, 웰당 다양한 농도구간의 항체-싸이토톡신 결합체를 각각 100 μ l씩 넣고 세포 배양기에서 4일간 배양하였다. CCK-8(Dojindo)를 1:10으로 희석하여 각 웰에 처리 후, 알루미늄호일에 싸서 세포 배양기에 2~5시간 반응하였다. SpectraMax 190 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

[230] 표 13

[Table 13]

Cell line	IC ₅₀ (pM)
Karpas-299	32.2
L-540	37.1

[231]

[232] 그 결과, Karpas-299, L-540 두 개의 세포 주 모두에서 모두 40pM 미만의 세포독성을 관측하였다.

[233]

[234] 9-2-2. 로보투주맙(Lorvotuzumab)

[235] 9-2-2-1. 로보투주맙-N-MMAF의 제조

[236] CHO 세포로부터 임시발현한 로보투주맙을 가지고 전술한 실시예 3의 방법에 따라 로보투주맙-N-MMAF(L-N-MMAF)를 제조하였다. 그 결과, 제조된 ADC는 도 18 및 하기 표 14와 같은 컨쥬게이션 프로파일을 보였으며, DAR는 3.33으로 결정되었다.

[237] 표 14

[Table 14]

No. of bound drugs	Mass (Da)	Relative content (%)	Delta mass (Da)
D0	147001.5	3.3	
D1	147830.8	10.8	829.3
D2	148657.9	18.6	827.1
D3	149486.6	22.7	828.7
D4	150315.4	20.1	828.8
D5	151144.7	13.7	829.3
D6	151973.5	7	828.8
D7	152803	3.7	829.5
DAR		3.329	

[238]

[239] 9-2-2-2. 리간드 결합 어세이

[240] 컨쥬게이션에 의한 항체의 특성변화가 있는지 알아보기 위해 컨쥬게이션 전후 항원에 대한 결합력이 변하는지 ELISA 방법을 이용하여 시험하였다. 항원인 CD56(R&D systems, 2408-NC-050)을 96 웰 마이크로플레이트에 1µg/ml의 농도로 코팅한 후, 1% BSA로 37°C 1시간 블록킹하였다. 블록킹 용액을 제거한 후 시료를 플레이트에 넣고 37°C의 온도에서 1시간 반응하였다. PBST(PBS +0.05% tween 20)으로 5번 세척 후 HRP 컨쥬게이션된 항-인간 카파 경쇄 항체를 1000배 희석하여 플레이트에 넣고 37°C 1시간 반응하였다. PBST로 5번 세척 후 TMB (Sigma)를 넣고 10분 발색하였다. 1N H₂SO₄를 넣어 반응을 정지 시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다. 도 19에서 동그라미(○)로 표시한 선은 약물과 컨쥬게이션하지 않은 항체에 대한 결과를, 삼각형(△)으로 표시한 선은 DAR 2.5의 L-N-MMAF에 대한 결과를, 사각형(◇)으로 표시한 선은 DAR 3.3의 L-N-MMAF에 대한 결과를 나타내는 것이다. 그 결과, DAR 정도에 상관없이 그 결합력이 유지되고 있음을 알 수 있었다.

[241]

[242] 9-2-2-2. In vitro 세포독성

[243] 제조한 항체-싸이토톡신 결합체의 *in vitro* 효능을 확인하기 위하여 OPM-2 세포주를 이용하여 항-증식 어세이를 수행하였다. 각 세포를 배양하여 1*10⁵ 세포/ml로 서스펜션하여 96 웰 플레이트에 100 µl씩 로딩하였다. 세포 배양기에서 3시간 배양 후, 웰당 다양한 농도 구간의 항체-싸이토톡신 결합체를 각각 100 µl씩 넣고 세포 배양기에서 4일간 배양하였다. CCK-8(Dojindo)를 1:10으로 희석하여 각 웰에 처리 후, 호일에 싸서 세포 배양기에 2~5시간

반응하였다. SpectraMax 190 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 표 15에 나타내었다.

[244] 표 15

[Table 15]

IC ₅₀ [nM]		
OPM-2	L-N-MMAF DAR 2.5	52.9
	L-N-MMAF DAR 3.3	41.9

[245]

[246] 그 결과 상기 표에서 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명에 따른 L-N-MMAF 항체는 42-53nM 수준의 세포 독성을 나타내었다.

[247]

[248] 9-2-3. 글렘바투무맙(Glembatumumab)

[249] 9-2-3-1. In vitro 세포독성

[250] 제조한 항체-싸이토톡신 결합체의 *in vitro* 효능을 확인하기 위하여 피부암세포주인 SK-MEL-2 세포주를 이용하여 항-중식 어세이를 수행하였다. 각 세포를 배양하여 1*10⁵ 세포/ml로 서스펜션하여 96 웰 플레이트에 100 μl씩 로딩하였다. 세포 배양기에서 3시간 배양 후, 웰당 다양한 농도구간의 항체-싸이토톡신 결합체를 각각 100 μl씩 넣고 세포 배양기에서 4일간 배양하였다. CCK-8(Dojindo)를 1:10으로 희석하여 각 웰에 처리 후, 호일에 싸서 세포 배양기에 2~5시간 반응하였다. SpectraMax 190 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 표 16에 나타내었다.

[251] 표 16

[Table 16]

SK-MEL-2	IC ₅₀ (nM)
G-N-MMAF DAR 2.2	5.47
G-N-MMAF DAR 3.4	3.36

[252]

[253] 그 결과 상기 표에서 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명에 따른 G-N-MMAF는 3-5nM 수준의 세포독성을 나타내었다.

[254]

[255] 상기와 같은 결과들은 본 발명에서 새롭게 확인한 위치 특이적, 즉 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 아미노산 잔기에 약물을 결합시킨, 새로운 플랫폼의 항체-약물 결합체가 안정성이 높으면서도 항체의 표적 특이성의 저해가 없으며, 또한 결합된 약물에 의해 항체의 치료가 배가될 수 있음을 시사하는 것이다.

[256]

[257] 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 것으로서 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.

[258]

청구범위

- [청구항 1] 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 아미노산 잔기에 세포독성 약물(cytotoxic drug)이 결합된, 항체-약물 결합체(antibody-drug conjugate, ADC).
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단의 α -아민기에 세포독성 약물이 결합된 것인, 항체-약물 결합체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는, 세포독성 약물의 반응기를 통하여 세포독성 약물이 항체에 연결된 형태인 것인, 항체-약물 결합체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기는 아이소티오시아네이트(isothiocyanate), 아이소시아네이트(isocyanates), 아실 아자이드(acyl azide), NHS 에스터(NHS ester), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데하이드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭사이드(epoxide), 옥시레인(oxirane), 칼보네이트(carbonate), 아릴 할라이드(aryl halide), 이미도에스터(imidoester), 카보이미드(carbodiimide), 안하이드라이드(anhydride) 및 플루오로페닐 에스터(fluorophenyl ester)로 이루어진 군에서 선택된 것인, 항체-약물 결합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 항체는 전장 항체, 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 단편 형태인 것인, 항체-약물 결합체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 항체는 IgG, scFv, Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂로 이루어진 군으로부터 선택된 형태를 가지는 것인, 항체-약물 결합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 세포독성 약물은 마이크로튜불린(microtubulin) 구조 형성 억제제, 유사분열(meiosis) 억제제, RNA 중합효소 억제제, 토포아이소머라아제(topoisomerase) 억제제, DNA 인터칼레이터(DNA intercalators), DNA 알킬레이터(DNA alkylator), 리보솜 억제제, 방사선 동위원소 및 독소로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항체-약물 결합체.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 세포독성 약물은 메이탄시노이드(maytansinoid), 오리스타틴(auristatin), 돌라스타틴(dolastatin),

튜브라이신(tubulysin), 칼리케아미신(calicheamicin),
 피롤로벤조디아제피네스(pyrrolobenzodiazepines),
 독소루비신(doxorubicin), 듀오카마이신(duocamycin),
 카보플라틴(파라플라틴)[Carboplatin(paraplatin)],
 시스플라틴(cisplatin), 시클로포스파미드(cyclophosphamide),
 이포스파미드(ifosfamide), 니드란(nidran),
 질소머스타드(메클로에타민 염산염)[nitrogen
 mustar(mechlorethamine HCL)], 블레오마이신(bleomycin),
 미토마이신 C(mitomycin C), 시타라빈(cytarabine),
 플루로우라실(flurouracil), 켄시타빈(gemcitabine),
 트리메트렉세이트(trimetrexate), 메토크렉세이트(methotrexate),
 에토포시드(etoposide), 빈블라스틴(vinblastine),
 비노렐빈(vinorelbine), 알림타(alimta), 알트레타민(altretamine),
 프로카바진(procarbazine), 탁솔(taxol), 탁소텔(taxotere),
 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan),
 트리코테센(trichothecene), CC1065, 알파-아마니틴(alpha-amanitin)
 균체 외독소 및 식물독소로 이루어진 균으로부터 선택된 것인,
 항체-약물 결합체.

[청구항 9]

제8항에 있어서,
 상기 오리스타틴은 모노메틸 오리스타틴 E(Monomethyl auristatin E) 또는 모노메틸 오리스타틴 F(Monomethyl auristatin F)인 것인,
 항체-약물 결합체.

[청구항 10]

제1항에 있어서,
 상기 항체는 암세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 것인,
 항체-약물 결합체.

[청구항 11]

제10항에 있어서,
 상기 암세포 표면 항원은 CD19, CD20, CD30, CD33, CD37, CD22, CD56, CD70, CD74, CD138, Muc-16, mesothelin, HER2, HER3, GPNMB(glycoprotein NMB), IGF-1R, BCMA(B cell maturation antigen), PSMA(prostate-specific membrane antigen), EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule) 및 EGFR(epidermal growth factor receptor)로 이루어진 균에서 선택된 것인, 항체-약물 결합체.

[청구항 12]

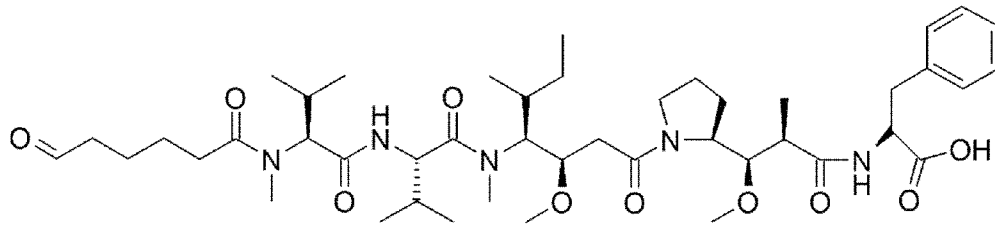
제1항에 있어서,
 상기 항체는 항-HER2 항체, 항-CD30 항체, 항-CD56 항체 및 항-GPNMB(glycoprotein NMB) 항체로 이루어진 균으로부터 선택된 것인, 항체-약물 결합체.

[청구항 13]

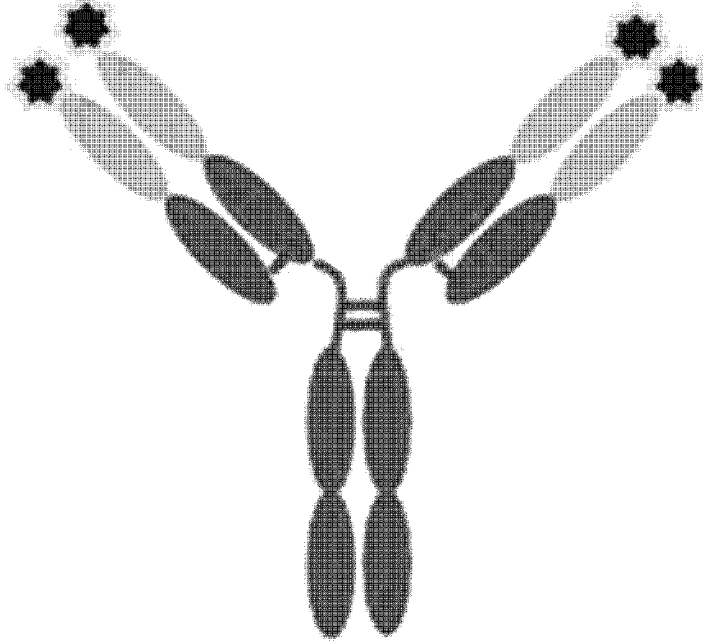
제12항에 있어서,

- 상기 항체는 트라스투주맙(Trastuzumab), 로보투주맙(Lorvotuzumab), 브렌투시맙(Brentuximab) 및 글렘바투무맙(Glembatumumab)으로 이루어진 군에서 선택된 것인, 항체-약물 결합체.
- [청구항 14] 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 아미노산 잔기에 면역억제제가 결합된, 항체-약물 결합체(antibody-drug conjugate, ADC).
- [청구항 15] α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기를 포함하는 세포독성 약물 또는 면역억제제와 항체를 반응시켜, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단의 α -아민기에 세포독성 약물 또는 면역억제제를 연결시키는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체-약물 결합체의 제조방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 제조방법은 추가로 결합체를 형성하지 않은 항체, 및 세포독성 약물 또는 면역억제제를 포함하는 반응 산물로부터 항체-약물 결합체를 분리하는 단계를 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기는 아이소티오시아네이트(isothiocyanate), 아이소시아네이트(isocyanates), 아실 아자이드(acyl azide), NHS 에스터(NHS ester), 설포닐 클로라이드(sulfonyl chloride), 알데하이드(aldehyde), 글리옥살(glyoxal), 에폭사이드(epoxide), 옥시레인(oxirane), 칼보네이트(carbonate), 아릴 할라이드(aryl halide), 이미도에스터(imidoester), 카보이미드(carbodiimide), 안하이드라이드(anhydride) 및 플루오로페닐 에스터(fluorophenyl ester)로 이루어진 군에서 선택된 것인 제조방법.
- [청구항 18] 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체-약물 결합체를 포함하는, 암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 19] 제14항의 항체-약물 결합체를 포함하는, 자가면역질환의 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 20] 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 항체-약물 결합체를 암 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 치료 방법.
- [청구항 21] 제14항의 항체-약물 결합체를 자가면역질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환의 치료 방법.

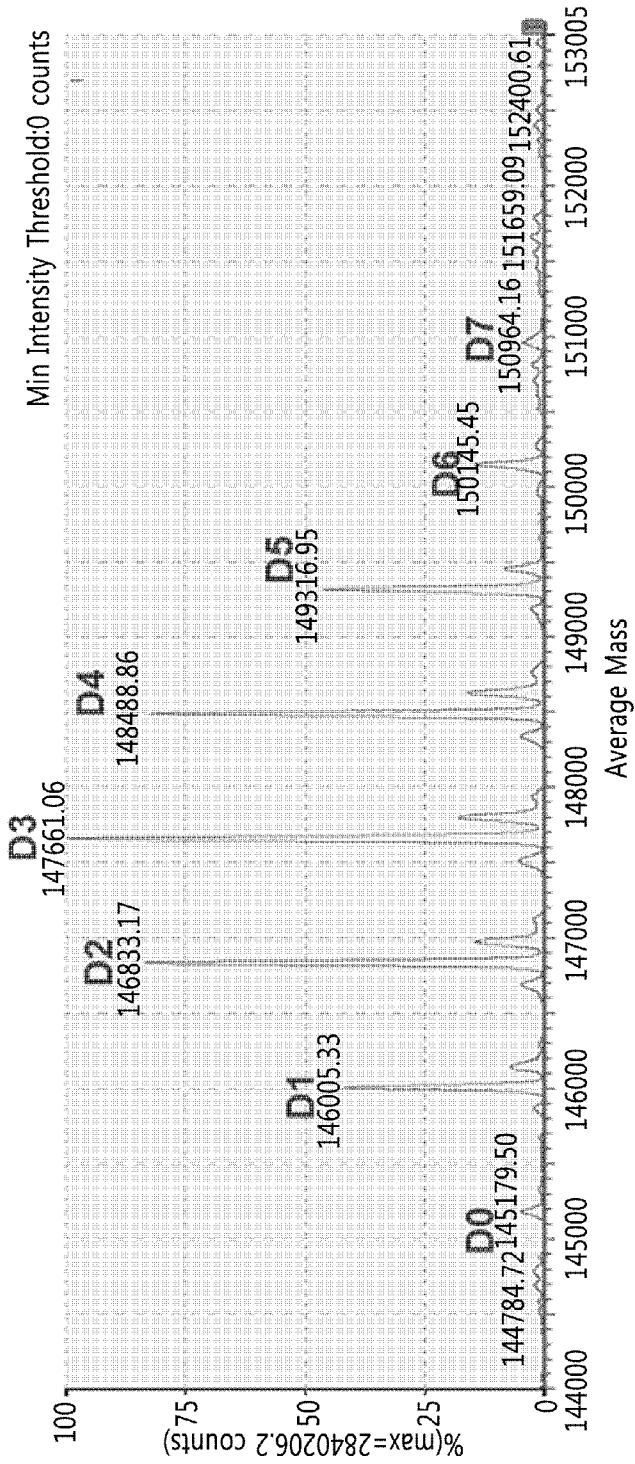
[Fig. 1]



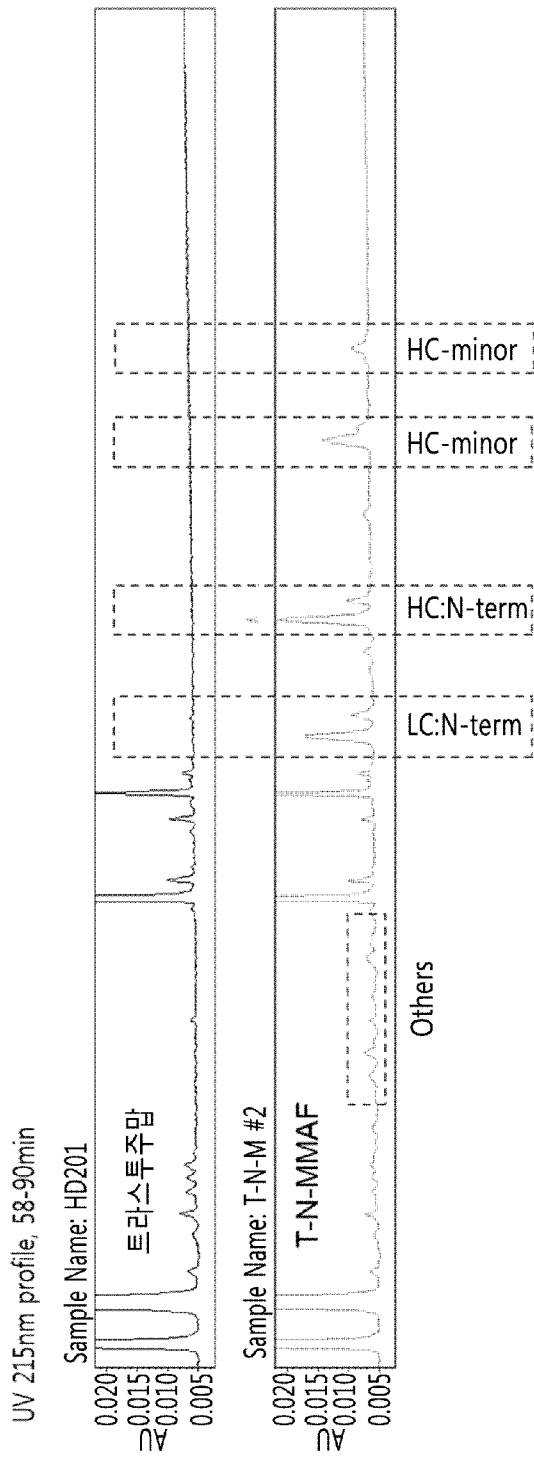
[Fig. 2]



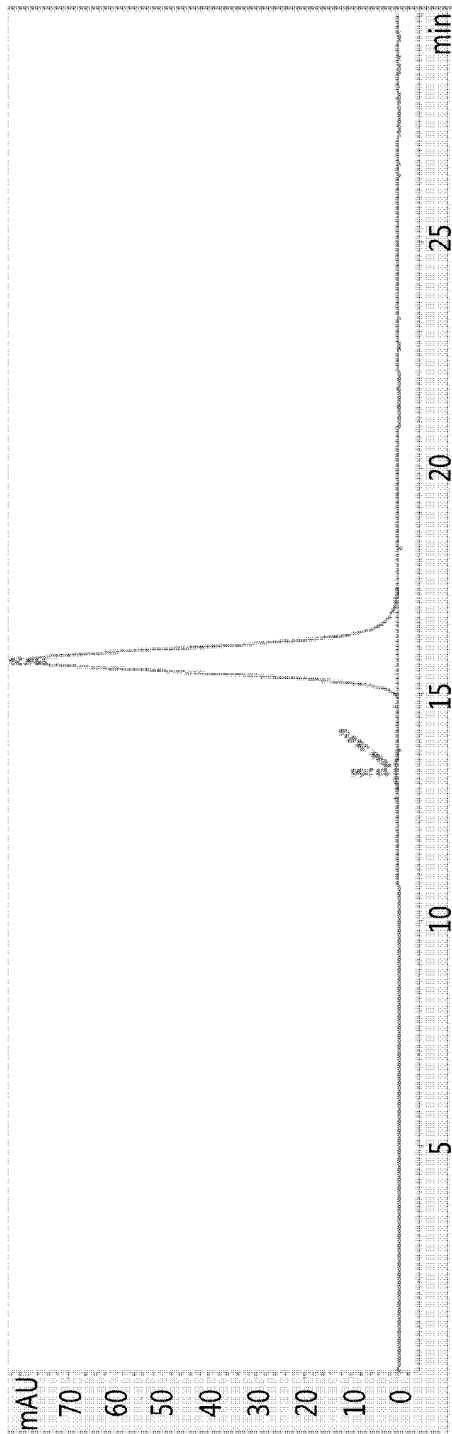
[Fig. 3]



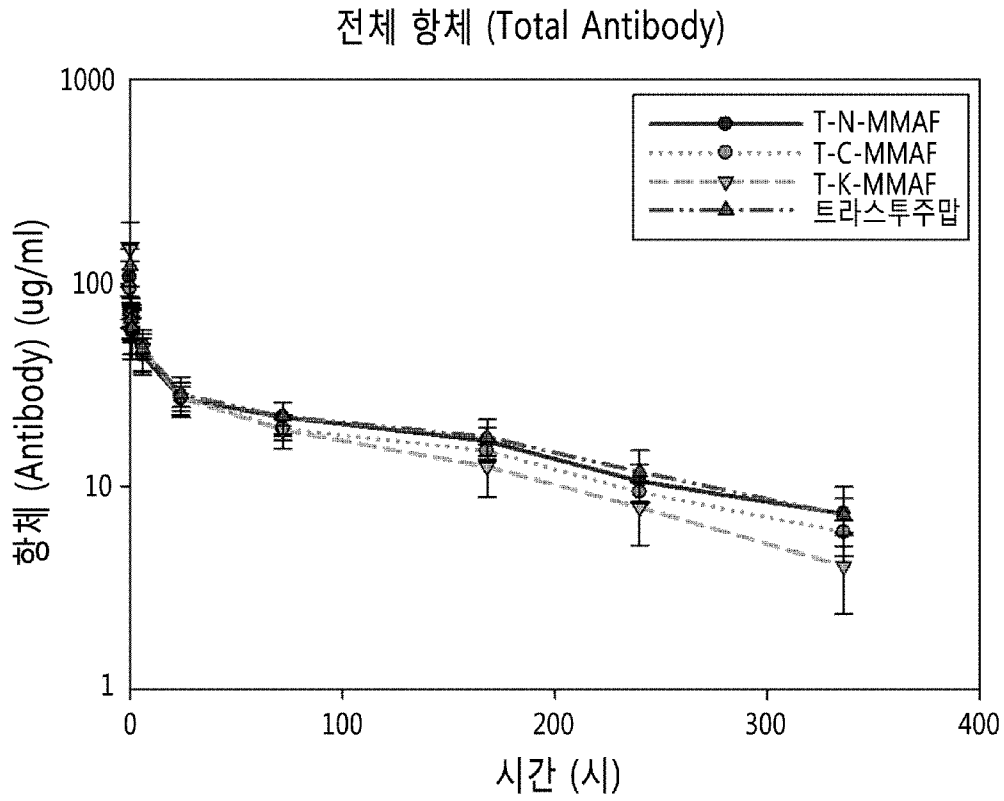
[Fig. 4]



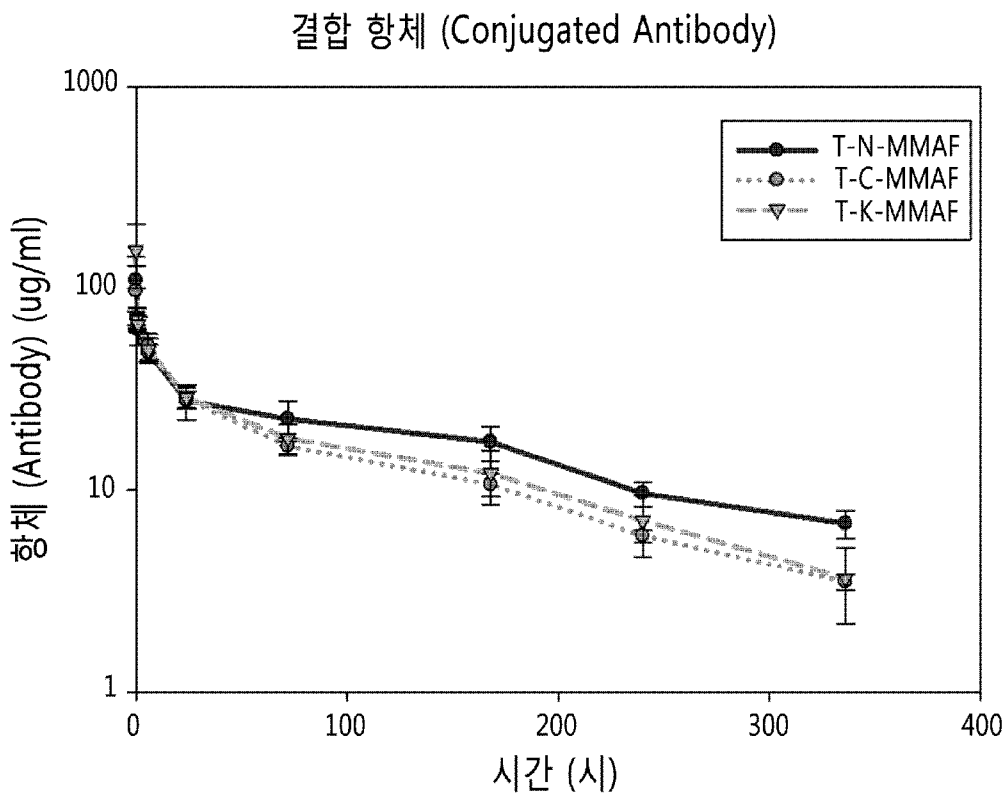
[Fig. 5]



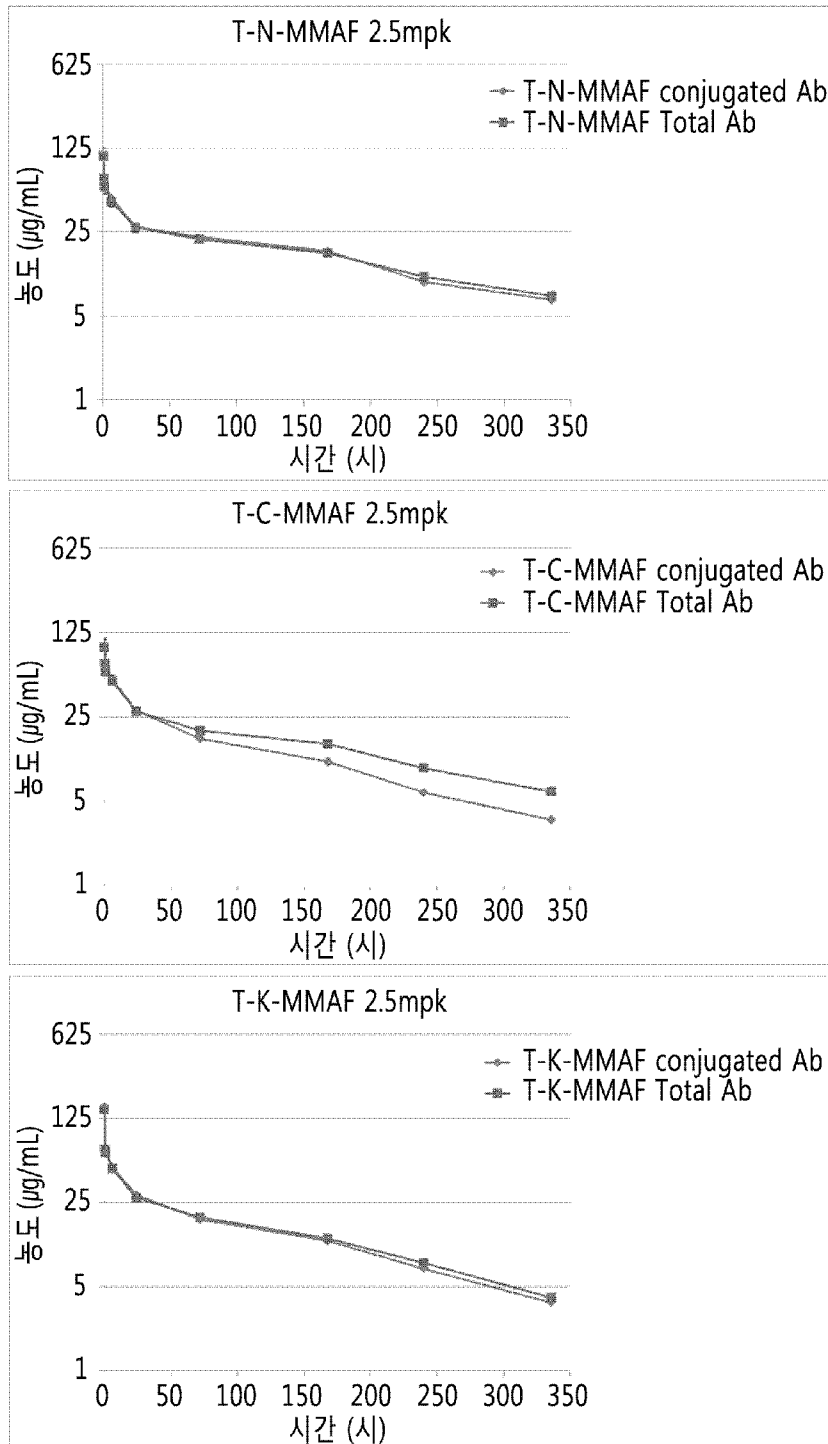
[Fig. 6]



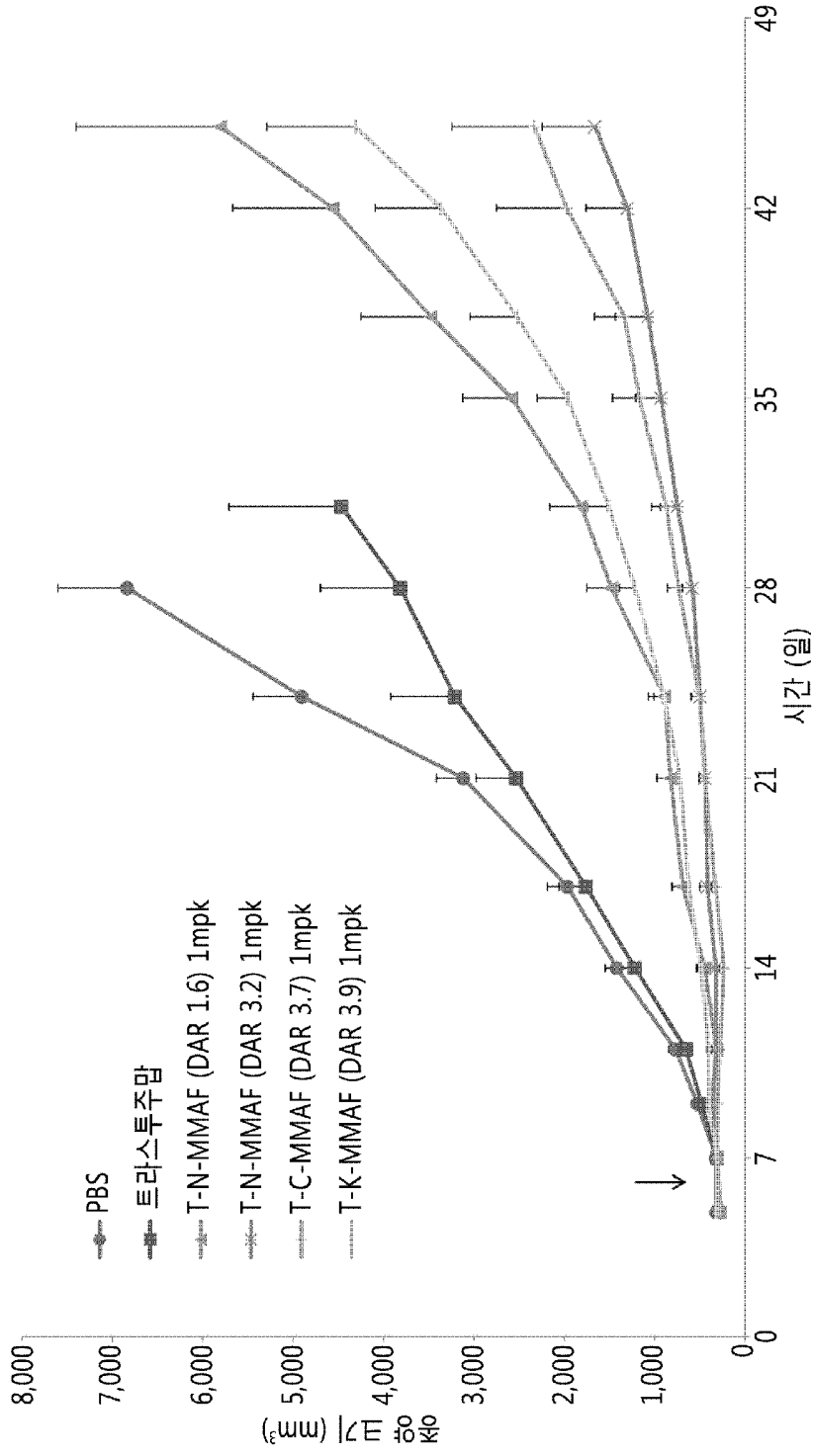
[Fig. 7]



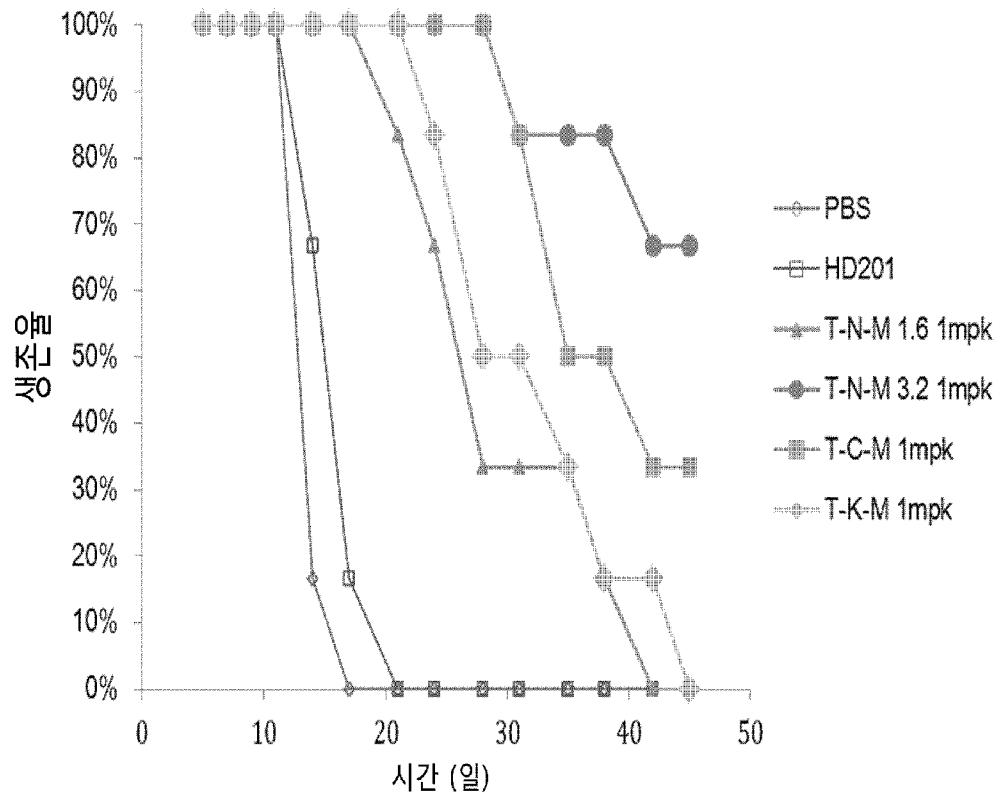
[Fig. 8]



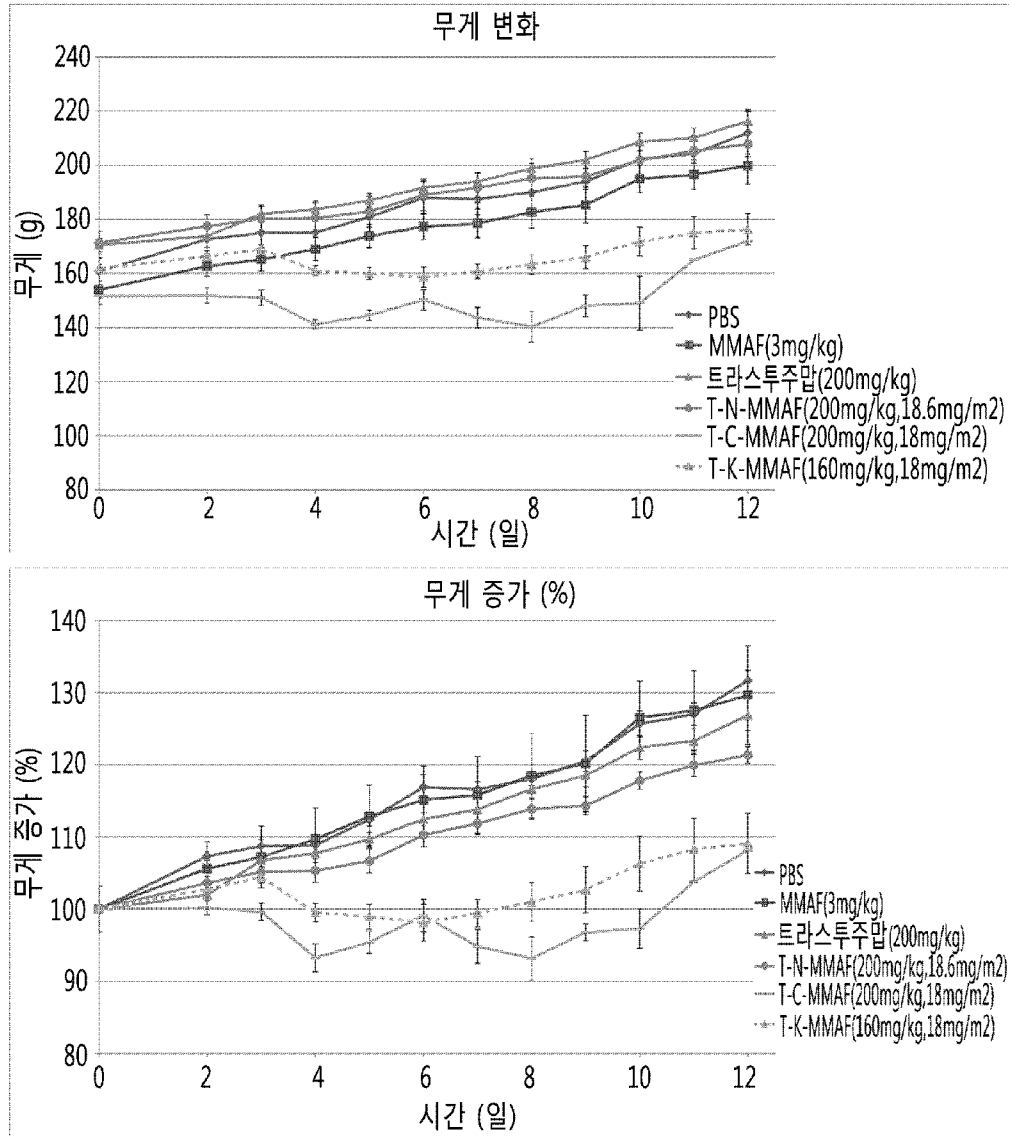
[Fig. 9]



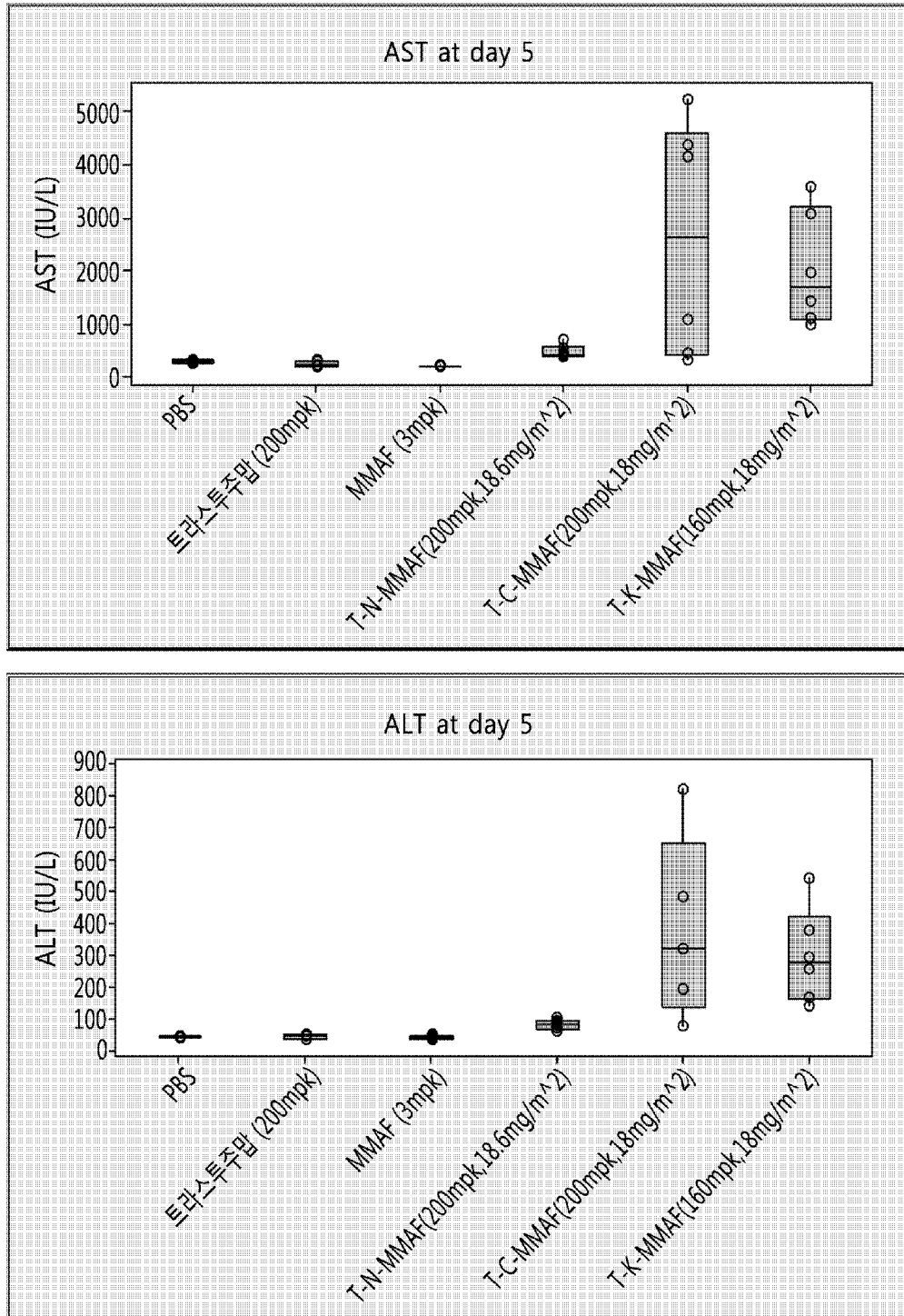
[Fig. 10]



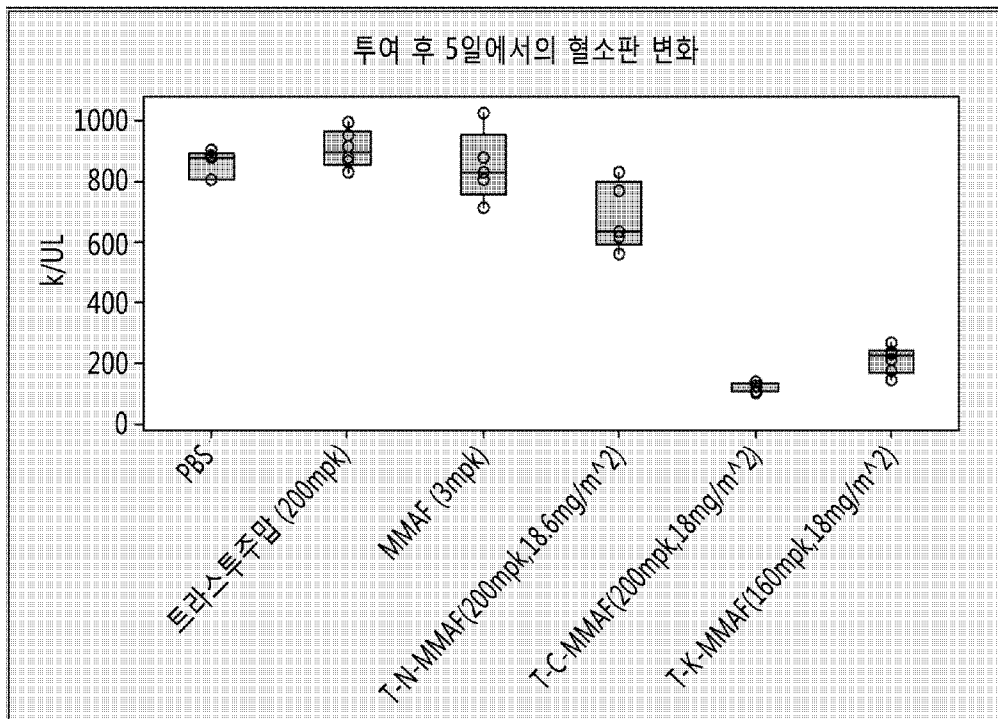
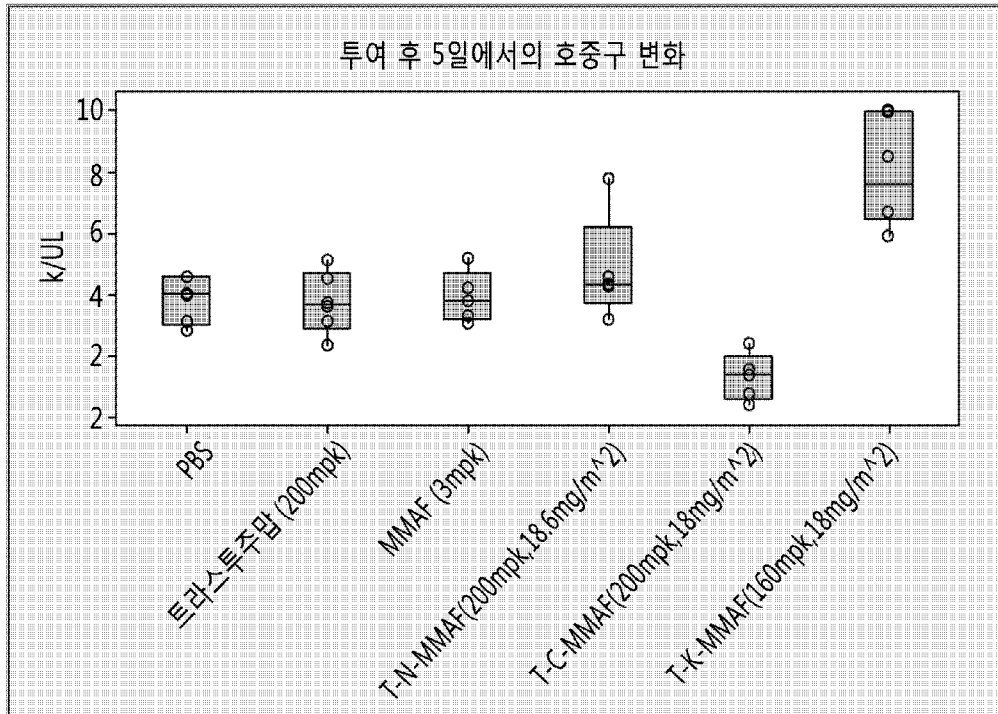
[Fig. 11]



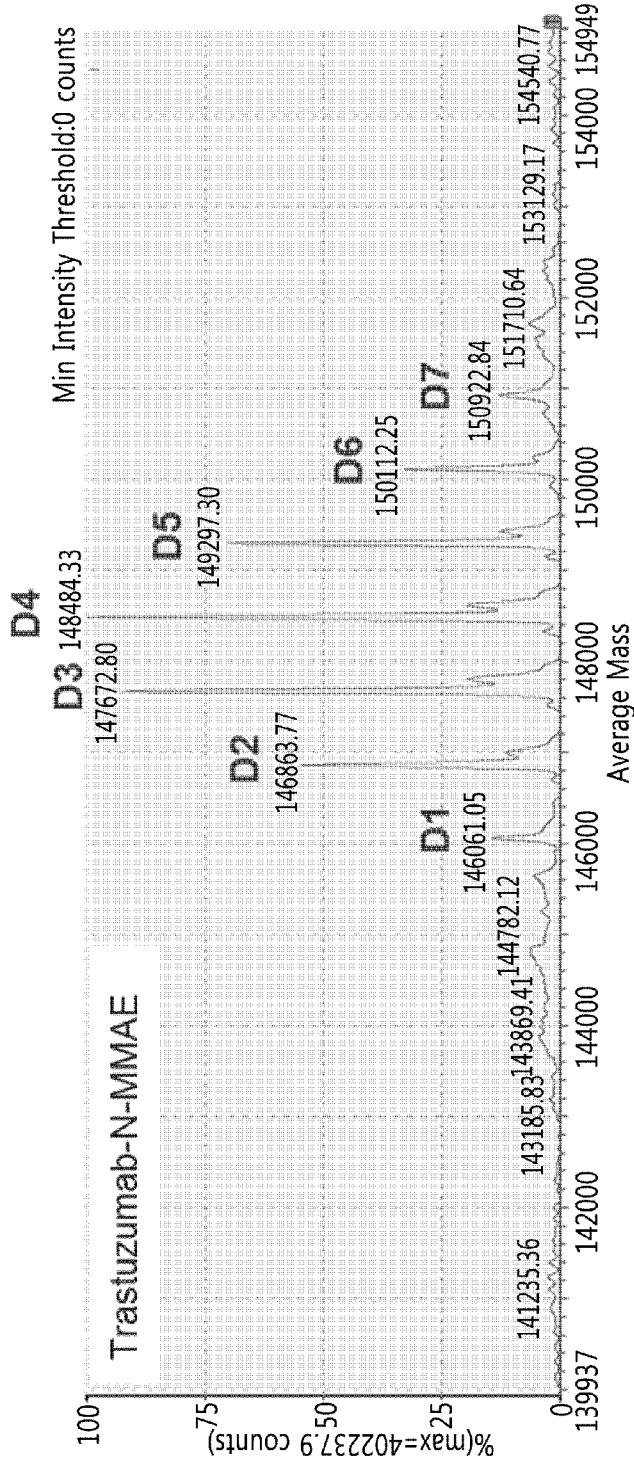
[Fig. 12]



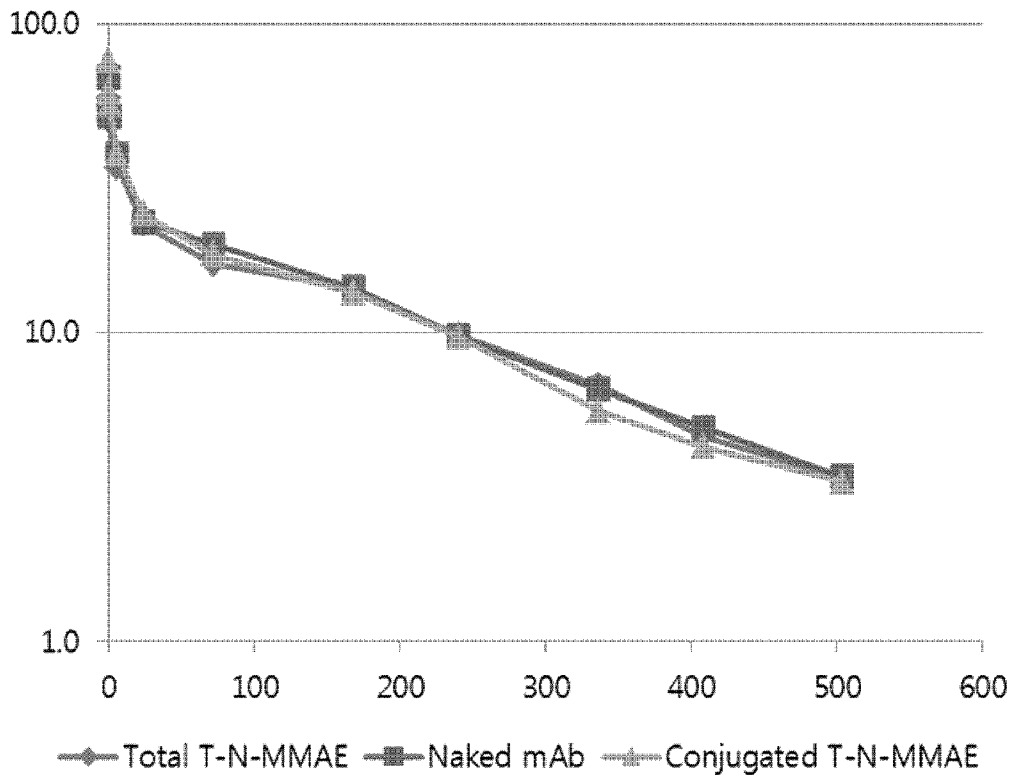
[Fig. 13]



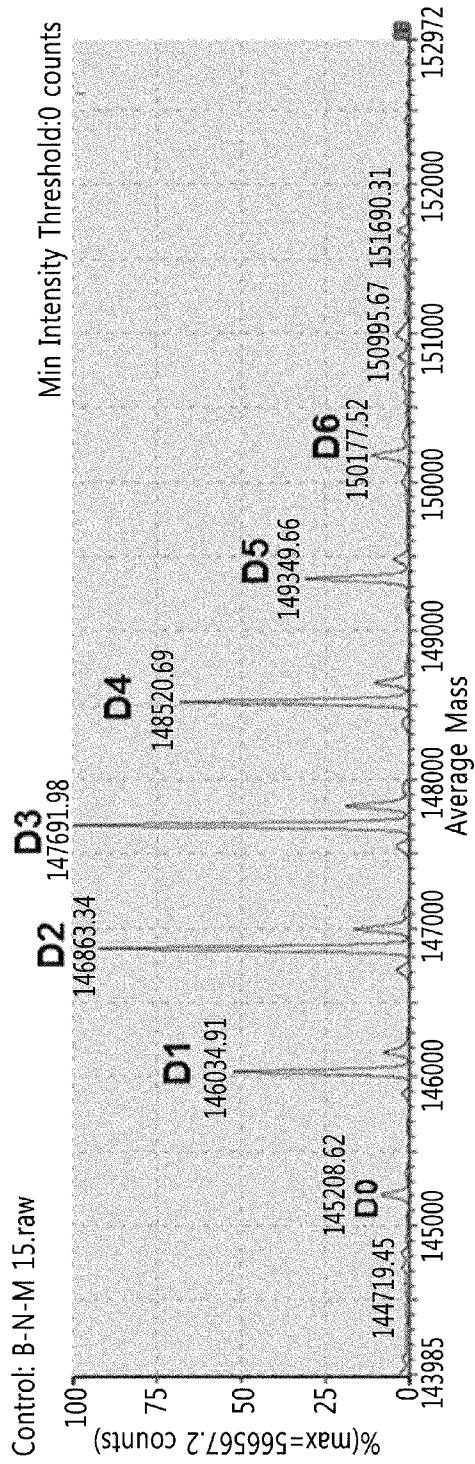
[Fig. 14]



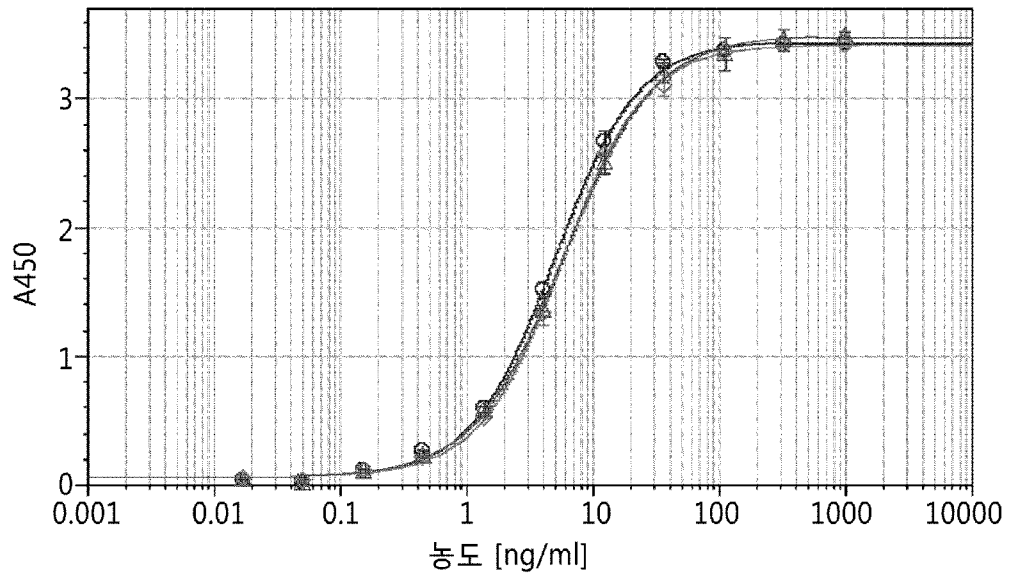
[Fig. 15]



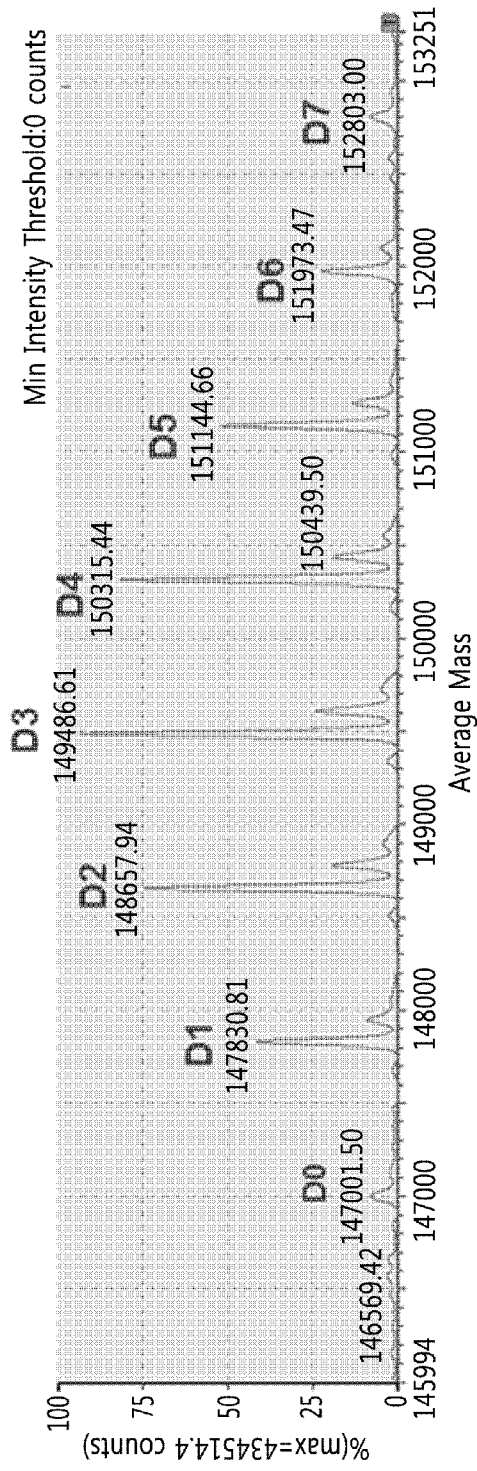
[Fig. 16]



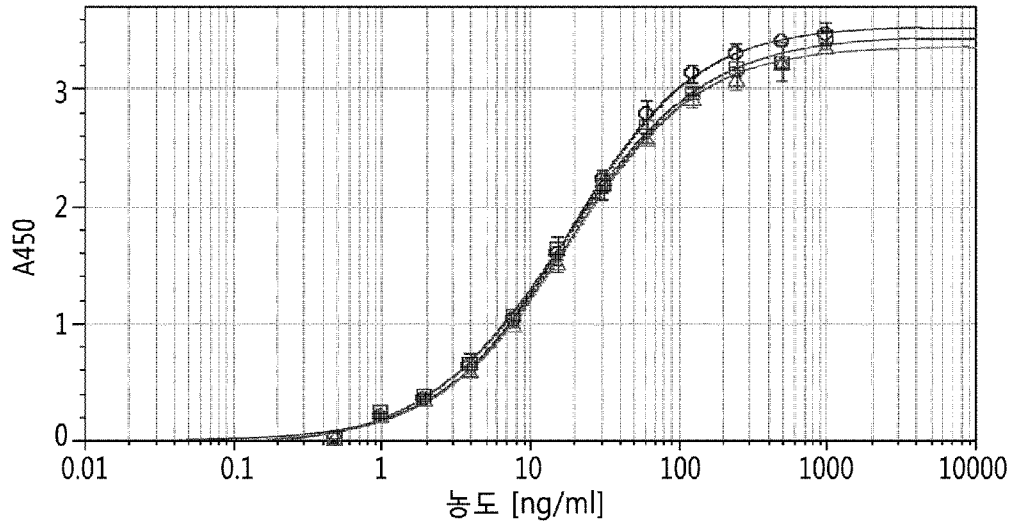
[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/48; A61K 39/395; C12P 21/08; A61P 37/06; A61K 39/00; C07K 16/00; A61P 35/00

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: Antibody-Drug Conjugate, N-terminal amine group, cytotoxicity medicine, treatment of cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009-026274 A1 (MEDAREX, INC.) 26 February 2009 See abstract and claims 1-23.	1-19
A	ZOLOT, R. S. et al., "Antibody-drug conjugates", Nature Reviews Drug Discovery, April 2013, vol. 12, pp. 259-260. See abstract; page 259; and figure 1.	1-19
A	US 2010-0183636 A1 (LAW, C.-L. et al.) 22 July 2010 See abstract and claims 1-26.	1-19
A	US 7723485 B2 (JUNUTULA, J. R. et al.) 25 May 2010 See abstract and claim 12.	1-19
A	KR 10-2007-0037575 A (GENENTECH, INC.) 05 April 2007 See abstract and claim 1.	1-19

 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

"I" 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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

"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)

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 OCTOBER 2014 (08.10.2014)

Date of mailing of the international search report

08 OCTOBER 2014 (08.10.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005589

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.: **20-21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 20-21 pertain to a method for treatment of the human, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2009-026274 A1	26/02/2009	EP 2185188 A1	19/05/2010
		EP 2185188 A4	13/07/2011
		EP 2185188 B1	06/08/2014
		US 2011-0280891 A1	17/11/2011
US 2010-0183636 A1	22/07/2010	AU 2004-213053 A1	02/09/2004
		AU 2004-213053 B2	26/02/2009
		AU 2004-213053 C1	16/07/2009
		AU 2006-236225 A1	26/10/2006
		CA 2516455 A1	02/09/2004
		CA 2516455 C	01/05/2012
		CA 2605507 A1	26/10/2006
		EP 1594542 A2	16/11/2005
		EP 1594542 A4	02/05/2007
		EP 1594542 B1	30/06/2010
		EP 1871418 A2	02/01/2008
		EP 1871418 B1	19/03/2014
		EP 2100619 A1	16/09/2009
		EP 2100619 B1	12/02/2014
		EP 2289559 A1	02/03/2011
		EP 2289559 B1	12/02/2014
		EP 2511299 A1	17/10/2012
		JP 2006-518753 A	17/08/2006
		JP 2008-538292 A	23/10/2008
		JP 2011-012080 A	20/01/2011
		JP 2012-205596 A	25/10/2012
		JP 2013-189472 A	26/09/2013
		JP 5122441 B2	16/01/2013
		JP 5356648 B2	04/12/2013
		US 2006-0233794 A1	19/10/2006
		US 2008-0025989 A1	31/01/2008
		US 2009-0148942 A1	11/06/2009
		US 2010-0150925 A1	17/06/2010
		US 2010-0158910 A1	24/06/2010
		US 2011-0150908 A1	23/06/2011
		US 2012-0251559 A1	04/10/2012
		US 2012-0288512 A1	15/11/2012
		US 7662387 B2	16/02/2010
		US 8067546 B2	29/11/2011
US 8535678 B2	17/09/2013		
US 8609104 B2	17/12/2013		
US 8663642 B2	04/03/2014		
WO 2004-073656 A2	02/09/2004		
WO 2004-073656 A3	24/02/2005		
WO 2004-073656 A9	01/09/2005		
WO 2006-113909 A2	26/10/2006		
WO 2006-113909 A3	31/01/2008		
US 7723485 B2	25/05/2010	AU 2008-251608 A1	20/11/2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		AU 2008-251608 B2	27/03/2014
		EP 2144628 A2	20/01/2010
		EP 2144628 B1	17/10/2012
		JP 2010-526821 A	05/08/2010
		JP 5290276 B2	18/09/2013
		US 2008-0311134 A1	18/12/2008
		WO 2008-141044 A2	20/11/2008
		WO 2008-141044 A3	31/12/2008
KR 10-2007-0037575 A	05/04/2007	AU 1996-51274 B2	24/02/2000
		AU 1997-25986 B2	05/07/2001
		AU 1998-54287 B2	14/03/2002
		AU 1998-81447 B2	01/11/2001
		AU 1998-90378 A1	12/04/1999
		AU 1998-93121 A1	05/04/1999
		AU 1998-93178 A1	05/04/1999
		AU 1998-93178 B2	22/11/2001
		AU 1998-93880 A1	12/04/1999
		AU 1998-93880 B2	16/01/2003
		AU 1998-93881 A1	12/04/1999
		AU 1998-93881 B2	21/02/2002
		AU 1998-93959 A1	05/04/1999
		AU 1998-94843 A1	05/04/1999
		AU 1999-10703 A1	10/05/1999
		AU 1999-11260 A1	17/05/1999
		AU 1999-12883 A1	17/05/1999
		AU 1999-15324 A1	15/06/1999
		AU 1999-15324 B2	28/06/2001
		AU 1999-16029 A1	16/06/1999
		AU 1999-16029 B2	26/07/2001
		AU 1999-17033 A1	15/06/1999
		AU 1999-17033 B2	10/05/2001
		AU 1999-22122 A1	26/07/1999
		AU 1999-30721 A1	27/09/1999
		AU 1999-30721 B2	19/06/2003
		AU 1999-30750 A1	11/10/1999
		AU 1999-30750 B2	20/03/2003
		AU 1999-31944 A1	18/10/1999
		AU 1999-31944 B2	11/09/2003
		AU 1999-36547 A1	16/11/1999
		AU 1999-36547 B2	15/01/2004
		AU 1999-37570 A1	08/11/1999
		AU 1999-37570 B2	22/11/2001
		AU 1999-39937 A1	06/12/1999
		AU 1999-39937 B2	01/11/2001
		AU 1999-40995 A1	13/12/1999
		AU 1999-42058 A1	13/12/1999
		AU 1999-43286 A1	20/12/1999
		AU 1999-43286 B2	05/06/2003
		AU 1999-44080 A1	13/12/1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		AU 1999-44226 A1	31/07/2000
		AU 1999-44228 A1	14/02/2000
		AU 1999-45479 A1	04/09/2000
		AU 1999-46744 A1	14/03/2000
		AU 1999-55908 A1	21/03/2000
		AU 1999-55908 B2	03/04/2003
		AU 1999-58167 A1	03/04/2000
		AU 1999-59200 A1	03/04/2000
		AU 1999-59229 A1	03/04/2000
		AU 1999-60413 A1	10/04/2000
		AU 1999-64984 A1	03/04/2000
		AU 2000-12005 A1	01/05/2000
		AU 2000-12005 B2	20/03/2003
		AU 2000-17471 A1	17/04/2001
		AU 2000-17482 A1	19/06/2000
		AU 2000-17482 B2	01/04/2004
		AU 2000-17498 A1	04/10/2000
		AU 2000-17499 A1	12/07/2000
		AU 2000-17499 B2	04/12/2003
		AU 2000-19320 A1	03/07/2000
		AU 2000-19320 B2	30/09/2004
		AU 2000-21928 A1	12/07/2000
		AU 2000-22114 A1	31/07/2000
		AU 2000-22115 A1	31/07/2000
		AU 2000-22153 A1	28/12/2000
		AU 2000-22248 A1	28/09/2000
		AU 2000-23907 A1	05/02/2001
		AU 2000-23993 A1	28/09/2000
		AU 2000-24747 A1	19/06/2000
		AU 2000-24952 A1	28/09/2000
		AU 2000-25935 A1	31/07/2000
		AU 2000-25935 B2	16/12/2004
		AU 2000-25967 A1	28/09/2000
		AU 2000-26008 A1	28/09/2000
		AU 2000-28794 A1	31/07/2001
		AU 2000-28794 B2	09/01/2003
		AU 2000-28836 A1	28/09/2000
		AU 2000-28837 A1	09/01/2001
		AU 2000-28839 A1	30/01/2001
		AU 2000-31070 A1	19/06/2000
		AU 2000-31077 A1	28/09/2000
		AU 2000-31077 B2	13/05/2004
		AU 2000-32461 A1	28/12/2000
		AU 2000-33816 A1	28/09/2000
		AU 2000-33816 B2	08/01/2004
		AU 2000-35144 A1	28/09/2000
		AU 2000-36326 A1	05/12/2000
		AU 2000-37375 A1	28/09/2000
		AU 2000-37743 A1	18/12/2000
		AU 2000-38648 A1	09/10/2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		AU 2000-38648 B2	07/08/2003
		AU 2000-38670 A1	21/09/2000
		AU 2000-38670 B2	13/01/2005
		AU 2000-38784 A1	10/04/2001
		AU 2000-38784 B2	29/09/2005
		AU 2000-39026 A1	17/04/2001
		AU 2000-40113 A1	05/02/2001
		AU 2000-42387 A1	02/11/2000
		AU 2000-42460 A1	02/11/2000
		AU 2000-43412 A1	14/11/2000
		AU 2000-43412 B2	20/01/2005
		AU 2000-43484 A1	02/11/2000
		AU 2000-44540 A1	14/11/2000
		AU 2000-46462 A1	02/11/2000
		AU 2000-48519 A1	28/12/2000
		AU 2000-51527 A1	02/01/2001
		AU 2000-54412 A1	18/12/2000
		AU 2000-54601 A1	18/12/2000
		AU 2000-55911 A1	18/12/2000
		AU 2000-63910 A1	19/02/2001
		AU 2000-69018 A1	12/06/2001
		AU 2000-70793 A1	26/03/2001
		AU 2000-75730 A1	26/03/2001
		AU 2001-19167 A1	16/07/2001
		AU 2001-20485 A1	27/08/2001
		AU 2001-20554 A1	12/06/2001
		AU 2001-255282 B2	14/07/2005
		AU 2001-25909 A1	03/07/2001
		AU 2001-268714 B2	21/09/2006
		AU 2001-286785 B2	17/08/2006
		AU 2001-30757 A1	20/08/2001
		AU 2001-32768 A1	24/07/2001
		AU 2001-32768 B2	07/09/2006
		AU 2001-34346 A1	12/06/2001
		AU 2001-41468 A1	20/08/2001
		AU 2001-55168 A1	17/09/2001
		AU 2001-55282 A1	23/10/2001
		AU 2001-65019 A1	11/12/2001
		AU 2001-65311 A1	17/12/2001
		AU 2001-68028 A1	24/09/2001
		AU 2001-68108 A1	04/03/2002
		AU 2001-68714 A1	08/01/2002
		AU 2001-70118 A1	04/03/2002
		AU 2001-71938 A1	13/03/2002
		AU 2001-71973 A1	05/02/2002
		AU 2001-73150 A1	05/02/2002
		AU 2001-78852 A1	08/01/2002
		AU 2001-84906 A1	04/03/2002
		AU 2001-86785 A1	04/03/2002
		AU 2001-94814 A1	08/04/2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		AU 2002-16610 A1	02/04/2002
		AU 2002-236618 B2	09/08/2007
		AU 2002-303231 B2	06/03/2008
		AU 2002-318371 B2	15/06/2006
		AU 2002-330015 B2	07/02/2008
		AU 2002-335054 A1	09/07/2003
		AU 2002-365246 A1	15/07/2003
		AU 2002-367318 A1	24/07/2003
		AU 2002-367318 B2	12/07/2007
		AU 2003-230874 A1	03/11/2003
		AU 2003-259913 A1	03/03/2004
		AU 2003-277226 A1	23/04/2004
		AU 2003-277226 A2	07/07/2005
		AU 2003-277226 B2	13/05/2010
		AU 2003-290848 A1	15/06/2004
		AU 2004-253953 A1	13/01/2005
		AU 2004-259638 A1	03/02/2005
		AU 2004-259638 B2	03/07/2008
		AU 2004-291141 A1	02/06/2005
		AU 2004-291141 B2	11/06/2009
		AU 2004-293787 A1	09/06/2005
		AU 2004-308972 A1	14/07/2005
		AU 2004-308972 B2	28/05/2009
		AU 2004-308972 C1	26/11/2009
		AU 2004-316290 A1	09/09/2005
		AU 2004-316290 A2	09/09/2005
		AU 2004-316290 B2	18/08/2011
		AU 2005-249490 A1	15/12/2005
		AU 2005-249490 B2	29/07/2010
		AU 2005-269967 A1	09/02/2006
		AU 2005-282496 A1	16/03/2006
		AU 2005-295131 A1	20/04/2006
		AU 2005-295131 B2	16/06/2011
		AU 2006-235436 A1	19/10/2006
		AU 2007-325316 A1	05/06/2008
		AU 2009-210627 A1	13/08/2009
		CA 2293740 A1	23/12/1998
		CA 2301847 A1	04/03/1999
		CA 2303834 A1	25/03/1999
		CA 2304102 A1	01/04/1999
		CA 2304129 A1	01/04/1999
		CA 2304810 A1	01/04/1999
		CA 2304810 C	10/05/2011
		CA 2305385 A1	29/04/1999
		CA 2305385 C	21/05/2013
		CA 2306183 A1	06/05/1999
		CA 2306450 A1	06/05/1999
		CA 2306450 C	10/07/2012
		CA 2309358 A1	03/06/1999
		CA 2309783 A1	03/06/1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CA 2309783 C	28/06/2011
		CA 2311640 A1	10/06/1999
		CA 2322792 A1	23/09/1999
		CA 2322792 C	14/09/2010
		CA 2323072 A1	30/09/1999
		CA 2323072 C	24/05/2011
		CA 2324297 A1	28/10/1999
		CA 2326001 A1	04/11/1999
		CA 2328496 A1	25/11/1999
		CA 2328895 A1	09/12/1999
		CA 2334693 A1	02/03/2000
		CA 2339043 A1	09/03/2000
		CA 2343577 A1	23/03/2000
		CA 2344465 A1	20/04/2000
		CA 2344467 A1	30/03/2000
		CA 2344467 C	25/01/2011
		CA 2345918 A1	24/08/2000
		CA 2347677 A1	08/06/2000
		CA 2347835 A1	08/06/2000
		CA 2348157 A1	08/06/2000
		CA 2353775 A1	29/06/2000
		CA 2353799 A1	29/06/2000
		CA 2354027 A1	06/07/2000
		CA 2361221 A1	28/09/2000

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 47/48(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 47/48; A61K 39/395; C12P 21/08; A61P 37/06; A61K 39/00; C07K 16/00; A61P 35/00

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: 항체-약물 결합체, N-말단 아민기, 세포독성 약물, 암치료제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2009-026274 A1 (MEDAREX, INC.) 2009.02.26. 요약 및 청구항 1-23 참조.	1-19
A	ZOLOT, R. S. 외 2명, `Antibody-drug conjugates`, Nature Reviews Drug Discovery, 2013.04, 12권, 페이지 259-260. 요약; 페이지 259; 및 도면 1 참조.	1-19
A	US 2010-0183636 A1 (LAW, C.-L. 외 3명) 2010.07.22. 요약 및 청구항 1-26 참조.	1-19
A	US 7723485 B2 (JUNUTULA, J. R. 외 1명) 2010.05.25. 요약 및 청구항 12 참조.	1-19
A	KR 10-2007-0037575 A (제넨테크, 인크.) 2007.04.05. 요약 및 청구항 1 참조.	1-19

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

국제조사의 실제 완료일 2014년 10월 08일 (08.10.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 10월 08일 (08.10.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 최승희 전화번호 +82-42-481-8740
---	------------------------------------

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

서면

전자적 형태

b. 제출시기

출원시 국제출원에 포함

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기제란 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: 20-21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제20항 및 제21항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의
규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2009-026274 A1	2009/02/26	EP 2185188 A1	2010/05/19
		EP 2185188 A4	2011/07/13
		EP 2185188 B1	2014/08/06
		US 2011-0280891 A1	2011/11/17
US 2010-0183636 A1	2010/07/22	AU 2004-213053 A1	2004/09/02
		AU 2004-213053 B2	2009/02/26
		AU 2004-213053 C1	2009/07/16
		AU 2006-236225 A1	2006/10/26
		CA 2516455 A1	2004/09/02
		CA 2516455 C	2012/05/01
		CA 2605507 A1	2006/10/26
		EP 1594542 A2	2005/11/16
		EP 1594542 A4	2007/05/02
		EP 1594542 B1	2010/06/30
		EP 1871418 A2	2008/01/02
		EP 1871418 B1	2014/03/19
		EP 2100619 A1	2009/09/16
		EP 2100619 B1	2014/02/12
		EP 2289559 A1	2011/03/02
		EP 2289559 B1	2014/02/12
		EP 2511299 A1	2012/10/17
		JP 2006-518753 A	2006/08/17
		JP 2008-538292 A	2008/10/23
		JP 2011-012080 A	2011/01/20
		JP 2012-205596 A	2012/10/25
		JP 2013-189472 A	2013/09/26
		JP 5122441 B2	2013/01/16
		JP 5356648 B2	2013/12/04
		US 2006-0233794 A1	2006/10/19
		US 2008-0025989 A1	2008/01/31
		US 2009-0148942 A1	2009/06/11
		US 2010-0150925 A1	2010/06/17
		US 2010-0158910 A1	2010/06/24
		US 2011-0150908 A1	2011/06/23
		US 2012-0251559 A1	2012/10/04
		US 2012-0288512 A1	2012/11/15
		US 7662387 B2	2010/02/16
		US 8067546 B2	2011/11/29
		US 8535678 B2	2013/09/17
		US 8609104 B2	2013/12/17
US 8663642 B2	2014/03/04		
WO 2004-073656 A2	2004/09/02		
WO 2004-073656 A3	2005/02/24		
WO 2004-073656 A9	2005/09/01		
WO 2006-113909 A2	2006/10/26		
WO 2006-113909 A3	2008/01/31		
US 7723485 B2	2010/05/25	AU 2008-251608 A1	2008/11/20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		AU 2008-251608 B2	2014/03/27
		EP 2144628 A2	2010/01/20
		EP 2144628 B1	2012/10/17
		JP 2010-526821 A	2010/08/05
		JP 5290276 B2	2013/09/18
		US 2008-0311134 A1	2008/12/18
		WO 2008-141044 A2	2008/11/20
		WO 2008-141044 A3	2008/12/31
KR 10-2007-0037575 A	2007/04/05	AU 1996-51274 B2	2000/02/24
		AU 1997-25986 B2	2001/07/05
		AU 1998-54287 B2	2002/03/14
		AU 1998-81447 B2	2001/11/01
		AU 1998-90378 A1	1999/04/12
		AU 1998-93121 A1	1999/04/05
		AU 1998-93178 A1	1999/04/05
		AU 1998-93178 B2	2001/11/22
		AU 1998-93880 A1	1999/04/12
		AU 1998-93880 B2	2003/01/16
		AU 1998-93881 A1	1999/04/12
		AU 1998-93881 B2	2002/02/21
		AU 1998-93959 A1	1999/04/05
		AU 1998-94843 A1	1999/04/05
		AU 1999-10703 A1	1999/05/10
		AU 1999-11260 A1	1999/05/17
		AU 1999-12883 A1	1999/05/17
		AU 1999-15324 A1	1999/06/15
		AU 1999-15324 B2	2001/06/28
		AU 1999-16029 A1	1999/06/16
		AU 1999-16029 B2	2001/07/26
		AU 1999-17033 A1	1999/06/15
		AU 1999-17033 B2	2001/05/10
		AU 1999-22122 A1	1999/07/26
		AU 1999-30721 A1	1999/09/27
		AU 1999-30721 B2	2003/06/19
		AU 1999-30750 A1	1999/10/11
		AU 1999-30750 B2	2003/03/20
		AU 1999-31944 A1	1999/10/18
		AU 1999-31944 B2	2003/09/11
		AU 1999-36547 A1	1999/11/16
		AU 1999-36547 B2	2004/01/15
		AU 1999-37570 A1	1999/11/08
		AU 1999-37570 B2	2001/11/22
		AU 1999-39937 A1	1999/12/06
		AU 1999-39937 B2	2001/11/01
		AU 1999-40995 A1	1999/12/13
		AU 1999-42058 A1	1999/12/13
		AU 1999-43286 A1	1999/12/20
		AU 1999-43286 B2	2003/06/05
		AU 1999-44080 A1	1999/12/13

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		AU 1999-44226 A1	2000/07/31
		AU 1999-44228 A1	2000/02/14
		AU 1999-45479 A1	2000/09/04
		AU 1999-46744 A1	2000/03/14
		AU 1999-55908 A1	2000/03/21
		AU 1999-55908 B2	2003/04/03
		AU 1999-58167 A1	2000/04/03
		AU 1999-59200 A1	2000/04/03
		AU 1999-59229 A1	2000/04/03
		AU 1999-60413 A1	2000/04/10
		AU 1999-64984 A1	2000/04/03
		AU 2000-12005 A1	2000/05/01
		AU 2000-12005 B2	2003/03/20
		AU 2000-17471 A1	2001/04/17
		AU 2000-17482 A1	2000/06/19
		AU 2000-17482 B2	2004/04/01
		AU 2000-17498 A1	2000/10/04
		AU 2000-17499 A1	2000/07/12
		AU 2000-17499 B2	2003/12/04
		AU 2000-19320 A1	2000/07/03
		AU 2000-19320 B2	2004/09/30
		AU 2000-21928 A1	2000/07/12
		AU 2000-22114 A1	2000/07/31
		AU 2000-22115 A1	2000/07/31
		AU 2000-22153 A1	2000/12/28
		AU 2000-22248 A1	2000/09/28
		AU 2000-23907 A1	2001/02/05
		AU 2000-23993 A1	2000/09/28
		AU 2000-24747 A1	2000/06/19
		AU 2000-24952 A1	2000/09/28
		AU 2000-25935 A1	2000/07/31
		AU 2000-25935 B2	2004/12/16
		AU 2000-25967 A1	2000/09/28
		AU 2000-26008 A1	2000/09/28
		AU 2000-28794 A1	2001/07/31
		AU 2000-28794 B2	2003/01/09
		AU 2000-28836 A1	2000/09/28
		AU 2000-28837 A1	2001/01/09
		AU 2000-28839 A1	2001/01/30
		AU 2000-31070 A1	2000/06/19
		AU 2000-31077 A1	2000/09/28
		AU 2000-31077 B2	2004/05/13
		AU 2000-32461 A1	2000/12/28
		AU 2000-33816 A1	2000/09/28
		AU 2000-33816 B2	2004/01/08
		AU 2000-35144 A1	2000/09/28
		AU 2000-36326 A1	2000/12/05
		AU 2000-37375 A1	2000/09/28
		AU 2000-37743 A1	2000/12/18
		AU 2000-38648 A1	2000/10/09

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		AU 2000-38648 B2	2003/08/07
		AU 2000-38670 A1	2000/09/21
		AU 2000-38670 B2	2005/01/13
		AU 2000-38784 A1	2001/04/10
		AU 2000-38784 B2	2005/09/29
		AU 2000-39026 A1	2001/04/17
		AU 2000-40113 A1	2001/02/05
		AU 2000-42387 A1	2000/11/02
		AU 2000-42460 A1	2000/11/02
		AU 2000-43412 A1	2000/11/14
		AU 2000-43412 B2	2005/01/20
		AU 2000-43484 A1	2000/11/02
		AU 2000-44540 A1	2000/11/14
		AU 2000-46462 A1	2000/11/02
		AU 2000-48519 A1	2000/12/28
		AU 2000-51527 A1	2001/01/02
		AU 2000-54412 A1	2000/12/18
		AU 2000-54601 A1	2000/12/18
		AU 2000-55911 A1	2000/12/18
		AU 2000-63910 A1	2001/02/19
		AU 2000-69018 A1	2001/06/12
		AU 2000-70793 A1	2001/03/26
		AU 2000-75730 A1	2001/03/26
		AU 2001-19167 A1	2001/07/16
		AU 2001-20485 A1	2001/08/27
		AU 2001-20554 A1	2001/06/12
		AU 2001-255282 B2	2005/07/14
		AU 2001-25909 A1	2001/07/03
		AU 2001-268714 B2	2006/09/21
		AU 2001-286785 B2	2006/08/17
		AU 2001-30757 A1	2001/08/20
		AU 2001-32768 A1	2001/07/24
		AU 2001-32768 B2	2006/09/07
		AU 2001-34346 A1	2001/06/12
		AU 2001-41468 A1	2001/08/20
		AU 2001-55168 A1	2001/09/17
		AU 2001-55282 A1	2001/10/23
		AU 2001-65019 A1	2001/12/11
		AU 2001-65311 A1	2001/12/17
		AU 2001-68028 A1	2001/09/24
		AU 2001-68108 A1	2002/03/04
		AU 2001-68714 A1	2002/01/08
		AU 2001-70118 A1	2002/03/04
		AU 2001-71938 A1	2002/03/13
		AU 2001-71973 A1	2002/02/05
		AU 2001-73150 A1	2002/02/05
		AU 2001-78852 A1	2002/01/08
		AU 2001-84906 A1	2002/03/04
		AU 2001-86785 A1	2002/03/04
		AU 2001-94814 A1	2002/04/08

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		AU 2002-16610 A1	2002/04/02
		AU 2002-236618 B2	2007/08/09
		AU 2002-303231 B2	2008/03/06
		AU 2002-318371 B2	2006/06/15
		AU 2002-330015 B2	2008/02/07
		AU 2002-335054 A1	2003/07/09
		AU 2002-365246 A1	2003/07/15
		AU 2002-367318 A1	2003/07/24
		AU 2002-367318 B2	2007/07/12
		AU 2003-230874 A1	2003/11/03
		AU 2003-259913 A1	2004/03/03
		AU 2003-277226 A1	2004/04/23
		AU 2003-277226 A2	2005/07/07
		AU 2003-277226 B2	2010/05/13
		AU 2003-290848 A1	2004/06/15
		AU 2004-253953 A1	2005/01/13
		AU 2004-259638 A1	2005/02/03
		AU 2004-259638 B2	2008/07/03
		AU 2004-291141 A1	2005/06/02
		AU 2004-291141 B2	2009/06/11
		AU 2004-293787 A1	2005/06/09
		AU 2004-308972 A1	2005/07/14
		AU 2004-308972 B2	2009/05/28
		AU 2004-308972 C1	2009/11/26
		AU 2004-316290 A1	2005/09/09
		AU 2004-316290 A2	2005/09/09
		AU 2004-316290 B2	2011/08/18
		AU 2005-249490 A1	2005/12/15
		AU 2005-249490 B2	2010/07/29
		AU 2005-269967 A1	2006/02/09
		AU 2005-282496 A1	2006/03/16
		AU 2005-295131 A1	2006/04/20
		AU 2005-295131 B2	2011/06/16
		AU 2006-235436 A1	2006/10/19
		AU 2007-325316 A1	2008/06/05
		AU 2009-210627 A1	2009/08/13
		CA 2293740 A1	1998/12/23
		CA 2301847 A1	1999/03/04
		CA 2303834 A1	1999/03/25
		CA 2304102 A1	1999/04/01
		CA 2304129 A1	1999/04/01
		CA 2304810 A1	1999/04/01
		CA 2304810 C	2011/05/10
		CA 2305385 A1	1999/04/29
		CA 2305385 C	2013/05/21
		CA 2306183 A1	1999/05/06
		CA 2306450 A1	1999/05/06
		CA 2306450 C	2012/07/10
		CA 2309358 A1	1999/06/03
		CA 2309783 A1	1999/06/03

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CA 2309783 C	2011/06/28
		CA 2311640 A1	1999/06/10
		CA 2322792 A1	1999/09/23
		CA 2322792 C	2010/09/14
		CA 2323072 A1	1999/09/30
		CA 2323072 C	2011/05/24
		CA 2324297 A1	1999/10/28
		CA 2326001 A1	1999/11/04
		CA 2328496 A1	1999/11/25
		CA 2328895 A1	1999/12/09
		CA 2334693 A1	2000/03/02
		CA 2339043 A1	2000/03/09
		CA 2343577 A1	2000/03/23
		CA 2344465 A1	2000/04/20
		CA 2344467 A1	2000/03/30
		CA 2344467 C	2011/01/28
		CA 2345918 A1	2000/08/24
		CA 2347677 A1	2000/06/08
		CA 2347835 A1	2000/06/08
		CA 2348157 A1	2000/06/08
		CA 2353775 A1	2000/06/29
		CA 2353799 A1	2000/06/29
		CA 2354027 A1	2000/07/06
		CA 2361221 A1	2000/09/28