

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 4월 21일 (21.04.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/060297 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009697

(22) 국제출원일: 2014년 10월 16일 (16.10.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인: 주식회사 파맵신 (PHARMABCINE INC.)
[KR/KR]; 34112 대전광역시 유성구 대덕대로 593, 307
호, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 유진상 (YOO, Jinsang); 305-804 대전시 유성
구 신성로 61 번안길 50 401 호, Daejeon (KR). 유진산
(YOO, Jin San); 305-370 대전시 유성구 엑스포로 339
번길 320, 2-101, Daejeon (KR). 김성우 (KIM, Sung-
Woo); 305-720 대전시 유성구 가정로 65, 102-1503,
Daejeon (KR). 김연주 (KIM, Yeun Ju); 305-804 대전시
유성구 신성로 98 번길 19, 201 호, Daejeon (KR). 전미
애 (JEON, Mi Ae); 305-805 대전시 유성구 신성로 62

번길 26, 205 호, Daejeon (KR). 변상순 (BYUN, Sang
Soon); 301-788 대전시 중구 계룡로 852, 25-1006, Dae-
jeon (KR). 이영애 (LEE, Youngae); 302-803 대전시 서
구 도산로 314 번길 70, 3-304, Daejeon (KR). 박미주
(PARK, Miju); 301-090 대전시 중구 대종로 81 번길
29, 302 호, Daejeon (KR). 이혁준 (LEE, Hyuk Joon);
305-758 대전시 유성구 송강로 15, 204-407, Daejeon
(KR). 김도윤 (KIM, Do Yun); 305-810 대전시 유성구
전민로 6 번길 33, 104 호, Daejeon (KR). 최진희 (CHOL,
Jinhee); 305-804 대전시 유성구 신성로 68 번길 25, 103
호, Daejeon (KR). 이원섭 (LEE, Weon Sup); 305-720 대
전시 유성구 가정로 65, 102-1106, Daejeon (KR). 심상
렬 (SHIM, Sang Ryeol); 305-744 대전시 유성구 배울 1
로 35, 409-1501, Daejeon (KR).

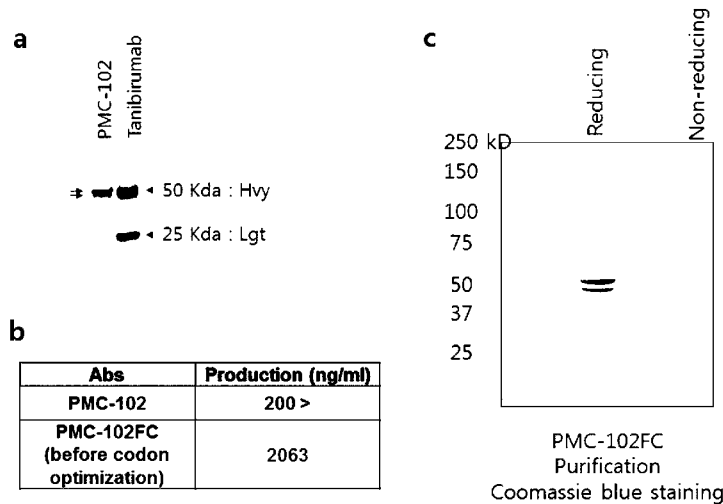
(74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 06133 서울시
강남구 테헤란로 123 11 층, Seoul (KR).

(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, KR, KZ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DUAL-TARGET ANTIBODY HAVING BINDING ABILITY TO VEGFR-2 AND C-MET

(54) 발명의 명칭: VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체



(57) Abstract: The present invention relates to a dual-target antibody having a binding ability to vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) and mesenchymal epithelial transition factor (c-Met) and, more specifically, to a dual-target antibody having a binding ability to VEGFR-2 and c-Met, a method for producing the dual-target antibody, and a pharmaceutical composition containing the dual-target antibody, wherein the dual-target antibody comprises a VEGFR-2 neutralizing antibody, which has a light chain variable region with an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and a heavy chain variable region represented by SEQ ID NO: 2, and a C-met neutralizing peptide represented by SEQ ID NO: 3 or 4, which is linked to the terminal of the light chain variable region or the heavy chain variable region of the VEGFR-2 neutralizing antibody. The dual-target antibody according to the present invention simultaneously neutralizes two targets involved in angiogenesis and cancer cell proliferation, and thus exhibits an excellent neutralizing ability compared with existing single target antibodies and is very effective in the treatment of cancer. In addition, it can be expected that c-Met neutralizing active domains, which were not previously easy to produce, can be mass-produced.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/060297 A1



LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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).

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

공개:

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

본 발명은 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역과 서열번호 2로 표시되는 중쇄가변영역을 가지는 VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2) 중화항체의 상기 경쇄가변영역 또는 상기 중쇄가변영역의 말단에 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 c-Met(Mesenchymal Epithelial Transition factor) 중화 펩타이드가 결합되어 있는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체, 상기 이중표적 항체의 제조방법 및 상기 이중표적항체를 포함하는 억제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 이중표적항체는 혈관신생과 암세포 증식에 관여하는 두 가지 표적을 동시에 중화시킴으로써, 기존의 단일표적 항체에 비해서 뛰어난 중화능을 보일 뿐만 아니라, 암 치료에도 매우 효과적이다. 또한, 기존에 생산이 용이하지 않았던 c-Met 중화활성 도메인을 대량생산할 수 있는 효과를 기대할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체

기술분야

- [1] 본 발명은 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역과 서열번호 2로 표시되는 중쇄가변영역을 가지는 VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptoer-2) 중화항체의 상기 경쇄가변영역 또는 상기 중쇄가변영역의 말단에 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 c-Met(Mesenchymal Epithelial Transition factor) 중화 펩타이드가 결합되어 있는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체, 상기 이중표적 항체의 제조방법 및 상기 이중표적항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] VEGF 수용체인 VEGFR-2을 표적으로 하는 혈관신생 억제 항체에는 Dyax의 자연 파지디스플레이 라이브러리(native phage display library)에서 발굴하여 개발중인, 임클론(Imclone)사의 IMC-1121B(EP1916001A2)와 UCB사의 CDP-791(PCT/GB02/04619), 그리고 본 연구진이 개발한 타니비루맵(TTAC-0001, Tanibirumab, 대한민국 등록특허 제883,430호 및 WO 2008/153237) 등이 있다. IMC-1121B는 완전 인간 Fab 라이브러리로부터 선별된 단일클론항체로서, 현재 전이성 유방암 및 위암에 대해서 임상 3상을 진행하여 위암환자에서 paclitaxel과 병합투여하여, 전반 생존율(Overall survival)과 종양 비진행 생존율(progression-free survival)을 호전시킨 바 있다. UCB사의 CDP-791은 인간화 항체로서, PEGylated Di-Fab 형태로 비소세포성폐암 치료를 위한 최초치료(first-line treatment)로써 carboplatin 과 paclitaxel의 병용 요법으로 임상 2상을 진행하여 종양반응과 진행율 모두에 있어서 호전반응을 보였다. 이 항체는 Fc를 가지고 있지 않기 때문에 항체의존적세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)이나 보체의존적독성(complement-dependent cytotoxicity)을 기대할 수 없다.
- [4] 본 발명자들이 개발하여, 현재 임상 1 단계에서 독성 문제없이 연구를 마친 타니비루맵은 (주)파맵신의 완전인간 ScFv 파아지 라이브러리로부터 선별된 단일클론항체로서, VEGFR-2을 표적으로 하면서 동시에 마우스나 랫트 유래의 flk-1(VEGFR-2 상동체)에 대해서도 반응성을 가지는 유일한 항체로서, 이것은 임클론사의 IMC-1121B와 구별이 되는 중요한 특징 가운데 하나이다(WO 2008/153237). 특히, 상기 타니비루맵이 보여주는 이중간

교차반응성(cross-species cross reactivity)은 동물질환 모델에 대한 연구를 가능하게 하였다.

- [5] 전임상 동물 실험에서 항 신생혈관형성 치료시 타겟 단백질은 억제되지만, 보상적 경로(compensatory pathway) 즉, 대체 신생혈관 자극 신호들이 활성화되어 종양의 생존과 증식에 기여함을 알 수 있으며, 아바스틴과 같이 VEGF/VEGFR 경로를 차단하는 암 치료용항체의 경우 장기 투여 시, c-Met 을 활성화시켜 억제 내성을 가동시키는 것으로 보고 되어있다(Bergers and Hanahan, *Nat. Rev. Cancer*, 8:592, 2008). 또한, 아바스틴 투여 후 GBM 성장이 진행된 경우, 아바스틴 비 투여군에 비해서 두개골 절개(craniotomy) 수술 후 생존율이 낮았으므로, 아바스틴 처리 시 수술합병증에 대한 별도의 고려가 있어야한다는 보고도 있다. (Clark *et al*, *Neurosurgery*, 70:361, 2011).
- [6] 한편, HGF/c-Met 신호전달 기작은 다양한 암조직과 종양세포에 과발현함으로써, 종양세포의 성장과 전이에 크게 기여하는 것으로 잘 알려져 있다.
- [7] C-Met(mesenchymal-epithelial transition factor)은 세포 표면의 수용체이며, 수용체 타이로신(tyrosine) 카이네이즈 패밀리(receptor tyrosine kinase family)의 암 유전자(oncogene)로써, 50 kD의 세포외 도메인만으로 구성된 알파(α) 서브유닛과 세포외, 세포막 투과, 타이로신 카이네이즈 도메인(domain) 그리고 인산화와 관련된 타이로신 모티프(motif)로 구성된 총 145 kD의 베타(β) 서브유닛으로 구성되어 있음이 밝혀졌다(Dean *et al.*, *Nature*, 4:318(6044):385, 1985; Park *et al.*, *PNAS*, 84(18):6379, 1987, Maggiora *et al.*, *J. Cell Physiol.*, 173:183, 1997). 부적절한 c-Met이나 HGF의 발현은 여러 타입의 악성 종양과 연관이 되어있으며, 과발현될 경우 그 예후가 좋지 않다고 보고되어있다(www.vai.org/met, Eder *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 15:2207, 2009).
- [8] 다수의 연구진들은 또한 상기 타이로신 카이네이즈 도메인이 활성화되기 위해서는 두 서브유닛 가운데, 베타 서브유닛에 있는 c-Met 세포외 도메인(extracellular domain)에 HGF/SF(hepatocyte growth factor/scatter factor)가 결합하여야 신호전달 기작에 있어서 매우 중요한 c-Met의 1349번째 및 1356번째 타이로신이 인산화되어 타이로신 카이네이즈 도메인이 활성화될 수 있다고 보고했다(Bottaro *et al.*, *Science*, 15:251(4995):802, 1991; Cooper, *Oncogene*, 7(1):3, 1992, Maggiora *et al.*, *J. Cell Physiol*, 173:183, 1997; Ponzetto *et al.*, *Cell*, 77(2):261, 1994; Maina *et al.*, *Cell*, 87:531, 1996).
- [9] C-Met은 HGF에 반응하여, c-Met의 인산화를 통한 다양한 신호전달 경로를 자극하여 암세포 및 혈관세포의 분열(mitogenesis)과 세포의 운동성(motility)을 증진시키고, 세포사멸을 억제하며, 혈관형성과 세포외기질(ECM, extracellular matrix)로 침윤(invasion)과 전이(metastasis)를 유도하는 등 암화과정(transformation)을 촉진시킨다(Jeffers *et al.*, *J. Mol. Med.*, 74:505, 1996; Amicone *et al.*, *EMBO J.*, 16:495, 1997; Matsumoto and Nakamura, *Biochem. Biophys.*

Res. Comm., 239:639, 1997; Corps *et al.*, *Int.J. Cancer*, 73:151, 1997). 특히, 신경교종(gliomas, Koochekpour *et al.*, *Cancer Res.*, 57:5391, 1997), 유방암(Nagy *et al.*, *Surg. Oncol.*, 5:15, 1996; Tuck *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 148:225, 1996), 췌장암(Ebert *et al.*, *Cancer Res.*, 54:5775, 1994), 흉막 중피종(pleural mesotheliomas, Tolpay *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124:291, 1998); Klominek *et al.* *Intl. J. Cancer*, 76:240, 1998) 등 다양한 암 조직과 세포에서 c-Met과 HGF가 동시에 과발현되는 것으로 보고되고 있지만, HGF와 상관없이 c-Met의 과발현을 통해서도 암으로의 발달이 진행되는 경우가 흔하게 관찰되고 있으며, 간암(hepatocellular carcinoma, Suzuki *et al.*, *Hepatology*, 20(5):1231, 1996), 위암(Taniguchi *et al.*, *Cancer*, 82:2112-2122(1998), 폐암(Harvey *et al.*, *J. Pathol.*, 180:389, 1996), 신장암(Natali *et al.*, *Intl. J. Cancer*, 69:212, 1996), 난소암(Nagy *et al.*, *J. Surg. Oncol.*, 60:95, 1995), 대장암(Hiscox *et al.*, *Cancer Invest.*, 15:513, 1997) 등이 그 좋은 예이다. 이와 같이 c-Met이 활성화되거나 과발현할 경우 암화 과정이 촉진되므로, c-Met의 활성화를 억제하는 여러 방법들이 유망한 항암 치료 전략으로서 개발되고 있다. 그 일례로써 c-Met에 ATP(adenosine triphosphate)가 결합하는 것을 방해하도록 고안된 저분자 화합물들이 있다. 이들 저분자 화합물들에는 Fermentek biotechnology사의 K252a, 수젠(Sugen)사의 SU11274, 파이저(Pfizer)사의 PHA-665752 등(Morotti *et al.*, *Oncogene*, 21(32):4885, 2002; Berthou *et al.*, *Oncogene*, 23(31):5387, 2004; Pfizer, Christensen *et al.*, *Cancer Res.*, 63(21):7345, 2003)이 있으며, 이들은 c-Met의 인산화를 방해하여, 신호 전달의 하류 단백질들이 활성화되지 못하도록 고안되었다. 그러나 이들 저분자 화합물의 단점은 c-Met에 의한 인산화만을 특이적으로 저해할 수 없다는 데 있다.

- [10] 또한, HGF/c-Met 신호전달 기작을 중화하는 두 번째 방법으로서 c-Met과 그것의 리간드인 HGF의 결합을 저해하는 방법이 있다. 이러한 방법에는 손실된 HGF 단편(Matsumoto & Nakamura, *Cancer Sci.*, 94(4):321, 2003)이나, HGF를 중화하는 항체(Cao *et al.*, *PNAS.*, 98(13):7443, 2001; Kim *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 12:1292, 2006; Burgess *et al.*, *Cancer Res.*, 66(3):1721, 2006) 또는 원래의 HGF 보다 강한 친화력으로 c-Met에 결합하지만 c-Met을 활성화 시키지는 않는 HGF 전구체(pro-HGF, Mazzone *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 114(10):1418, 2004)를 사용하는 방법 등이 있다. 아울러 파아지 디스플레이 방법(phage display method) 및 패닝기술(panning technique)을 이용해 c-Met의 활성을 억제할 수 있는 펩타이드(peptide) 서열을 선별함으로써, 해당 펩타이드를 c-Met 활성화 방지에 이용하기도 한다 (Kim *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, 354: 115, 2007). 선별된 펩타이드는 c-Met이 과발현된 생체내 조직이나 기관을 탐색하기 위한 분자 영상에 적용되기도 한다(Cao *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 13(20):6049, 2007). 이들은 오로지 HGF 의존적인 c-Met 활성화만 저해한다는 한계를 가지고 있으나, 실험실에서(in vitro) 또는 생체내(in vivo)에서 실제 항암효과를 나타내고 있으므로, 기존의 항암치료와 병합하는 등의 응용을 통하여 유용하게 사용될 수

있을 것으로 사료된다. 또, EGFR(epidermal growth factor receptor) 카이네이즈 억제제인 gefitinib과 erlotinib은 효과적인 암 치료제로 사용되고 있으나, 종종 약제 내성이 생기기도 하는데, 그 원인이 c-Met 수용체의 집중적인 증폭에서 기인하는 것으로 보고된 바 있으며(Engelman *et al.*, *Science*, 316(5827):1039, 2007), 따라서 c-Met 억제물을 병합처리 한다면 항암 효과가 증폭될 것으로 기대한다.

- [11] 현재 HGF를 표적으로 하는 항체는 암젠(Amgen)사의 SPH domain 에 결합하는 AMG-102(Rilotumumab, Burgess *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 9:400, 2010), AVEO Pharmaceuticals의 AV-299(Ficlatuzumab)이 임상개발 중이며, 또 c-Met을 표적으로 하는 항체로는 제넨텍(Genentech)사가 항체자체의 활성화 모드를 억제하기 위하여 원래 2가(bivalent)였던, c-Met항체의 One arm만을 채용 1가(monovalent)로 개발한 MetMab(Onartuzumab, PRO143966)이 에스트로겐 수용체(estrogen receptor (ER)), 프로게스테론 수용체(rogesterone receptor (PR)) 그리고, Her2/neu (EGFR-2 수용체)가 모두 결여된 3무 유방암(Triple negative breast cancer)과 NSCLC(non-small cell lung cancer, 비소세포폐암)에서 임상 2상을 진행하고 있으며, Lilly 사의 LA-480(LY2875358)의 경우 임상 1상을 진행하고 있다.
- [12] C-Met은 다른 신호전달 체계인 EGFR, semaphorin 4D receptor, transforming growth factor- β (TGF β), WNT, tetraspanins kangai 1(KAI1 또는 CD82) 및 CD151 등과 상호소통하여 세포의 성장, 분화, 재생 및 암화에 영향을 준다(Gherardi, *Nat. Rev. Cancer*, 12:89, 2012). 또한, c-Met은 HGF에 의해 활성화 되어, 그 자체로써 신생 혈관형성에 기여하는 것으로 잘 알려져 있고, 신생혈관형성의 주요 수용체인 VEGFR-2과 상호작용을 통하여, 신생혈관 형성을 자극하는 것으로 알려져 있다. 이때, c-Met을 VEGFR-2와 동시에 타겟팅하여 저해할 경우, 인간 이종이식모델에서 종양 성장이 상승적으로 저해됨을 관찰할 수 있었다(Zhang *et al.*, *IDrugs*, 13:112, 2010).
- [13] C-Met의 유일한 리간드인 HGF는 N-말단 도메인, 4개의 크링글(kringle, K1~K4) 도메인과 C-말단의 SPH(serine proteinase homology;세린계 단백질 분해효소의 유사 도메인)으로 이루어져 있고, NK1(Chirgadze *et al.*, *Nature Struct. Biol.*, 6:72, 1999; Ultsch *et al.*, *Structure* 6:1383, 1998), NK2(Tolbert *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107:13264, 2010), SPH 절편과 SPH 도메인(Kirchhofer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279:39915, 2004)과 Met의 세포외 도메인 중 SEMA 도메인과의 복합체 형태로(Stamos *et al.*, *EMBO J.*, 23:2325, 2004) 결정 구조가 분석되었다. 한편, 간세포나 대식세포에 감염할 때 리스테리아 균(*Listeria monocytogenes*)의 내재화(internalization)에 중요한 단백질인 InlB (Internalin B) 와 c-Met의 복합체 형태로 된 구조를 분석했을 때, c-Met의 4개의 IgG 유사 도메인(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 가운데 첫 번 째인 IgG1 도메인에 결합하는 것으로 나타났다(Niemann *et al.*, *Cell* 130:235, 2007; Ferraris *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 395:522, 2010).

- [14] HGF은 복잡하고, 불안정한 형태의 단백질로 여러 개의 도메인을 이루고 있으며, 혈청 단백질인 단백질 절단효소 전구체인 플라스미노젠(plasminogen)과 구조적, 기능적 연관성을 가지고 있어서, HGF 전구체로 부터 단백질 절단에 의해, 전체적인 구조 재배열이 일어나서, 활성화된 HGF가 만들어져야 HGF-Met 신호가 전달이 된다(Gherardi *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4046, 2006). HGF의 스플라이싱 변이체인 NK1은 HGF에 비해 c-Met을 아주 약하게 활성화하지만, HSPG (heparan-sulfate proteoglycan)에 의해 결합력이 증진된다(Schwall *et al., J. Cell. Biol.*, 133:709, 1996).
- [15] SAXS (small angle X-ray scattering) 분석과 몇 가지 X-선 결정 분석을 통하여, c-Met 복합체가 신호 전달을 하는 최소한의 구조는 리간드 이량체(dimer)를 중심에 두고, 양쪽 바깥으로 Met 수용체가 배열해 있는 2:2 위상임을 알게 되었다(Gherardi *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4046, 2006).
- [16] HGFA(HGF activator), matriptase(ST14) 와 hepsin, 이 세 종류의 세린계 단백질 분해효소(Serine proteinases)가 HGF의 절단 및 활성화에 관여하는데, matriptase(ST14) 와 hepsin의 경우는 c-Met을 발현하는 세포에서 발현되고 있으나, HGFA는 수용성 인자로, thrombin에 의해 절단되어, 혈액응고와 조직재생에 관여하는 HGF/c-Met 신호를 연결시키는 역할을 한다(Shimomura *et al., J. Biol. Chem.* 268:22927, 1993). 또한, HGF의 활성화는 적어도 HAI1(HGF activator inhibitor 1; SPINT1), HAI2(HGF activator inhibitor 2; SPINT2), 이 두 개의 저해인자(inhibitors)에 의해 통제되는데, matriptase 또는 hepsin의 발현량이 증가하거나, HAI1 나 HAI2의 발현량이 감소하게 되면, 암세포의 전이활성이 저하된다는 측면에서 상기한 단백질을 암 치료의 타겟으로 연구하기도 한다(Morris *et al., Cancer Res.*, 65:4598, 2005).
- [17] 또 다른 c-Met저해 단백질로써 유비퀴틴 E3 ligase인 CBL은 세포막 인접부위에 존재하는 c-Met의 모티프(motif)인 Tyr1003를 인지하고, E2 ligase를 결합하는 ring finger 도메인이 가지고 있어, 양자에 결합하여 궁극적으로 c-Met 분해를 유도하는데, 이 같은 이유로 Tyr1003 모티프가 제거되거나, 변이가 생기면 c-Met이 분해되지 않고 재순환 하게 되어, 세포의 암화를 촉진하게 된다(Peschard *et al., Mol. Cell*, 8:995, 2001).
- [18] HGF의 여러 변이체들이 c-Met의 길항제 역할을 한 예도 있는데, 변이체 가운데 가장 많이 발현되고 있는 NK2는 부분적으로 c-Met을 활성화 시키기는 하지만, 궁극적으로는 길항작용을 수행하며(Otsuka *et al., Mol. Cell. Biol.*, 20:2055, 2000), N-말단 도메인과 두번째 크렐글도메인(K2)의 닫힌 모노머형태("closed" monomer conformation)를 열어 주면, NK2는 c-Met을 활성화시키는 형태로 전환된다(Tolbert *et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107:13264, 2010). 또한, NK4는 HGF의 길항제로 잘 알려져 있으나, 발현 및 생산이 여의치 않다(Nakamura *et al., Anticancer Agents Med. Chem.*, 10:36, 2010). NK1과 NK2, NK4와같은 HGF 변이체들을 이용하여 c-Met의 활성화를 저해하기 위한 노력들이 있었으나, 이들

- 변이체들은 단백질의 발현과 안정성 측면에서 모두 좋지 않은 결과를 보였다.
- [19] 특히, NK1은 기능적인 HGF의 가장 작은 형태인데, 불안정하여, 단백질 발현이 어려운 측면이 있다(Tolbert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:14592, 2007; Lokker *et al.*, *EMBO J.*, 11:2503,1992). 이러한 이유로 스탠포드 대학의 한 그룹에서는 NK1에 오류 PCR (error prone polymerase chain reaction)을 통하여 직접진화(directed evolution)를 발생시켜, NK1의 발현률을 40배 높여 주었고, 녹는점(Tm, melting temperature)을 15°C이상 증진시켜 단백질 안정성을 높여주어 치료용 단백질로 이용할 수 있도록 개량하는 시도가 있었다(Douglas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:13035, 2011).
- [20] 이와 같이, 항 신생혈관형성 치료 시 나타나는 저항성에 c-Met 타겟팅이 좋은 치료법 일 수 있으며(Comoglio *et al.*, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 7:504, 2008) c-Met의 활성을 억제하였을 때, VEGFR-2 길항제의 활성을 복구 시켜준 예에서(You *et al.*, *Cancer Res.* 71:4758, 2011) VEGFR-2와 c-Met의 활성을 동시에 저해하는 치료법이 항 신생혈관 저해제의 종양의 치료효율을 개선할 수 있다고 사료된다.
- [21] 이와 같이 최근의 항체연구는 단일 표적에 대해 기능성을 가지는 항체를 개발하는 것 이외에도, 두 가지 또는 그 이상의 표적을 동시에 취할 수 있는, 이른바 이중표적항체(bispecific antibody) 또는 다중표적 항체(multi-specific antibody) 관련 연구가 활발히 진행되고 있다(Van Spriel *et al.*, *Immunol. Today*, 21:391, 2000; Kufer *et al.*, *Trend in Biotechnol.*, 22:238, 2004; Marvin and Zhu, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 9:184, 2006). 아직 이러한 항체들 가운데 FDA 승인을 얻어서 상품화가 이루어진 사례는 없으나, 지속적인 관심과 잠재력을 바탕으로 실험실 및 임상수준에서 꾸준히 연구개발이 이루어지고 있다. 이 부류에 속하는 항체들은, 크게 1) ScFv 기반 항체, 2) Fab 기반 항체, 3) IgG 기반 항체 등으로 구분할 수 있으며, 상기와 같이 이중표적 또는 다중표적 항체 및 그의 제조방법에 대해 다양한 학술적 보고가 있었으며, 이들 항체들은 사용목적에 따른 형태학적 특징에 따라 저마다 기능상의 장단점을 보이지만, 암을 치료하기 위한 효과적이고 새로운 치료용 이중표적 및 다중표적 항체의 개발은 여전히 필요한 실정이다. 특히, 이중표적 또는 다중표적을 위해 제조된 항체가 제대로 그 기능을 나타내는가가 중요한 문제이며, 이 경우 무엇보다도 동시 표적으로 하는 항원에 대한 선택이 매우 중요한 것으로 이해되고 있다.
- [22] 이에, 본 발명자들은 혈관신생을 억제하여 암치료 효과를 가지는 이중표적항체를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, VEGFR-2 및 c-Met을 동시에 중화시킬 수 있는 IgG 기반의 이중표적항체를 제조하고, 상기 이중표적 항체가 VEGFR-2 단일표적 항체 또는 c-Met 길항 도메인에 비해서 세포 수준에서 대등하거나 보다 우수한 항암효과를 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[23]

[24] 발명의 요약

- [25] 본 발명의 목적은 VEGFR-2 및 c-Met을 동시에 중화시킬 수 있는 IgG 기반의 이중표적항체를 제공하는 데 있다.
- [26] 본 발명의 다른 목적은 상기 이중표적 항체를 코딩하는 DNA 및 상기 DNA를 함유하는 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.
- [27] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중표적 항체를 코딩하는 DNA를 함유하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는 데 있다.
- [28] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 수득하는 단계를 포함하는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [29] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중표적항체를 포함하는 혈관신생억제용 약학조성물을 제공하는 데 있다.
- [30] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중표적항체를 포함하는 암치료용 약학조성물을 제공하는 데 있다.
- [31] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역과 서열번호 2로 표시되는 중쇄가변영역을 가지는 VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptoer-2) 중화항체의 상기 경쇄가변영역 또는 상기 중쇄가변영역의 말단에 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 c-Met(Mesenchymal Epithelial Transition factor) 중화 펩타이드가 결합되어 있는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 제공한다.
- [32] 또한, 본 발명은 상기 이중표적 항체를 코딩하는 DNA 및 상기 DNA를 함유하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [33] 또한, 본 발명은 상기 이중표적 항체를 코딩하는 DNA를 함유하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [34] 또한, 본 발명은 (a) 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 수득하는 단계를 포함하는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체의 제조방법을 제공한다.
- [35] 또한, 본 발명은 상기 이중표적항체를 포함하는 혈관신생억제용 약학조성물을 제공한다.
- [36] 또한, 본 발명은 상기 이중표적항체를 포함하는 암치료용 약학조성물을 제공한다.

[37]

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 본 발명에 따른 벡터 pPMC-102를 293T 세포를 이용하여 생산한 후, PMC-102의 발현율이 매우 낮음을 웨스턴블랏과 ELISA로 확인하고(a 및 b), pPMC-102FC를 293T 세포에서 임의 발현시킨 후 정제한 후, 이중표적항체 PMC-102FC의 생산 및 정제도를 SDS-PAGE를 통해서 확인한 결과(c)를 나타낸 것이다.
- [39] 도 2는 c-Met에 결합하는 HGF의 NK1 도메인과 그 변형체의 염기 서열을 나타낸 것이다.
- [40] 도 3은 본 발명에 따른 벡터 pPMC-102FC를 제작 시, 코돈최적화(codon optimization)를 수행하여 얻은 PMC-102FC의 경쇄부분의 염기서열(b) 중쇄를 포함한 전체 pPMC-102FC를 클로닝하여 이를 도식화(a)하여 나타낸 것이다.
- [41] 도 4는 본 발명에 따른 이중표적항체의 VEGFR-2 및 인간 및 마우스 c-Met에 대한 결합능과 친화도(a)와 VEGFR-2 및 인간 및 마우스 c-Met에 대한 동시결합능(b)을 BiaCore로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 5는 본 발명에 따른 이중표적항체 PMC-102의 BxPC3 세포주(a)에서, 또 PMC-102FC의 KP-4 세포주(b 및 c)에서 세포증식 분석(proliferation assay) 결과를 나타낸 것이다.
- [43] 도 6은 본 발명에 따른 이중표적항체 PMC-102FC의 HUVEC에 대한 세포증식 분석(proliferation assay) 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 7은 본 발명에 따른 이중표적항체 PMC-102FC를 KP-4에 처리하였을 때, c-Met의 활성화가 억제되고, Erk의 활성화가 저해되는 현상을 웨스턴블랏으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [45] 도 8은 본 발명에 따른 이중표적항체를 HUVEC에 처리하였을 때, VEGFR-2의 활성화가 억제되고, Erk의 활성화가 저해되는 현상을 웨스턴블랏으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [46]
- [47] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예
- [48] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [49] 본 발명은 일관점에서, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역과 서열번호 2로 표시되는 중쇄가변영역을 가지는 VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2) 중화항체의 상기 경쇄가변영역 또는 상기 중쇄가변영역의 말단에 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 c-Met(Mesenchymal Epithelial Transition factor) 중화 펩타이드가 결합되어 있는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체에 관한 것이다.
- [50] 본 발명에서는 항암 치료용 항체 개발을 위하여 종양으로부터 유래한

혈관신생의 억제와 더불어, 종양의 증식 및 전이를 동시에 저해하기 위해서 VEGF/VEGFR 및 HGF/c-Met 신호전달 기작을 표적으로 하였다.

- [51] 본 발명에 있어서, 이중표적항체의 뼈대를 이루고 있는 타니비루맵(TTAC-0001, Tanibirumab, 대한민국 등록특허 제883,430호 및 WO 2008/153237)은 VEGFR-2을 표적으로 하면서 동시에 마우스나 랫트 유래의 flk-1에 대해서도 반응성을 가지는 동시에, 두 번째 표적인 c-Met을 타겟팅하는 도메인 또한 인간, 마우스를 동시에 타겟팅 할 수 있도록 디자인 되어있어, 이종간 교차반응성을 이용한 동물질환 모델에 대한 연구를 가능케 함으로써, 이행연구를 유도하고 향후 특정 암종에 대한 항암제 개발을 단계적으로 진행시켜 관련 연구를 보다 수월하게 진행할 수 있게 한다.
- [52] 본 발명에 있어서, 상기 VEGFR-2 중화 항체는 scFV(Single Chain Fragment Variable) 또는 IgG인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 c-Met 중화 펩타이드와 상기 VEGFR-2 중화항체의 경쇄 가변영역 또는 중쇄가변영역은 링커를 통하여 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [53] 상기 c-Met 중화 펩타이드는 상기 VEGFR-2 중화항체의 경쇄 가변영역 또는 중쇄가변영역의 N-말단 또는 C-말단에 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [54] 본 발명의 일 양태에서는 타니비루맵의 경쇄서열(서열번호 1)의 아미노 말단에 NK1(hHGF의 아미노산 28번에서 210까지:서열번호 3) 도메인을 링커로 연결하여 pPMC-102.Lgt를 제작하고, 타니비루맵의 중쇄서열 벡터인 pIgGLD-6A6Hvy과 함께, 293T 세포에 공동 형질도입하여 VEGFR-2와 C-Met의 활성을 동시에 억제하는 이중표적 항체를 발현시켰다.
- [55] 본 발명의 다른 양태에서는 상기 NK1에서 8개의 코돈에 돌연변이를 가진 M15 도메인을 제작하고, 타니비루맵의 중쇄서열에 대하여는 불필요한 서열을 제거하고 코돈최적화를 수행하는 과정을 통하여, 보다 향상된 발현능을 가지는 VEGFR-2와 C-Met의 활성을 동시에 억제하는 이중표적 항체, PMC-102FC를 제조하였다.
- [56] 본 발명에 따른 이중표적항체의 PMC-102FC의 인간 VEGFR-2 및 인간과 마우스 c-Met에 대한 결합능과 해리상수(Kd, dissociation constant), 동시결합을 확인한 결과, VEGFR-2에는 타니비루맵과 PMC-102FC이 비슷한 결합능을 보이는 것을 확인한 반면, 인간과 마우스 c-Met에는 PMC-102FC만이 결합능을 가지고 있는 것을 확인하였다 (도 4a). 또한, VEGFR-2에 대한 양성대조군인 타니비루맵의 경우 VEGFR-2에만 결합하고, c-Met에 대한 양성대조군인 Fc-M15의 경우 c-Met에만 결합하는 것이 확인되었다 (도 4b). 각 배치별 친화도를 분석한 결과, 타니비루맵, PMC-102FC의 VEGFR-2과 c-Met 각각에 대한 높은 친화도를 확인하였으며(도 4a), 본 발명의 이중표적항체 PMC-102FC는 VEGFR-2와 c-Met에 동시결합능을 보였다(도 4b).
- [57] 본 발명의 또다른 양태에서는 이중표적항체 PMC-102FC 처리 후 암세포인 BxPC3 및 KP4의 증식능의 변화를 분석하였으며, 그 결과, BxPC3에 PMC-102를

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였을 때 효과적으로, 세포의 증식을 저해하였다(도 5a). 또한, HGF의 자가공급(autocrine) 세포주인 KP4를 사용하였을 때도, 뼈대 항체인 타니비루맵에 비하여 세포의 증식을 저해 하였으며, 저해 효과는 c-Met 억제제(SantaCruz, 미국)와 유사하였다(도 5b 및 도 5c).

- [58] 본 발명의 또다른 양태에서는 이중표적항체 PMC-102FC 처리 후, 혈관내피세포(HUVEC)의 증식능 변화를 확인하였으며, 그 결과, 이중표적항체 PMC-102FC가 VEGF에 의해 야기되는 HUVEC 세포의 증식능을 모항체인 타니비루맵과 비슷하게 저해하였으며, HGF의 효과도 동시에 차단하여, VEGF와 HGF를 동시에 처리한 경우에도 HUVEC의 증식능을 타니비루맵에 비하여 더욱 강력히 저해할 수 있음을 확인하였다(도 6a 및 도 6b).
- [59] 본 발명의 또다른 양태에서는 PMC-102FC은 췌장암세포인 KP4세포에서 c-Met의 인산화를 효과적으로 저해할 수 있음을 확인할 수 있었으며(도 7), PMC-102FC은 VEGFR-2와 c-Met의 인산화를 동시에 효과적으로 저해할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 8).
- [60] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 이중표적 항체를 코딩하는 DNA 및 상기 DNA를 함유하는 제조합 벡터에 관한 것이다.
- [61] 본 발명에서 이중표적 항체를 코딩하는 DNA는 서열번호 6으로 표시되는 VEGFR-2 중화항체의 경쇄가변영역과 c-Met 중화 펩타이드가 결합된 단편을 코딩하는 DNA와 서열번호 7로 표시되는 VEGFR-2 중화항체의 중쇄가변영역을 코딩하는 DNA를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [62] 본 발명에서, "벡터(vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는 게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [63] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 형질전환은 Sambrook, *et. al.*, *supra*의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서

용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법 (electroporation)(Neumann, *et. al.*, *EMBO J.*, 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

- [64] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 재조합벡터 내에 포함되게 된다. 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 재조합벡터는 진핵 발현숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [65] 상술한 재조합 벡터에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [66] 물론 모든 벡터가 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 코딩되는 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다.
- [67] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 이중표적 항체를 코딩하는 DNA를 함유하는

제조합 벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다.

- [68] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 이중표적 항체를 코딩하는 DNA 및 상기 DNA를 함유하는 제조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 배양하여 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 수득하는 단계를 포함하는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체의 제조방법에 관한 것이다.
- [69] 본 발명의 이중표적 항체는 의약으로서, 과도한 혈관신생에 의하여 발생하는 질병 및 암에 대한 예방 및/또는 치료를 목적으로 한 의약 조성물로서 이용될 수 있다. 본 발명의 항체는 제제화하여 경구적 혹은 비경구적으로 투여할 수 있다. 본 발명의 항체를 포함하는 제제는 의약 조성물로 하여 사람 혹은 동물에 대해 안전하게 투여될 수 있다.
- [70] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 이중표적항체를 포함하는 혈관신생억제용 약학조성물 및 상기 이중표적항체를 이용한 혈관신생억제 방법에 관한 것이다.
- [71] 본 발명의 혈관신생억제용 조성물은 과도한 혈관신생에 의하여 발생하는 종양의 성장과 전이(metastasis), 연령관련 황반변성(age-related macular degeneration, ARMD), 당뇨병성 망막병증(diabetic retinopathy), 건선(psoriasis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 만성염증(chronic inflammation)과 같은 질환의 치료용으로 사용될 수 있다.
- [72] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 이중표적 항체를 포함하는 암치료용 약학조성물 및 상기 이중표적 항체를 이용한 암의 치료방법에 관한 것이다.
- [73] 본 발명에서, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 갑상선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 직장암, 대장직장암, 전립선암, 신장암, 흑색종, 전립선암의 골전이암, 난소암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [74] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용된 담체는 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 약제학적으로 허용되는 담체라고 한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이소나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.
- [75] 본 발명에 따른 의약 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내,

- 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다.
- [76] 경구 및 비경구 투여가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [77] 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매중의 멸균 주사용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올중의 용액)일 수 있다. 허용적으로 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링겔 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 불휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 불휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.
- [78] 본 발명의 약제학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 캡슐, 정제 및 수성 현탁액 및 용액을 포함하여 경구적으로 허용되는 어떠한 용량형으로도 경구 투여될 수 있다. 경구용 정제의 경우, 흔히 사용되는 담체로는 락토즈 및 옥수수 전분이 포함된다. 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제가 또한 전형적으로 첨가된다. 캡슐형으로 경구 투여하는 경우 유용한 희석제로는 락토즈 및 건조된 옥수수 전분이 포함된다. 수성 현탁액이 경구 투여될 때 활성 성분은 유화제 및 현탁화제와 배합된다. 필요한 경우, 감미제 및/또는 풍미제 및/또는 착색제가 첨가될 수 있다.
- [79] 본 발명의 화합물은 통상적인 항염증제와 혼합하거나 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제, 리폭시게나제 억제제 및 IL-1와의 사이토킨의 억제제와 혼합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 염증과 같은 IL-1 매개된 질환 증세를 예방 또는 퇴치하기 위해 면역조절제(예, 브로피리민, 항-사람 알파 인터페론 항체, IL-2, GM-CSF, 메티오닌 엔케팔린, 인터페론 알파, 디에틸디티오키바메이트, 중앙 괴사 인자, 알트렉손 및 rEPO) 또는 프로스타글란딘과 배합하여 투여할 수 있다. 본 발명의 화합물이 다른 치료 제제와 배합하여 투여될 때 이들은 환자에게 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 다른 방도로서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 일반식(1)의 화합물과 상기된 다른 치료 또는 예방제와 혼합하여 이루어질 수 있다.
- [80] 본 발명의 의약조성물에 대한 유효량은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 규정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 변할 수 있음은 이해될 것이다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽,

슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

- [81] 바람직한 양태로서, 비경구적 투여의 경우 본 발명의 의약 조성물은 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액 (Hank's solution), 링거 용액 (Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 물리적으로 적절한 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입 (injection) 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성 성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액 (oily injection suspensions)으로 제조될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.
- [82] 의약 조성물중의 항체는 바이알 등의 유리용기와 주사통 등에 흡착하고 또한 불안정하며, 여러 가지 물리화학적 인자, 예컨대 열, pH 및 습도 등에 의해 쉽게 실활한다. 따라서, 안정한 형으로 제제화하기 위해 안정화제, pH조정제, 완충제, 가용화제, 계면활성제 등을 첨가한다. 안정화제로서는 글리신, 알라닌 등의 아미노산류, 덱스트란 40 및 만노우스등의 당류, 솔비톨, 만니톨, 크실톨 등의 당알콜등이 열거되고, 또한 이들의 2중이상을 병용해도 좋다. 이들 안정화제의 첨가량은 항체의 중량에 대하여 0.01 내지 100배, 특히 0.1 내지 10배 첨가하는 것이 좋다. 이들 안정화제를 가함에 의해 액상제제 또는 동결건조제제의 보존안정성을 향상할 수 있다. 완충제로서는 예컨대 인산버퍼, 구연산버퍼등이 열거된다. 완충제는 액상제제 또는 동결건조제제의 재용해 후 수용액의 pH를 조정하고, 항체의 안정성, 용해성에 기여한다. 완충제의 첨가량으로서는 예컨대 액상제제 혹은 동결건조제제를 재용해 한 후의 수량에 대해 1 내지 10mM로 하는 것이 좋다. 계면활성제로서는 폴리솔베이트 20, 프프로닉(pulluronic) F-68, 폴리에틸렌글리콜 등을 사용할 수 있으며 특히 바람직하게는 폴리솔베이트 80이 열거되고, 또 이들의 2중 이상을 병용해도 좋다.
- [83] 상기한 바와 같이 항체와 같은 고분자 단백질은 용기의 재질인 유리나 수지 등에 흡착하기 쉽기 때문에, 계면활성제를 첨가하는 것에 의해 액상제제 혹은 동결건조제제의 재용해 후 항체의 용기로의 흡착을 방지할 수 있다. 계면활성제의 첨가량으로서는 액상제제 혹은 동결건조제제의 재용해 후 물 중량에 대해 0.001 내지 1.0% 첨가함이 좋다. 이상과 같은 안정화제, 완충제 혹은 흡착방지제를 가하여 본 발명 항체의 제제를 조제할 수 있지만, 특히 의료용 또는 동물약용 주사제로서 이용하는 경우는 삼투압비로서 허용되는 삼투압비는 1 내지 2가 좋다. 삼투압비는 약제화시에 염화나트륨의 증감에 의해 조제할 수 있다. 조제중의 항체 함량은 적용질환 적용투여경로 등에 따라 적절히 조정할 수 있고, 사람에 대한 사람형화 항체의 투여량은 항체의 사람 단백질 NSP에 대한

친화성, 즉 사람 단백질 NSP에 대한 해리정수(Kd값)에 의존하고, 친화성이 높은(Kd값이 낮은)만큼 사람에 대한 투여량을 적게해도 약효를 발현할 수 있다.

[84]

[85] 실시예

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

[87]

특히, 하기 실시예에서는 본 발명에 따른 유전자를 제거하기 위하여 특정 벡터와 숙주세포로 숙신산 생성 미생물인 맨하이미아 속 미생물만을 예시하였으나, 다른 종류의 숙신산 생성 미생물들을 사용하여도 순수 숙신산 생성 변이 미생물을 수득할 수 있다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이라 할 것이다.

[88]

[89] 실시예 1 NK1의 클로닝

[90] C-Met과 결합하여 활성을 억제하는 인간 HGF 도메인 관련 DNA는 RT-PCR을 이용한 통상적인 분자 생물학적인 방법을 통하여 추출하여 사용하였다.

[91]

추출된 DNA를 이용하여 NK1 도메인만을 증폭하기 위해서 다음과 같은 조건에서 PCR을 수행하였다: 94°C 4분, (94°C, 45초/50°C, 45초/72°C, 1분) 25회, 72°C 7분, 4°C. 이때 사용된 반응물 조성은 다음과 같다: BstXI 제한효소 인식부위를 가지는 프라이머 SP-SBs와 SalI site와 6XHis sequence를 가진 역방향 프라이머 NK1HisSal-As 각 2 μ l (10 pmole/ μ l), 주형 DNA로써 인간 HGF cDNA 1 μ l (100 ng/ μ l), 중합효소로써 i-Max™ II Taq 2.5 U (Intron #25261, 대한민국), 10X 버퍼 5 μ l, dNTP 2 μ l (각 2.5 mM), 증류수 37.5 μ l. PCR을 통해서 얻어낸 산물은 1% 아가로스 겔을 통해서 전기영동을 수행하여 확인하였으며, BstXI와 SalI으로 절단하여, 이후 600 bp에 못 미치는 희미한 밴드를 HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience #YDF300, 대만)를 이용해서 분리해 내어, pcDNA3(invitrogen)가 변형된 발현벡터를 BstXI와 XhoI으로 절단한 부분에 연결하여 클로닝하여 염기서열 분석을 통해 바르게 클로닝된 NK1 발현벡터 pSP.NK1.His를 수득하였다.

[92]

[93] SP-SBs 프라이머: NNN CCA GCG GTG TGG GCC ACC ATG GGC TGG TCC TAC ATC (서열번호:8)

[94]

NK1HisSal-As 프라이머: NNN GTC GAG CTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTC AAC TTC TGA ACA CT (서열번호:9)

[95]

[96] 본 발명자들이 출원하여 등록된 타니비루맵(TTAC-0001, 대한민국 등록특허 제10-0883430호 및 국제출원 제PCT/KR07/003077호)에 기재된

pIgGLD-6A6Lgt를 backbone 벡터로 하여, pIgGLD-6A6Lgt의 타니비루맵 경쇄서열(서열번호 1)의 아미노 말단에 NK1(hHGF의 아미노산 28번에서 210까지:서열번호 3) 도메인을 [G4S]X2 링커(아미노산 서열; sggggsgggsgs)로, PCR을 이용하여, pPMC-102.Lgt를 제작하였다.

- [97] 타니비루맵의 중쇄서열 벡터인 pIgGLD-6A6Hvy과 함께, 293T 세포에 공동 형질도입하여 임의발현을 유도한 후, 그 배양액을 얻어 인간 IgG에 대한 SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅을 통해서 그 발현여부를 확인하였다(도 1a).
- [98] 이 때, 형질도입은 lipofectamine™ 2000(Invitrogen #11668-019, 미국)을 이용하였으며, DMEM 배지(Welgene, 대한민국)가 들어있는 6-웰 플레이트에 웰당 2×10^6 개의 293T 세포를 접종한 후, 가습이 유지되는 CO₂(5%) 배양기를 사용하여 37°C에서 24시간 정치하고, 세포밀도가 90% 이상 되도록 조밀하게 배양하였다.
- [99] 제조합벡터 3 μ g(pPMC-102.Lgt와 pIgGLD-6A6Hvy 각 2 μ g씩)과 6 μ l의 lipofectamin™ 2000을 각기 250 μ l의 무혈청 OptiMEM 배지에 희석하여 상온에서 5분간 방치하였다. DNA 희석액과 lipofectamin™ 2000 희석액을 섞어 상온에서 20분간 반응시켜 DNA-lipofectamin™ 2000 복합체가 형성되도록 하였다. 배양된 세포에서 기존의 배지를 제거한 후, DNA-lipofectamin™ 2000 복합체 500 μ l와 무혈청 OptiMEM 배지 500 μ l를 각 웰에 첨가하여, 37°C 조건의 CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양하였다. Freestyle 293 배지 2 ml를 추가하여 48-72시간 동안 배양한 후, 그 상등액만을 분리하여 항체의 발현 여부를 SDS-PAGE와 웨스턴블로팅을 통해 확인하였다. SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅은 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법을 준용하였으며, 사용된 시료는 다음과 같다: 10% SDS-polyacrylamide Gel, PVDF 멤브레인(Millipore #IPVH00010, 미국), HRP-conjugated goat anti-human IgG(kappa) 항체, 그리고 HRP-conjugated goat anti-human IgG(Fc) 항체(Pierce, 미국).
- [100] 임의 발현으로 얻어진 배지 내 IgG 발현농도는 ELISA를 사용하여 확인하였다. 이를 위해서 96-웰 플레이트에 1차 항체로써, 2 μ g/ml의 goat anti-human IgG(Fc)(Pierce, 미국)를 100 μ l씩 첨가하고, 4°C에서 12시간 방치함으로써 코팅을 마쳤다. 이후 웰 속에 남아있는 용액을 버린 후, 1x PBS에 2% 탈지우유를 함유한 blocking solution을 200 μ l씩 첨가, 37°C에서 1시간 방치하였다. 1X PBS에 0.05% Tween-20을 함유한 Washing buffer로 각 웰을 3번 반복하여 씻은 후, 293T 형질도입을 통하여 얻은 세포배양액 100 μ l씩을 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 제차 washing buffer로 각 웰을 3번 반복해서 씻고 난 후, 2차 항체로써 HRP-conjugated goat anti-human IgG(kappa)를 washing buffer에 1:5,000 비율로 희석하여 100 μ l씩 첨가, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 washing buffer로 각 웰을 3번 반복해서 씻고 난 후, TMB substrate reagent(BD biosciences, 미국)를 100 μ l씩 첨가, 5~10분 동안 반응시킨 후, 2N 황산(H₂SO₄)용액 50 μ l씩 첨가하여 발색반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 리더(Tecan, 스위스)를

사용하여 O.D._{450-650nm} 값을 얻어 결과 표준품과 비교하여 정량을 수행 하였으며, 그 결과를 도 1b에 나타내었다.

[101]

[102] 실시예 2 타니비루맵 서열의 코돈 적합화와 pPMC-102FC 제작

[103] 정량실험을 통하여 PMC-102의 발현율은 매우 저조한 것으로 확인되었다(도 4b). NK1 자체는 불안정한 단백질로 알려져 있으며, 발현이 저조하기 때문에 경쇄의 아미노 말단에 연결했을 때에도 그 발현율이 낮은 것으로 판단되었다. 이에 따라 발현율과 안정성을 개선한 형태의(Douglas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:13035, 2011) NK1 변이체(M15)를 제작하였다(도 2).

[104] 즉, 실시예 1에서 제작한 pSP.NK1.His를 주형으로하여, 하기 기재된 프라이머를 이용하여, 도 2에 나타난 바와 같은 8개의 코돈에 돌연변이를 가진 M15가 만들어질 때까지 PCR 및 클로닝을 진행하였다. 이렇게 하여 pSP.M15.His를 제작하였는데 야생형 NK1 유전자 서열을 이용하여, 여러 단계의 PCR을 통한 돌연변이를 일으키고, 여섯 개의 히스티딘(6X His)을 종결코돈 직전에 삽입하여, 발현벡터 pSP.M15.His를 제작하였으며, M15 단편의 서열을 서열번호 4에 나타내었다.

[105]

[106] M1KS : TGA AGA TAG AAA CCA AAA AA (서열번호:10)

[107] M1KAS: TTT TTT GGT TTC TAT CTT CA (서열번호:11)

[108] M2KS: CAA GAA AAA GAT GCC TCT G (서열번호:12)

[109] M2KAS: CAG AGG CAT CTT TTT CTT G (서열번호:13)

[110] M345KS: ATT GGT AAT GGA CGC AGC TAC AGG GGA ACA G
(서열번호:14)

[111] M345KAS: GCT GCG TCC ATT ACC AAT GAT GCA TTT TCT AAT GT
(서열번호:15)

[112] M67KS: ATC GGG GTG AAG ACC TAC GGG AAA ACT (서열번호:16)

[113] M67KAS: AGT TTT CCC GTA GGT CTT CAC CCC GAT (서열번호:17)

[114] M8KS: TCA CAA GCG ATC CAG AGG T (서열번호:18)

[115] M8KAS: ACC TCT GGA TCG CTT GTG A (서열번호:19)

[116]

[117] 이렇게 만들어진 NK1의 변이체 M15를 코돈적합화를 통해 합성하고(인비트로젠, 미국), 역시 코돈 적합화를 통해 얻은 타니비루맵의 경쇄서열의 카르복시 말단에 상기의 [G4S]X2 링커를 연결한, 타니비루맵경쇄-M15를 PCR 법을 이용하여 증폭하였다. PCR 증폭시 N-말단 쪽 프라이머에 제한효소 *AscI*, C-말단 쪽 프라이머에 *HpaI*을 넣어 주어 절단한 후, pcDNA3를 기반으로 하는 dual 발현벡터의 *AscI*, *HpaI* 절단 부위에 삽입하였다. 이어, 타니비루맵의 코돈 적합화를 통해 얻은 중쇄서열을 PCR 증폭시 N-말단 쪽 프라이머에 제한효소 *BamHI*, C-말단 쪽 프라이머에 *NheI*을 넣어 주어 절단한 후,

상기의 타니비루맵경쇄-M15 서열을 이미 함유하고 있는 dual 발현벡터의 BamHI, Nhe I 절단 부위에 삽입하여, 도 3의 pPMC-102FC를 완성하였다. 완성된 벡터의 중쇄 및 경쇄 부분의 염기서열은 서열번호 6 및 7에 기재하였다.

[118] 상기 제작된 pPMC-102FC를 293T에서 실시예 1에서 예시된 방법으로 트랜스펙션하여 발현시키고 그 배양액을 얻어 ELISA 방법으로 정량하였을 때, PMC-102에 비하여 현저하게 많은 양의 PMC-102FC가 생산되는 것을 확인하였다(도 1b). 이에 따라, 유전자 서열과 아미노산 서열 중 VEGFR-2를 길항하는 성질을 유지하도록 하면서, 불필요한 서열을 제거하도록 디자인하고, 인비트로젠-진아트(Invitrogen-GeneArt)에 의뢰하여 코돈 최적화(codon optimization)를 수행하여, 서열번호 7의 중쇄서열을 합성하여 얻었다.

[119] 또한, c-Met을 타겟팅하는 NK1의 도메인은 타니비루맵의 경쇄서열(서열번호 1)의 카르복시 말단에 NK1의 변이체인 M15를 링커를 통해 연결하도록 디자인 하여, 역시 인비트로젠-진아트(Invitrogen-GeneArt)에 의뢰하여 코돈 적합화(codon optimization)를 수행하였다. 경쇄-M15 하이브리드를 합성하여 pPMC-102FC의 경쇄-M15 (*AscI/HpaI* sites)와 중쇄(*BamHI/NheI* sites)를 포함하는 벡터 pPMC-102FC를 완성하였고(도 3), 경쇄-M15의 아미노산 서열을 서열번호 5에 나타내었으며, 염기서열을 서열번호 6 및 도 3b에 나타내었다. pPMC-102FC를 293T 세포에 PEI 침전법으로 임시 발현을 통하여, 약 8 mg/L의 생산량을 보였고, protein A 레진에 결합한 IgG를 정제한 결과 4.4 mg의 높은 순도의 PMC-102FC를 수득하였다. 이에 대한 환원적, 비환원적 SDS-PAGE 후 Coomassie blue 염색 결과를 도 1c에 나타내었다.

[120] 임의발현 배양을 통해서 확보된 이중표적항체 PMC-102FC는 보다 세밀한 연구를 위해서 MAbSelect Sure(GE health care, 스웨덴)을 패키징한 후 FPLC(fast protein liquid chromatography) 시스템으로 정제하여, 95% 이상 순도의 항체만을 확보하였다(도 1c). 우선, 배양액을 0.45 μ m 필터를 이용하여 불순물들을 걸러내고, 0.1 M NaCl이 포함된 20 mM sodium phosphate(pH 7.0)로 안정화된 protien A 컬럼에, UF(Ultrafiltration)를 거친 배지를 넣은 후, 결합하지 않은 단백질을 동일 버퍼를 사용하여 씻어내고, 다시 한 번 0.5 M NaCl이 포함된 20 mM sodium phosphate(pH 7.0) 버퍼 용액을 이용해서 비특이적으로 protein A 레진에 결합한 단백질을 씻어냈다. Protein-A에 특이적으로 결합하는 단백질은 0.1 M NaCl이 포함된 0.1 M Glycine-Cl(pH 3.5) 버퍼를 사용하여 용출하였으며, 1 M Tris를 이용하여 pH 6.0으로 시료를 중화시켰다.

[121]

[122] 실시예 3 이중표적항체 PMC-102FC의 결합능 시험

[123] PMC-102FC의 VEGFR-2 및 c-Met에 대한 결합능, 친화도, 동시결합 시험

[124] PMC-102FC의 인간 VEGFR-2 및 인간과 마우스 c-Met에 대한 결합능과 해리상수(Kd, dissociation constant), 동시결합을 알아보기 위해 BIACORE 3000(GE Healthcare)을 사용하였으며 CM5 chip을 사용하였다. 해리상수는 Km

값의 유사값으로 효소-기질복합체에서 효소의 기질에 대한 친화성의 지표로 사용되며, 값이 낮을수록 효소와 기질의 친화도가 높은 것을 의미한다.

- [125] 시료의 고정화는 Amine Coupling Kit(GE Healthcare)인 400mM EDC(N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) Carbodiimide), 100mM NHS(N-Hydroxysuccinimide), 1M 에탄올 아민 염화수소(Ethanolamine hydrochloride, pH 8.5)를 사용하며, 재생 버퍼로는 20mM 수산화나트륨, 고정화 버퍼로는 1X PBS에 희석한 후 pH 5.0의 10mM 아세트이트(GE Healthcare)에 분석시료를 1/40으로 희석하였다. 고정화 범위로는 4000RU(Response Unit)에서 고정화시켰다. 분석시료의 흡착성 측정 버퍼는 HBS-EP 버퍼(GE Healthcare)를 사용하였다. 항원으로는 인간 c-Met(hHGFR; R&D Systems)를 측정 농도 각각 7.8nM, 15.6nM, 31.3nM, 62.5nM, 125nM 및 250nM, 마우스 c-Met(mHGFR; R&D Systems)를 측정 농도 각각 0.78nM, 1.56nM, 3.13nM, 6.25nM, 12.5nM 및 25 nM로 HBS-EP 버퍼를 사용하여 최종 부피가 200 μ l가 되도록 단계별 희석하였다. 6개의 농도 중 5개의 농도를 선택하여 fitting하였다. 재생버퍼는 실제 분석하기 전에 예비로 7.8nM 시료를 결합단계, 해리단계를 거친 후 수산화나트륨을 이용 베이스라인(base line)의 + 10% 정도 재생되는지를 확인 후 사용 농도를 선택하였다. 분석 유속은 30 μ l/min이며, 결합 구간은 60초, 해리 구간은 300초로 하여 분석시료의 친화도를 측정하였다.
- [126] 그 결과, VEGFR-2에는 타니비루맵과 PMC-102FC이 비슷한 결합능을 보이는 것을 확인한 반면, 인간과 마우스 c-Met에는 PMC-102FC만이 결합능을 가지고 있는 것을 확인하였다 (도 4a). 또한, VEGFR-2에 대한 양성대조군인 타니비루맵의 경우 VEGFR-2에만 결합하고, c-Met에 대한 양성대조군인 Fc-M15의 경우 c-Met에만 결합하는 것이 확인되었다 (도 4b).
- [127] 각 배치별 친화도를 분석한 결과, 타니비루맵, PMC-102FC의 VEGFR-2과 c-Met 각각에 대한 높은 친화도를 확인하였으며(도 4a), 본 발명의 이중표적항체 PMC-102FC는 VEGFR-2와 c-Met에 동시결합능을 보였다(도 4b).
- [128]
- [129] 실시예 4 이중표적항체 PMC-102FC 처리 후 BxPC3 및 KP4의 증식능 분석
- [130] 본 발명에 따른 이중표적항체 PMC-102FC 처리 후, BxPC3 세포 (ATCC, 미국) 및 KP4 세포(Riken, 일본)의 증식변화를 확인하기 위해서, 세포 증식능 분석을 실시하였다. BxPC3 및 KP4의 배양은 10% 우태혈청(Gibco, 미국)을 첨가한 RPMI-1640 배지(Welgene, 한국)를 사용하였으며, 세포배양은 가습 된 5% CO₂ 혼합공기 조건의 37°C 배양기에서 배양하였다. 증식능 분석을 위해서 1% 우태혈청이 첨가된 RPMI-1640배지에서 각각의 BxPC3 및 KP4 세포를 10 μ g/ml의 PMC-102(기본형), PMC-102FC, 인간 IgG, 음성대조군인 타니비루맵, 양성대조군 Fc-M15 및 최종 2 μ M c-Met 억제제(SantaCruz, 미국)와 혼합하여 20분간 선 처리한 후, 30 ng/ml recombinant human HGF (R&D systems, 미국)을 처리하였다. 항체와 성장인자를 처리한 KP4는 96-웰 플레이트에 2 $\times$ 10³세포/웰의

- 밀도로 72시간 배양 후 WST-8(Dojindo, 일본)을 2~4 시간 처리하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써, 각 조건에서의 세포 증식능을 비교하였다.
- [131] 그 결과, BxPC3에 PMC-102를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였을 때 효과적으로, 세포의 증식을 저해하였다(도 5a). 또, HGF의 자가공급(autocrine) 세포주인 KP4를 사용하였을 때도, 뼈대 항체인 타니비루맵에 비하여 세포의 증식을 저해하였으며, 저해 효과는 c-Met 억제제(SantaCruz, 미국)와 유사하였다(도 5b 및 도 5c).
- [132]
- [133] 실시예 5 이중표적항체 PMC-102FC 처리에 따른 HUVEC의 증식능 분석
- [134] 본 발명에 따른 이중표적항체 PMC-102FC 처리 후, 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)(Lonza, 스위스)의 증식능 변화를 확인하기 위해서, 세포 증식능 분석을 실시하였다.
- [135] HUVEC의 배양은 LifeLine 배지(Vasculife 배지에Lifefactors(rhVEGF, rhIGF-1, rh FGF-B, Ascorbic acid, rh EGF, Heparin, FBS, L-Glutamine, Hydrocort 포함)첨가)(LifeLine, 미국)를 사용하였으며, 세포배양은 가습된 5% CO₂ 혼합공기 조건의 37°C 배양기에서 배양하였다. 혈관내피세포의 생존률 분석을 위해서 이들 세포를 24-웰 플레이트에 2×10⁴ 세포/웰의 밀도로 24시간 배양하였다. 이후, M199 배지로 2회 씻어낸 후, 1% 우태혈청(Hyclone, 미국)이 포함된 M199 배지의 낮은 혈청농도 조건에서 6시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 항체를 세포에 30분간 선 처리한 후, 20 ng/ml VEGF (R&D systems, 미국)을 처리하였다. 48시간 배양 후 WST-8(Dojindo, 일본)을 2시간 처리하여 450 nm 파장에서의 흡광도를 측정함으로써, 각 조건에서의 세포 증식능을 비교하였다.
- [136] 그 결과, HUVEC 세포에 대한 세포 증식능 어세이를 통해서, 이중표적항체 PMC-102FC가 VEGF에 의해 야기되는 HUVEC 세포의 증식능을 모항체인 타니비루맵과 비슷하게 저해하였으며, HGF의 효과도 동시에 차단하여, VEGF와 HGF를 동시에 처리한 경우에도 HUVEC의 증식능을 타니비루맵에 비하여 더욱 강력히 저해할 수 있음을 확인하였다(도 6a 및 도 6b).
- [137]
- [138] 실시예 6 웨스턴 블로팅법을 통한 세포 내 c-Met 또는 VEGFR-2의 인산화 저해
- [139] 6-1. 암세포 특이적 c-Met 인산화 저해
- [140] 본 발명에 따른 이중표적항체 PMC-102FC의 c-Met에 대한 인산화 저해를 확인하기 위해서 웨스턴 블로팅법을 실시하였다. KP4 세포는 10% 우태혈청이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 세포를 6-웰 플레이트에 5×10⁵세포/웰의 밀도로 24시간 동안 배양하였다. 이후 KP4를 우태혈청이 포함되지 않은 RPMI-1640 배지로 바꿔준 후 6시간 동안 배양하고, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 PMC-102FC, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 인간 IgG, 음성대조군 타니비루맵, 양성대조군 Fc-M15을 30분간 선 처리하였다. 이후, 30 ng/ml 제조합 인간 HGF를 15분간 처리하였다.

- [141] 웨스턴블로팅법을 통한 분석을 위해서, 샘플버퍼 (1%(w/v) SDS, 1 mM Na₃VO₄, 1X Protease Inhibitor Cocktail)을 처리하여 용해질을 얻은 후 BCA 정량을 통해 정량하였다. 정량된 용해질에 β -mercaptoethanol을 첨가한 후 10분간 끓여 준비하였다. SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅은 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법을 준용하였으며, 사용된 시료는 다음과 같다: 4-20% SDS-polyacrylamide Gel(BioRad, 미국), PVDF멤브레인(Millipore # IPVH00010, 미국), c-Met 인산화 저해활성 분석을 위한 1차 항체로써 anti-c-Met 항체(Santa Cruz, 미국)와 anti-phospho-Erk 항체, anti-phospho-c-Met 항체(Cell Signaling technology, 미국); anti- β actin 항체(Abfrontier, 한국)와 그리고 화학발광법을 위해 1차 항체와 결합할 2차 항체로써 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체(Santa Cruze Biotechnology, 미국) 및 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology, 미국).
- [142] 그 결과, PMC-102FC은 채장암세포인 KP4세포에서 c-Met의 인산화를 효과적으로 저해할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 7). C-Met의 인산화는 HGF에 의존적으로 진행되기 때문에, 대조군(Mock)의 경우, HGF가 처리된 KP4 세포에서 c-Met 인산화가 확인되었다. 반면 10 μ g/ml 또는 20 μ g/ml PMC-102FC 처리군의 경우, HGF가 처리된 세포에서조차도 c-Met 인산화는 확인되지 않았다.
- [143]
- [144] 6-2. 혈관 내피세포의 c-Met과 VEGFR-2의 인산화 저해
- [145] 웨스턴 블로팅법을 통한 세포내 VEGFR-2 인산화 저해 분석
- [146] 본 발명에 따른 이중표적항체 PMC-102FC의 VEGFR-2 에 대한 인산화 저해를 확인하기 위해서 웨스턴블로팅법을 실시하였다. 이중표적항체 PMC-102FC 처리 후, 혈관내피세포의 세포신호전달의 변화를 확인하기 위해서, 웨스턴블랏을 실시하였다. 24시간 동안 배양된 혈관내피세포(HUVEC)를 1% 우태혈청을 포함하는 M199 배지 조건에서 6시간 배양 후, 10 μ g/ml의 PMC-102FC 항체, 양성 대조군 타니비루맵과 Fc-M15, 음성 대조군 hIgG 항체를 20분간 선 처리하였다. 이후, 10 ng/ml VEGF와 30 ng/ml hHGF를 15분간 처리하여, 세포를 용해시켜 웨스턴블랏에 이용하였다.
- [147] 6-1의 실시예를 준용하되, 1차 항체로써 부가적으로 anti-VEGFR-2 항체(Cell Signaling technology, 미국)를 추가하여 웨스턴 블로팅을 수행한 결과, Fc-M15의 경우 c-Met 활성화만을 저해함으로써, Erk를 부분적으로 저해하는 것처럼 보이지만, VEGFR-2의 인산화는 저해하지 못한 반면, PMC-102FC의 경우 타니비루맵과 동등하거나, 더 효과적으로 VEGFR-2와 Erk의 인산화를 저해할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 8).
- [148]

산업상 이용가능성

[149] 본 발명에 따른 이중표적항체는 혈관신생과 암세포 증식에 관여하는 두 가지 표적을 동시에 중화시킴으로써, 기존의 단일표적 항체에 비해서 뛰어난 중화능을 보일 뿐만 아니라, 암 치료에도 매우 효과적이다. 또한, 기존에 생산이 용이하지 않았던 c-Met 중화활성 도메인을 대량생산할 수 있는 효과를 기대할 수 있다.

[150]

[151] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

서열목록 Free Text

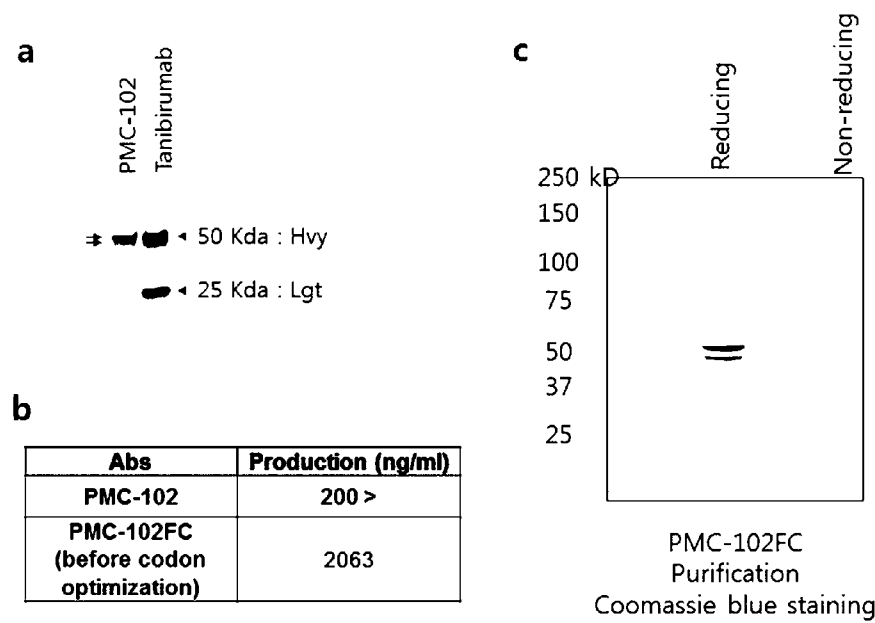
[152] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 경쇄가변영역과 서열번호 2로 표시되는 중쇄가변영역을 가지는 VEGFR-2(Vasicular Endothelial Growth Factor Receptoer-2) 중화항체의 상기 경쇄가변영역 또는 상기 중쇄가변영역의 말단에 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 c-Met(Mesenchymal Epithelial Transition factor) 중화 펩타이드가 결합되어 있는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 VEGFR-2 중화 항체는 scFV(Single Chain Fragment Variable) 또는 IgG인 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 c-Met 중화 펩타이드와 상기 VEGFR-2 중화항체의 경쇄 가변영역 또는 중쇄가변영역은 링커를 통하여 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 이중표적 항체.
- [청구항 4] 상기 c-Met 중화 펩타이드는 상기 VEGFR-2 중화항체의 경쇄 가변영역 또는 중쇄가변영역의 N-말단 또는 C-말단에 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 이중표적 항체를 코딩하는 DNA.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 서열번호 6으로 표시되는 VEGFR-2 중화항체의 경쇄가변영역과 c-Met 중화 펩타이드가 결합된 단편을 코딩하는 DNA와 서열번호 7로 표시되는 VEGFR-2 중화항체의 중쇄가변영역을 코딩하는 DNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.
- [청구항 7] 제5항의 DNA를 함유하는 재조합 벡터.
- [청구항 8] 제7항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [청구항 9] 다음 단계를 포함하는 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체의 제조방법:
(a) 제8항의 숙주세포를 배양하여 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 생성시키는 단계; 및
(b) 상기 생성된 VEGFR-2 및 c-Met에 대하여 결합성을 갖는 이중표적항체를 수득하는 단계.
- [청구항 10] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 이중표적항체를 포함하는 혈관신생억제용 약학조성물.
- [청구항 11] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 이중표적항체를 포함하는 암치료용 약학조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 갑상선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 직장암, 대장직장암, 전립선암,

신장암, 흑색종, 전립선암의 골전이암, 난소암으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

M15 modified from NK-1

```
1   TATGCAGAGG GACAAAGGAA AAGAAGAAAT ACAATTCATG AATTCAAAAA ATCAGCAAGG ACTACCCCTAA TCAAAATAGA TCCAGCACTG AAGATAAAA  
101  CCAAAAAGT GAATACTGCA GACCAATGTG CTAATAGATG TACTAGGAAT AAGGACTTC CATTCACTTG CAAGGCTTTT GTTTTGATA AAGCAAGAAA  
201  ACAATGCTTC TGGTCCCTT TCAATAGCAT GTCAAGTGGG GTGAAAAAAG AATTGCGCA TGAATTGAC CTCTATGAAA ACAAGACTA CATTAGAAC  
301  TGCAATCATG GTAAAGGACG CAGCTACAGG GGAACAGTAT CTATCACCIAA GAGTGGCATC AAATGTCAGC CCTGGASTTC CATGATACCA CAAGAACACA  
401  GCCTTTTCCC TTCGAGCTAT CCGGGTAAAG ACCTACAGGA AAATCTACTGT CGAAATCTTC GAGGGGAAGA AGGGGGACCC TGGTGTTCCT CAAGCAATCC  
501  AGAGGTACGC TACGAAGTCT GTGACATTC TCACTGTTCCT GAAGTTGAAA
```


[Fig. 4]

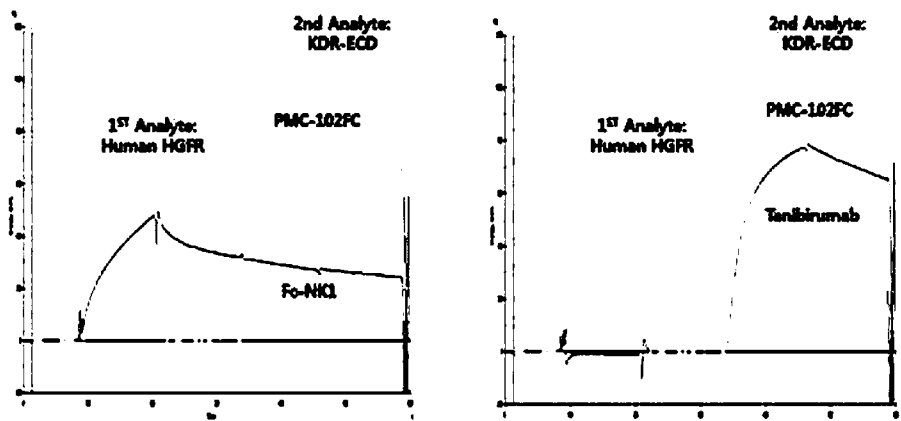
a

Affinity Result

Antibody	Analyte	KD (M)
PMC-102FC	Human c-Met	7.67E-08
	Mouse c-Met	5.28E-10
	VEGFR-2	1.12E-09
Tanibirumab	Human c-Met	-
	Mouse c-Met	-
	VEGFR-2	1.03E-09

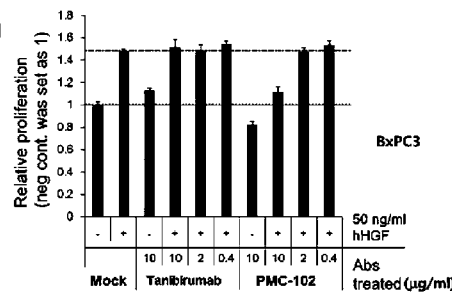
b

Dual binding



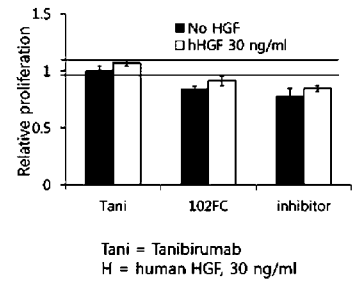
[Fig. 5]

a

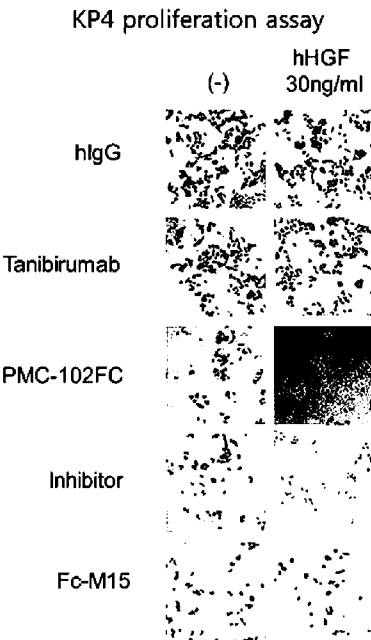


HGF proliferation assay

b

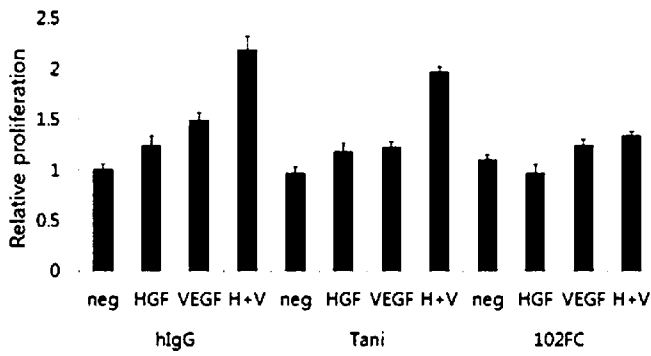


c



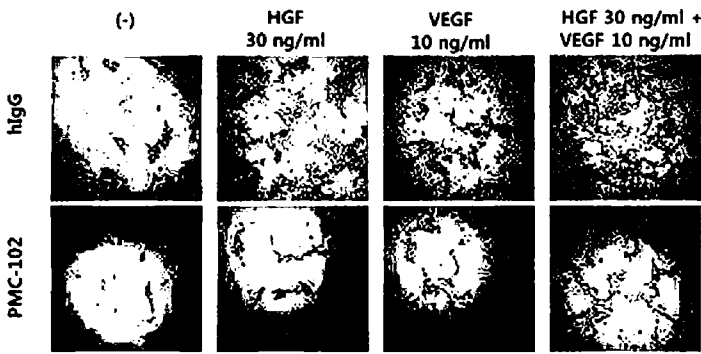
[Fig. 6]

a

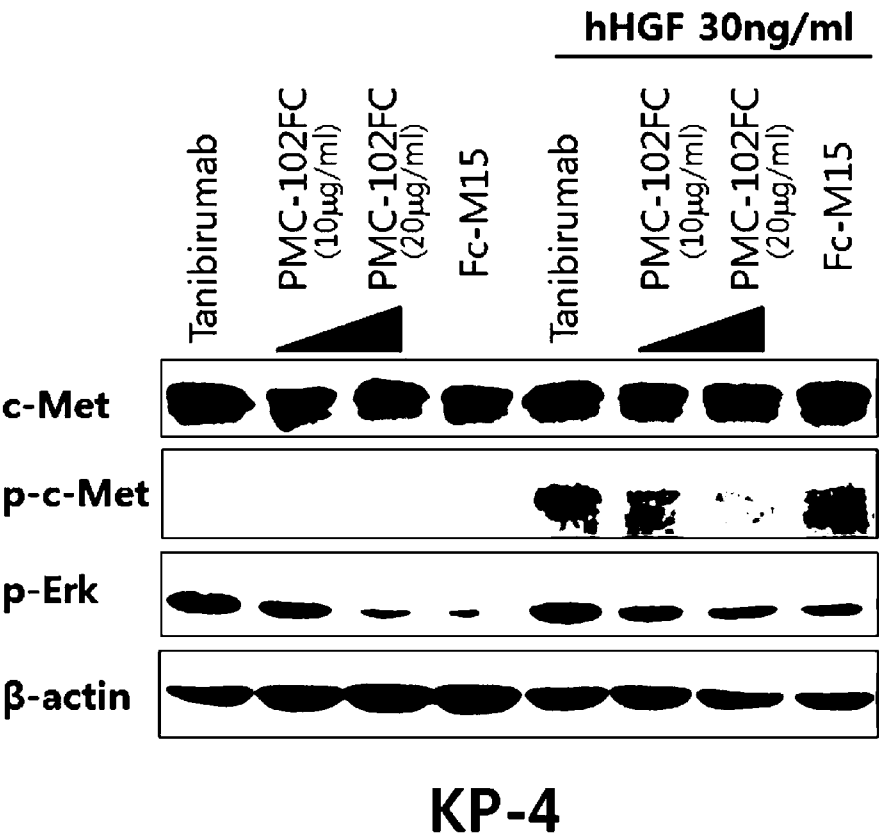


Tani = Tanibirumab
H = human HGF, 30 ng/ml
V = VEGF165, 10 ng/ml

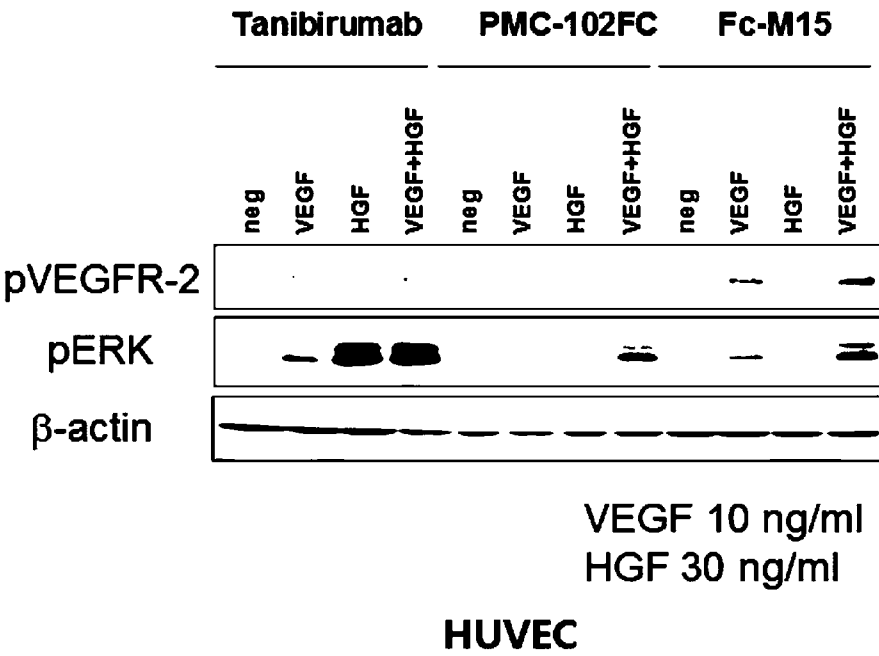
b



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/46(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12P 21/08(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)

C07K 16/28; C07K 19/00; C07K 14/47; C07K 16/46; C07K 16/30; C12N 15/13; C12N 15/62; C12P 21/08; A61K 39/395; 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: bispecific antibody, c-Met, VEGFR-2, angiogenesis, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012-161372 A1 (PHARMABCINE INC. et al.) 29 November 2012 See abstract; paragraph [0012]; and claims 1-18.	1-12
A	KR 10-2005-0045419 A (NATIONAL CANCER CENTER) 17 May 2005 See abstract; and claims 1-7.	1-12
A	NCBI, Genbank accession no. ADW08086.1 (01 March 2011) See the entire document.	1-12
A	KR 10-2010-0125033 A (PHARMABCINE INC.) 30 November 2010 See abstract; and claims 1-18.	1-12
A	WO 2013-033008 A2 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.) 07 March 2013 See abstract; and claim 1.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

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

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 JUNE 2015 (10.06.2015)

Date of mailing of the international search report

10 JUNE 2015 (10.06.2015)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009697

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-161372 A1	29/11/2012	KR 10-2012-0130658 A	03/12/2012
KR 10-2005-0045419 A	17/05/2005	AU 2004-287743 A1	19/05/2005
		AU 2004-287743 B2	09/10/2008
		EP 1694700 A1	30/08/2006
		EP 1694700 B1	11/08/2010
		JP 2007-532097 A	15/11/2007
		JP 4446393 B2	07/04/2010
		US 2007-0036789 A1	15/02/2007
		US 2009-0023894 A1	22/01/2009
		US 7408043 B2	05/08/2008
		WO 2005-044848 A1	19/05/2005
KR 10-2010-0125033 A	30/11/2010	AU 2009-346447 A1	25/11/2010
		EP 2433968 A1	28/03/2012
		JP 2012-527234 A	08/11/2012
		US 2012-0065380 A1	15/03/2012
		WO 2010-134666 A1	25/11/2010
WO 2013-033008 A2	07/03/2013	EP 2748197 A2	02/07/2014
		KR 10-2014-0054268 A	08/05/2014
		US 2014-294834 A1	02/10/2014
		WO 2013-033008 A3	25/04/2013
		WO 2013-033008 A9	13/06/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/46(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12P 21/08(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28; C07K 19/00; C07K 14/47; C07K 16/46; C07K 16/30; C12N 15/13; C12N 15/62; C12P 21/08; A61K 39/395; 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: 이중표적항체, c-Met, VEGFR-2, 혈관신생, 암

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2012-161372 A1 (주식회사 파맙신 등) 2012.11.29 요약; 단락 [0012]; 및 청구항 1-18 참조.	1-12
A	KR 10-2005-0045419 A (국립암센터) 2005.05.17 요약; 및 청구항 1-7 참조.	1-12
A	NCBI, Genbank accession no. ADW08086.1 (2011.03.01) 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-2010-0125033 A (주식회사 파맙신) 2010.11.30 요약; 및 청구항 1-18 참조.	1-12
A	WO 2013-033008 A2 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.) 2013.03.07 요약; 및 청구항 1 참조.	1-12

☐ 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

2015년 06월 10일 (10.06.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 06월 10일 (10.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-161372 A1	2012/11/29	KR 10-2012-0130658 A	2012/12/03
KR 10-2005-0045419 A	2005/05/17	AU 2004-287743 A1	2005/05/19
		AU 2004-287743 B2	2008/10/09
		EP 1694700 A1	2006/08/30
		EP 1694700 B1	2010/08/11
		JP 2007-532097 A	2007/11/15
		JP 4446393 B2	2010/04/07
		US 2007-0036789 A1	2007/02/15
		US 2009-0023894 A1	2009/01/22
		US 7408043 B2	2008/08/05
		WO 2005-044848 A1	2005/05/19
KR 10-2010-0125033 A	2010/11/30	AU 2009-346447 A1	2010/11/25
		EP 2433968 A1	2012/03/28
		JP 2012-527234 A	2012/11/08
		US 2012-0065380 A1	2012/03/15
		WO 2010-134666 A1	2010/11/25
WO 2013-033008 A2	2013/03/07	EP 2748197 A2	2014/07/02
		KR 10-2014-0054268 A	2014/05/08
		US 2014-294834 A1	2014/10/02
		WO 2013-033008 A3	2013/04/25
		WO 2013-033008 A9	2013/06/13