

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2010/134666 A1

(43) 국제공개일
2010년 11월 25일 (25.11.2010)

PCT

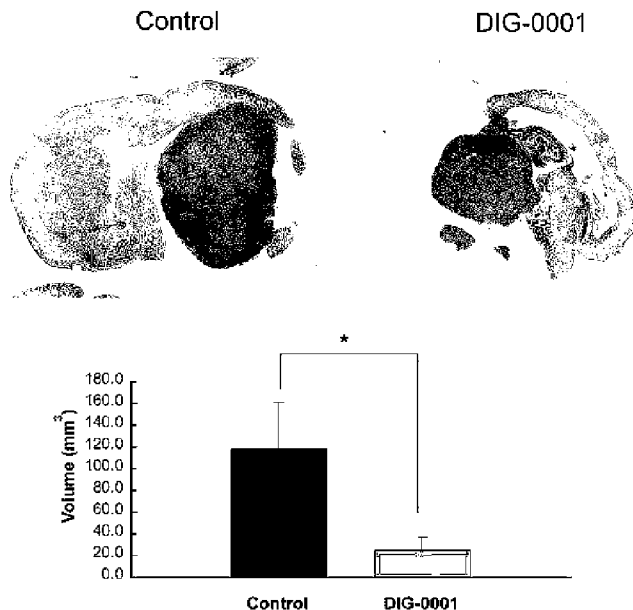
- (51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/004084
- (22) 국제출원일: 2009년 7월 22일 (22.07.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0044032 2009년 5월 20일 (20.05.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **주식회사 파맵신 (PHARMABCINE INC.)** [KR/KR]; 대전 유성구 전민동 461-8 대전바이오벤처타운 412 호, 305-811 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **유진산 (YOO, Jin San)** [KR/KR]; 대전 유성구 원촌동 257-22 사이언스빌 2 동 101 호, 305-370 Daejeon (KR). **이원섭 (LEE, Weon Sup)** [KR/KR]; 대전 유성구 신성동 대림두레아파트 106 동 606 호, 305-720 Daejeon (KR). **김성우 (KIM, Sung Woo)** [KR/KR]; 대전 유성구 신성동 대림두레아파트 106 동 503 호, 305-720 Daejeon (KR). **심상열 (SHIM, Sang Ryeol)** [KR/KR]; 대전 유성구 신성동 140-7 102 호, 305-804 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: **김순웅 (KIM, Soon Woong)**; 서울 구로구 구로동 188-5 키콕스벤처센터 209 호, 152-050 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DUAL TARGETING ANTIBODY OF NOVEL FORM, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규한 형태의 이중표적항체 및 그 용도

[Fig. 10]



(57) Abstract: The present invention relates to: a dual targeting antibody of a novel form having a water-soluble ligand fused to the N-terminal of a heavy chain or light chain of an antibody; a DNA encoding the dual targeting antibody; a recombinant expression vector containing the DNA; a host cell which is transformed with the recombinant expression vector; a method for preparing the dual targeting antibody by culturing the host cell; and a pharmaceutical composition containing the dual targeting antibody.

(57) 요약서: 본 발명은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 수용성 리간드가 융합된 신규한 형태의 이중표적항체, 이 이중표적항체를 코딩하는 DNA, 이 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터, 이 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포 및 이 숙주세포를 배양하여 이중표적항체를 제조하는 방법 및 상기 이중표적항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 형태의 이중표적항체 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 수용성 리간드가 융합된 신규한 형태의 이중표적항체, 이 이중표적항체를 코딩하는 DNA, 이 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터, 이 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포 및 이 숙주세포를 배양하여 이중표적항체를 제조하는 방법 및 상기 이중표적항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 신생혈관형성 (angiogenesis)이라 함은 내피세포의 성장, 분열, 이동 등에 의하여 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 기작으로, 상처의 치유나 여성의 생리주기를 포함하는 정상적인 성장과정에서 중요한 역할을 담당하고 있으며 (Risau, *Nature*, 386:671, 1997), 뿐만 아니라 비정상적으로 과도한 신생혈관형성은 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 질환에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Carmeliet and Jain, *Nature*, 407:249, 2000).
- [3] 1971년 Dr. J. Folkman에 의해, 종양의 성장과 전이는 신생혈관형성 의존적이고, 따라서 항 신생혈관형성에 초점을 맞춘 치료법은 고혈압에 대한 새로운 치료제가 될 수 있을 것이라는 가설이 제기된 이후, 과도한 신생혈관형성 기작의 억제와 관련된 연구는 다수 연구진들의 관심을 끌어들였다 (Ferrara and Kerbel, *Nature*, 435:967, 2005). 신생혈관형성 과정의 진행양상은 신생혈관형성 유발 인자들과 신생혈관형성 저해 인자들의 종합적인 밸런스에 의해서 결정되어지며, 여러 단계의 복잡하고 순차적인 과정에 의해서 진행된다. 그 과정을 살펴보면, 우선 종양이나 상처 난 조직에서 분비되는 혈관내피성장인자 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)를 비롯한 다양한 신생혈관형성 유발 인자들이 주변에 있는 기존 혈관내피세포의 해당 수용체에 결합함으로써, 혈관내피세포들을 활성화시켜 혈관내피세포들의 투과성을 증가시키게 되고, 기저막 단백분해효소 (matrix metalloproteinase, MMP)와 같은 단백질 분해효소를 분비함으로써, 혈관내피세포 주변의 기저막과 세포외기질을 분해시켜, 혈관내피세포들이 기존의 모세혈관으로부터 벗어나 신생혈관형성 유발 인자를 분비하는 조직을 향해 이동·증식하게 된다. 이동·증식한 혈관내피세포들은 혈관 내 튜브 구조를 이루고, 마지막으로 혈관내피세포의 구조적 지지대인 혈관주위세포 (pericyte)가 유입되면서 안정하고 성숙한 혈관형성이 이루어지게 된다. 이때 혈관내피세포로부터 분비되는 엔지오포이에틴 1 (angiopoietin 1,

Ang1)은 그것의 수용체인 Tie-2와 결합함으로써, 혈관주위세포의 유입과 혈관의 안정화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Suri *et al.*, *Cell*, 87:1171, 1996). 한편, Ang1과 Tie-2의 상호작용을 저해하는 길항자 (antagonist)로써 알려져 있는 엔지오포이에틴 2 (angiopoietin 2, Ang2)는 Tie-2에 대하여 Ang1과 비슷한 수준의 친화도를 나타내고 있기 때문에, Ang1에 의해서 유도되는 Tie-2의 인산화과정을 경쟁적으로 저해할 수 있다 (Maisonpierre *et al.*, *Science*, 277:55, 1997). 하지만, Ang2의 기능은 세포의 형태나 실험방식에 따라 Tie-2의 인산화를 유도하기도 하는 것으로 보고된 바 있으며 (Kim *et al.*, *Oncogene*, 19:4549, 2000), 신생혈관형성 초기단계에서 혈관내피세포와 혈관주위세포 사이의 상호작용을 저해함으로써, 혈관을 불안정하게 만들고, VEGF와 같은 자극에 대해서 혈관내피세포를 민감하게 만드는 것으로도 보고된 바 있다 (Klagsbrun and Moses, *Chem. Biol.*, 6:R217, 1999; Veikkola and Alitalo, *Semin Cancer Biol.*, 9:211, 1999; Carmeliet and Jain, *Nature*, 407:249, 2000). 특히, Ang1의 경우 정상조직에서 비교적 광범위하게 발현되어지고 (Maisonpierre *et al.*, *Science*, 277:55, 1997), 종양조직에서는 발현이 높지 않은 경향 (Hayes *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:1154, 2000)을 보이는 반면, Ang2는 혈관신생형성 정도가 큰 암 조직이나 혈관 리모델링이 활발한 정상조직인 태반, 자궁, 난소 등에서 과발현 양상을 보인다는 사실은 (Kong *et al.*, *Cancer Res.*, 61:6248, 2001; Ahmad *et al.*, *Cancer*, 92:1138, 2001) 상대적으로 Ang2가 Ang1 보다 높아지는 경우, 결과적으로 종양 신생혈관형성의 시작을 개시하는 것으로 추정케 하고 있다. 따라서, Ang2가 Tie-2 신호전달 기작에 있어서 작용자 (agonist)로써의 역할도 가능한 것으로 추측되고 있으며 종합해 볼 때, 엔지오포이에틴과 Tie-2의 신호전달 기작은 아직 명확하게 규명되어 있지 않아 추가적인 연구가 필요한 것으로 보이지만, Ang1과 Ang2는 신생혈관형성에 중요하면서도, 서로 다른 역할을 수행하는 것으로 해석되어지고 있다.

- [4] 엔지오포이에틴은 약 50개의 아미노산으로 구성된 N-말단 도메인 (N-도메인)과 215개의 아미노산으로 구성된 coiled coil 도메인 (C-도메인) 그리고 약 215개의 아미노산으로 구성된 Fibrinogen-like domain (F-도메인)으로 구성되어 있으며, 이중 N- 및 C-도메인은 엔지오포이에틴의 다중체 형성에 관여하며, F-도메인은 수용체인 Tie-2 결합에 관여한다 (Davis *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 10:38, 2003). Tie-2의 신호가 작동하기 위하여 필요한 인산화는 다른 타이로신 카이네이즈 수용체처럼 수용체의 이중화 (dimerization)를 통해서 이루어지며, 이를 위해서는 엔지오포이에틴이 다중화 (multimerization)되어야 한다는 사실 (Procopio *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:30196, 1999; Schlessinger, *Cell*, 103:211, 2000)은 신생혈관형성 저해를 이용하는 신약개발 전략의 표적으로서, 이들 리간드가 이용될 수 있음을 시사하고 있다. 특히, Davis *et al.*은 Tie-2의 인산화를 위한 엔지오포이에틴의 최소 모듈은 유전공학적 방법을 통해서 확인한 결과, 테트라머 (tetramer)이며, 다이머 (dimer)로 모듈을 구성한 경우

길항제로써 사용될 수 있다고 주장한 바 있다 (Davis *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 10:38, 2003). 또 다른 연구에서도 Ang1 다이머 변이체는 Tie-2에 대한 신호전달을 효과적으로 진행시키지 못한다는 사실이 보고된 바 있다 (Cho *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:5547, 2004). 다시 말해서, Ang1이 길항제로써의 역할이 보고된 바 없음에도 불구하고, 이 분자의 올리고머 패턴을 변형시킴으로써 Tie-2에 대한 신호전달을 저해한 것은, 결국 엔지오포이에틴의 다중화 (multimerization)를 막는 전략이 Tie-2 신호전달기작을 막을 수 있는 방안이 될 수 있음을 시사하고 있다. 보고된 엔지오포이에틴과 Tie-2와의 결합 구조에 따르면, 엔지오포이에틴내의 Tie-2 결합부위를 확인할 수 있으며 Ang1 및 Ang2와 Tie-2간의 결합구조가 유사함을 확인할 수 있다 (Barton W.A. *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 13:524, 2006). 따라서 본 연구진은 엔지오포이에틴, 특히 본 발명에서는 Ang2의 Tie-2 결합부위를 기존항체에 융합시킨 이중표적항체를 제작함으로써, 신생혈관형성을 효과적으로 억제하고자 하였다.

- [5] 한편, 신생혈관형성을 억제하기 위한 또 다른 표적으로 본 발명에서는 VEGF/VEGFR 신호전달 기작을 주시하였다. 신생혈관형성 과정의 대부분의 단계에서 커다란 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 VEGF는 종양조직 부위의 저산소 (hypoxia) 지역에서 광범위하게 분비된다. VEGF는 1989년 제넨텍 (Genentech)사의 Dr. N. Ferrara 그룹에 의해서 단백질의 분리·정제 및 cDNA 클로닝이 이루어졌다 (Leung *et al.*, *Science*, 246:1306, 1989). VEGF-A라고도 불리는 VEGF는 현재까지 4개의 이소형 (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆)이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 그 가운데 VEGF₁₆₅는 태반을 제외한 모든 인간조직에서 가장 풍부한 것으로 보고된 바 있다 (Tisher *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:11947, 1991). VEGF는 그것의 수용체인 VEGFR-1과 VEGFR-2에 매우 높은 친화도를 가지고 결합하지만, 주로 VEGFR-2을 통해서 그것의 신호를 전달함으로써, 혈관내피세포의 증식과 이동 등의 신생혈관형성과 관련된 기작을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유에서, VEGF 및 VEGFR-2은 VEGF에 의해 유도되는 신생혈관형성 기작을 억제하기 위한 주요 표적이 되어왔으며, 이와 관련해서 다수의 논문이 이들을 다루고 있다 (Ellis and Hicklin, *Nature Rev. Cancer*, 8:579, 2008; Youssoufian *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 13:5544s, 2007). 가령, 제넨텍사의 아바스틴 (Avastin)은 VEGF-A를 표적으로 하는 인간화항체 (Ferrara *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 333:328, 2005)로서, 2004년에 전이성 대장암 (metastatic colorectal cancer), 2006년에 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer), 그리고 2008년에 Her-2 negative 전이성 유방암 (metastatic breast cancer)에 대하여 각각 미국 FDA 승인을 얻어 시판 중에 있으며, 현재에도 적응증을 확대하기 위해 다양한 고형암종에 대해서 임상시험을 진행 중에 있다. 뿐만 아니라 같은 회사에서 출시된 루센티스 (Lucentis)는 노인성 황반변성의 주 양상인 황반주위의 과도한 신생혈관형성을 억제하기 위해서, 망막에 주사하였을 때, 그것의 투과성을 좋도록 만들기 위해서

아바스틴으로부터 Fab 절편만을 잘라내어 제조된 항체로서 (Eter *et al.*, *Biodrgus*, 20:167, 2006), 습성 연령관련 황반변성 (wet-ARMD)에 대한 치료약으로서, 2006년에 미국 FDA 승인을 획득한 바 있다. VEGF를 표적으로 하는 또 다른 치료용 항체로는 리제네론 (Regeneron)사의 VEGF-trap이 있다 (Holash *et al.*, *PNAS*, 99:11393, 2002). 이것은 VEGFR-1의 두 번째 면역글로불린 도메인과 VEGFR-2의 세 번째 면역글로불린 도메인을 인간의 Fc에 융합한 형태의 수용성 ‘미끼수용체 (decoy receptor)’로, 아직 미국 FDA 승인을 얻지 못했지만, 전이성 유방암과 전이성 폐암, 전이성 대장암 그리고 호르몬 비의존성 전립선암 (hormone refractory prostate cancer) 등에 대해서 현재 Phase III 단계를 진행 중에 있다.

- [6] 한편, VEGF 수용체인 VEGFR-2을 표적으로 하는 신생혈관형성 억제 항체에는 임클론 (Imclone)사의 IMC-1121B (EP 1916001A2)와 UCB사의 CDP-791 (PCT/GB02/04619), 그리고 본 연구진이 개발한 TTAC-0001 (PCT/KR07/003077) 등이 있다. IMC-1121B는 완전인간 Fab 라이브러리로부터 선별된 단일클론항체로서, 현재 전이성 유방암에 대해서 Phase III 단계를 진행 중에 있으며, 2009년에 위암에 대해서 Phase III 진입을 계획 중이다. UCB사의 CDP-791은 인간화항체로서, PEGylated Di-Fab 형태로 비소세포성 폐암에 대해서 현재 Phase II 단계를 진행하고 있다. 이 항체는 Fc를 가지고 있지 않기 때문에 항체의존적세포독성 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)이나 보체의존적독성 (complement-dependent cytotoxicity)을 기대할 수 없다. 마지막으로 본 연구진이 개발하여, 현재 전임상 단계에서 연구 중인 TTAC-0001은 완전인간 ScFv 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(PCT/KR07/003077). 특히, TTAC-0001이 보여주는 이종간 교차반응성 (cross-species cross reactivity)은 동물질환모델에 대한 연구를 가능케 함으로써, 향후 특정 암종에 대한 항암제 개발을 단계적으로 진행시켜 관련 연구를 보다 수월하게 마치도록 도움을 줄 수 있다.

- [7] 이처럼 VEGF 및 VEGFR-2을 표적으로 하는 연구는 최근 5년간 비약적으로 발전하여, 다수의 치료제가 시장 및 임상연구를 통해서 개발되어지고 있다. 신생혈관형성 억제를 통한 치료용 항체를 개발하는 것 이외에도, 질환별 단일 표적에 대한 다수의 항체 치료제가 FDA 허가를 얻어 시판되고 있는데 가령, 상피세포성장인자 수용체 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)를 표적으로 하여, 전이성 대장암 치료제로 출시 중인 임클론사의 Eribitux나 Her-2/neu를 표적으로 하여 전이성 유방암 치료제로 출시 중인 제넨텍사의 Herceptin, 그리고 CD-20를 표적으로 하여 비호즈킨성 림프종 치료제로 사용 중인 Rituxan™ 등은 전 세계 단일클론항체 시장을 이끄는 주요한 항체 치료제들이다.

- [8] 한편, 최근의 항체 시장동향은 단일 표적에 대해 기능성을 가지는 항체를 개발하는 것 이외에도, 두 가지 또는 그 이상의 표적을 동시에 취할 수 있는, 이른바 이중표적항체 (bispecific antibody) 또는 다중표적항체 (multi-specific antibody) 관련 연구가 활발히 진행되고 있다 (Van Spriël *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 이 부류에 속하는 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 있다.
- [9] 첫째, ScFv를 기반으로 하는 다중표적항체의 경우, 상이한 ScFv들의 V_L 과 V_H 를 각기 서로 조합하여 얻은, 혼성 ScFv를 heterodimeric 형태로 만든 디아바디 (diabody)가 있다 (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:6444, 1993). 하지만, 이 형태의 항체는 heterodimer의 결합력이 약해서 안정성이 떨어지는 단점이 있다. 또한, 상이한 ScFv를 서로 연결해서 얻은 tandem ScFv (Kipriyanov *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 293:41, 1999; Robinson *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 99:1415, 2008), 상이한 ScFv 말단에 상호간 결합능이 있는 Jun과 Fos를 각각 발현시켜서 얻은 heterodimeric ScFv (De Kruif and Logtenberg, *J. Biol. Chem.*, 271:7630, 1996), Fab의 C_{H1} 과 C_L 을 각각의 ScFv의 말단에 발현시켜 얻은 heterodimeric 미니항체 (miniantibody) (Muller *et al.*, *FEBS lett.*, 432:45, 1998), 그리고 Fc의 homodimeric 도메인인 C_{H3} 도메인의 일부 아미노산을 치환하여 'knob into hole' 형태의 heterodimeric 구조로 변경시켜, 이들 변경된 C_{H3} 도메인을 상이한 각각의 ScFv 말단에 발현시킴으로써 heterodimeric ScFv형태의 미니바디 (minibody)를 제조하는 방법 등이 보고된 바 있다 (Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:677, 1998). 이외에도 ScFv를 기반으로 하는 다양한 유사체들이 학술적으로 보고된 바 있으며 (Kipriyanov and Le Gall, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 7:233, 2004), 트리아바디 (triabody)를 이용한 삼중표적 또는 테트라바디 (tetrabody)를 이용한 사중표적 ScFv도 학계에 보고된 바 있다 (Hudson and Kortt, *J. Immunol. Methods*, 231:177, 1999).
- [10] 둘째로, Fab을 기반으로 하는 다중표적항체의 경우, 특정 항원에 대한 개별 Fab'을 이황화결합 또는 매개체를 이용해서 서로 조합하여 얻은 heterodimeric Fab (Brennan *et al.*, *Science*, 229:81, 1985; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547, 1992)의 형태가 대부분을 차지한다. 한편, 특정 Fab의 중쇄 또는 경쇄의 말단에 상이한 항원에 대한 ScFv를 발현시킴으로써 항원 결합가 (antigen valency)를 2개로 만든다거나 (Schoonjans *et al.*, *J. Immunol.*, 165:7050, 2000; Lu *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 267:213, 2002), Fab과 ScFv 사이에 경첩부위 (hinge region)를 둠으로써, homodimeric 형태로 4개의 항원결합가를 가지도록 만든 이중표적항체도 보고된 바 있다 (Coloma and Morrison, *Nat. Biotechnol.*, 15:159,

1997). 또한, Fab의 경쇄말단과 중쇄말단에 상이한 항원에 대한 ScFv를 융합시킴으로써 항원에 대한 결합가를 3개로 만든 이중표적 바이바디 (bibody)와 Fab의 경쇄말단과 중쇄말단에 상이한 ScFv를 각각 융합시킴으로써, 항원에 대한 결합가를 3개로 가지도록 한 삼중표적 바이바디 또한 학계에 보고된 바 있으며 (Schoonjans *et al.*, *J. Immunol.*, 165:7050, 2000), 상이한 Fab 3개를 화학적으로 접합시킴으로써 얻어진 간단한 형태의 삼중표적항체 F(ab')₃도 보고된 바 있다 (Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147:60, 1991).

- [11] 셋째로, IgG를 기반으로 하는 다중표적항체의 경우, 트리온파마(Trion Pharma)사가 마우스와 랫트 하이브리도마를 하이브리드함으로써, 이중표적항체를 생산하는 하이브리드 하이브리도마, 일명 쿼드로마 (quadromas)를 얻었다. 이 회사의 이중표적항체 Ertumaxomab (항원: Her-2/neu, CD3)은 전이성 유방암에 대해서 Phase II에 진입해 있으며 (Kiewe and Thiel, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 17:1553, 2008), Catumaxomab (항원: EpCAM, CD3)은 위암과 난소암에 대해서 Phase II, 악성복수 (malignant ascites)에 대해서 Phase III에 진입해있다 (Shen and Zhu, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 10:273, 2008). 다만, 이 항체들은 반복된 투여로 인한 HAMA (human anti-mouse antibody) 또는 HARA (human anti-rat antibody) 반응을 배제할 수 없다. 한편, 경쇄부분은 공유하면서, 상이한 중쇄에 대해서 Fc의 C_{H3} homodimeric 도메인의 일부 아미노산을 변형시켜 heterodimeric 형태로 제작한 이른 바 'Holes and Knob' 형태의 이중표적항체도 보고되었다 (Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:677, 1998). Heterodimeric 형태의 이중표적항체 이외에, 상이한 2종의 ScFv를 IgG의 경쇄와 중쇄의 variable 도메인 대신 constant 도메인에 각각 융합 발현시켜 homodimeric 형태의 (ScFv)₄-IgG (항원: EGFR, IGF-1R)로 발현시킨 사례가 보고된 바 있다 (Lu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279:2856, 2004). 하지만, 이 항체의 경우 생산성이 현저히 낮은 것이 문제점으로 대두되었으며, 이에 동일 연구그룹에서 (ScFv)₄-IgG를 보완하여 동일 표적에 대해서 생산성을 향상시킨 디-디아바디 (di-diabody)를 제작하여 그 가능성을 확인하였다 (Lu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280:19665, 2005). 하지만, 이 형태의 항체는 디아바디 자체의 문제점인 안정성이 떨어지는 단점을 극복하지는 못했다. 또한, 임클론사의 Shen *et al.*이 인간 VEGFR-2에 대한 chimeric 단일클론항체인 IMC-1C11을 기반으로하여, 이 항체의 경쇄 아미노 말단에 마우스 혈소판유도성장인자수용체-알파 (Platelet-derived Growth Factor Receptor- α , PDGFR- α)에 대한 single variable domain만을 융합시켜 이중표적항체를 제작하여 그 가능성을 보고하였다 (Shen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:10706, 2006; Shen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 318:65, 2007). 최근에 Rossi *et al.*은 단백질 카이네이즈 A (protein kinase A, PKA) R 서브유닛의 dimerization and docking domain (DDD)과 PKA의 anchoring domain을 이용한 이른 바 'dock and lock (DNL)'이라 불리는 방법을 통해서 CD20에 대한 다수의 항원결합가를 지니는 항체를 선보인 바 있으며 (Rossi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:6841, 2006; Rossi *et al.*,

Cancer Res., 68:8384, 2008), 동일 연구그룹에서 그러한 기술을 바탕으로 한 이중표적항체를 보고한 바 있다 (Chang *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 13:5586, 2007). DNL 방법을 이용하는 항체는 적용이 간편하고, 모듈 형식이라 다양한 조합이 가능하며, 생체내 안정성이 우수하다는 장점을 지니지만, 생체내 단백질 분해효소에 의한 분해가 있을 수 있으며, 면역원성 관련 문제가 있을 수 있다고 알려져 있다.

- [12] 지금까지 학술적으로 보고된 이중표적 또는 다중표적항체들은 다수가 존재하지만, 사용목적에 따른 형태학적 특징에 따라 저마다 기능상의 장단점을 보여 왔다. 특히, 암을 치료하기 위한 치료용 이중표적 및 다중표적항체의 개발 관련 연구는 치열하게 진행되고 있는 상황이다. 하지만, 이러한 연구를 통해 얻어진 항체가 제대로 그 기능을 나타내기 위해서는 무엇보다도 동시 표적으로 하는 항원에 대한 선택이 매우 중요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 이에, 본 발명자들은 신생혈관형성 억제를 통한 항암치료용 이중표적항체 개발을 위해서, 신생혈관형성 기작의 전후과정에서 밀접히 관여하는 두 수용체, VEGFR-2 및 Tie-2를 동시에 중화시킬 수 있는 이중표적항체를, 기존에 보고되지 않은 새로운 형태로 제작함으로써, 상기 항체가 VEGFR-2 또는 Tie-2에 대한 단일표적항체에 비해서 세포 수준에서 뿐만 아니라 생체 내에서도 대등하거나 보다 우수한 항암효과를 나타내는 것을 확인하고서 본 발명을 완성하게 되었다.
- [14] 본 발명의 한 목적은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 수용성 리간드가 융합된 신규한 형태의 이중표적항체를 제공하는데 있다.
- [15] 본 발명의 다른 목적은 상기 이중표적항체를 코딩하는 DNA를 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 DNA를 포함하는 제조합 발현 벡터를 제공하는데 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공하는데 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 숙주세포를 배양하여 이중표적항체를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 이중표적항체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [20] 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 수용성 리간드가 융합된 신규한 형태의 이중표적항체에 관한 것이다.
- [21] 본 발명의 명세서에 사용된 용어 '항체'는 다양한 종류의 항원을 특이적으로 인식하도록 B 세포에 의해 생성되고 B 세포의 항원 수용체 역할을 하는 단백질을

분자를 가리킨다. 이 분자는 Y 모양으로 두 개의 동일한 경쇄와 두 개의 동일한 중쇄로 구성된다. 경쇄와 중쇄 모두는 가변 및 고정 영역을 포함한다. 4개의 쇠는 힌지 영역이라고 하는 중쇄의 플렉서블 영역(flexible region)에 위치한 디설파이드 결합에 의해 함께 고정되어 있다. 중쇄와 경쇄 모두의 가변 영역은 결합하여 두 개의 동일한 항원-결합 부위를 형성한다. 중쇄 고정 영역에 의해 A(IgA), D(IgD), E(IgE), G(IgG) 및 M(IgM)인 다섯 개 부류로 나누어진다. 각각의 부류는 이소타입이라고 하며 독특한 구조적 특징과 상이한 생물학적 특성을 갖고 있다. 본 발명에서는 모든 이소타입의 항체를 포함하며, 바람직하게는 IgG를 이용하는 것이다.

[22] 본 발명의 항체는 이에 제한되는 것은 아니지만, 종양 세포(neoplastic cell), 암 기질 세포(cancer stromal cell), 종양 연관 내피세포(tumor associate endothelial cell), 종양 연관 내피 전구세포(tumor associated endothelial progenitor cell), 종양 연관 순환 내피세포(tumor associated circulating endothelial cell), 순환 종양세포(circulating tumor cell), 암 줄기세포(cancer stem cell) 등에서 특이적으로 발현하는 항원에 대한 항체인 것이 바람직하다.

[23] 보다 구체적으로는, VEGFR-1(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1), VEGFR-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2), VEGFR-3(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3), FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3), c-FMS/CSF1R(Colony Stimulating Factor 1 Receptor), RET(Rearranged during Transfection), c-Met(Mesenchymal-Epithelial Transition Factor), EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor), Her2/neu, HER3, HER4, FGFRs(Fibroblast Growth Factor Receptor), IGFR(Insulin-like growth factors receptor), PDGFR(Platelet-Derived Growth Factor Receptors), c-KIT(stem cell factor receptor), BCR(Breakpoint cluster region), 인테그린(Integrin), MMPs(Matrix metalloproteinases) 등 세포 표면에 발현하는 단백질에 대한 항체이지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

[24]

[25] 본 발명에서 항체는 '다클론' 또는 '단클론' 항체일 수 있으나, 단클론 항체가 보다 바람직하다. 단클론 항체는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 말하는데, 즉 이러한 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 단일 항원성 부위에 대해 고도로 특이적이다. 더욱이, 상이한 에피토프에 대한 상이한 항체를 포함하는 다클론 항체와는 반대로, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 에피토프에 대해 유도된다. 단클론은 임의의 특정한 방법으로 항체를 생성하는 것을 필요로 한다는 의미로 해석되어서는 안된다. 예를 들면, 본 발명에서 유용한 단클론 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495(1975)]에 기재된 하이브리도마 방법으로 제조하거나, 재조합 DNA 방법 [미국특허 제4,816,567호 참조]으로 제조할 수 있다. 또한, 단클론 항체는 예를 들면 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991); Marks et al., J. Mol. Biol.,

222:581-597(1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수도 있다.

- [26] 본 발명의 항체는 '인간화 항체'인 것이 바람직하다. 인간화 항체란, 비인간 상보성 결정 영역(CDR)을 보유하는 항체의 서열을 변경시킴으로써 일부 또는 전체가 인간 항체 배선(germline)으로부터 유도된 아미노산 서열로 구성된 항체를 의미한다. 이러한 변경법으로 가장 간단한 것은 단순히 쥐과 불변 영역을 인간 항체의 불변 영역으로 치환하는 것이며, 이것으로 제약상 용도에 허용가능할 만큼 면역원성이 충분히 낮을 수 있는 인간/쥐과 키메라가 생성된다. 그러나, 항체의 가변 영역 및 심지어는 CDR도 현재 당업계에 공지된 기술을 사용하여 인간화하는 것이 바람직하다. 비인간 CDR을 실질적으로 무손상으로 유지하거나 CDR을 인간 게놈에서 유도된 서열로 대체하면서, 가변 영역의 프레임워크 영역을 상응하는 인간 프레임워크 영역으로 치환한다. 완전한 인간 항체는 면역 시스템이 인간 면역 시스템이 상응하도록 변경된 유전적으로 변형된 마우스에서 생성된다.

- [27] 본 발명의 항체는 '인간 항체'인 것이 특히 바람직하다. 인간 항체는 인간에 의해 생산된 항체 또는 인간 항체를 제조하기 위한 기술 중 임의의 기술을 이용하여 제조한 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 인간 항체는 당업계에 알려진 다양한 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 항체는 인간 항체를 발현하는 파지 라이브러리로부터 선별한다(Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314(1996); Sheets et al. *PNAS (USA)* 95:6157-6162(1998); Hoogenboom and Winter, *J.Mol.Biol.* 227:381(1991); Marks et al. *J.Mol.Biol.* 222:581(1991)). 인간 항체는 내재 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 형질전환 동물, 예를 들어, 마우스 내에 인간 면역글로불린 좌위를 도입함으로써 제조할 수도 있다. 챌린지시, 유전자 재배열, 어셈블리 및 항체 레파토리를 비롯한 모든 점에서 인간에서 보여지는 것과 매우 유사한 인간 항체의 생성이 관찰된다. 이 방법은 예를 들어, 미국특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호 및 문헌[Marks et al. *Biotechnology* 10:779-783(1992); Lonberg et al. *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild et al. *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Lonberg and Huszar, *Intem. Rev. Immunol.* 13: 65-93(1995)]에 기재되어 있다. 별법으로, 인간 항체는 표적 항원에 대해 유도된 항체를 생산하는 인간 B 림프구(예컨대, B 림프구는 개체로부터 회수하거나 시험관내에서 면역화시킬 수 있음)의 불멸화를 통해 제조할 수 있다(Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss, p.77(1985); Boerner et al. *J.Immunol.*, 147(1):86-95(1991); 및 미국특허 제5,750,373호).

- [28] 본 발명의 명세서에 사용된 용어 '수용성 리간드'는 세포에 존재하는 특히,

세포 표면에 존재하는 수용체에 특이적으로 결합하는 단백질로 물에 용해될 수 있는 수용성 특성을 나타내는 단백질의 전체 또는 일부를 의미한다. 수용성 리간드는 예를 들면, VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), EGF(Epidermal Growth Factor), PlGF(Placenta Growth Factor), FGF(Fibroblast Growth Factor), PDGF(Platelet-derived Growth Factor), HGF(Hepatocyte Growth Factor), 엔지오포이에틴(Angiopoietin) 등이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[29]

[30] 본 발명의 신규한 형태의 이중표적항체에서 항체와 리간드는 각각의 고유한 역할을 그대로 발휘한다. 단, 이중표적항체의 경우 두 개의 신호를 동시에 억제 또는 증폭시킬 수 있기 때문에 하나의 신호를 억제/증폭하는 경우보다 더욱 효과적일 수 있으며, 각각의 신호를 각각의 신호억제제로 처리했을 경우와 비교하면, 저용량 투약이 가능하며, 동일한 시간 및 공간에서의 두 개의 신호를 억제/증폭시킬 수 있다.

[31] 본 발명에서는 항체와 수용성 리간드를 링커(linker)를 통해 융합시키는 것이 바람직하다. 본 발명에서 '링커'는 융합 단백질의 두 부분을 연결하는 펩티드 단편을 말한다. 본 발명에 적합한 링커는 5 내지 25개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 20개의 아미노산, 더욱 바람직하게는 10 내지 15개의 아미노산을 가지는 펩티드를 포함한다.

[32]

[33] 본 발명의 이중표적항체를 제조하기 위해, 이 이중표적항체를 코딩하는 핵산 서열을 제조한다. 상기 핵산 서열은 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 핵산 서열의 5' 말단에 수용성 리간드를 코딩하는 핵산 서열의 3' 말단을 융합시킴으로써 작제할 수 있다. 한 양태로서, 링커를 통해 융합된 이중표적항체를 코딩하는 핵산 서열은 프라이머에 링커의 핵산 서열이 포함되도록 설계한 후 PCR을 수행함으로써 수득할 수 있다.

[34] 상기에서 제조된 이중표적항체 코딩 유전자를 벡터에 삽입하여 제조할 발현 플라스미드를 제조한 후, 이 플라스미드를 숙주세포에 도입하여 형질감염체 또는 형질전환체를 제조하고, 이 세포를 증폭 배양하여 생성된 이중표적항체는 분리 정제함으로써 목적하는 이중표적항체를 얻을 수 있다.

[35] 본 발명에서, 이중표적항체 발현에 사용되는 숙주세포는 원핵 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 또한, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 이, 콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프레라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충세포, 차이니스 햄스터 난소 세포(CHO) 및 마우스 세포와 같은 동물세포, COS1, COS7, 사람 태아신장 293 세포(human embryonic kidney cells), BSC 1, BSC 40 및 BMT 10과 같은 아프리카 그린 원숭이 세포, 및 조직 배양된 인간 세포가 사용될 수 있는 숙주세포의 예이다.

[36] 본 발명에서, 이중표적항체를 발현하기 위해 매우 다양한 발현숙주/벡터

조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스를 포함한다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pBluescript, pGEX2T, pUC, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같은 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10과 λ 11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lamda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.

[37] 제조합 발현 벡터의 숙주세포로의 형질전환은 예를 들면, DEAE-덱스트란 매개 형질전환(DEAE-dextran mediated transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transduction), 칼슘 포스페이트 형질전환(calcium phosphate transfection), 양이온 지질-매개 형질전환(cationic lipid-mediated transfection), 스크래프 로딩(scrape loading) 및 감염(infection) 등이 포함된다.

[38] 본 발명에서 숙주세포는 적절한 배지와 이중표적항체의 발현 및/또는 분리되는 것을 허용하는 조건 하에, 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 혹은 대규모 발효, 셰이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지된 기술을 사용해서 탄소, 질소 공급원 및 무기염을 포함하는 적합한 배양 배지에서 진행한다. 적합한 배지는 상업적으로 입수 가능하고, 예를 들면, ATCC(American Type Culture Collection)의 카탈로그 등에 기재된 성분 및 이들의 조성 비율에 따라 만들 수 있다.

[39] 이러한 배양물로부터 이중표적항체는 당업계에 공지된 방법에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 이중표적항체는 이에 제한되는 것은 아니지만, 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상의 방법에 의해서 배양물로부터 분리될 수 있다. 더 나아가, 이중표적항체는 크로마토그래피(예, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해도(예, 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

[40] 본 발명의 조성물은 특정 분자에 적합한 임의의 경로에 의해 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임의의 적절한 수단을 이용하여 인간을 포함한 동물에게 직접적으로(예컨대, 주사, 피하주입 또는 조직 위치에서의 국소적 투여와 같이 국소적으로) 또는 전신적으로(예컨대, 비경구 또는 경구적으로) 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물이 비경구, 예컨대 정맥, 피하, 눈, 복강, 근육내, 구강, 직장, 질, 안와내, 대뇌내, 척수내, 심실내, 초내, 조내, 낭내, 비강내, 또는 연무질 투여에 의해 제공될 경우, 조성물은 수성 또는 생리적 화합성인 유체 현탁액 또는 용액 부분을 포함하는 것이 바람직하다. 그러므로, 담체 또는 부형제는 생리적으로 허용가능한 것이어서, 원하는 조성물을 환자에게 전달하는 것 외에도, 환자의 전해질 및/또는 부피 균형에 불리한 영향을 미치지 않아야 한다.

- [41] 본 발명의 이중표적항체를 함유하는 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등 경구 투여용 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화한다.
- [42] 한 양태로서, 본 발명의 이중표적항체는 경구 투여용 고상 제제로 제형화할 수 있다. 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [43] 다른 양태로서, 본 발명의 이중표적항체를 함유한 약제학적 조성물을 경구 투여용 액상 제제로 제형화할 수도 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제 (예를 들면, 정제수, 에탄올, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [44] 또 다른 양태로서, 본 발명의 이중표적항체를 함유한 약제학적 조성물은 비경구, 바람직하게는 복강내 투여를 위한 제제로 제형화될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제로, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기제인 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [45]
- [46] 본 발명의 이중표적항체는 본 발명의 한 실시예에 따라 수득한 DIG 0001이 가장 바람직하다.
- [47] 본 발명의 이중표적항체 DIG 0001은 국제특허출원 제PCT/KR07/003077호에 개시된 TTAC0001을 근간으로 하여, 이 항체의 경쇄 아미노 말단 부위에 특정 링커를 통해서 Tie-2와 결합하는 Ang2의 결합도메인을 융합시킴으로써

완성하였다(실시예 1 및 2).

[48] 상기에서 완성된 이중표적항체 DIG 0001은 SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅을 통해서 정체성을 확인하였으며, 보다 세밀한 연구를 위해서 Protein A 친화성 컬럼, SP-sepharose 컬럼, 크기배제 컬럼을 이용한 FPLC를 통해서 순도 95% 이상의 정제된 항체만을 확보하였다(실시예 3).

[49] 상기에서 정제된 이중표적항체 DIG 0001은 ELISA를 이용한 결합어세이를 통해서 VEGFR-2 D1~D3-Fc와 Tie-2-Fc에 대한 결합능력을 확인하였으며, ELISA를 이용하여 VEGF165 및 Ang2에 대한 경쟁어세이를 수행하여 이중표적항체로서의 기능성을 확인하였다(실시예 4).

[50] 본 발명에서는, 초대 배양한 HUVEC 세포에 대한 세포 생존능어세이를 통해서, DIG 0001 이중표적항체가 VEGF 또는 Ang1 각각에 의해 야기되는 HUVEC 세포의 생존능을 저해할 수 있음을 확인하였으며, VEGF 및 Ang1이 함께 유도하는 HUVEC 세포의 생존능 또한 효과적으로 저해할 수 있음을 확인하였다(실시예 5).

[51] 본 발명의 DIG 0001 이중표적항체는 세포이동분석을 통해서, VEGF와 Ang1 각각에 의해 비롯되는 HUVEC 세포의 이동성을 저해할 수 있음을 확인하였으며, 또한 VEGF 및 Ang1이 함께 유도하는 HUVEC 세포의 이동성을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인하였다(실시예 6).

[52] 본 발명의 DIG 0001 이중표적항체는 Ang1에 의해 유도되는 Tie-2의 신호전달기작을 저해하고, VEGF에 의한 VEGFR-2의 신호전달기작을 저해할 수 있음을 웨스턴블로팅을 통해서 확인하였으며, 또한 Ang1과 VEGF에 의한 신호전달기작을 동시에 저해할 수 있음도 웨스턴블로팅을 통해서 확인하였다(실시예 7).

[53] 특히, 본 발명의 DIG 0001 이중표적항체를 아교모세포종 동물 모델에 투여한 결과, 종양 부피가 현저하게 감소됨을 확인하였다(실시예 8).

[54] 상기의 항체는 다음과 같은 방법을 통해서 제조되었다. 우선, Tie-2에 대해서 길항체로서 작용할 수 있는, Ang2의 Tie-2에 대한 결합도메인 DNA 서열을 PCR을 통해 확보하였다. 이 때, 확보된 DNA 단편의 3'-말단에는 링커 DNA가 포함되도록 디자인하였다. 이 단편을 링커 DNA의 일부를 포함하는 TTAC0001의 경쇄 DNA 서열 5'-말단에 SOE-PCR을 통해서 융합시킴으로써, VEGFR-2 및 Tie-2에 대해서 특이적으로 결합할 수 있는 이중표적항체를 완성하였다.

[55] 본 발명의 DIG 0001 이중표적항체는 신생혈관형성을 억제함으로써, 신생혈관형성과 관련된 질환을 치료하는데 이용될 수 있다.

[56] 본 발명에서 '신생혈관형성 관련 질환'은 암, 연령관련 황반변성 (age-related macular degeneration), 류마티스성 관절염 (rheumatoid arthritis), 당뇨병성 망막병증 (diabetic retinopathy), 건선 (psoriasis) 및 만성 염증(chronic inflammation)을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [57] 본 발명에서 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 갑상선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 직장암, 대장직장암, 전립선암, 신장암, 흑색종, 전립선암의 골전이암, 난소암 및 혈액암을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [58] 본 발명의 이중표적항체는 암 환자에게 치료적 처치를 위해 종양의 진행, 예를 들어 종양의 성장, 침입, 전이 및(또는) 재발을 방지, 억제 또는 감소시키기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 상기 목적을 달성하기에 적절한 양을 치료 유효 용량으로 정의 한다. 상기 용도에 효과적인 양은 질병의 심각도 및 환자 자신의 면역계의 일반적인 상태에 따를 것이다.
- [59] 본 발명의 바람직한 용량은 0.01 mg/kg~100 mg/kg 이고, 0.1 mg/m² ~ 10 mg/m² 인 것이 보다 바람직하다.
- [60] 그러나, 최적 투여량은 치료할 질환과 부작용의 존재에 따라 달라지며 통상적인 실험으로 결정할 수 있다. 항체의 투여는 주기적인 환약 주입, 또는 외부 저장기(예컨대, 정맥 백) 또는 내부 저장기(예컨대, 생체분해성 임플란트)로부터의 연속적인 정맥 또는 복강 주사로 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 단백질은 다수의 상이한 생물학적 활성 분자와 함께 투여할 수 있다. 그러나, 항체 단백질 및 기타 분자의 최적 조합, 투여 방식, 투여량은 당업자의 기술 수준에 속하는 통상적인 실험에 의해 결정할 수 있다.
- [61] 본 발명에 따르는 조성물은 해당 질환과 관련된 다른 치료제와 병행 또는 혼합하여 사용할 수 있다.
- [62] 인간 종양을 포함하는 종양을, 본 발명의 이중표적항체를 화학요법제, 방사선, 또는 추가의 수용체 길항제 또는 그의 조합과 함께 이용하여 치료하는 경우, 상승작용이 존재할 수 있다. 환언하면, 본 발명의 이중표적항체에 의한 종양성장의 억제는, 화학요법제, 방사선, 또는 추가의 수용체 길항제 또는 그의 조합과 병용하는 경우 기대이상으로 증강될 수 있다. 상승작용은, 예를 들어, 본 발명의 이중표적항체 및 화학요법제, 방사선, 또는 추가의 수용체 길항제에 의한 치료의 상기효과로부터 기대되는 것보다, 병용치료법의 이용에 의한 더 큰 종양성장억제의 것에 의해 예시 될 수 있다. 바람직하게는, 상승작용은 본 발명의 이중표적항체 및 화학요법제의 조합물, 방사선, 또는 추가의 수용체 길항제를 이용한 치료로부터는 완화가 기대되지 않는 암의 완화에 의해 증명된다.
- [63] 본 발명의 이중표적항체는 화학요법 또는 방사선 요법의 착수 이전, 이들 요법의 착수 이후, 및 그의 조합, 즉, 화학요법 및/또는 방사선 요법의 착수 이전 및 동안, 이들 요법의 착수 이전 및 이후, 이들 요법의 착수 동안 및 이후, 또는 이들 요법의 착수 이전, 동안, 및 이후에 투여된다. 예를 들어 DIG 0001항체의 경우, 일반적으로 항체는 방사선 요법 및/또는 화학요법의 착수 1 내지 30일 이전, 바람직하게는, 3 내지 20일 이전, 더 바람직하게는 5 내지 12일 이전에 투여된다.
- [64] 따라서, 본 발명의 항체는 당업계에 잘 알려진 연구, 예방 또는 치료방법을 위해

생체내 및 시험관내에서 사용될 수 있다. 물론, 당업계의 숙련인이 본 명세서에 개시된 본 발명의 원리를 변동시킬 수 있으며, 그러한 변형은 본 발명의 범위 내에 포함 되는 것은 자명한 것이다.

발명의 효과

- [65] 본 발명은 신생혈관형성에 관여하는 VEGFR-2 및 Tie-2 수용체를 동시에 중화시킴으로써, 신생혈관형성 관련 신호전달기작을 효과적으로 억제할 수 있는 인간 단일클론항체 유래 이중표적항체와 상기 항체를 함유하는 신생혈관형성 억제 및 암 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 이중표적항체는 신생혈관형성에 관여하는 두 가지 표적을 동시에 중화시킴으로써, 기존의 단일표적항체에 비해서 뛰어난 중화능을 보일 뿐만 아니라, 암 치료에도 매우 효과적이다. 또한 상호 연관성이 있는 두 가지 표적에 대하여, 본 발명자가 발명한 형태의 이중표적항체를 제작함으로써 단일표적항체 처치에 의한 실익보다 우수한 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [66] 도 1은 pIgGLD-mAng2-TTAC0001 lgt 벡터에 삽입된 유전자의 DNA 서열(서열번호: 6) 및 기능을 나타낸 것이다.
- [67] 도 2는 본 발명에 따른 벡터 pIgGLD-mAng2-TTAC0001 lgt의 제조를 위한 방법을 도식화하여 나타낸 것이다.
- [68] 도 3은 본 발명에 따른 벡터를 CHO-DG44 세포를 이용하여 임의발현 시킨 후, 이중표적항체 DIG 0001의 생산을 웨스턴블로팅을 통해서 확인한 결과이다.
- [69] 도 4는 본 발명에 따른 고 생산성 세포주 확립을 위해서, MTX 반복처리(700 nM까지)를 통한 고 생산성 클론의 선별 결과를 나타낸 것이다.
- [70] 도 5은 정제된 DIG 0001의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.
- [71] 도 6은 DIG 0001을 이용한 VEGF 및 Ang-2-Fc에 대한 경쟁어세이(competition assay)를 ELISA를 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [72] 도 7는 본 발명에 따른 DIG 0001의 HUVEC에 대한 생존률 분석(survival assay) 결과를 나타낸 것이다.
- [73] 도 8은 본 발명에 따른 DIG 0001의 HUVEC에 대한 이동성 분석(migration assay) 결과를 나타낸 것이다.
- [74] 도 9은 본 발명에 따른 DIG 0001의 VEGF에 의한 VEGFR-2 및 ERK의 인산화 억제능과 동 항체의 Ang1에 의한 Tie-2, ERK, 그리고 AKT의 인산화 억제능을 웨스턴블로팅을 통해서 확인한 결과이다.
- [75] 도 10은 본 발명에 따른 DIG 0001이 Glioblastoma 마우스 모델에서의 종양성장 억제효과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [76] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[77]

[78] 실시예 1: DIG 0001 생산용 발현벡터의 제조

[79] Tie-2와 결합하는 Ang2의 결합도메인 관련 DNA는 PCR을 통해서 확보하였으며, 이를 위한 주형으로써 사용된 DNA는 미국 메모리얼 슬론 케터링 암센터의 Dimitar B. Nikolov 박사로부터 인간 Ang2-RBD를 생산하는 HEK293 세포주를 (Barton *et al.*, *Structure*, 13:825, 2005) 기증받아 genomic DNA를 추출하여 사용하였다. 추출된 DNA를 이용하여 Ang2 결합도메인 (F281-F496)만을 증폭하기 위해서 다음과 같은 조건에서 PCR을 수행하였다: 94°C 4분, (94°C 45초/50°C 45초/72°C 1분) 30회, 72°C 7분, 4°C ∞. 이때 사용된 반응물 조성은 다음과 같다: *Bst*XI 제한효소 인식부위를 가지는 프라이머 F-ksw001 (5'-CAC TCC AGC GGT GTG GGT TCC TTC AGA GAC TGT GCT GAA GTA TTC, 서열번호: 1)과 역방향 프라이머 R'-ksw001 (5'-ACT ACC TCC GCC TCC TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, 서열번호: 2) 각 2 μ l (10 pmole/ μ l), 주형 DNA로써 genomic DNA 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 수행하였으며, 이후 700 bp에 못 미치는 희미한 밴드를 HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience #YDF300, 대만)를 이용해서 분리해 내었다. 분리한 DNA를 주형으로 사용하여 재차 PCR을 수행함으로써 링커가 융합된 Ang2 결합도메인 단편을 확보하였다 (mAng2로 명명). 이때 사용된 PCR 방법은 역방향 프라이머로써 R-ksw001 (5'-GGA GCC TCC TCC GCC ACT ACC TCC GCC TCC TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, 서열번호: 3)를 사용한 것을 제외하면 이전의 방법과 동일하다.

[80] 한편, Ang2 결합도메인을 융합시킬 TTAC0001의 경쇄부분을 다음의 조건에서 PCR을 통해서 증폭시켰다: 94°C 4분, (94°C 30초/50°C 30초/72°C 30초) 30회, 72°C 5분, 4°C ∞. 이때 사용된 PCR 반응물 조성은 다음과 같다: 링커 부분의 일부가 첨가된 프라이머 F-ksw002 (5'-AGT GGC GGA GGA GGC TCC GGT TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG, 서열번호: 4)와 제한효소 *Bst*XI 인식부위를 함유한 프라이머 R-ksw002 (5'-CAG ATC TTT CCA CGA GGC TGG CTC CTC, 서열번호: 5) 각 2 μ l (10 pmole/ μ l), 주형 DNA로써 pIgGLD-TTAC0001 Lgt 10 ng (PCT/KR07/003077), 중합효소로써 i-Max™ II Taq 2.5 U (Intron #25261, Korea), 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 수행하였으며, 약 350 bp에 해당하는 TTAC0001 경쇄 단편을 HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience #YDF300, 대만)를 이용해서 분리해 내었다 (TTAC0001 lgt로 명명).

- [81] PCR을 통해서 확보한 Ang2 단편 부분 (mAng2)과 TTAC0001 경쇄부위 (TTAC0001_lgt) 각각을 융합시키기 위해서 SOE-PCR을 수행하였다. 이때 사용된 PCR 조건은 다음과 같다: 94°C 4분, (94°C 45초/50°C 45초/72°C 1분) 30회, 72°C 7분, 4°C ∞. 또한, 이때 사용된 PCR 반응물 조성은 다음과 같다: *Bst*XI 제한효소 인식부위를 가지는 프라이머 F-ksw001 및 R-ksw002 각 2 μ l (10 pmole/ μ l), 주형 DNA로써 mAng2 및 TTAC0001 lgt 각 10 ng, 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 수행하였으며, 약 1 kb에 해당하는 mAng2-TTAC0001 lgt 융합 PCR 산물을 HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience #YDF300, 대만)를 이용해서 분리해 내었다 (mAng2-TTAC0001 lgt로 명명). 분리해 낸 PCR 산물은 TOPcloner TA 클로닝 키트 (Enzymonics #EZ111, 대한민국)를 이용해서 T-벡터에 삽입시킨 후, 대장균 DH5에 형질전환시켜 미니프랩 및 제한효소 *Bst*XI 처리 후, 1 kb 가량의 목적 DNA를 함유한 벡터에 대해서 DNA 염기서열을 의뢰 및 확인하였다(도 1 및 서열번호: 6).
- [82] DIG 0001 이중표적항체 발현을 위한 경쇄 발현벡터 제조방법은 다음과 같다(도 2). 우선, 본 연구진이 보유하고 있는 TTAC0001 경쇄발현벡터 pIgGLD-TTAC0001 Lgt (PCT/KR07/003077)를 *Bst*XI으로 처리하여, 전기영동을 거쳐 1% 아가로스 겔로부터 벡터로 사용될 수 있는 부분만을 분리하였다. 또한, mAng2-TTAC0001 lgt가 삽입된 T-벡터를 역시 *Bst*XI으로 처리하여, 전기영동을 거쳐 1% 아가로스 겔로부터 잘려져 나온 단편만을 분리하였다. 이후, 분리된 두 단편을 T4 DNA 리가아제 (Enzymonics #M001S, 대한민국)를 이용하여 4°C에서 12시간가량 방치함으로써 하나의 완성된 벡터로 제조하였다. 제조된 벡터는 대장균 DH5를 통한 형질전환을 거쳐, 미니프랩 후 *Bst*XI 처리를 통해서 mAng2-TTAC0001 lgt의 삽입 유무를 최종적으로 확인하였다. 확인된 제조합 벡터는 'pIgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt'로 명명되었다.
- [83]
- [84] **실시예 2: DIG 0001의 생산 및 동정**
- [85] 완성된 경쇄발현 벡터 pIgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt와 기존의 중쇄발현 벡터 pIgGHD-TTAC0001 Hvy (PCT/KR07/003077)를 CHO-DG44 (*dhfr*-deficient CHO) 세포에 공동 형질도입을 통한 임의발현을 유도한 후, SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅을 통해서 그 발현여부를 확인하였다. 형질도입은 lipofectamine™ 2000 (Invitrogen #11668-019, 미국)을 이용하였으며, 그 방법은 제조사의 설명을 따랐다. 약술하면, α MEM 배지(Welgene, 대한민국)가 들어있는 6-웰 플레이트에 웰당 5 x 10⁵개의 CHO-DG44 세포를 접종한 후, 가슴이 유지되는 CO₂ (5%) 배양기를 사용하여 37°C에서 24시간 방치함으로써, 세포밀도가 80-90% 정도 되도록 조밀하게 배양하였다. 제조합벡터 3 μ g (pIgGHD-TTAC0001 Hvy와 pIgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt 각 1.5 μ g씩)과 6 μ l의 lipofectamin™ 2000을 각기

250 μ l의 무혈청 α MEM 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 α MEM 배지 500 μ l를 각 웰에 첨가하여, 37°C 조건의 CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양하였다. 투석우태혈청이 20% 포함된 α MEM 배지 1 ml를 추가하여 48-72시간 동안 배양한 후, 그 상등액만을 분리하여 항체의 발현 여부를 SDS-PAGE와 웨스턴블로팅을 통해 확인하였다(도 3). SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅은 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법을 준용하였으며, 사용된 시료는 다음과 같다: 12% 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).

발명의 실시를 위한 형태

[86] 실시예 3: DIG 0001 생산을 위한 세포주 확립 및 항체의 분리정제

[87] CHO-DG44 (*dhfr*-deficient CHO) 세포를 통해서 DIG 0001 생산 세포주를 구축하였다. 재조합항체 발현 CHO-DG44 세포주를 확립하기 위한 형질도입 과정은 상기 기술한 바와 동일하다. 형질도입된 CHO-DG44 세포 (*dhfr*-positive)의 선별을 위해, hypoxanthine-thymidine이 제거된 α MEM 배지를 사용하였고, 선별마커로써 500 μ g/ml의 G418 (Sigma-aldrich사, 미국)과 400 μ g/ml zeocine (Invitrogen, 미국)을 이용하여 일차 선별하였다. 재조합항체가 발현되는 단일클론 콜로니를 얻기 위해, 일차 선별된 세포를 10 cells/ml의 밀도로 희석하여 96-웰 플레이트 (Nunc, 미국)에 접종하여 2주간 배양, 단세포로부터 분열하여 형성된 단일 콜로니를 분리하여 모세포 클론을 확립하였다. 고발현 세포주를 얻기 위해 다양한 농도 (40 nM, 80 nM, 160 nM, 320 nM, 700 nM)의 methotrexate (MTX)가 첨가된 배지에서 단계적으로 3~5회 계대 배양하였으며, 발현정도는 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, 항체발현 CHO-DG44 세포주로부터 얻은 세포배양액 100 μ l씩을 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 재차 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 얻었다. 동일한 방식으로 1차 항체로써 VEGFR-2 및 Tie-2를 사용하고, 2차 항체로써 HRP-conjugated goat anti-human IgG (kappa)를 이용하여 ELISA를 수행함으로써 결과를 재확인 하였다. 최종적으로, MTX 700 nM에서 가장 높은 발현율을 보이는 클론을 고발현 세포주로 확립하였다(도 4). 고발현 세포주의 배양은 10% 투석우태혈청 (KDR, 대한민국), 100 units/ml의 페니실린 (Hyclone, 미국), 100 µg/ml의 스트렙토마이신 (Hyclone, 미국), 그리고 αMEM 배지 (Welgene, 대한민국)를 통해 이루어졌으며, 세포배양은 37°C 배양기를 이용하여 가습된 5% CO₂ 혼합공기 조건하에서 진행되었다.

- [88] 고발현 세포주의 배양을 통해서 확보된 이중표적항체 DIG 0001은 보다 세밀한 연구를 위해서 Protein A 친화성 컬럼, SP-sepharose 컬럼 및 크기배제크로마토그래피를 가지고 FPLC(fast protein liquid chromatography)를 이용해서 순도 95% 이상의 정제된 항체만을 확보하였다(도 5). 우선, 배양액을 원심분리를 통해서 세포 덩어리와 배지로 분리하였으며, 분리된 배지 내 DIG 0001은 분획분자량 (molecular weight cut-off)이 10,000 Da 이하인 UF막 (Millipore, 미국)을 통해서 농축되었다. UF를 거친 배지는 protein A 친화성 크로마토그래피를 이용하여 1차 정제를 마쳤다. 그 과정을 간략히 설명하면 다음과 같다. 0.1 M NaCl이 포함된 20 mM sodium phosphate (pH 7.0)로 안정화된 protien A 컬럼에, UF를 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. 이후, 친화성 컬럼을 통해 분리된 시료 내에 잔존할지도 모르는 DNA, Endotoxin, protein-A의 오염을 제거하기 위해서 양이온교환 크로마토그래피를 다음의 절차에 따라 실시하였다. 우선 protein-A 컬럼에서 용출된 시료는 동일한 부피의 20 mM sodium phosphate (pH 6.0) 버퍼와 섞어 놓는다. 이후 50 mM의 NaCl이 함유된 10 mM sodium phosphate (pH 6.0) 버퍼로 SP-sepharose (5 ml, GE healthcare) 컬럼을 안정화 시킨 후, 시료를 첨가하여 결합되지 않는 DNA, endotoxin 등을 세척하였다. 레진에 결합된 항체분자는 pH, salt gradient (50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 1 M NaCl)를 이용하여 용출하였다. 마지막으로 다량체 항체를 제거하기 위하여, 시료를 PBS로 안정화시킨 Superdex 200 (16 mm x 60 cm, GE healthcare) 컬럼에 넣은 후, 크기배제 크로마토그래피를 수행하였다. 위 정제 과정을 모두 마친 항체를 이용하여 세포 및 생체 내 분석을 수행하였다.

[89]

[90] 실시예 4: DIG 0001의 경쟁어세이

[91] 이중표적항체 DIG 0001이 VEGFR-2 및 Tie-2에 대하여 VEGF 및 Ang2와

경쟁할 수 있는 지를 알아보는 경쟁어세이를 ELISA를 이용하여 실시하였다. 이를 위하여 96-웰 플레이트에 VEGF165와 Ang2-RBD를 각각 200 ng씩 웰에 분주하여 실온에서 하루 동안 코팅한 후, 2% 탈지우유/PBS를 이용하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 플레이트를 PBS로 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 미리 반응시킨 혼합액 A그룹 (100 ng의 Fc가 절단된 형태의 VEGFR-2(ECD1-3)에 다양한 농도(0-250 nM)의 DIG 0001을 섞은 것들)을 VEGF165가 코팅된 웰에 넣고, 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 동일한 방식으로 Ang2-RBD가 코팅된 웰에는, 실온에서 1시간 동안 미리 반응시킨 혼합액 B그룹 (500 ng의 Tie-2-Fc에 다양한 농도 (0-250 nM)의 DIG 0001을 섞은 것들)을 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 2시간 반응이 끝난 후, PBS를 이용하여 세척하였으며, VEGF165가 코팅된 웰에 대해서 1차 반응 항체로써, 5 μ g/ml의 anti-VEGFR-2 마우스 항체(Reliatech, 독일)를 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Ang2-RBD가 코팅된 웰에 대해서도 동일한 방식으로, PBS를 이용해 세척 후 1차 항체로써 5 μ g/ml의 anti-Tie-2 마우스 항체 (abcam, 영국)를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체로써 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (abcam, 영국)를 1:5000으로 희석해서 양쪽 모두에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, TMB substrate reagent (BD Biosciences #555214, 미국)를 이용해 발색반응을 유도하였으며, 2N 황산 (H₂SO₄) 용액 50 μ l씩을 첨가하여 발색반응을 중지시켰다. 발색반응의 측정은 마이크로플레이트 리더(Tecan, 스위스)를 이용해서 흡광도 450 nm와 650 nm에서 이루어졌다(도 6).

[92]

[93] **실시예 5: DIG 0001 처리 후 HUVEC의 생존률 분석**

[94] DIG 0001 처리 후, 혈관내피세포 (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)의 생존률 변화를 확인하기 위해서, 세포 생존률 분석을 실시하였다. HUVEC의 배양은 20% 우태혈청 (Hyclone, 미국), 페니실린 100 units/ml (Hyclone, 미국), 스트렙토마이신 100 μ g/ml (Hyclone, 미국), 섬유아세포성장인자 (Upstate Biotechnology, 미국) 3 ng/ml, 헤파린 5 units/ml (Sigma-Aldrich, 미국)을 첨가한 phenol red-free M199 배지 (Invitrogen, 미국)를 사용하였으며, 세포배양은 가습된 5% CO₂ 혼합공기 조건의 37°C 배양기에서 배양하였다. 혈관내피세포의 생존률 분석을 위해서 이들 세포를 24-웰 플레이트에 2 x 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, 10 ng/ml VEGF (R&D systems, 미국)와 100 ng/ml Ang1 (R&D systems, 미국)을 처리하였다. 48시간 배양 후 WST-8 (Dojindo, 일본)을 2시간 처리하여 450 nm 파장에서의 흡광도를 측정함으로써, 각 조건에서의 세포 생존률을 비교하였다(도 7).

[95]

[96] 실시예 6: DIG 0001 처리 후 HUVEC의 이동성 분석

[97] DIG 0001의 HUVEC에 대한 이동성(주화성) 억제 확인하기 위해서, 세포 이동성 분석을 실시하였다. HUVEC의 이동성 분석을 위해서, 8- μ m pore-sized polycarbonate filters 트랜스웰 (Corning, 미국)을 이용하였으며, 사용 전 필터의 아랫면을 10 μ g 젤라틴으로 코팅한 후, 건조시켜 사용하였다. 아래쪽 웰에는 1% 우태혈청을 포함하는 M199 배지에 10 ng/ml의 VEGF와 100 ng/ml의 Ang1을 첨가하였다. 낮은 혈청농도에서 6시간 배양한 혈관내피세포를 트립신 처리하여 떼어낸 후, 1×10^6 cells/ml의 밀도로 1% 우태혈청을 포함하는 M199 배지에 현탁하여 준비하였다. 다양한 농도의 항체로 30분간 선 처리한 세포를 위쪽 트랜스웰에 100 μ l씩 균일하게 뿌린 후, 37°C 세포 배양기에서 3.5시간 동안 배양하였다. 세포를 헤마톡실린-에오신 (Sigma, 미국) 또는 크리스탈바이올렛 (Sigma, 미국)으로 염색하고, 필터 윗면에 붙어있는 미 이동세포는 면봉을 이용하여 제거하여, 필터 아랫면의 이동한 세포만을 남겨두었다. 디지털카메라가 부착된 광학현미경 (Olympus, IX71, 일본)에서 100배율로 사진을 찍어 이동한 세포수를 비교하였으며, 각 조건별로 10개의 이미지를 계수, 분석하였다(도 8).

[98]

[99] 실시예 7: 면역침강법과 웨스턴 블로팅법을 통한 세포내 VEGFR-2 및 Tie-2 인산화 저해 분석

[100] 이중표적항체 DIG 0001의 VEGFR-2 및 Tie-2에 대한 인산화 저해를 확인하기 위해서 면역침강법과 웨스턴 블로팅법을 실시하였다. 24시간 동안 배양된 혈관내피세포를 1% 우태혈청을 포함하는 M199 배지 조건에서 6시간 배양 후, 26.7 μ g/ml의 DIG 0001 항체를 30분간 선 처리하였다. 이후, 10 ng/ml VEGF와 100 ng/ml Ang1을 15분간 처리하였다. 면역침강법을 이용한 분석을 위해서, 냉각된 PBS로 씻어내고 면역침강용 완충액 (1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM sodium orthovanadate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM sodium fluoride)을 500 μ l 처리하였다. 스크래퍼로 긁어 모은 용해질을 26-게이지 주사기에 수 차례 통과시켜, 충분히 용해시킨 후 12,000 g로 10 분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 300 μ g의 용해질에 2 μ g의 anti-Tie-2 (R&D systems, 미국) 면역침강용 항체를 첨가하여 8시간 이상 반응시킨 후, protein A/G 플러스 아가로스 (Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 첨가하여 결합시켰다. Protein A/G 플러스 아가로스에 결합된 면역복합체를 원심분리와 완충액으로 씻기를 3~5회 반복하고, SDS 샘플 버퍼를 넣고 끓인 후, 원심분리를 통해서 아가로스 침전물을 제거하였다.

[101] 웨스턴 블로팅법을 통한 분석을 위해서, 용균완충액 (1% (w/v) SDS, 10 mM Tris (pH 7.4), 2 mM sodium orthovanadate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM sodium fluoride)을 처리하여 용해질을

얻어 끓인 후, 4°C에서 10,000 g로 5분간 원심분리하여 비용해성 침전물을 제거하였다. 상층액을 SDS 샘플 버퍼와 섞어 10분간 끓여 준비하였다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅은 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법을 준용하였으며, 사용된 시료는 다음과 같다: 12% SDS-polyacrylamide Gel, PVDF 멤브레인 (Millipore #IPVH00010, 미국), Tie-2 인산화 저해활성 분석을 위한 1차 항체로써 anti-Tie-2 항체 (abcam, 영국)와 anti-phosphotyrosine 항체 (Upstate Biotechnology, 미국); anti-p44/42 항체 (Cell Signaling technology, 미국)와 anti-phospho p44/42 항체 (Cell Signaling technology, 미국); anti-AKT 항체 (Cell Signaling technology, 미국)와 anti-phospho AKT 항체 (Cell Signaling technology, 미국), VEGFR-2 인산화 저해활성 분석을 위한 1차 항체로써 anti-VEGFR-2 항체 (Cell Signaling technology, 미국)와 anti-phospho VEGFR-2 항체 (Cell Signaling technology, 미국); anti-AKT 항체 (Cell Signaling technology, 미국)와 anti-phospho AKT 항체 (Cell Signaling technology, 미국), 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 Cruze Biotechnology, 미국) (도 9).

[102]

[103] 실시예 8: 아교모세포종 (Glioblastoma) 동물모델에서의 DIG-0001에 의한 종양 성장 억제

[104] 동소이식 아교모세포종 성장을 위해, 특이적 병원체가 제거된 수컷 Balb/c-nu 마우스 (Japan SLC)가 이용되었다. U-87MG 아교모세포종 (2×10^5 cells, American Type Culture Collection)의 뇌내 이식이 공지된 방법에 따라 수행되었다. 아교모세포종의 뇌내 이식 후 다음날, 마우스를 두 개의 그룹(n=4)으로 나누어 다음 치료를 받도록 하였다: (a) PBS의 복막내 주입, (b) 0.5 mg/kg DIG-0001의 복막내 주입. 모든 치료는 5회(종양 세포 접종 후 15, 18, 21, 24 및 27일째) 시행되었다. 종양 세포 이식 후 29일째에 마우스를 희생시키고 뇌를 제거한 후 관상으로 절단하였다. 한 절편은 10% 완충된 포르말린으로 고정하고 포르말린으로 포매하였고, 나머지는 OCT 화합물에 포매하였다. 종양 부피는 가장 큰 종양 부분을 가진 절편을 측정하고 다음 식을 적용함으로써 계산하였다: $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.5$ (도 10).

산업상 이용가능성

[105] 본 발명의 조성물은 신생혈관형성과 관련된 질환, 특히 암을 치료하는데 이용될 수 있다.

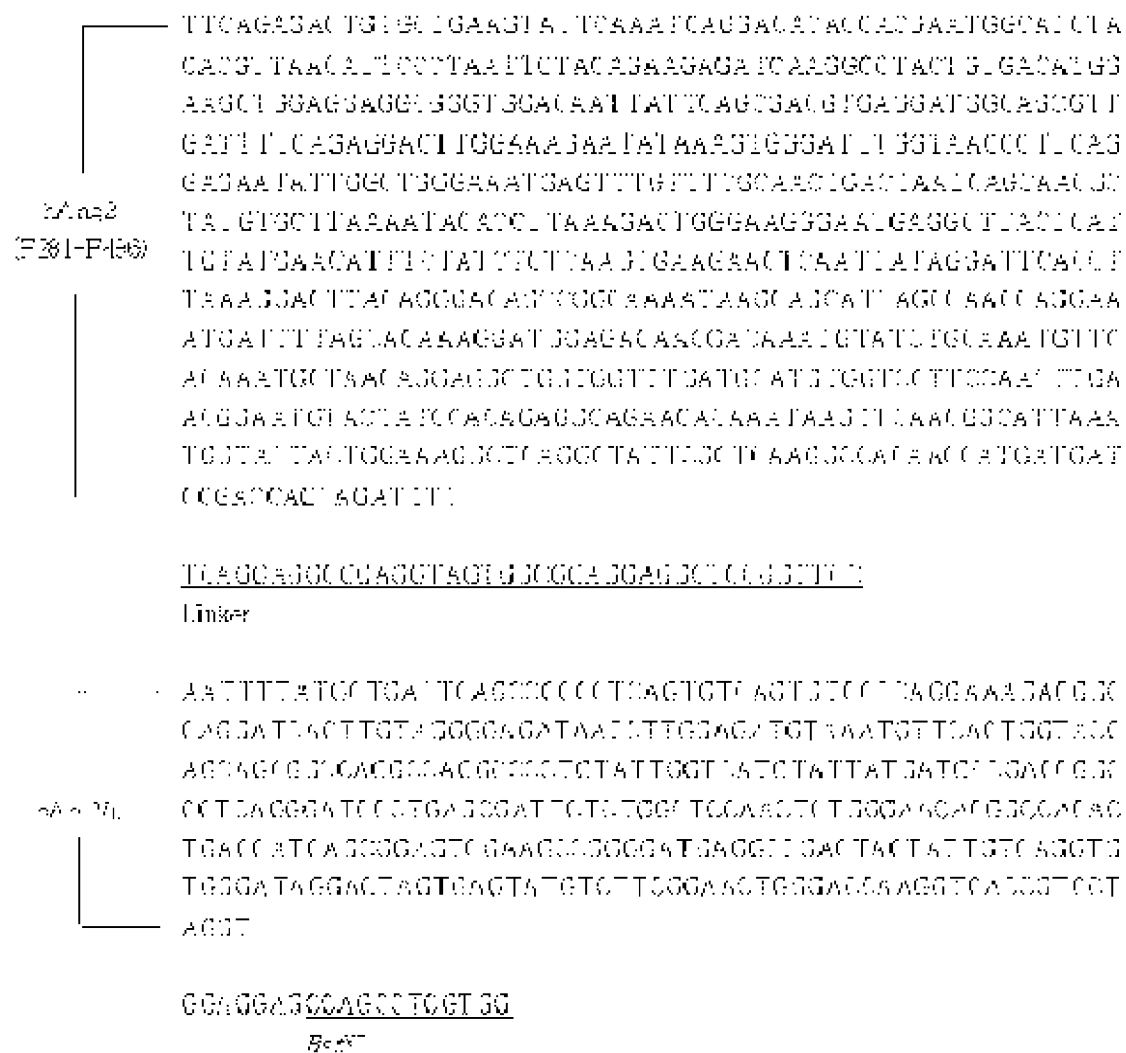
[106]

청구범위

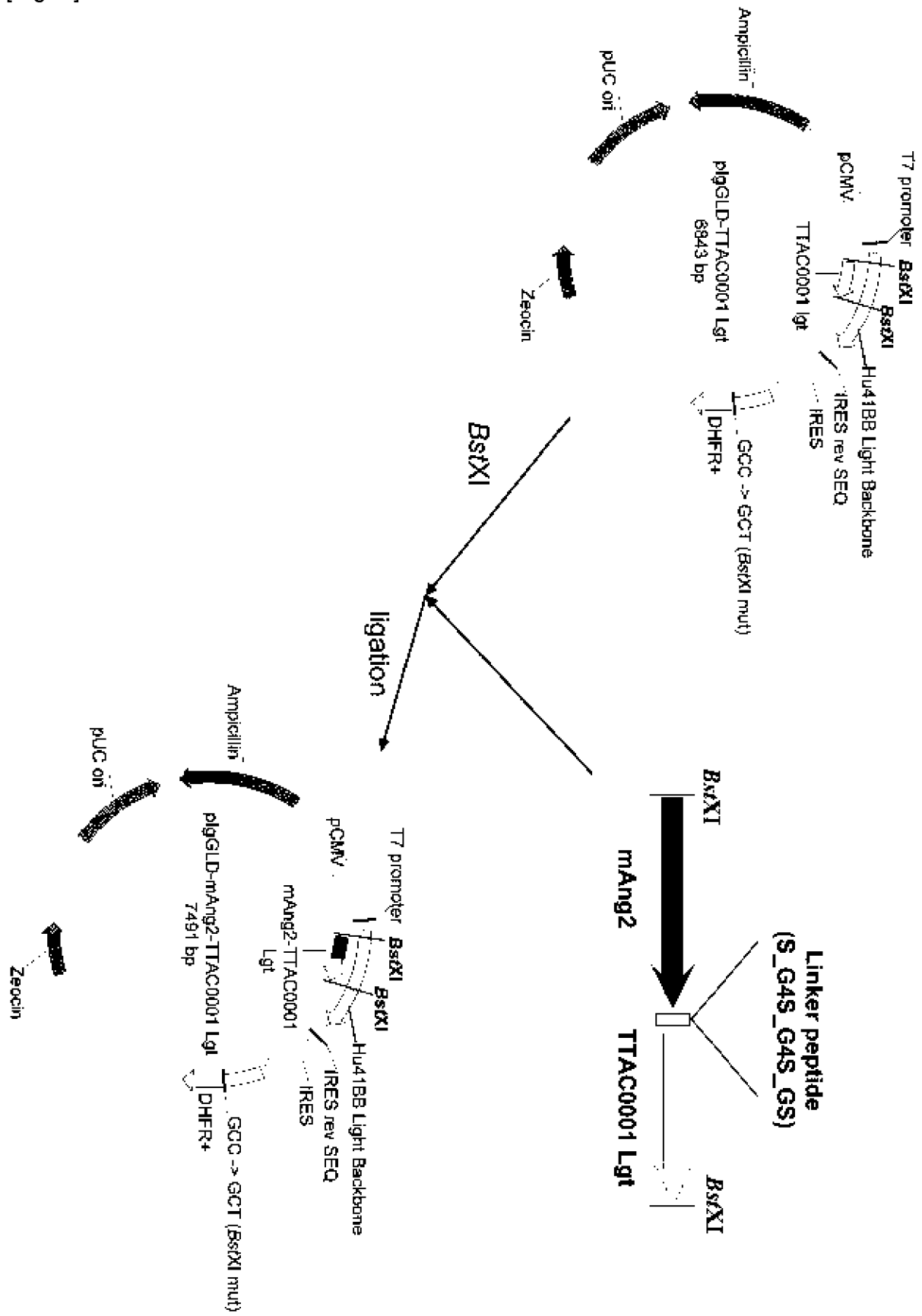
- [청구항 1] 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 수용성 리간드가 융합된 이중표적항체.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 항체는 종양 세포, 암 기질 세포, 종양 연관 내피세포, 종양 연관 내피 전구세포, 종양 연관 순환 내피세포, 순환 종양세포 및 암 줄기세포 중에서 선택된 세포에서 특이적으로 발현하는 항원에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 항원은 VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FLT3, c-FMS/CSF1R, RET, c-Met, EGFR, Her2/neu, HER3, HER4, FGFRs, IGFR, PDGFR, c-KIT, BCR, 인테그린 및 MMPs 중에서 선택된 항원인 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 항체는 VEGFR-2/KDR에 대한 중화항체 TTAC 0001인 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 수용성 리간드는 VEGF, EGF, PlGF, FGF, PDGF, HGF 및 엔지오포이에틴 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 수용성 리간드는 엔지오포이에틴 2의 Tie-2에 대한 결합도메인인 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서,
항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 수용성 리간드는 링커를 통해 융합되는 것을 특징으로 하는 이중표적항체.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 이중표적항체를 코딩하는 DNA.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서,
항체의 경쇄와 수용성 리간드는 서열번호: 6에 나타난 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 DNA.
- [청구항 10] 제 8항에 따른 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서,
도 2에 나타난 개열지도를 갖는 pIgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt인 것을 특징으로 하는 재조합 발현 벡터.
- [청구항 12] 제 10항에 따른 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [청구항 13] 제 12항에 따른 숙주세포를 배양하고, 이의 배양물로부터

- 이중표적항체를 분리함으로써 이중표적항체를 제조하는 방법.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서,
이중표적항체는 Protein A 친화성 컬럼, SP-sepharose 컬럼 및 크기배제크로마토그래피를 가지고 FPLC를 이용해서 추가로 정제하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 이중표적항체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서,
신생혈관형성 관련 질환 치료용인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서,
신생혈관형성 관련 질환은 암, 연령관련 황반변성, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막병증, 건선 및 만성 염증 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 18] 제 17항에 있어서,
상기 암은 위암, 간암, 폐암, 갑상선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 직장암, 대장직장암, 전립선암, 신장암, 흑색종, 전립선암의 골전이암, 난소암 및 혈액암 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

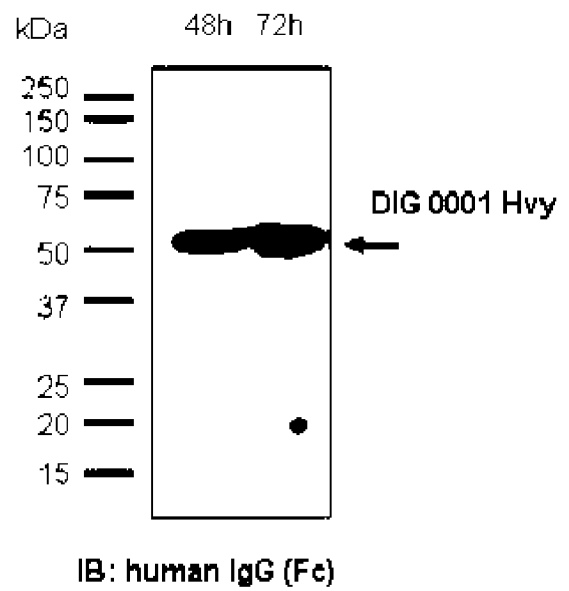
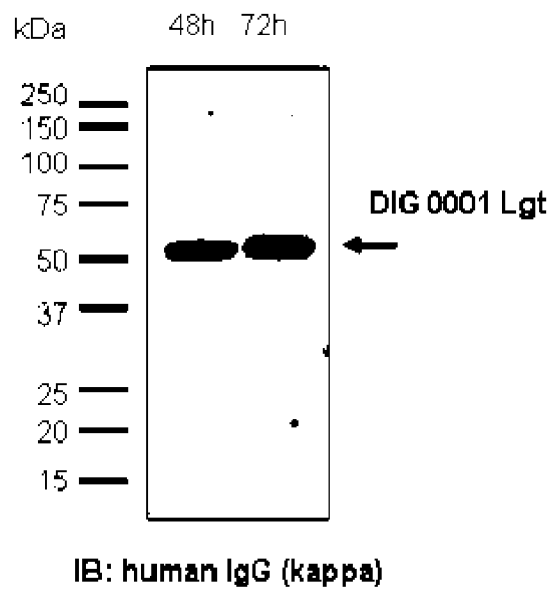
3.2.1



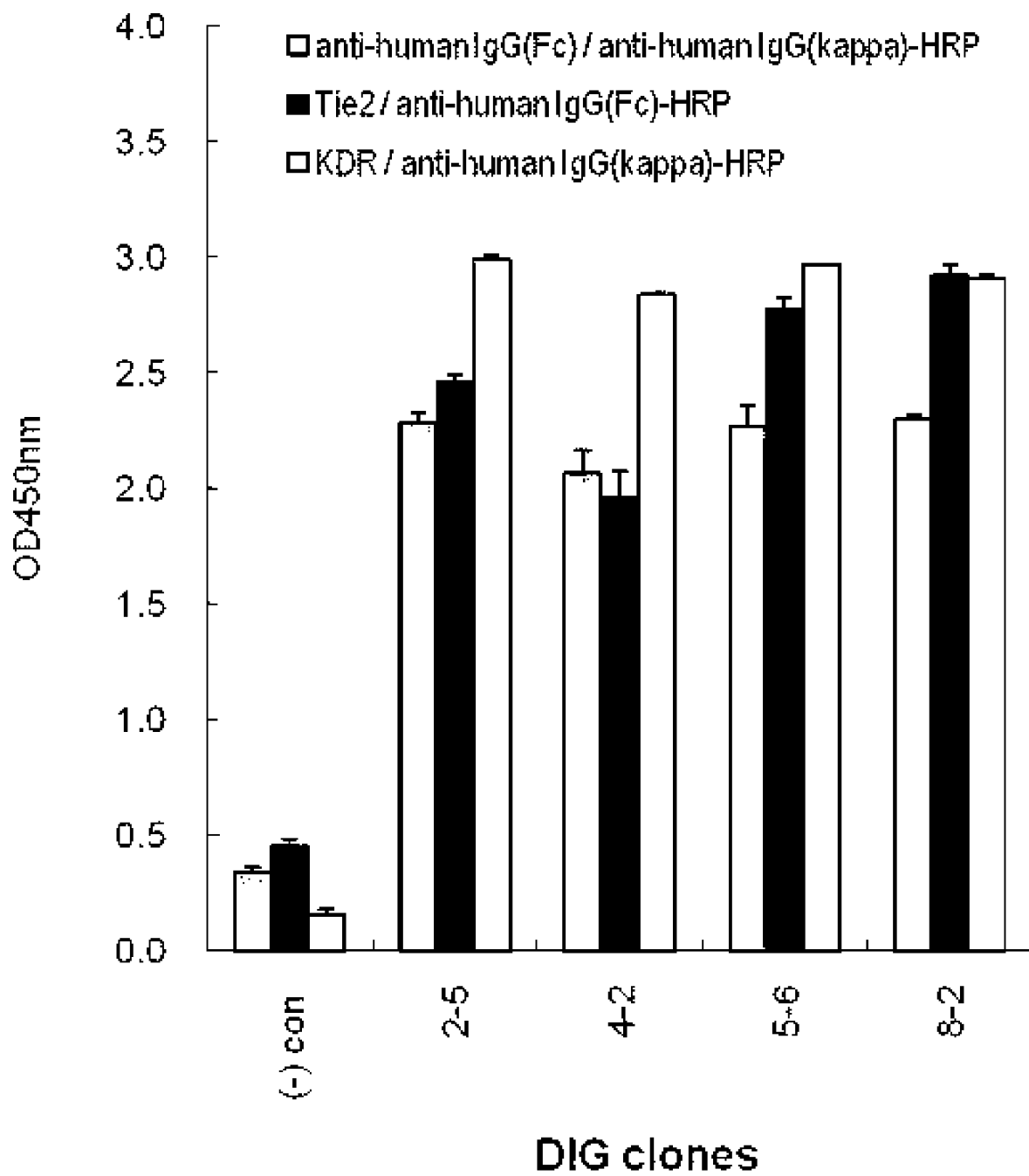
[Fig. 2]



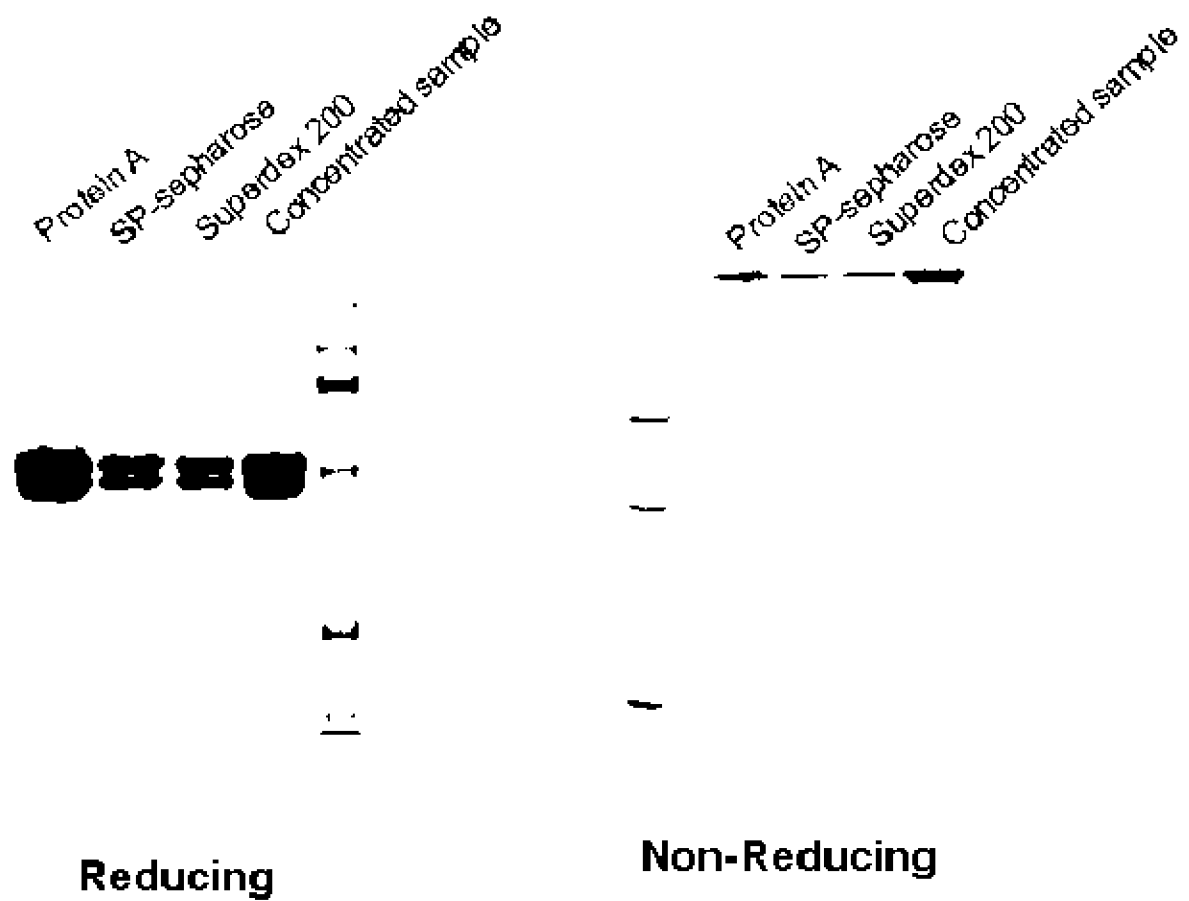
[Fig. 3]



[Fig. 4]

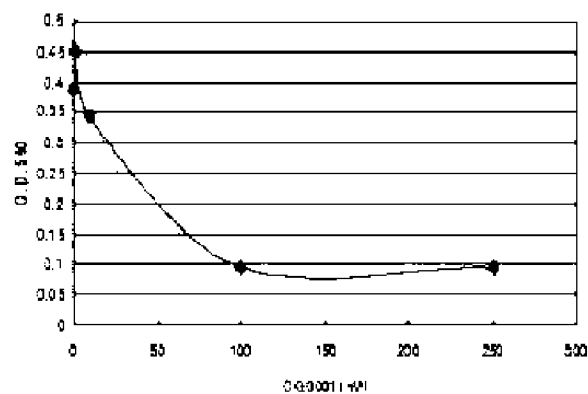
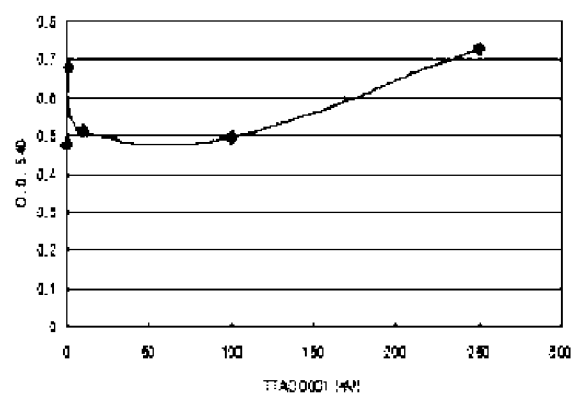


[Fig. 5]

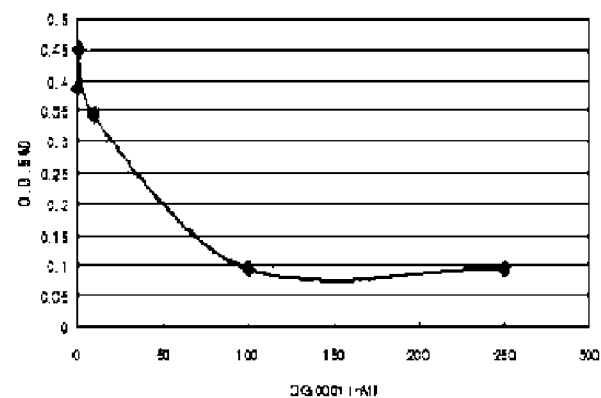
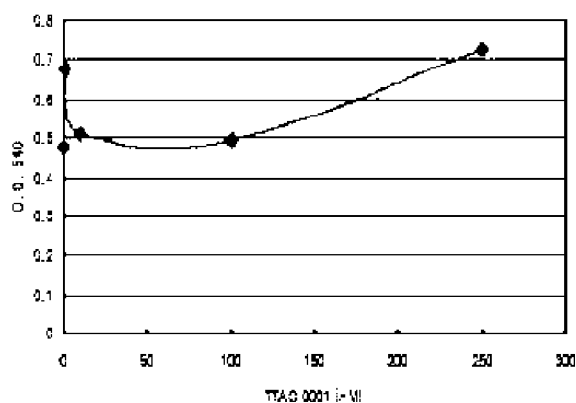


[Fig. 6]

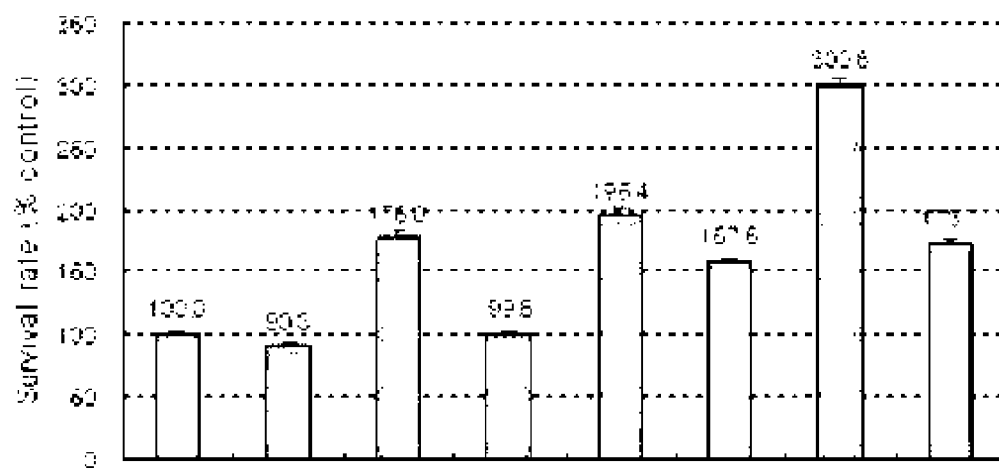
1) VEGF165 코팅



2) Ang2-Fc 코팅



[Fig. 7]



VEGF (10 ng/ml)

—

—

+

+

—

—

+

+

Ang1 (100 ng/ml)

—

—

—

—

+

+

+

+

DIG 0001 (26.7 μg/ml)

—

+

—

+

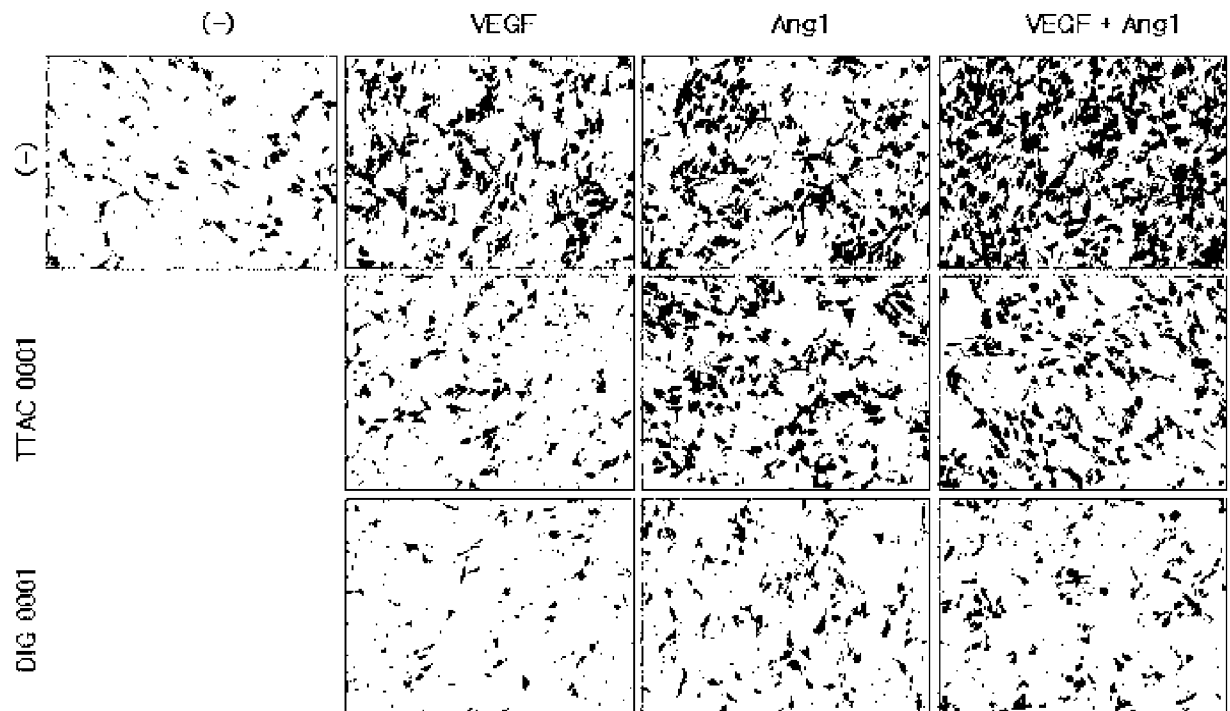
—

+

—

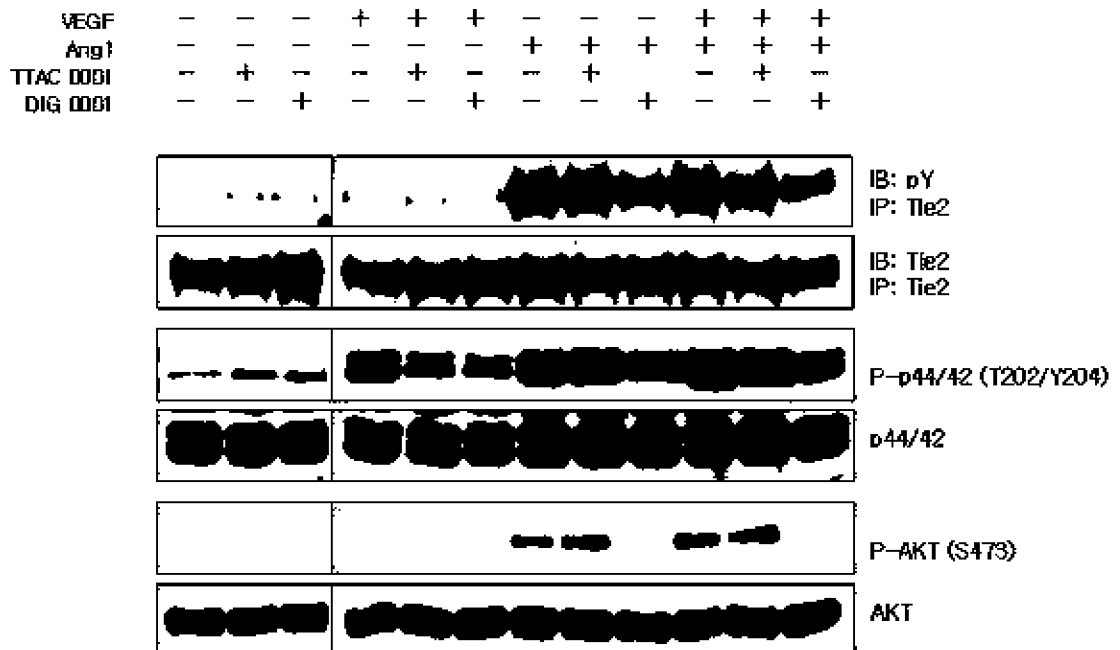
+

[Fig. 8]

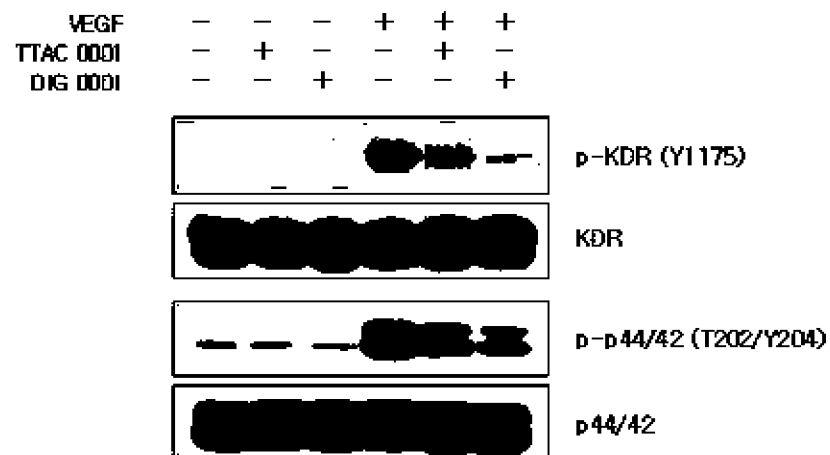


[Fig. 9]

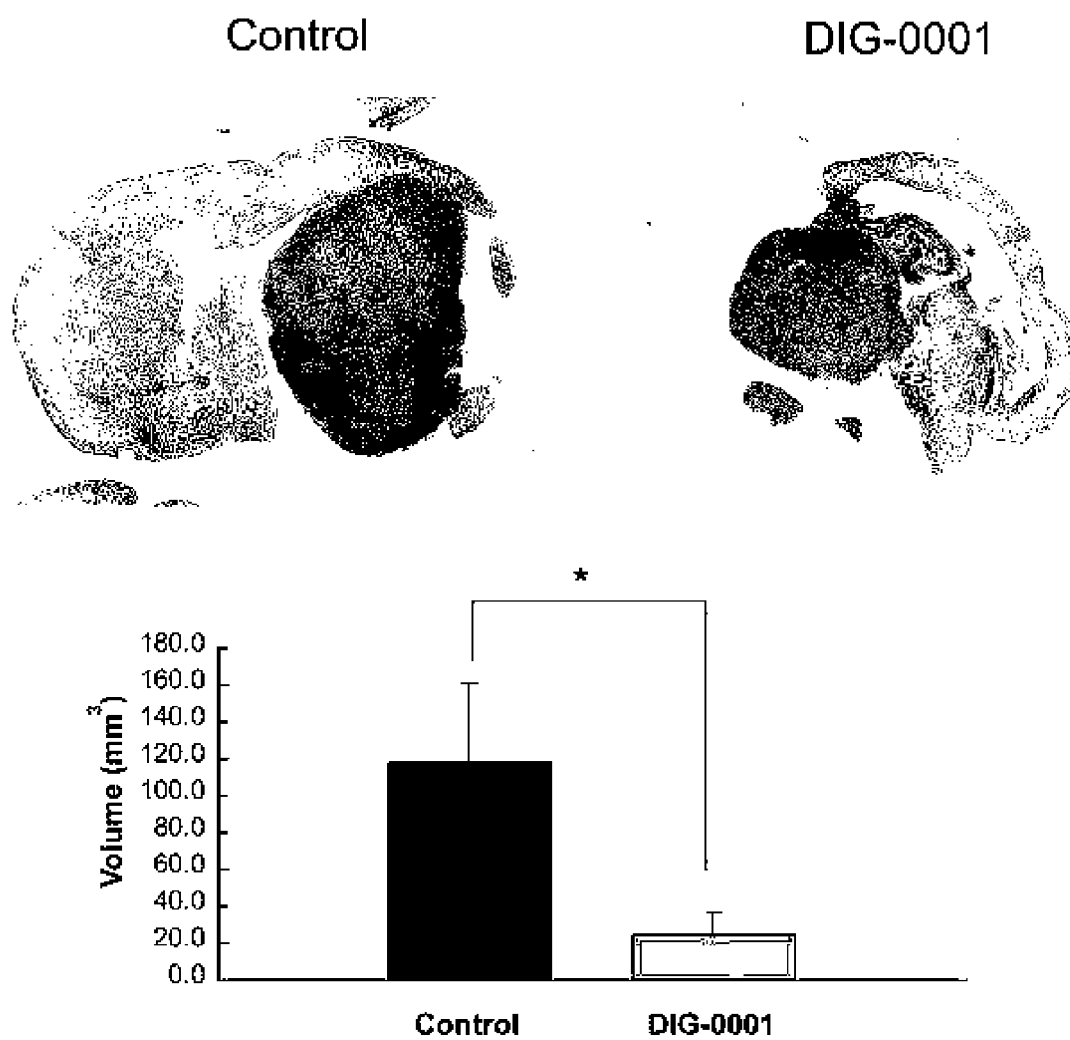
1) Tie-2 인산화 저해 분석



2) KDR 인산화 저해 분석



[Fig. 10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/004084**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 19/00(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)

IPC C07K 19/00, A61K 38/16, 39/395, A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), PubMed(NCBI), JPO, USPTO, Google

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- A	Dan Lu et al. 'Simultaneous Blockade of Both the Epidermal Growth Factor Receptor and the Insulin-like Growth Factor Receptor Signaling Pathways in Cancer Cells with a Fully Human Recombinant Bispecific Antibody', The Journal of Biological Chemistry, Vol. 279 No. 4, pages 2856-2865 (23 January 2004) See abstract, pages 2857-2859 (Experimental Procedure), figures 1, 2	1-3, 5-8, 15-18 ----- 4, 9, 10
A	KR 10-0883430 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 12 February 2009 Abstract, paragraph [0299], figures 1, 2, 9, 10	1-10, 15-18
A	US 7,090,843 B2 (Joseph A. Francisco et al.) 15 August 2006 Abstract, column 39 - column 42 (Embodiment), claims 1-18	1-10, 15-18



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

13 APRIL 2010 (13.04.2010)

Date of mailing of the international search report

15 APRIL 2010 (15.04.2010)

Name and mailing address of the ISA/KR

 Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2009/004084

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/004084**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **11-14**
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:
Claim 11 contains a reference to the drawings in the claim, and the configuration of an individual cleavage map of the drawings is not clear, thus an international search is not required to be carried out. Claim 11 is cited in claims 12 - 14 directly or indirectly. Therefore, an international search is not required to be carried out for the same reason.

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/KR2009/004084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0883430 B1	12.02.2009	AU 2007-354976 A1	18.12.2008
		EP 2158217 A1	03.03.2010
		WO 2008-153237 A1	18.12.2008
US 07090846 B2	15.08.2006	AU 2000-58351 A1	31.01.2001
		AU 2000-58351 B2	19.01.2006
		CA 2377074 A1	04.01.2001
		CN 1371288 A	25.09.2002
		CN 1371288 A0	25.09.2002
		EP 1202748 B1	17.09.2008
		EP 1202748 A2	08.05.2002
		JP 2003-503363 A	28.01.2003
		KR 10-0795093 B1	17.01.2008
		US 06727347 B1	27.04.2004
		US 2004-0220083 A1	04.11.2004
		WO 2001-000242 A2	04.01.2001
		WO 2001-000242 A3	04.01.2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 19/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) IPC C07K 19/00, A61K 38/16, 39/395, A61P 35/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(KIPO internal), PubMed(NCBI), JPO, USPTO, Google		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X ----- A	Dan Lu 등 'Simultaneous Blockade of Both the Epidermal Growth Factor Receptor and the Insulin-like Growth Factor Receptor Signaling Pathways in Cancer Cells with a Fully Human Recombinant Bispecific Antibody', The Journal of Biological Chemistry, 제279권제4호, 제2856면-제2865면(2004년 1월 23일) 요약, 제2857-2859면(Experimental Procedure), 도 1, 2 참조	1-3, 5-8, 15-18 ----- 4, 9, 10
A	KR 10-0883430 B1 (한국생명공학연구원) 2009년 2월 12일 요약, 문단식별번호 [0299], 도면 1, 2, 9, 10	1-10, 15-18
A	US 7,090,843 B2 (Joseph A. Francisco 등) 2006년 8월 15일 요약, 제39컬럼-제42컬럼(실시예), 청구항 제1항-제18항	1-10, 15-18
☐ 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 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2010년 04월 13일 (13.04.2010)		국제조사보고서 발송일 2010년 04월 15일 (15.04.2010)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 박영관 전화번호 82-42-481-8407 

제1기재란 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:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 11-14
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제11항은 청구항에 도면을 인용하고 있고, 또한 인용된 도면의 개열지도가 어떻게 구성되어 있는지 명확하지 않아 국제조사를 수행할 수 없습니다. 더불어, 청구항 제12항 내지 제14항은 제11항을 직간접적으로 인용하고 있어 동일한 이유로 국제조사를 수행할 수 없습니다.
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 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 합니다.
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 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 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
KR 10-0883430 B1	2009.02.12	AU 2007-354976 A1 EP 2158217 A1 WO 2008-153237 A1	2008.12.18 2010.03.03 2008.12.18
US 07090846 B2	2006.08.15	AU 2000-58351 A1 AU 2000-58351 B2 CA 2377074 A1 CN 1371288 A CN 1371288 A0 EP 1202748 B1 EP 1202748 A2 JP 2003-503363 A KR 10-0795093 B1 US 06727347 B1 US 2004-0220083 A1 WO 2001-000242 A2 WO 2001-000242 A3	2001.01.31 2006.01.19 2001.01.04 2002.09.25 2002.09.25 2008.09.17 2002.05.08 2003.01.28 2008.01.17 2004.04.27 2004.11.04 2001.01.04 2001.01.04