

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



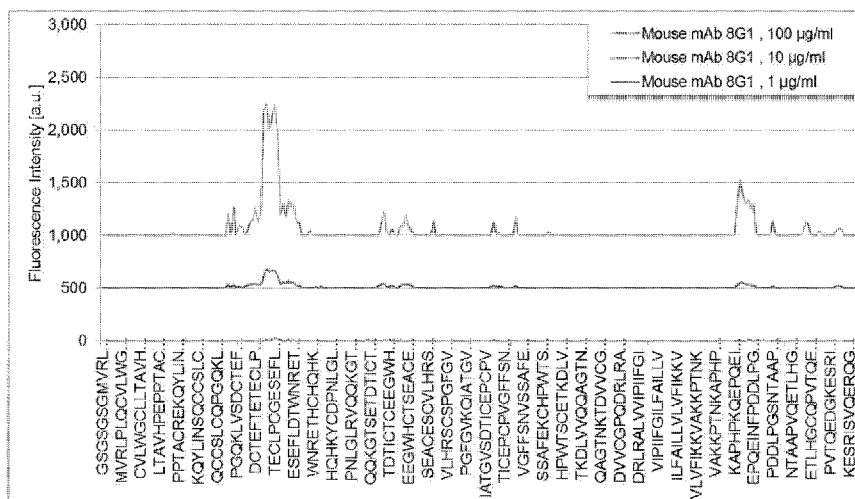
(43) 국제공개일
2018년 12월 6일 (06.12.2018) WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/222019 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/006327
- (22) 국제출원일: 2018년 6월 1일 (01.06.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0068350 2017년 6월 1일 (01.06.2017) KR
- (71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박정규 (PARK, Chung Gyu); 04575 서울시 중구 퇴계로 447, C동 105호, Seoul (KR). 김정식 (KIM, Jung Sik); 14061 경기도 안양시 동안구 학의로 390, 109동 2201호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: NOVEL ANTI-CD40 ANTIBODIES AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규한 항-CD40 항체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to novel anti-CD40 antibodies and a use thereof and, more specifically, provided are a pharmaceutical composition for treating or preventing autoimmune diseases and a composition for inhibiting immune rejection during organ transplantation, both compositions containing, as an active ingredient, novel anti-CD40 antibodies that specifically bind to a novel epitope of CD40. Novel anti-CD40 antibodies of the present invention directly target CD40, but not CD40 ligands, and block the signaling of CD40-CD134 without stimulating platelets so as to exhibit excellent antagonistic effects, thereby being expected to be usable as a preparation effective in the treatment of autoimmune diseases and the inhibition of organ transplantation rejection.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 항-CD40 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CD40의 신규 에피토프에 특이적으로 결합하는 신규한 항-CD40 항체를 유효 성분으로 포함하는 자가면역질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물 및 장기이식시 면역거부반응 억제용 조성물을 제공한다. 본 발명의 신규한 항-CD40 항체는 CD40 리간드가 아닌 CD40을 직접 타겟으로 하며, 혈소판을 자극하지 않으면서 CD40-CD134 신호전달을 차단하여 탁월한 길항 효과를 나타내므로 자가면역질환의 치료 및 장기이식 거부반응 억제에 효과적인 제제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 항-CD40 항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 항-CD40 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] CD40 신호 전환 경로는 많은 세포내 요인의 배합된 조절에 좌우된다. TNF 수용체 패밀리의 다른 구성원들과 같이, CD40은 CD40과 CD40L (고체상 CD40L 또는 가용성 CD40L 중 어느 하나)의 결합 후에 세포내 신호를 중재하는 TRAF 단백질 (TNF 수용체 인자-결합 단백질), 예컨대 TRAF2 및 TRAF3과 반응한다. TRAF는 신호를 맵 키나제, 예컨대 NIK (NF- κ B 유도 키나제) 및 I- κ B과 B 키나제 (IKK α/β)를 경유하여 핵으로 전환하여, 궁극적으로는 전사 인자 NF- κ B를 활성화한다 (Young et al. (1998) Immunol. Today 19:502-06). Ras와 MEK/ERK 경로를 경유하는 신호화는 또한 B 세포의 하위세트에서 증명되었다. CD40 세포 신호화에 포함된 추가의 경로로는 PI3K/Akt 경로 및 P38 MAPK 경로가 있다 (Craxton et al. (1998) J. Immunol. 5:439-447).
- [4] CD40을 경유한 신호화는 아포토시스로부터의 세포 죽음을 방지하는 것으로 밝혀졌다 (Makus et al. (2002) J. Immunol. 14:973-982). 아포토시스 신호는 배합된 방식으로 계획된 세포 죽음을 유도하기 위하여 필요하다. 세포 죽음 신호는 세포질 망상 구조 스트레스와 같은 세포 내에서 오는 고유의 자극 또는 FasL 또는 TNF α 의 수용체 결합과 같은 외래 자극을 포함할 수 있다. 신호화 경로는 복잡하며, 카스파제 3 및 9와 같은 카스파제의 활성화, 및 폴리(ADP 리보스)중합효소 (PARP)의 활성화를 포함한다. 캐스케이드 동안 항-아포토시스 신호화 단백질, 예컨대 Mcl-1 및 BCLx, 및 IAP-패밀리 단백질의 구성원들, 예컨대 아포토시스의 X-결합 억제제 (XIAP)는 하향 조절된다 (Budihardjo et al. (1999) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15:269-90). 예를 들어 수지상 돌기 세포에서 CD40 세포 신호화는 FasL에 의해 전환된 아포토시스 신호를 차단할 수 있다 (Bjorck et al. (1997) Int'l Immunol. 9:365-372).
- [5] 그러므로 CD40L에 의한 CD40 결합 및 이어지는 CD40 신호화의 활성화는 정상적인 면역 반응에 필수적인 단계이며, 이러한 CD40 신호화의 기능조절 장애는 자가면역 질병을 유발할 수 있다 (Ichikawa et al. (2002), J. Immunol. 169:2781-7 및 Moore et al. (2002) J. Autoimmun. 19:139-45). 또한, CD40/CD40L 상호작용은 염증성 진행과정에서도 중요한 역할을 한다. 예를 들어 CD40이나 CD40L은 둘 다 사람 및 실험상의 아테롬성 동맥경화증 병변에서 과잉발현된다. CD40 자극은 매트릭스-분해 효소의 발현 및 아테롬-관련 세포 유형, 예컨대 내피 세포, 평활근 세포, 및 대식세포에서의 조직 인자 발현을 유도한다. 나아가 CD40

자극은 전염증성 사이토킨, 예컨대 IL-1, IL-6, 및 IL-8, 및 점착 분자, 예를 들면 ICAM-1, E-셀렉틴, 및 VCAM의 생성을 유도한다. CD40/CD40L 상호작용의 억제제는 동물 모델에서 아테롬 발생을 방지한다.

- [6] CD40은 정상 및 신생 사람 B 세포, 수지상 돌기 세포, 항원제공 세포(APCs), 내피 세포, 단핵 세포, CD8+ T 세포, 및 상피 세포의 표면에 나타나는 55 kDa의 세포-표면 항원이다. CD40 항원은 또한 활성화된 T 세포, 활성화된 혈소판, 염증이 있는 혈관 평활근 세포, 호산성 세포, 류머티스성 관절염의 활액막, 피부의 섬유아세포, 및 다른 비-임파성 세포 유형에서도 발현된다. CD40을 발현하는 세포의 유형에 따라 결찰이 세포내 점착, 분화, 활성화, 및 증식을 유도할 수 있다. 예를 들어 CD40의 그것의 동족 리간드인 CD40L (또한 CD154로 표시)에 대한 결합은 B-세포 증식 및 그것의 혈장 세포로의 분화, 항체 생성, 이소타입 스위칭, 및 B-세포 기억 재생을 자극한다. B-세포 분화가 일어나는 동안 CD40은 선구 B-세포상에 발현되지만 그것이 혈장 세포로 분화될 때에는 없어진다.
- [7] CD40 리간드는 활성화된 T 세포의 세포 표면에서 확인되지만 (Fenslow et al. (1992) *J. Immunol.* 149:655; Lane et al. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2573; Noelle et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6550), 일반적으로 정지하고 있는 사람 T 세포상에서는 발현되지 않는다. CD40L은 TNF- α 와 상동성을 가지고 있는 제 II 유형 경막 당단백질이다 (Armitage et al. (1992) *Nature* 357:80 and Spriggs et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1543). CD40L의 세포외재성 도메인은 경막 영역 가까운 곳에 두 개의 아르기닌 잔기를 함유하며, 그것은 리간드의 가용성 형태 (sCD40L)를 발생시키는 잠재적인 단백질 가수분해성 절단 부위를 제공한다. CD40L의 과잉발현은 설치류 모델에서 전신성 홍반성 낭창과 유사한 자가면역 질병을 유발한다 (Higuchi et al. (2002) *J. Immunol.* 168:9-12). 대조적으로 활성화된 T 세포상에 기능성 CD40L이 없는 것은 X-결합된 초(hyper)-IgM 증후군을 유발한다 (Allen et al. (1993) *Science* 259:990; and Korthauer et al. (1993) *Nature* 361: 539).
- [8] 한편, 제1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병이라 불리는 대사 장애 질환이며 자가 면역질환이다. 주요 기전은 T 세포에 의한 베타세포 (β cell)의 파괴로 인슐린생산이 부족해지고 혈당 조절의 실패로 이어지는 것이다. International Diabetes Federation의 2014년 통계에 의하면 당뇨병을 가진 환자는 38,700만명이며, 2035년에는 59,200만명에 이를 것으로 추산된다. 당뇨로 인한 합병증으로 사망한 환자는 2014년 4,900 만명에 이르고 매 7초에 1명이 당뇨병에 의해 사망하는 것으로 알려져 있다.
- [9] 이의 치료법으로 몇 가지 방법이 존재한다.
- [10] 첫번째 인슐린 대체 요법 (Insulin-replacement therapy)은 적극적인 인슐린 치료법으로서 단기적으로 효과가 있으나 근본적인 치료법이 될 수 없다. 장기적으로 인슐린 치료법은 저혈당증의 발생에 대한 위험을 막지 못하고, 이로

인한 합병증의 발생을 예방할 수 없다.

- [11] 두번째 면역학적 접근법 (Immunological approaches)은, 가장 최신의 Disease Modifying Therapies의 한 방법으로, 면역세포의 공격으로 베타세포가 파괴되고, 이로 인해 발생하는 제1형 당뇨병의 진행을 막기 위해 면역조절이나 면역관용유도 기법을 이용하는 것이다. 예를 들어 베타세포에 특이적인 백신으로 사용하여 항원 특이적 T 세포 면역 관용을 유도하는 방법이 있다. 이러한 면역학적 접근법은 베타세포의 추가적인 파괴를 막거나 지연시킬 수 있으나, 일반적으로 제1형 당뇨병이 생긴 환자가 당뇨병이 진단될 시기쯤에는, 베타세포가 전체의 10-20% 정도만이 남아있는 경우가 대부분이다. 따라서 면역관용 유도법을 이용한 이 접근법은 제1형 당뇨병이 진단된 환자보다는 발생할 소지가 많은 예비환자에게 더 효과적이다. 항원 비특이적 면역조절제의 경우 또한 발병초기 환자에게만 효과가 있어 그 적용범위가 매우 제한적이며, 일반면역체계에 영향을 줄 수 있어 이로 인한 부작용이 발생할 수 있다.
- [12] 세번째 재생의학적 접근법 (Regenerative approaches)의 경우 베타세포는 임신이나 비만인 경우 필요한 대사요구량을 맞추기 위해 그 수가 늘어날 수 있다. 이는 췌장의 내분비세포 또는 비 내분비세포의 분화에 의하거나, 베타세포 자체의 증식에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다. FDA에 승인된 약 중 Dipeptidyl peptidase 4(DPP4) 억제제와 Proton-pump 억제제는 당뇨쥐에서 GLP1과 gastrin을 증가시켜 베타세포 증식을 유도하고 당뇨병을 치료할 수 있다는 보고가 있으나, 재생의학적 접근법은 아직 많은 연구가 필요한 분야로 임상적용 사례가 없다.
- [13] 네번째 췌도 이식법 (Allogeneic / Xenogeneic islet transplantation)은, 다른 사람(allogeneic)이나 돼지와 같은 동물(xenogeneic)로부터 베타세포가 포함된 췌도(islet)를 분리하여 환자에게 이식하는 방법으로 제1형 당뇨병을 치료하는 가장 근본적인 접근 방법이다. 췌도이식법은 이식된 췌도에 반응하여 발생하는 수용자(recipient)의 면역반응을 효과적으로 억제할 수 있는 면역억제요법 개발이 가장 중요하다. 2000년 초 daclizumab (Zenapax), sirolimus (Rapamune), tacrolimus (Prograf)를 조합으로 하는 Edmonton 프로토콜이 개발되어 동종간 사람의 췌도이식법은 일반화되었다. 2013년까지 Collaborative Islet Transplant Registry에 따라 전 세계적으로 40여곳의 병원에서 1,085건의 췌도 이식이 진행되어 5년간 인슐린 비의존 비율은 50%를 상회하고 있으나, 동종간 췌도이식의 경우 공여자 3-4명의 췌장에서 췌도를 분리하여 한사람의 수용자에게 이식하므로 이식대기자에 비하여 공여자의 수가 턱없이 부족한 실정이다. 공여자부족을 해결하기 위해 동물, 특히 돼지의 췌도를 분리하여 사람에게 이식(Xenogeneic porcine islet transplantation)하고자 하는 시도가 전세계적으로 진행되고 있다.
- [14] 그러나, 역설적으로 동종간 췌도이식에서 현재 사용되는 면역억제제는 이식된 췌도의 생착을 방해하고, 장기간 사용시 수용자에게 다양한 부작용을 야기시킬 뿐 아니라, 췌도의 사멸을 유도하여 췌도의 장기생존에 큰 걸림돌이 되고 있다.

따라서 부작용이 적고 특정 면역세포 특이적인 신규 면역억제제(또는 면역억제항체)의 개발이 요구된다.

- [15] 현재, 인슐린처방에 의존하는 비율이 매우 높지만, 기술의 발전으로 향후 면역억제제의 안정성 및 유효성이 확보되면 그 적용범위가 점차 확대될 것으로 예상된다.
- [16] 따라서, 제1형 당뇨병 치료를 위한 동종 및 이종간 췌도이식시 CD40-CD154 신호전달을 차단하는 것은 거부반응의 억제와 초기 당뇨병 발병억제에서 절대적으로 중요하다.
- [17] 즉, 영장류를 이용한 동종 및 이종간 췌도이식모델에서 항 CD154 항체 및 항-CD40 항체는 모두 B 세포의 항체생산억제 및 T 세포의 활성화억제기전을 통해 이식된 췌도의 장기생존을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 면역세포의 CD40-CD154 신호전달의 차단은 면역억제 요법의 핵심으로서, CD40/CD40L의 상호작용의 차단으로 이식 거부반응을 방지할 수 있다.
- [18] 따라서, 효과적으로 CD40/CD40L의 상호작용을 억제할 수 있는 물질로서 치료적, 임상적으로 관련된 항-CD40 항체의 개발이 필요하다.
- [19] 상기 개발된 항-CD40 항체에 의한 Cd40-CD40L 신호전달 차단을 통해 면역억제 효과로 크게 자가면역질환 치료제, 장기이식 면역억제제 개발, 만성염증성 질환 치료제 및 약물에 대한 항체(Anti-Drug antibody) 억제를 통한 보조치료제를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

[20]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [21] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 자가면역질환 치료, 장기이식시 면역거부반응 억제, 만성염증성 질환 치료 및 약물에 대한 항체(Anti-Drug antibody) 형성 억제를 통한 보조치료를 위해 CD40-CD154 신호전달 차단을 표적으로 하는 면역 억제제를 개발하고자 예의노력하였다. 그 결과, 인간 CD40의 특정 에피토프에 특이적으로 결합하는 신규한 항-CD40 항체(RM8G-1)를 개발하였고, 본 발명의 신규한 항-CD40 항체는 CD40 리간드가 아닌 CD40을 직접 타겟으로 하며, 혈소판을 자극하지 않으면서 CD40-CD154 신호전달을 차단하여 탁월한 면역억제 효과를 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [22] 따라서, 본 발명의 일 목적은 CD40의 아미노산 서열 중 Glu58, Cys59, Leu60, Pro61, Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66 및 Phe67의 CD40 아미노산 잔기로 이루어진 항-CD40 항체 에피토프를 제공하는 데 있다.
- [23] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 CD40의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.
- [24] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 CD40의 에피토프를 인간을 제외한

동물에 주입하는 단계를 포함하는, 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법을 제공하는 데 있다.

[25] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, CD40-CD40L 신호전달 차단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[26] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효 성분으로 포함하는 자가면역질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[27] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효 성분으로 포함하는 만성염증성질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[28] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 장기이식시 면역거부반응 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[29] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환 또는 만성염증성질환의 치료 방법을 제공하는 데 있다.

[30]

과제 해결 수단

[31] 달리 정의되지 않으면, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 내용상 달리 요구되지 않으면, 단수 용어는 복수를 포함하며 복수 용어는 단수를 포함한다. 일반적으로, 본 명세서에 개시된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 하이브리드화와 관련하여 사용되는 명명법 및 기법은 당업계에 잘 알려지고 통상적으로 이용되는 것들이다.

[32]

[33] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[34]

[35] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 CD40의 아미노산 서열 중 Glu58, Cys59, Leu60, Pro61, Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66 및 Phe67의 CD40 아미노산 잔기로 이루어진 항-CD40 항체 에피토프를 제공한다.

[36] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 CD40의 에피토프에 특이적으로 결합하여 CD40 안타고니스트로 작용하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[37] 본 발명의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 당업계에 공개된 항체가 결합하는 에피토프(Epitope)와는 다른 신규한 에피토프를 인식한다는 것이 본 발명자에 의해 최초로 발견되었다.

[38] 즉, 본 항체는 종래 항체와는 상이하고 신규한 에피토프에 결합하여 CD40에

대하여 안타고니스트로 작용하는 우수한 길항 항체이다.

[39] 또한, 본 항체는 종래 항체와 달리 에피토프의 구조적 형태외에도 선형(Linear form) 항원을 인식하여 결합 특성을 나타낸다.

[40] 본 명세서에서, 상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD40 단백질에서 CD154와 상호작용하는 부위인 CD40에서 58번 잔기 Glu, 59번 잔기 Cys, 60번 잔기 Leu, 61번 잔기 Pro, 62번 잔기 Cys, 63번 잔기 Gly, 64번 잔기 Glu, 65번 잔기 Ser, 66번 잔기 Glu 및 67번 잔기 Phe를 포함하는 10개 아미노산의 CD40 부위를 에피토프로 하며, CD154와의 상호작용을 방해하여, CD40-CD154 신호 전달을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 CD40은 Pubmed Gene ID: 707749의 유전자로 암호화된 단백질이다.

[41] 또한, 본 발명의 항-CD40 항체는, (i) CD40-CD154 결합 차단 of 고효율성, 비-아고니스트(non-agonistic) 성질, 비-고갈(non-depleting) 또는 최소 고갈(minimum-depleting) 성질, 신규한 에피토프 결합 및 고친화성을 보여주므로, 장기 이식시 면역거부 반응 억제 및 자가면역질환 치료를 위한 항-CD40 항체로서 갖추어야 할 모든 선결 조건을 충족하고 있을 뿐만 아니라;

[42] (ii) 영장류/인간 교차 결합이 가능하여 비임상/전임상 시험에 적용가능하여 치료제 개발에 유리하며, (이종인 돼지)CD40-(인간)CD40L을 차단하는 항체로서 이종세포/이종장기이식용으로 특화가 가능하다는 점에서, 장기 이식시 면역거부 반응 억제 및 자가면역질환 치료를 위한 항-CD40 항체로서 갖추어야 할 모든 충분 요건을 충족하고 있는바;

[43] 항-CD40 항체 치료제 개발의 필요충분 조건을 모두 부합하면서 탁월한 효과를 발휘하는 자가면역 질환 치료제 및 장기 이식시 면역 억제제로 이용할 수 있다.

[44] 본원에서 사용된 용어 "항체"란 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 통해 다른 분자(항원)에 결합하는 단백질을 일컫는 것으로, IgG, IgD, IgA 및 IgE 타입을 포함한다. 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 다특이성 항체를 포함한다. 또한 본원의 항체는 다양한 형태의 구조를 갖는 모노클로날 항체를 포함하는 것으로, 예를 들면, 두 개의 전장 중쇄 및 두 개의 전장 경쇄를 포함하는 온전한 항체(intact Ab)는 물론 불변영역을 포함하거나 또는 포함하지 않는 이의 단편, 키메라 항체, 인간항체, 인간화항체, 또는 본원에 따른 특징을 갖는 기타 유전공학적으로 변형된 항체를 일컫는 것이다.

[45] 또한, 본 발명에서, 본 발명의 항체를 언급하면서 사용되는 "RM8G-1"는 "8G1"와 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다.

[46] 본원에서 사용된 용어 "항원 결합 단편"은 상술한 온전한 항체의 일부를 일컫는 것으로, 길이면에서 온전한 항체의 아미노산 서열보다 하나 이상의 서열이 짧은 서열이다. 기능적인 면에서는 온전한 항체 또는 모(parent) 항체의 적어도 일부 활성 또는 기능을 포함하는 것으로 그 종류는 예를 들면 Fab(Fragment for antigen binding), Fab', F(ab')₂, Fv 또는 단쇄항체(Single Chain Antibody, SCA)(예를 들면 scFv 또는 dsFv), bispecific scFv 및 diabody를 들 수

있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

- [47] 본원에서 사용된 용어 "에피토프"는 면역글로블린 또는 T-세포 수용체에 특이적 결합을 할 수 있는 임의의 단백질 결정인자를 포함한다. 에피토프 결정인자는 대개 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹핑으로 이루어지며 대개 특이적 전하 특성뿐만 아니라 특이적 삼차 구조 특성을 갖는다.
- [48] 본 발명에서, 본 발명의 에피토프에는 본 발명의 항 CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 외에도 화학적 약물(chemical drug) 또는 에피토프에 상보적으로 결합하는 펩타이드를 포함한 다양한 항원 결합 물질이 결합될 수 있으며, 이들은 본 발명의 항 CD40 항체와 유사한 또는 동등한 CD40-CD40L 신호 전달 차단 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 화학적 약물 또는 펩타이드를 포함한 다양한 항원 결합 물질은 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.
- [49] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 CD40은 영장류의 CD40이고, 상기 영장류는 인간, 원숭이, 침팬지, 고릴라 또는 오랑우탄이고, 보다 바람직하게는 인간 또는 원숭이이다.
- [50] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH); 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 면역글로블린 중쇄 가변영역(VL);을 포함한다.
- [51] 또한, 상기 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)은, 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 3의 HCDR1, 서열번호 4의 HCDR2 및 서열번호 5의 HCDR3의 아미노산 서열을 포함하고; 상기 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)은, 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 6의 LCDR1, 서열번호 7의 LCDR2 및 서열번호 8의 LCDR3의 아미노산 서열로 표시되는 서열을 포함한다.
- [52] 본원에서 사용된 용어 "가변영역"은 중쇄와 경쇄의 일부에 의해 형성되는 항원 결합부위로, 각 가변영역은 서열이 보존된 4개의 골격(FR)과 서열의 변이가 심한 3개의 상보성결정부위(CDR, Complementary Determining Region)로 이루어져 있다. 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 CDR은 HCDR1 내지 HCDR3, 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 CDR은 LCDR1 내지 LCDR3로 칭한다.
- [53] 본원에서 사용된 용어 "상보성결정부위"는 항체의 항원에 대한 특이성과 결합력을 결정하는 부위로, 항체간 서열변이가 가장 많이 발견된다. 이들 중 CDR3 부위의 변이가 가장 심하며, 짧게는 2개의 아미노산 많게는 26개 이상을 아미노산 잔기로 구성되어 있다. VH 및 VL에서 CDR 이외의 부분은 골격잔기이다. 본원의 항원 결합 폴리펩타이드의 골격은 자연에 존재하는 인간 항체에서 발견되는 서열, 또는 다양한 항체에서 발견되는 서열을 공통서열로 하여 사용할 수도 있다.
- [54] 본 발명의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, CD40의 에피토프 Glu58, Cys59, Leu60, Pro61, Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66 및 Phe67을 특이적으로

인식하여 결합하여 CD40와 CD154와의 상호작용을 차단할 수 있는 한, 다양한 형태로 제공될 수 있다.

- [55] 상기 다양한 형태는 변형을 포함하며, 상기 변형은 항체의 Fc 부분의 변형이 특징인, 효과인자 기능이 감소된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 상기 Fc-엔지니어링은 Complement에 의한 CDC, 세포독성 세포(cytotoxic Cell)에 의한 ADCC 효과가 미비한 IgG4나 그 변형체에 해당할 수 있다.
- [56] 즉, IgG4 또는 Fc 부위의 complement binding site나 Fc 수용체 결합부위가 변형되어 CDC나 ADCC기능이 현저히 저하된 변형체에 해당한다.
- [57] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 영장류화 항체, 인간화 항체 및 인간 항체로 이루어진 군으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [58] 또한, 상기 항-CD40 항체는 다량체 항체, 이종이량체 항체, 반이량체 항체, 4가 항체, 이중특이적 항체 및 단일 쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [59] 상기 항원 결합 단편은 Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv 및 도메인 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [60] 기술분야의 당업자라면 상기와 같은 서열번호 3 내지 8의 서열을 갖는 가변영역을 이용하여 불변영역을 포함하는 항체의 구성요소를 포함하는 항체를 구축할 수 있을 것이다.
- [61] 또한, 본 발명은 상기 서열번호 1 내지 8에서 아미노산에 보존적 치환이 일어난 것을 포함한다. 본 발명에서는 10개 미만, 9개 미만, 8개 미만, 7개 미만, 6개 미만, 5개 미만, 4개 미만, 3개 미만, 2개 미만 또는 1개의 아미노산에서 치환이 일어난 것이다.
- [62] 본원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 하나의 아미노산이 유사한 특징의 다른 아미노산으로 치환되는 것을 일컫는 당업계에서 널리 통용되는 용어이다. 유사한 특징이란, 예를 들면 크기, 소수성, 또는 전하(Charge)를 포함한다. 아미노산은 통상적으로 측쇄의 전기적 특징에 따라 양으로 하전된 측쇄, 음으로 하전된 측쇄, 비하전 측쇄 또는 소수성 측쇄를 갖는 아미노산으로 분류된다. 예를 들면 보존적 치환은 루이신(Leu)에서 아이소루이신(ile), 알지닌(Arg)에서 라이신(Lys), 페닐알라닌(Phe)에서 트립토판(Trp), 아스파르트산(Asp)에서 글루탐산(Glu), 또는 세린(Ser)에서 트레오닌(Thr), 또는 그 역으로의 치환을 포함한다. 일반적으로 CDR 서열의 보존적 치환은 CDR의 기능에 본질적인 영향을 미치지 않는다.
- [63] 이러한 서열의 치환 방법은 당업계에 공지된 것으로 예를 들면 Sambrook, Molecular Cloning [0053] A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory (2012) N.Y. 를 참조할 수 있다.
- [64] 본원에 따른 항체는 항원 결합 단편, 변이체 또는 그 유도체를 포함하는 것으로, 폴리클로날, 모노클로날, 다특이성, 인간, 인간화, 영장류화, 또는 키메라 항체, 단쇄 항체, 에피토프 결합 단편, 예를 들면 Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Fd, Fvs, 단쇄

Fvs (scFV), 이황화 연결된 Fvs (sdFv), VL 또는 VH 영역을 포함하는 단편을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 항체는 임의의 유형 예를 들면 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY일 수 있으며, 또한 임의의 클래스 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 또는 IgA2일 수 있거나 또는 그 서브클래스일 수 있다.

- [65] 본원의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 키메라 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "키메라 항체"는 가변영역 즉 항원 결합 부위와 항체의 불변영역 (경쇄의 경우 CL1, 중쇄의 경우, CH1, CH2, 및 CH3 영역을 포함)의 적어도 일부가 다른 종(species)로부터 유래한 것을 말한다. 예를 들면 가변영역은 마우스유래이고, 불변영역은 인간 유래의 것을 포함할 수 있다. 또는 클래스전환(class switch)된 항체 예를 들면 IgG 유형에서 IgE 유형으로 전환된 항체를 또한 의미한다.
- [66] 또한, 본원의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "인간화 항체"는 항체의 골격은 인간의 항체이고 CDR 영역의 일부는 원래 항체분자가 유래된 종의 CDR 중 항원에 대한 특이적 결합에 필수적인 부분만을 포함하도록 변형된 것을 의미한다. 예를 들면 원숭이, 또는 마우스 유래 항체의 CDR 중 항원에 대한 특이적 결합에 필수적인 부위를 제외한 나머지 CDR 부위와 경쇄 및 중쇄 골격은 인간의 항체로 대체된다.
- [67] 또한, 본 발명에 따르면, 본 발명의 항체는 다양한 형태의 항체로 제조될 수 있다. 본 발명의 항체는 서로 다른 기능을 가진 Fab를 융합하여 다기능을 갖는 융합 항체, 예컨대, CD40+CD40L 융합 항체로 제조될 수 있고, 또한 Fab 항체에 얻은 경쇄 및 중쇄 가변영역을 이용하여 사람 유래의 불변영역과 재조합함으로써 완전한(whole) 형태의 항체를 제공할 수도 있다.
- [68] 또한, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 모노클로날 항체일 수 있다. 용어 "모노클로날 항체" 또는 "단일클론 항체"는, 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체분자를 의미하며, 단일클론 항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.
- [69] 모노클로날 항체는 골수종 세포를 면역화된 포유류 유래의 비장세포와 융합하여 제조하는 것을 기본으로 하는 것으로 당업계에 다양한 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 다른 구현예에서, 본원의 항체는 기탁번호 KCLRF-BP-00336로 기탁된 하이브리도마에 생산된 항체의 경쇄유래의 하나 이상의 CDR, 및/또는 중쇄유래의 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체 단편을 포함한다.
- [70] 본원에 따른 항체는 구체적 목적에 따라, 추가적으로, 치료제, 프로드럭, 펩타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 개질제, 약물 및 PEG(polyethylene glycol)로 구성되는 군으로부터 선택되는 기능적 물질과 컨쥬게이션되어 제공될 수 있다. 또한, 컨쥬게이션 되는 물질의 종류에 따라 다양한 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

- [71] 상기 치료제, 프로드럭, 펩타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 개질제 및 약물은 목적의 효과를 달성할 수 있는 한, 당업계에서 통상적으로 이용되는 임의의 것들을 이용할 수 있다.
- [72] 항체의 단편은 펩신 또는 파파인으로 처리하여 수득될 수 있다. $F(ab')_2$ 단편은 온전한 항체를 펩신으로 처리하여 수득할 수 있으며, 이를 티올 환원제로 후속 처리하면, 경쇄 및 중쇄 일부를 포함하는 Fab 단편을 수득할 수 있다. Fab 단편은 또한 온전한 항체를 파파인으로 처리하여 수득될 수 있다. 예를 들면 본원 하이브리도마에서 생산된 항체를 펩신 또는 파파인으로 처리하여 $F(ab')_2$ 또는 Fab와 같은 CD40를 특이적으로 인식하는 항체 단편을 제작할 수 있다.
- [73] Fv 단편은 중쇄 및 경쇄의 가변영역만으로 구성된 항체 단편으로 두 가변영역은 화학적가교제 또는 분자간 이황화결합 같은 비공유 또는 공유 결합으로 연결될 수 있으며 (Inbar et al. (1972) PNAS 69:2659-2662), 예를 들면 본원 하이브리도마에서 생산된 항체를 효소 처리하여 중쇄 및 경쇄의 가변영역만을 분리하거나 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여, CD40를 특이적으로 인식하는 항체를 제작할 수 있다.
- [74] SCA 단편은 효소 처리 또는 유전공학적으로 제조될 수 있으며, 경쇄의 가변영역 및 중쇄의 가변영역이 폴리펩타이드와 같은 링커에 의해 연결되어 있는 항체 단편이다. ScFv의 제조방법은 예를 들면 US 특허 제4,936,778호 또는 US 특허 제5,892,019호에 기재된 것을 참조할 수 있으며, 본원 하이브리도마에서 생산된 항체를 효소처리하거나 또는 재조합 DNA 기술 예를 들면 상기 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 벡터를 제작하여, 이를 적절한 세포에서 발현함으로써, CD40를 특이적으로 인식하는 항체를 제작할 수 있다.
- [75] 본원에서 사용된 용어 "결합" 또는 "특이적 결합"은 본원 항체 또는 항체 조성물의 항원에 대한 친화도를 나타내는 것이다. 항원 항체 결합에서 "특이적 결합"은 전형적으로 해리상수(dissociation constant, K_d)가 $1 \times 10^{-5} M$ 미만 또는 $1 \times 10^{-6} M$ 미만 또는 $1 \times 10^{-7} M$ 미만인 경우 비특이적인 배경 결합과 구분될 수 있다. 특이적 결합은 당업계의 공지된 방법, 예를 들면 ELISA, SPR(Surface plasmon resonance), 면역침전(immunoprecipitation), 공침전(coprecipitation) 등의 방법으로 검출될 수 있으며, 비특이적 결합과 특이적 결합을 구분할 수 있는 적절한 대조군을 포함한다.
- [76] 상술한 바와 같은 온전한 항체 또는 그 단편을 포함하는 본원의 항체는 단량체의 항원 결합능의 적어도 일부를 포함하는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 등의 다량체로 존재할 수 있다. 이러한 다량체는 또한 동종다량체, 또는 이종다량체를 포함하는 것이다. 항체 다량체는 다수의 항원 결합 부위를 포함하기 때문에 단량체와 비교하여 항원에 대한 결합능이 우수하다. 항체의 다량체는 또한 다기능성(bifunctional, trifunctional, tetrafunctional) 항체 제작에도 용이하다.

- [77] 본원에서 사용된 용어 "다기능성"이란, 두 가지 이상의 활성 또는 기능 (예를 들면 항원결합능, 효소 활성, 리간드 또는 수용체 결합능)을 갖는 항체 또는 항체 조성물을 일컫는 것으로, 예를 들면 본원의 항체는 효소 활성을 갖는 폴리펩타이드 예를 들면 루시퍼라제, 아세틸트랜스퍼라제, 갈락토시다제 등과 결합될 수 있다. 다기능성 항체는 또한 다가성(multivalent) 또는 다특이성(bispecific, trispecific, 등) 형태의 항체를 포함한다.
- [78] "다특이성"이라는 용어는 두 개 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 가변영역을 포함하는 것이다. 상기 두 가지 이상의 에피토프는 한 가지 항원에 존재할 수 있거나 또는 다른 항원에 존재할 수 있다.
- [79]
- [80] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자 및 상기 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [81] 핵산은 예를 DNA, cDNA, RNA, 또는 재조합 또는 합성된 DNA 또는 RNA를 포함한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 cDNA이다. 핵산은 또한 상응하는 유전체(genomic DNA) 또는 그 단편일 수 있다. 본원에 따른 항체 또는 그 일부 또는 그 단편을 코딩하는 핵산 서열을 아미노산을 코딩하는 핵산서열의 중복성(redundancy)으로 인하여 상이할 수 있으며, 이러한 서열도 본원에 포함된다.
- [82] 본원에 사용될 수 있는 벡터는 예를 들면, 파이지, 플라스미드, 복제 가능 또는 복제 불능의 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 포함한다. 본원에 따른 핵산 분자는 공지된 다양한 벡터에 도입될 수 있다. 예를 들면 원핵세포용 벡터로서 pUC 계열 벡터, pBluescript (Stratagene), pET 계열 벡터(Novagen) 또는 pCRTPOPO (Invitrogen) 벡터 등을 포함하며, 진핵세포용 벡터로서, pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMCI neo(Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pLZD35, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems), pTriEx-Hygro (Novagen) 및 pCINeo (Promega) 벡터 등을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [83] 본원에 따른 벡터는 공지된 다양한 원핵 또는 진핵세포에 공지된 형질전환 또는 전달입 방법으로 도입될 수 있다. 세포에 도입시, 숙주세포의 유전체로 삽입될 수 있거나, 또는 엑스트라 크로모솜 형태로 존재할 수 있다.
- [84] 사용될 수 있는 원핵 세포로는 *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces* 및 *Salmonella* 계열에 속하는 세포를 포함하며, 진핵 세포로는 포유류 세포 예를 들면 Hela, HEK293, H9, Jurkat, 마우스 NIH3T3, C127, Cos1, Cos7 및 CV1, 마우스 C2C12, BHK, CHO 세포; *Saccharomyces cerevisiae* 또는 *Pichia pastoris* 와 같은 진균 세포, 초파리 S2 및 *Spodoptera Sf9*와 같은 곤충세포를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [85] 본원의 항체는 재조합 방법을 이용하여 공지된 방법대로 생산될 수 있다.

제조합 방법의 경우 본원에 따른 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 서열 및 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 항체를 하나 또는 두 개의 발현벡터에 클로닝한 후 진핵 숙주세포에 전달이입하여 항체를 발현한 후, 숙주세포 또는 배지로부터 항체를 수득할 수 있다. 이러한 벡터의 제작, 제작된 벡터로부터 세포에서의 단백질의 발현 및 단백질의 분리를 포함하는 제조합 방법은 당업계에 공지되어 있으며 예를 들면 Kaufman, R.J., Mol. (2000) Biotechnol. 16:151-160에 기재된 것 등을 참조할 수 있다. 본원의 항체를 코딩하는 벡터는 적절한 숙주세포 예를 들면 CHO 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, 이스트 또는 대장균에서 발현될 수 있으며, 항체는 세포의 용해물 또는 배지로부터 수득될 수 있다.

- [86] 본원의 항체 전부 또는 그 단편을 코딩하는 핵산 서열은 본원에 개시된 하이브리도마 세포로부터 통상의 방법대로 분리된 후 그 서열이 분석될 수 있다. 이어 분리된 핵산 서열을 상술한 바와 같은 적절한 발현벡터에 클로닝한 후 항체를 생산하지 않는 HEK293 세포, CHO 세포 또는 NS0 세포에 전달이입하여 숙주세포에서 제조합 항체를 생산할 수 있다. 본원의 항체 또는 그 단편을 코딩하는 핵산은 프로모터, 번역개시부위, 3' 비번역부위, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결 신호를 포함하는 발현벡터로 도입된다. 경쇄 및 중쇄는 하나의 벡터 또는 별도의 벡터에 도입될 수 있다.

[87]

- [88] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 항-CD40 항체에 에피토프를 인간을 제외한 동물에 주입하는 단계를 포함하는, 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생산하는 방법을 제공한다.

- [89] 본원의 항체는 하이브리도마를 포함하는 온전한 세포, 또는 그 세포 용해물(lysate)이나 배지에 존재할 수 있으며, 이로부터 일부 또는 실질적으로 순수한 형태로 정제 분리될 수 있다. 정제는 항체 이외의 세포의 다른 부산물 예를 들면 세포구성물, 핵산, 단백질 등을 제거하기 위한 것으로, 알칼라인/SDS 처리, CsCl 분리, 컬럼크로마토그래피, 아가로스전기영동과 같은 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

- [90] 모노클로날 항체는 예를 들면 본원에 개시된 하이브리도마 세포를 배양한 후, 이의 배지로부터 통상의 방법 예를 들면 단백질 A-세파로즈, 하이드록시아파타이드 크로마토그래피, 투석, 또는 친화 크로마토그래피와 같은 방법을 사용하여 분리될 수 있다.

[91]

- [92] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, CD40-CD40L 신호 전달 차단용 조성물을 제공한다.

- [93] 본 발명의 조성물은 상술한 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그

기제를 생략한다.

[94]

[95] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효 성분으로 포함하는 자가면역질환 또는 만성염증성질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[96] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 자가면역질환 또는 만성염증성질환의 치료 또는 예방 효과 증진용 약학적 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 목적 효과를 달성하는, 즉, 자가면역질환 또는 만성염증성질환의 치료 또는 예방 효과를 나타내는 임의의 치료제, 예컨대, 면역치료제와 병용될 수 있는 보조 치료제로서 제공될 수 있다.

[97] 본 명세서에서 사용되는 용어 “보조 치료제”는, 당업계에서 일반적으로 사용되는 자가면역질환 또는 만성염증성질환 치료제의 효과를 증진시키기 위하여 보조적으로 사용될 수 있는 제제를 말하며, 본 발명에 의한 보조제를 사용함으로써 자가면역질환 또는 만성염증성질환 치료제의 효능을 촉진하여 치료제의 효과를 향상시킬 수 있다.

[98] 또한, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD40-CD40L 신호 전달 차단 효과에 의하여, 항-약물 항체(Anti-Drug antibody) 생성 억제제 용도로 이용될 수 있다.

[99] 본 발명에서 사용되는 용어 “항-약물 항체 생성 억제제”란, 항체 약물을 투여받는 환자 중 해당 약물에 대한 억제 항체가 생성되어 약물 저항성을 가지고 있는 환자에 투여됨으로써, 약물에 대한 억제 항체 생산을 저해하여 약물의 효과를 유도할 수 있는 물질을 의미한다. 예컨대, 항-TNF 억제 항체(Humira, 라미케이드, 엠브렐 등)를 투여받는 환자의 30%는 약제 저항성을 가지고 있으나, 본원 발명의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 보조제로 투여하는 경우, 항-TNF-억제 항체에 대한 항체 생산을 저해하여 항-TNF-억제 항체의 효과를 유도할 수 있어 약제 저항성 문제를 해소할 수 있다.

[100] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 선택적으로 부형제 또는 안정화제와 함께 제형화된다.

[101] 본원에서 사용된 용어 “약학적으로 허용 가능한 담체”는 생리적으로 적합한 물질로, 예를 들면 임의의 용매, 분산매질, 코팅제 항박테리아 및 항진균제, 등장액, 흡수/재흡수 지연제, 등과 같은 물질을 포함한다. 한 구현예에서, 담체는 특히 주사 및 주입에 적합한 물질이 사용된다. 예를 들면 약학적으로 허용 가능한 담체는 멸균수 용액 또는 등장 완충 식염수 또는 분산액 및 멸균 주사액 제조용 멸균 분말을 포함할 수 있으며, 당업자라면 조성물에 포함되는 활성성분의 종류에 따라 적절한 제제를 선택할 수 있을 것이다.

[102] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th

ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [103] 본원의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 목적하는 효과에 따라 투여 방식 및 경로가 상이할 수 있음은 당업자에게 자명한 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구로 투여된다. 비경구로 투여되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [104] 본원에 따른 약학적 조성물의 유효 투여량 및 투여기간은 특정 환자, 조성물에 포함된 항체의 종류 및 투여방식 등을 고려하여 목적하는 치료효과에 따라 변할 수 있으며, 환자에게 독성을 유발하지 않아야 한다. 환자별 실제 투여량은 사용되는 조성물의 활성도, 투여경로, 투여시간, 분비속도, 함께 사용하는 다른 약물, 성별, 나이, 몸무게, 전반적 건강상태, 기저질환 등과 같은 다양한 요인을 고려하여 선별해야 한다. 한 구현예에서 본원의 항체는 질환의 치료 또는 예방을 위해 약 1 내지 100 mg/kg 체중, 예를 들면 약 10, 20, 30, 40, 또는 50 mg/kg 체중의 양으로 투여될 수 있으나, 경우에 따라 많게는 약 100 mg/kg의 양으로 투여될 수 있다.
- [105] 본원에 따른 약학적 조성물의 투여간격은 투여되는 항체의 반감기를 고려하여 적절한 간격 일단위, 주단위, 달단위로 투여될 수 있다.
- [106] 또한 본원 조성물은 투여 경로와 상관없이 약학적으로 허용가능한 적절한 투약 형태, 예를 들면, 수화된 형태, 예를 들면 수용액, 또는 동결건조된 형태로 제형화될 수 있다.
- [107] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 자가면역질환은 제1형 당뇨병, 알로페시아그레아타(alopecia greata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역아디슨 질환, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성유천포창, 심근병증, 복강 스프루우-피부염(celiac spruedermatitis), 만성 피로 면역이상 증후군, 만성염증성탈수초 다발성 신경병증, Churg-Strauss 증후군, 반흔성유천포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론씨병, 원판성낭창, 복태성복합한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 켈레인바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판감소성자반증, IgA 신경염, 연소자성 관절염, 편평태선, 홍반성루푸스, 메니에르병, 혼합성 연결 조직질환, 다발성 경화증, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결정성 다발동맥염, 다발연골염, 자가면역성 다선 증후군, 류마티스다발성근통, 다발성 근염과피부근염, 일차성무감마글로불린혈증, 일차성담증성간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성루푸스, 홍반성루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포

동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너육아종증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 가장 바람직하게는 제1형 당뇨병이다.

- [108] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 만성염증성질환은 염증성장질환(Inflammatory Bowel Disease), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis), 채장염, 만성간염, 식도염, 위염, 대장염, 폐렴, 기관지염, 인후염, 심근경색, 심부전, 알츠하이머, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 전신홍반루프스, 천식, 신부전, 건선, 빈혈, 당뇨 및 섬유화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환이다.
- [109]
- [110] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 장기이식시 면역거부반응 억제용 조성물을 제공한다.
- [111] 상기 조성물은 당업계에 공지된 기존의 면역조절제와 함께 병합 사용될 수 있다.
- [112] 상기 이식은 동종세포, 이종세포, 동종조직, 이종조직, 동종장기 및 이종 장기로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상을 이식하는 경우이다.
- [113] 본 발명에 따른 조성물은 CD40과 CD154의 상호작용을 효과적으로 억제할 수 있어, T 세포 활성화 및 항체 생성이 모두 억제되어 세포성 면역반응 및 체액 면역 반응을 모두 억제할 수 있다.
- [114] 이에 의해, 상기 조성물은 이식 수용체에 의한 조직 이식편의 거부반응을 억제 또는 반전시키거나, 이식수용체에 이식된 조직의 기능을 생존 연장 또는 보존시키거나, 또는 이식 수용체에서 손상된 이식 조직의 기능을 회복시킨다.
- [115] 본 발명의 조성물은 상술한 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이용하므로, 이와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [116]
- [117] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 약학적 조성물을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환 또는 만성염증성질환의 치료 방법을 제공한다.
- [118] 본 발명의 방법은 상술한 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 이용하므로, 이와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [119]
- [120] 즉, 본 발명에 따른 신규한 CD40 에피토프를 특이적으로 인식하여 이의 CD154와의 상호작용을 억제하는 본 발명의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 이를 포함하는 조성물은 CD40-CD154 신호전달 차단 용도, 자가면역질환의 치료, 예방 또는 조절뿐만 아니라 장기이식시 면역거부반응 억제에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [121]

발명의 효과

- [122] 본 발명의 신규한 항-CD40 항체는 CD40 리간드가 아닌 CD40을 직접 타겟으로 하며, 혈소판을 자극하지 않으면서 CD40-CD154 신호전달을 차단하여 탁월한 길항 효과를 나타내므로 자가면역 질환을 치료하고, 동종 또는 이종간의 장기의 이식 시 수용체(recipient)에서 발생하는 다양한 면역거부 반응을 극복하는 데 효과적인 제제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[123]

도면의 간단한 설명

- [124] 도 1a 및 도 1c는 본 항체의 에피토프 분석결과를 보여준다. 도 1b는 본 항체의 선형(Linear form) 항원 결정기 결합을 보여준다.
- [125] 도 2a 및 2b는 본 항체의 CD40-CD154 신호 전달차단의 고효율성을 보여준다.
- [126] 도 3은 본 항체의 고친화성을 보여준다.
- [127] 도 4는 본 항체의 비-아고니스트(non-agonistic) 성질을 보여준다.
- [128] 도 5a 및 5b는 본 항체의 세포독성 효과기(minimal depleting)의 성질을 보여준다.
- [129] 도 6은 본 항체의 영장류/인간 교차반응을 보여준다,
- [130] 도 7은 본 항체는 돼지 CD40-CD40L 결합 차단을 보여준다.

[131]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [132] 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 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[133]

[134] 실시예 1. 본 발명의 항-CD40 항체를 생산하는 하이브리도마의 제작

- [135] 본 발명자들은 CD40을 타겟으로 하여 CD40-CD154(CD40L) 신호전달을 차단하는 신규한 항-CD40 항체를 하기와 같이 제조, 선별, 및 분석하였다.
- [136] 신규한 항-CD40 항체를 개발하기 위하여 6 주령의 Balb/c 암컷 마우스 한 마리당 인간 CD40 항원 (100 μ g/마우스) 또는 CD40 발현 CHO 세포주를 1×10^7 의 수만큼 마우스 복강(IP; intraperitoneal cavity)으로 3주간의 간격으로 세 번 주입하고 정맥에서 혈액 검체를 취하여 혈청을 분리하였다. 상기 분리된 혈청에 CD40 발현CHO 세포에 희석한 혈청을 넣고 4°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리하여 결합하지 않은 항체를 세척하였다. 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-FITC(Dinona)을 200배 희석하여 넣고 4°C에서 15분간 반응시키고 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 세척한 후 유세포 분석기로 측정하여 CD40 발현 CHO세포주에 대한 역가를 확인하였다. CD40 발현 CHO세포주에 대한 역가를 유세포분석기로

확인한 결과 CD40 발현 CHO세포주를 면역화한 혈청에서 CD40 발현 CHO세포주에 대한 양성 반응이 높게 나타난 것을 확인하였다.

- [137] 상기와 같이 면역화된 마우스의 비장을 절제하여 단일 세포 부유액을 수득하고 RPMI(GIBCO)으로 2회 정도 세척한 후, 0.4% trypan blue(sigma)를 1:1(v/v)으로 섞은 후 현미경으로 염색되지 않은 세포를 측정하는 트립판 블루(trypan blue) 염색법으로 세포수를 계수하였다. 세포융합 partner 세포로는 X63 mouse myeloma 세포주(ATCC CRL-1580)를 사용하였으며 상기 비장세포와 동일하게 세척 후 세포수를 계수하였다.
- [138] 상기 골수(myeloma) 세포와 비장세포는 1:5의 비율로 혼합하고 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 미리 37°C로 예열된 50% PEG(polyethylene glycol) 1500 1ml을 1분에 걸쳐 서서히 첨가하였다. 약 1분 정도 정체시켰다가 RPMI 배지를 서서히 추가하여 단계적으로 희석하였다. 이를 원심 분리한 후 1xHAT이 포함된 RPMI(20%FBS, hypoxanthine-aminopterin-thymidine)에 부유시키고, 96-웰 플레이트에 150 μ l/웰로 분주한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 상기 융합 후 일정기간 HAT feeding을 진행하고, 군락을 형성한 웰이 관찰되면 HT 배지를 150 μ l 첨가하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양 후 형광염색을 실행하고 유세포 측정기로 분석하였다. CD40 발현CHO 세포주에 하이브리도마 배양 상층액을 100 μ l씩 넣고 4°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS 3ml을 넣고 1500rpm에서 3분간 원심분리하여 결합하지 않은 항체를 수세하고 결합된 항체를 확인하기 위해 이차항체인 goat anti-Mouse Ig-FITC (Jackson Laboratory)을 200배 희석하여 넣은 후 4°C에서 15분간 반응시킨 후 PBS 3ml로 위와 동일한 방법으로 수세한 후 유세포 분석기로 측정하였다.
- [139] 상기 방법에서 CHO 세포에 음성인 반면 정상 폐세포주인 L132와 말초혈액의 과립구(granulocytes)와 림프구(lymphocytes) 및 단핵세포(monocytes)에 모두 음성인 단클론 항체를 선별하고, 최종적으로 제한 희석(limiting dilution)을 통해 단일 콜로니의 RM8G1 하이브리도마 세포를 확보하였다.
- [140] 상기 하이브리도마를 최적의 하이브리도마로 선택하여 RM8G1으로 표시하였다.
- [141] 상기 하이브리도마 RM8G1을 ATCC에 2015년 01월 14일자로 기탁하였고, 하기 기탁 번호가 부여되었다: KCLRF-BP-00336.
- [142]
- [143] 실시예 2. 본 발명의 항-CD40-항체의 서열
- [144] 본 발명자들은 본 발명에 따라 생산된 항체의 구조를 분석하기 위하여, 항-CD40 항체를 생산하는 하이브리도마로부터의 중쇄 및 경쇄 단편을 암호화하는 핵산을 클로닝하였다.
- [145] 클로닝과 서열 결정은 하기와 같이 이루어졌다.
- [146] 유전자의 클로닝을 위해 RNA 미니프랩 키트(Qiagen)를 제조자의 방법대로 사용하여, 실시예 1에서 획득한 RM8G-1 하이브리도마 세포에서 RNA를 추출한

후, PCR 을 수행하여 cDNA를 합성하였다.

[147] 중쇄 cDNA 경쇄 cDNA 합성을 위한 PCR 조건 및 클로닝 방법은 다음과 같다:

[148] CD40 항원 특이 항체, RM8G-1 항체 유전자는 Mouse Ig-Primer Set (Millipore, Cat. #: 69831)을 이용하여 클로닝하였다. RM8G-1 하이브리도마로부터 분리한 RNA로부터 Mouse Ig-Primer Set을 이용하여 PCR을 수행하고, 이를 pGem-T 벡터(Promega, Cat. #: A3600)에 삽입한 후, 시퀀싱을 통해 DNA 염기서열을 확인하였으며, IMGT site (www.imgt.org)를 통해 마우스 항체 유전자를 확인하였다.

[149] 중쇄 가변영역 CDRH 1, 2 및 3의 서열은 각각 서열번호 3 내지 5로 나타낸다.

[150] 경쇄 가변영역 CDRH 1, 2 및 3의 서열은 각각 서열번호 6 내지 8로 나타낸다.

[151]

[152] 실시예 3. 본 발명의 항-CD40 항체가 인지하는 CD40 항원 에피토프 결정

[153] 본 발명자들은 본 발명의 항-CD40 항체가 인지하는 인간 CD40 항원 에피토프를 확인하였다.

[154] 에피토프 맵핑을 위해 사람 CD40 항원의 아미노산 서열 중 15 아미노산으로 구성된 펩티드 277개를 제작하고 이를 이용하여 펩타이드

마이크로어레이(peptide microarray)를 실시하였다. 하나의 펩티드는 15개의 아미노산으로 이루어져 있고 이중 14개는 중복되도록 제작하였다. 펩타이드 마이크로어레이 판은 duplicate로 만들어 실시하였으므로 총 554개의 펩티드 스폿과 반응이 일어나지 않을 음성 대조군 펩티드 78개 스폿을 제작하였다. 하나의 펩타이드 마이크로어레이 판에는 goat anti-IgG(H+L) DyLight680 항체로 (1:5000) 반응하고 background 반응여부를 확인하였다. 다른 3개의 microarray 판에는 RM8G-1을 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 반응하였 세척후 goat anti-mouse IgG(H+L) DyLight680(1:5000)으로 45분 상온에서 반응시켰다. Microarray spot은 LI-COR Odyssey Imaging System으로 read-out하였다. Microplate를 secondary goat anti-mouse IgG(H+L) DyLight680으로 반응하였을시 CD40 peptide에 대해 비특이적 결합반응이 일어나지 않았으나 RM8G-1을 농도별로 처리한 샘플에서는 도 1a와 같은 결합 반응이 생겼다. 항체 RM8G-1이 반응하는 부위는 ECLPCGESEF 부위가 가장 강하였고 추가적인 약한 반응이 EPQEINFPDD에 나타났다.

[155] 그 결과, 도 1a 내지 1c에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 CD40 단일클론항체는 통상적으로 이용되고 있는 기존 항체가 결합하는 항원 결정기(Binding Epitope)와는 상이한 신규 에피토프(epitope)에 결합한다는 것을 확인하였으며, 상기 에피토프의 서열은 다음과 같다: ECLPCGESEF(Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe).

[156] RM8G-1이 선형 항원 결정기를 결합하는지 알아보기 위해 웨스턴 블롯(western blot) 분석을 실시하였다. 즉, Raji 세포를 RIPA 용해 완충액(lysis buffer)으로 용해 후 전기영동하여 PVDF 에 트랜스퍼하였다.

- [157] 항-CD40 RM8G-1로 4°C에서 밤새 반응시키고 항-마우스 IgG-HRP (1:2000)로 1 시간 반응하여 TBST로 세척한 후 발색을 확인하였다.
- [158] 그 결과, 도 1b이 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항-CD40 항체는 종래 항-CD40 항체와 달리 에피토프의 구조적 형태외에도 선형(Linear form) 항원 결정기 결합 특성을 나타냄을 확인하였다.
- [159] 즉, 웨스턴 블롯시 항원을 선형(linear) 형태로 만든 후 실시하드로 반응이 있다는 것은 본 발명의 항-CD40 항체가 선형(linear form)의 형태를 인식할 수 있다는 것을 제시한다. 따라서, 이는 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G1)가 선형의 형태를 인식하지 못하는 종래 항체보다 현저한 특성을 나타내는 중요한 특징임을 알 수 있다.
- [160]
- [161] 실시예 4. 본 발명의 항-CD40 항체의 길항 효과
- [162] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제작된 본 발명의 신규한 항-CD40 항체의 길항 효과를 확인하였다.
- [163]
- [164] **4-1. 본 발명의 항-CD40 항체에 의한 CD40-CD154 신호 전달 억제**
- [165] 본 발명자들은 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)에 의한 CD40-CD154 신호 전달 억제능을 확인하였다.
- [166] RM8G-1의 신호 전달 억제 효과를 확인하기 위해 영장류의 일종인 rhesus monkey의 혈액에서 PBMC를 분리하고 His-tag CD40L를 반응시켰다. 이때 RM8G-1을 농도별로 처리하고 상온에서 30분 반응시켰다. Washing 후 anti-histidine-FITC 항체로 40분 ice 반응시켜 유세포 분석을 실시하였다. 유세포 분석후 FITC 발현을 mean-fluorescence intensity 값으로 표시하는데 이 값이 높을수록 blocking 효과는 떨어짐. Relative inhibition은 RM8G-1을 처리하지 않는 그룹의 M.F.I값을 100으로 하고 실험군의 M.F.I값의 상대적인 값으로 표시하였다.
- [167] 또한, RM8G-1이 사람의 CD40-CD40L 신호전달을 차단하는지 알아보기 위해 Ramos B 세포와 CD40L가 발현된 CHO 세포(CHO-CD40L)를 24시간 동안 동시 배양하였다. 이때 RM8G-1을 농도별(0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다.
- [168] Ramos B 세포에는 CD40가 발현되어 있어 CHO-CD40L의 CD40L 신호에 의해 자극을 받아 활성화된다. 상기 활성화된 Ramos 세포는 ICAM-1이라는 부착인자를 발현하는데 이러한 ICAM-1의 발현 정도를 유세포 분석으로 확인함으로써 RM8G-1의 blocking 정도를 정량할 수 있다.
- [169] 즉 양성 대조군인 Ramos, CHO-CD40L를 배양하고 항체처리를 하지 않는 그룹에서 Ramos에서 발현되는 ICAM-1의 발현정도 (M.F.I로 표시)를 기준으로 하여 항체를 처리한 그룹에서 확인되는 ICAM-1의 발현정도를 비교하여 저해율을 계산하였다.

- [170] 그 결과, 도 2a 및 2b에 나타낸 바와 같이, 영장류 및 인간에서 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)는 CD40-CD154 결합을 특이적으로 억제할 수 있을 뿐만 아니라, CD40-CD154 신호 전달을 차단하는 억제능이 고효율성임을 보여준다.
- [171]
- [172] **4-2. 본 발명의 항-CD40 항체의 CD40 항원에 대한 친화성**
- [173] 본 발명자들은 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)의 인간 CD40 항원에 대한 친화성을 확인하였다.
- [174] Maxisorp ELISA plate에 well당 사람 CD40 항원을 100ng 넣어 37°C에서 한 시간 반응시켜 항원을 코팅한 뒤, 1x blocking 용액(sigma)을 well 당 200 μ l 넣고 37°C에서 한 시간 반응시켜 블로킹하였다. 상기 준비된 플레이트에 RM8G-1 항체 및 PBS 100 μ l을 넣은 후 37°C에서 한 시간 반응시키고 PBS로 수세하여 결합하지 않는 항체는 제거하였다. 이 때, RM8G-1 항체는 50 μ g/ml 의 농도에서 출발하여 3 배수로 연속 희석하여 0.000282 μ g/ml 농도까지 총 12 포인트의 RM8G-1 항체 결합을 시켰다. 이후 Goat anti-Mouse IgG-HRP(Jackson Laboratory)을 희석하여 넣어주고 30 분간 반응시킨 후 PBS로 수세한 뒤 TMB 용액을 well 당 50 μ l씩 넣어 10분간 반응시킨 후 황산 50 μ l를 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [175] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 ELISA 방법으로 CD40 항원에 대한 친화성을 확인했을 때, RM8G-1 항체가 농도 구배에 따라 CD40 항원에 결합함을 나타낸다.
- [176] 따라서, 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)는 우수한 친화성을 보여준다.
- [177] RM8G-1 항체의 CD40에 대한 고 친화성을 확인하기 위해 Association rate constant K_a 값과 dissociation rate constant K_d , Equilibrium dissociation constant K_D 값을 CM5 sensor chip assay를 통해 확인하였다.
- [178] 즉 항-His 항체를 아민 커플링(amine coupling) 방법으로 CM5 sensor chip 표면에 고정화(immobilization)시켰다. His-tagged CD40 항원을 항체와 반응하여 Capture 시키고 anti-his antibody가 coating된 Sensor chip과 반응시켰다. 그 결과는 biocore T200(GE Healthcare)를 통해 판독하였다.
- [179] 그 결과, 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)는 $K_a=4.741 \times 10^5 M^{-1} S^{-1}$, $K_D=2.340 \times 10^{-4} S^{-1}$, Equilibrium Dissociation Constant $K_D=4.936 \times 10^{-10} M$ 값을 나타내었으며, 이는 항-CD40 항체(RM8G-1) 항체가 추가적인 affinity maturation 없이도 치료제로 개발할 수 있을 정도의 고 친화도를 나타낸다는 것을 제시한다.
- [180]
- [181] **4-3. 본 발명의 항-CD40 항체의 비-아고니스트(non-agonistic) 성질**
- [182] CD40을 인식하는 항-CD40 항체는, B 세포에 대하여 각종 생물 활성을 나타내는 것으로 개시되어 왔으며, CD40과 CD40L과의 상호 작용에 대하여 아고니스틱인 것과 안타고니스틱인 것으로 크게 구별된다.
- [183] 아고니스틱 항-CD40 항체는 CD40과 CD40L과의 상호 작용의 활성화가 필요한

질환의 치료에 유효할 가능성이 있으며, 세균, 바이러스 등의 감염증 치료, 암 치료 등에 사용할 수 있는 것으로 알려져 있다.

- [184] 그러나, CD40L은 활성화된 혈소판에 발현한다는 보고(V. Henn et. al., Nature 391: 591, 1998)가 있기 때문에, 항 CD40L 항체를 치료약으로서 사용한 경우, 혈전을 야기할 위험성이 존재하는 것이 보고되어 있다(T. Kawai et. al., Nat. Med. 6: 114, 2000).
- [185] 또한, CD40은 비-호지킨 소포성 림프종과 같은 악성 종양 B 세포를 활성화하고 생존하도록 하는 B 세포 수용체로 보고되어 있다(Johnson et al., Blood 82:1848-1857(1993); 및 Metkar et al., Cancer Immunol. Immunother. 47:104(1998)).
- [186] 이러한 관점에서, CD40과 그의 리간드의 결합을 저해하는 항체 치료약으로서, 항 CD40L 항체보다 오히려 CD40에 대한 항체의 경우가 안전성이 우수하다고 할 수 있다. 따라서, 항-CD40 항체로서는 CD40L의 CD40에의 결합을 억제하고, 또한 항체 자체가 CD40을 활성화하지 않는 것이 필요하다.
- [187] CD40은 면역 반응에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있기 때문에, CD40과 그의 리간드의 결합을 저해함으로써, 장기 이식시의 면역 억제나 자기 면역 질환을 치료할 수 있다.
- [188] 이에, 본 발명자들은 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)의 비-아고니스트(non-agonistic) 성질을 확인하였다.
- [189] RM8G-1이 농도 별로 코팅된 plate에 Ramos (B cell) 세포를 배양하였다. 이때 아고니스트 항체인 경우 Ramos 세포의 CD40을 자극하여 신호전달이 이루어지며 활성화된 경우 ICAM-1이라는 부착인자의 발현이 증가된다. 그러나, RM8G-1의 경우 이러한 활성화가 없는 상태로 유지되는 것이 확인되었다.
- [190] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)는 우수한 비-작용성(non-agonistic) 항체임을 보여준다.
- [191] 따라서, 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)는 비-아고니스틱(non-agonistic) 및 안타고니스틱(antagonistic) 활성을 유지하는 안타고니스틱 항-CD40 항체로서, 자기 면역 질환의 치료, 장기, 골수 등의 이식에 있어서의 거절 반응의 억제에 보다 효과적임을 알 수 있다.
- [192]
- [193] **4-4. 본 발명의 항-CD40 항체의 세포독성 효과기 기능**
- [194] 본 발명자들은 본 발명의 안타고니스틱 항-CD40 항체(RM8G-1)에 대하여 추가적으로 Fc-엔지니어링(Fc-engineering)을 통해 비-고갈(non-depleting) 또는 최소 고갈(minimum-depleting) 항체로 제조하였다.
- [195] 항-CD40 항체의 Fc 엔지니어링은 항체를 치료제로 개발시 ADCC 및 CDC에 의해 타겟 세포(주로 항원 전달 세포)가 세포독성으로 고갈(depletion)되는 부작용을 제거하기 위해서이다. 이러한 ADCC나 CDC를 없애기 위해서는 항체에서 보체나 세포의 Fc 수용체가 결합하는 부위를 변형하거나 결합력이

낮은 IgG4 형태의 Fc를 사용할 수 있다.

- [196] 구체적으로 본 발명자들은 본 발명의 안타고니스틱 항-CD40 항체(RM8G-1)의 항체 의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)과 같은 세포독성 효과기 기능을 확인하였다.
- [197] CDC 어세이를 위해, 사람 B 세포주인 Raji cell을 96웰(well) 플레이트에 5×10^4 cells/well로 분주한 후 37°C CO_2 incubator에서 20-24시간 배양하였다. 각 웰(well)의 배양 배지를 우태혈청이 포함되지 않은 RPMI 배지로 교체한 후, 정제한 RM8G-1 및 Rituximab 항체를 최종 농도 $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 10%의 human serum을 섞어 혼합액을 만든 뒤 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 각 4시간과 21시간 후, 세포들은 Raji 세포를 검출하기 위한 마커로서 항 CD19 항체-PE-Cy7 (BD)와 세포의 생존여부를 확인하기 위한 시약으로서 7-AAD (BD)로 염색한 후, 유세포분석기로 분석하였다. CD19 양성인 면서 동시에 7-AAD 양성인 그룹을 구획화하여 Raji 세포의 CDC에 결과를 분석하였다. 상기 결과는 도 5a에 나타내었다.
- [198] ADCC 어세이를 위해, 사람 B 세포주인 Raji cell을 24웰(well) 플레이트에 5×10^4 cells/well로 분주한 후 37°C CO_2 incubator에서 20-24시간 배양한다. 각 웰(well)의 배양 배지를 우태혈청이 포함되지 않은 RPMI 배지로 교체한 후, effector 세포로서 사람 PBMC를 타겟 세포 Raji 세포 대비 100배수 (5×10^6 cells/well) 되도록 넣고, RM8G-1 및 Rituximab 항체를 최종 농도 $10 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 분주하였다. 각 4시간과 21시간 후, 세포들은 Raji 세포를 검출하기 위한 마커로서 항 CD19 항체-PE-Cy7 (BD)와 세포의 생존여부를 확인하기 위한 시약으로서 7-AAD (BD)로 염색한 후, 유세포분석기로 분석하였다. CD19 양성인 면서 동시에 7-AAD 양성인 그룹을 구획화하여 Raji 세포의 세포독성 결과를 분석하였다. 상기 결과는 도 5b에 나타내었다.
- [199] 이때, 당업계에 공지된 항-CD20 항체인 리툭산(Rituxan, Rituximab)을 대조군으로 이용하였다.
- [200] 그 결과, 도 5a 및 5b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)는 공지된 항체와 비교하여, ADCC와 같은 세포적 세포독성은 나타나지 않으며 최소한의 CDC가 나타나는 것으로 확인되었다. 최소한의 CDC는 향후 인간화 항체 제작시 CDC나 ADCC가 없는 Fc 변형체나 IgG4 형태의 Fc를 사용함으로써 극복가능하다.

[201]

[202] 실시예 5. 본 발명의 항-CD40 항체의 종 교차반응성

[203] 본 발명자들은 다양한 종, 특히 영장류인 원숭이로부터의 CD40에 대한 본 발명의 항체의 결합 및 친화성을 결정하기 위하여 FACS 분석을 실시하였다.

[204] Chinese hamster overy cell(CHO)세포에 Monkey CD40 유전자를 형질전환시킨 Monkey CD40-CHO 세포를 제작하였다. Raji 세포는 인간 세포주이다. RM8G-1 항체($0.5 \mu\text{g/ml}$)를 CHO 세포와 Monkey CD40-CHO 세포, Raji 세포에 얼음위에서

30분 반응시키고 세척한 뒤 항-마우스 IgG-PE로 얼음 위에서 40분 반응시켰다. 이를 세척한 후 유세포 분석을 실시하였다. 이때 CHO는 음성대조군으로 Raji는 양성대조군으로 사용하였다.

[205] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항-CD40 항체는 영장류(Rhesus monkey) 및 인간의 CD40과 교차결합이 가능하므로 전임상연구 및 치료제 개발에 매우 유리하다는 것을 제시한다.

[206]

[207] 실시예 6. 본 발명의 항-CD40 항체의 이종세포 신호전달 차단

[208] 본 발명자들은 본 발명의 항-CD40 항체의 이종세포(돼지) 신호전달 차단 효과를 확인하였다.

[209] 이종세포(돼지)의 CD40의 신호전달을 차단하는지 확인하기 위해 돼지 혈액에서 PBMC를 분리하고 CD40L-His tag과 1 시간 동안 얼음 위에서 반응시켰다. 이때 RM RM8G-1 을 농도별 처리하여 돼지 CD40-CD40L 신호전달 차단효과를 유세포 분석으로 확인하였다. 이를 위해 anti-His tag-FITC 항체로 40분간 반응시키고 돼지의 PBMC의 CD40에 반응하는 CD40L-His tag의 양을 Mean-fluorescence intensity로 표기하였다.

[210] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 항-CD40 항체는 농도에 비례하여 돼지 CD40-CD40L 결합을 차단하였으며, 이는 이종세포/이종고형장기/이종체도이식시 발생하는 공여자-수용자의 CD40-CD154 신호를 차단할 수 있는 유일한 항체로 이종이식 거부반응억제에 매우 효과적으로 작용할 것으로 기대된다.

[211]

[212] 결론적으로, 본 발명에서는 인간 CD40의 에피토프(ECLPCGESEF)에 결합하여 CD40-CD154 상호작용을 억제할 수 있는 신규한 항체(RM8G-1)를 개발하였으며, 인간 CD40-CD154 결합 차단에 대한 효율성이 기존의 항-CD40 항체보다 현저한 효과를 발휘함을 확인하였다.

[213] 또한, 본 발명의 항-CD40 항체(RM8G-1)는 장기 이식시 면역거부 반응 억제 및 자가면역질환 치료를 위한 항-CD40 항체로서 갖추어야 할 모든 선결 조건을 충족하고 있는 바, 탁월한 자가면역 질환치료제 및 장기 이식시 면역 억제제로 이용할 수 있다.

[214]

[215] 기탁기관명 : 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)

[216] 수탁번호 : KCLRFBP-00336

[217] 수탁일자 : 20150114

[218]

[219]



한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)

110-799, 서울시 종로구 대학로 103 서울대학교 의과대학 암연구소 7층

TEL : +82-2-3658-7915, FAX : +82-2-742-0021, http://cellbank.snu.ac.kr, snukclb@snu.ac.kr

Korean Cell Line Bank; Korean Cell Line Research Foundation, International Microorganism Depository Authority approved by WIPO
Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 103 Daehak-ro, Chongno-gu, Seoul 150-799, KOREA.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

To: Chung-Gyu Park, MD, PhD

Department of Microbiology and Immunology, Seoul National University

College of Medicine, 103 Daehak-ro Jongno-gu, 110-799 Seoul, Korea.

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : RM8G1	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00336
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☒ A scientific description ☒ A proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on January 14, 2015	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Director Korean Cell Line Research Foundation Address : Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Signature(s) <i>Chung-Gyu Park</i> Date : 2015. 01. 27 .

[220]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명
국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 박정규 교수님
(110-799) 대한민국 서울특별시 종로구 대학로 103, 서울대학교 의과대학, 미생물학 및 면역학 교실

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: RM8G1	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCLRF-BP-00336
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ■ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2015년 01월 14일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____ 에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____ 에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank) 주소: (110-799) 대한민국 서울특별시 종로구 연 건동 28, 서울대학교 의과대학, 암연구소	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명:  서명일: 2015. 01. 27

BP/4 형식(KTC Form 17)

단일 페이지

(원문과 상위 없음을 확인함) 대리인 : 변리사 김 순 응



청구범위

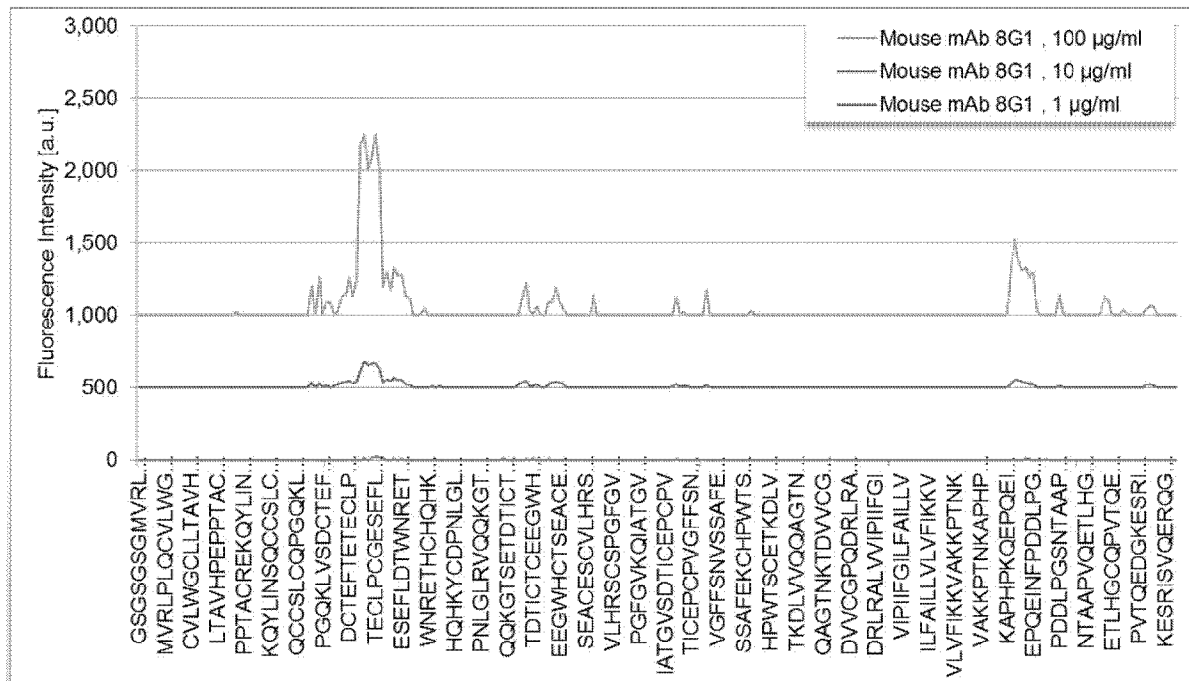
- [청구항 1] CD40의 아미노산 서열 중 Glu58, Cys59, Leu60, Pro61, Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66 및 Phe67의 CD40 아미노산 잔기로 이루어진 항-CD40 항체 에피토프.
- [청구항 2] CD40의 아미노산 서열 중 Glu58, Cys59, Leu60, Pro61, Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66 및 Phe67의 CD40 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 CD40에의 결합이 CD40을 길항하는(antagonize) 길항 항체(antagonistic antibody)인 것을 특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 CD40은 영장류의 CD40인 것을 특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,
상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH); 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는 면역글로블린 중쇄 가변영역(VL);을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)은, 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 3의 HCDR1, 서열번호 4의 HCDR2 및 서열번호 5의 HCDR3의 아미노산 서열을 포함하고;
상기 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)은, 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 6의 LCDR1, 서열번호 7의 LCDR2 및 서열번호 8의 LCDR3의 아미노산 서열로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 7] 제2항에 있어서,
상기 항-CD40 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 영장류화 항체, 인간화 항체 및 인간 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 8] 제2항에 있어서,
상기 항-CD40 항체는 다량체 항체, 이중이량체 항체, 반이량체 항체, 4가 항체, 이중특이적 항체 및 단일 쇄 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

- [청구항 9] 제2항에 있어서,
상기 항원 결합 단편은 Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv 및 도메인
항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 항-CD40
항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 10] 제2항에 있어서,
상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 기탁번호
KCLRF-BP-00336로 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것을
특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 11] 제2항에 있어서,
상기 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 추가적으로 치료제,
프로드럭, 펩타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 개질제, 약물
및 PEG로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질과 컨쥬게이션되는 것을
특징으로 하는, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 12] CD40의 아미노산 서열 중 Glu58, Cys59, Leu60, Pro61, Cys62, Gly63,
Glu64, Ser65, Glu66 및 Phe67의 CD40 아미노산 잔기로 이루어진 항-CD40
항체 에피토프를, 인간을 제외한 동물에 주입하는 단계를 포함하는, 상기
에피토프에 특이적으로 결합하는 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합
단편을 생산하는 방법.
- [청구항 13] 제2항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합
단편을 포함하는, CD40-CD40L 신호 전달 차단용 조성물.
- [청구항 14] 제2항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합
단편을 유효 성분으로 포함하는 자가면역질환의 치료 또는 예방용
약학적 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 자가면역질환은 제1형 당뇨병,
알로페시아그레아타(alopecia greata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군,
자가면역아디슨 질환, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈,
자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증,
베체트병, 수포성유천포창, 심근병증, 복강 스프루우-피부염(celiac
spruedermatitis), 만성 피로 면역이상 증후군, 만성염증성탈수초 다발성
신경병증, Churg-Strauss 증후군, 반흔성유천포창, CREST 증후군, 한냉
응집소 질환, 크론씨병, 원판성낭창, 복태성복합한냉글로불린혈증,
섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 궤레인바레 증후군,
하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판감소성자반증, IgA
신경염, 연소자성 관절염, 편평태선, 홍반성루푸스, 메니에르병, 혼합성
연결 조직질환, 다발성 경화증, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈,
결정성 다발동맥염, 다발연골염, 자가면역성 다선 증후군,
류마티스다발성근통, 다발성 근염과피부근염,
일차성무감마글로불린혈증, 일차성담증성간경변, 건선, 건선성 관절염,

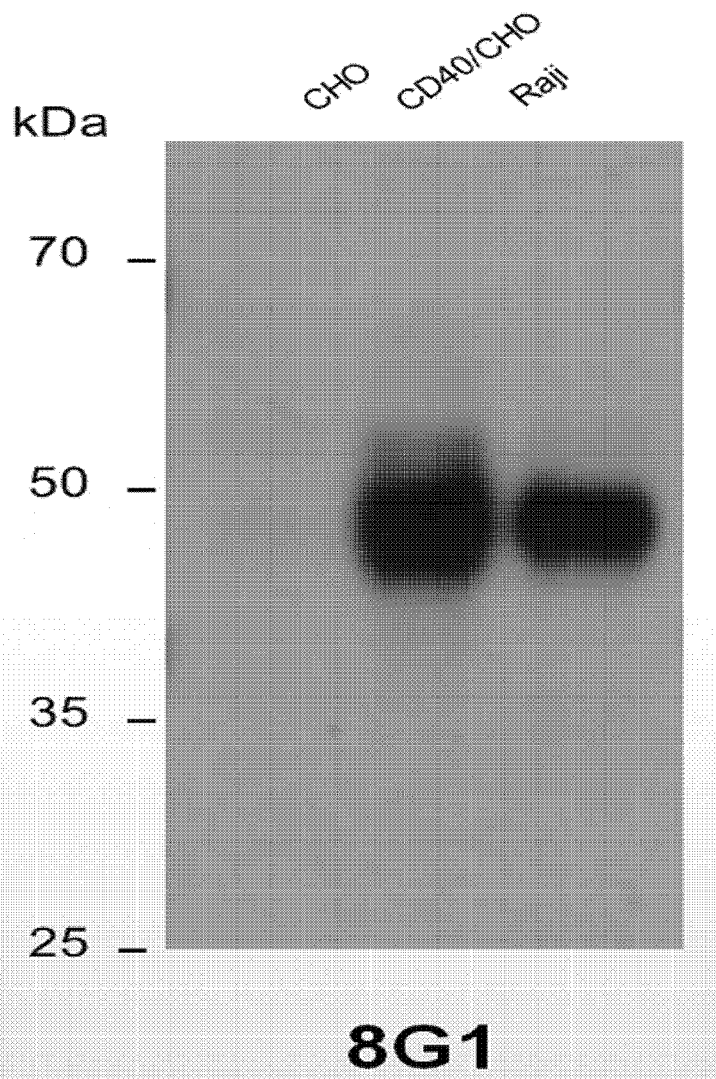
레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성루푸스, 홍반성루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너육아종증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

- [청구항 16] 제2항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 유효 성분으로 포함하는 만성염증성질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 만성염증성질환은 염증성장질환(Inflammatory Bowel Disease), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(Ulcerative colitis), 췌장염, 만성간염, 식도염, 위염, 대장염, 폐렴, 기관지염, 인후염, 심근경색, 심부전, 알츠하이머, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 전신홍반루푸스, 천식, 신부전, 건선, 빈혈, 당뇨 및 섬유화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 18] 제2항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 이식시 면역거부반응 억제용 조성물.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 이식은 동종세포, 이종세포, 동종조직, 이종조직, 동종장기 및 이종장기로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상을 이식하는 경우인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 20] 제18항에 있어서,
상기 조성물은 이식 수용체에 의한 조직 이식편의 거부반응을 억제 또는 반전시키거나, 이식수용체에 이식된 조직의 기능을 생존 연장 또는 보존시키거나, 또는 이식 수용체에서 손상된 이식 조직의 기능을 회복시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 21] 제14항 또는 제16항의 약학적 조성물을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환 또는 만성염증성질환의 치료 방법.

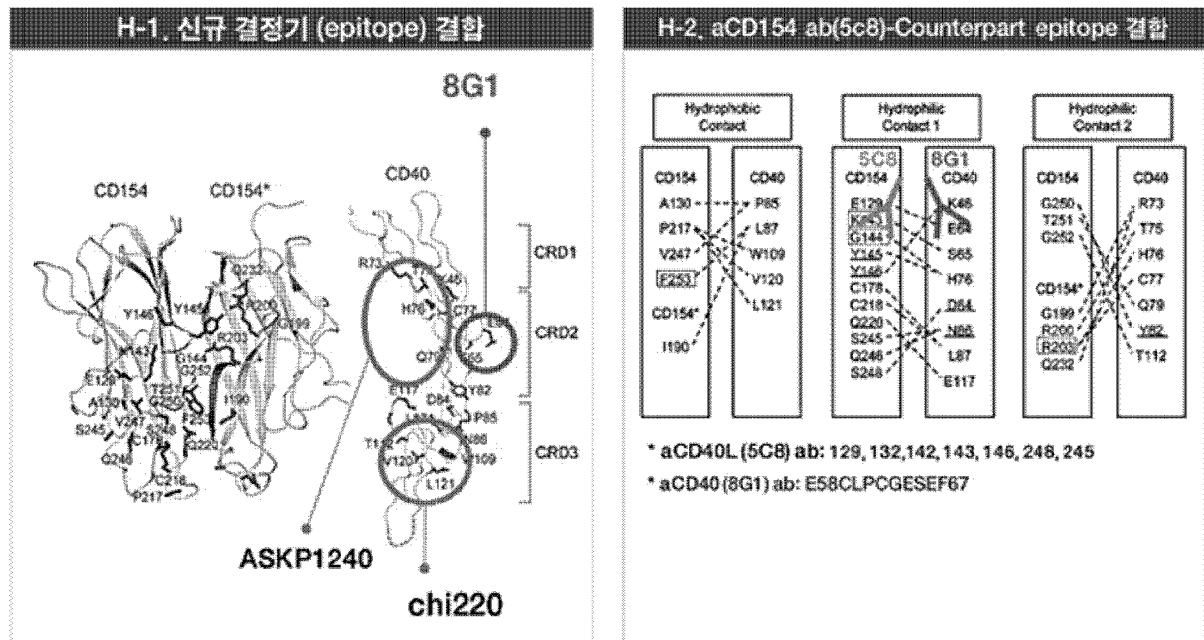
[도 1a]



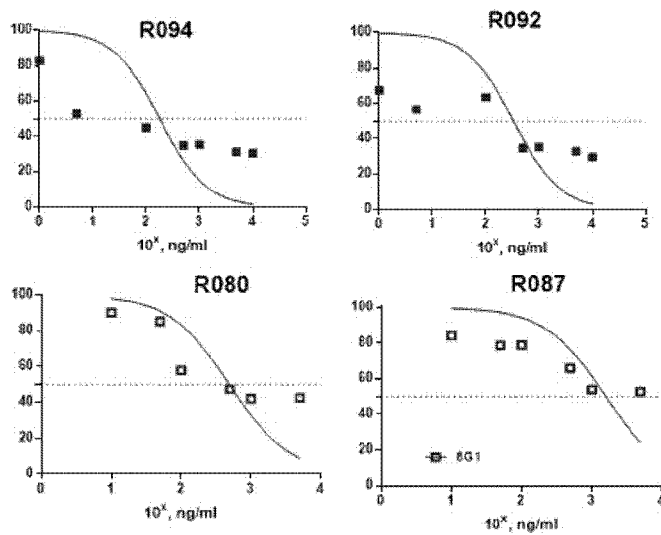
[도 1b]



[도1c]

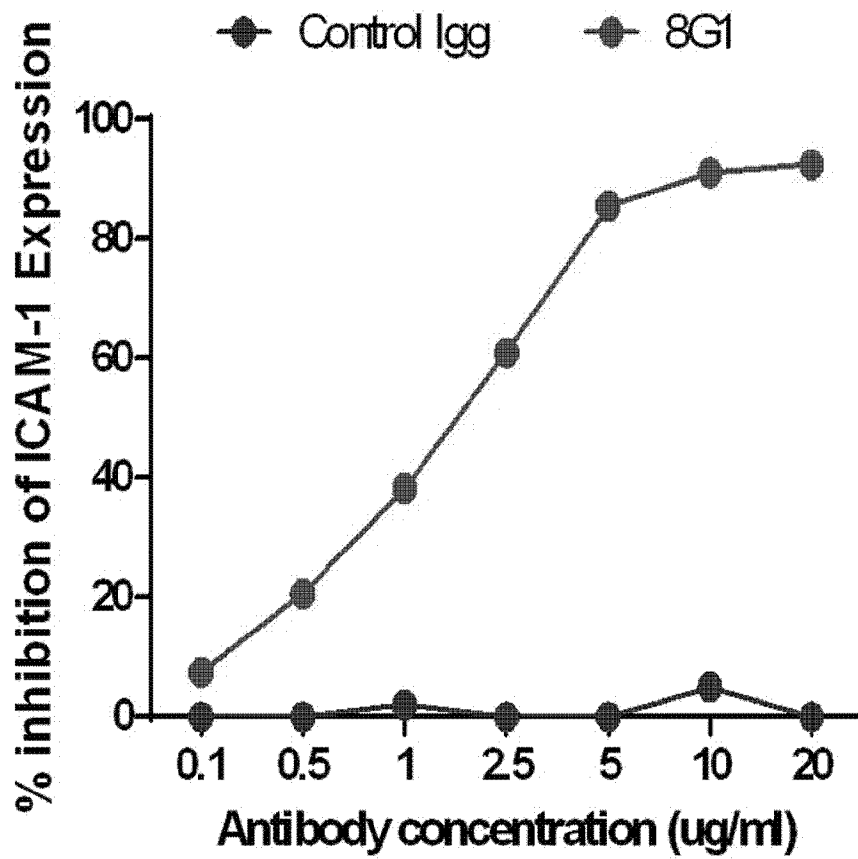


[도2a]

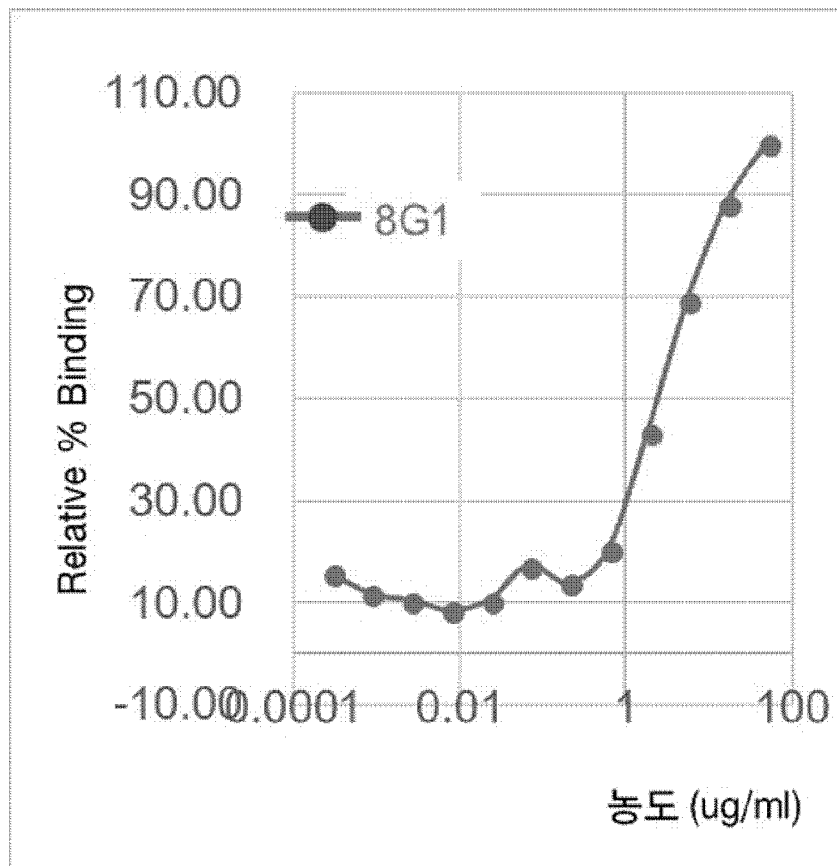


	Rhesus pre-TPL	RM8G1(ug/ml)
IC ₅₀	R094	0.178
	R092	0.332
	R080	0.490
	R087	1.60
Total	n=4	0.65

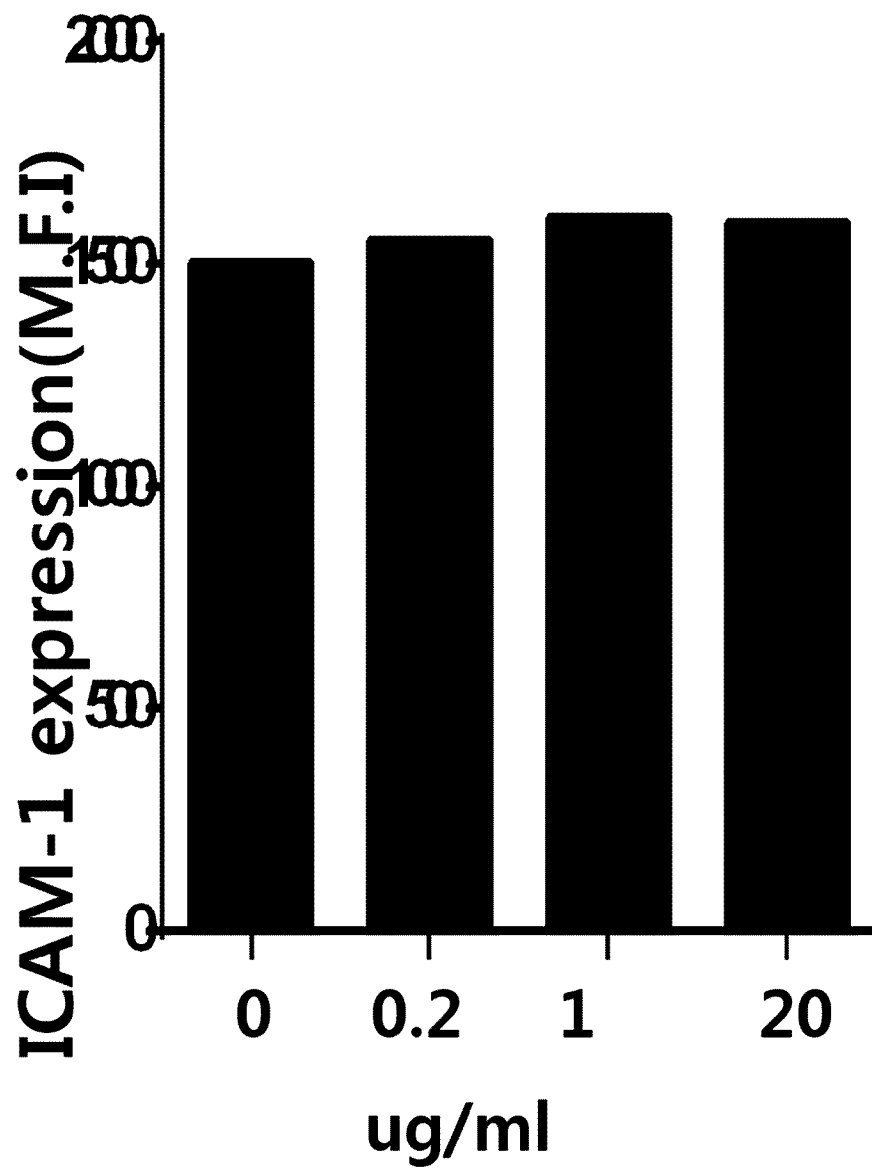
[도2b]



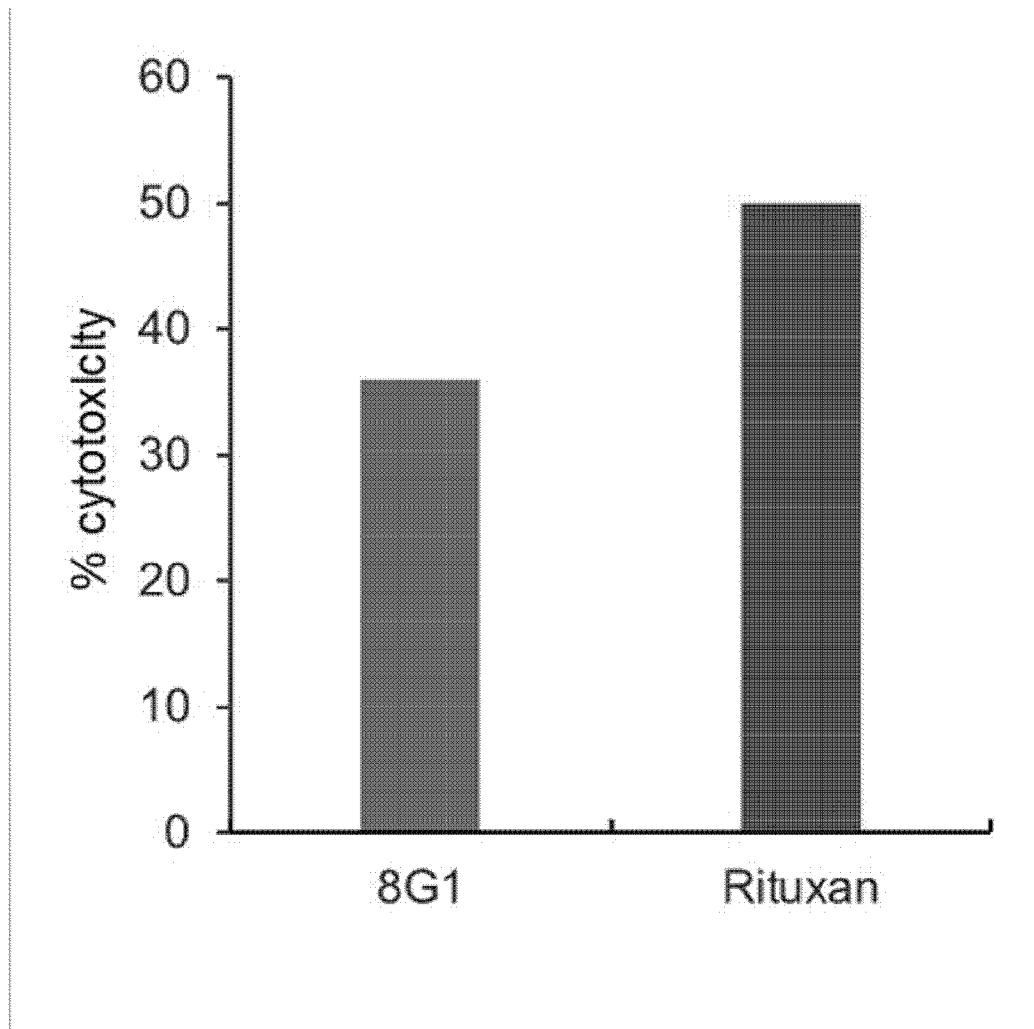
[도3]



[도4]



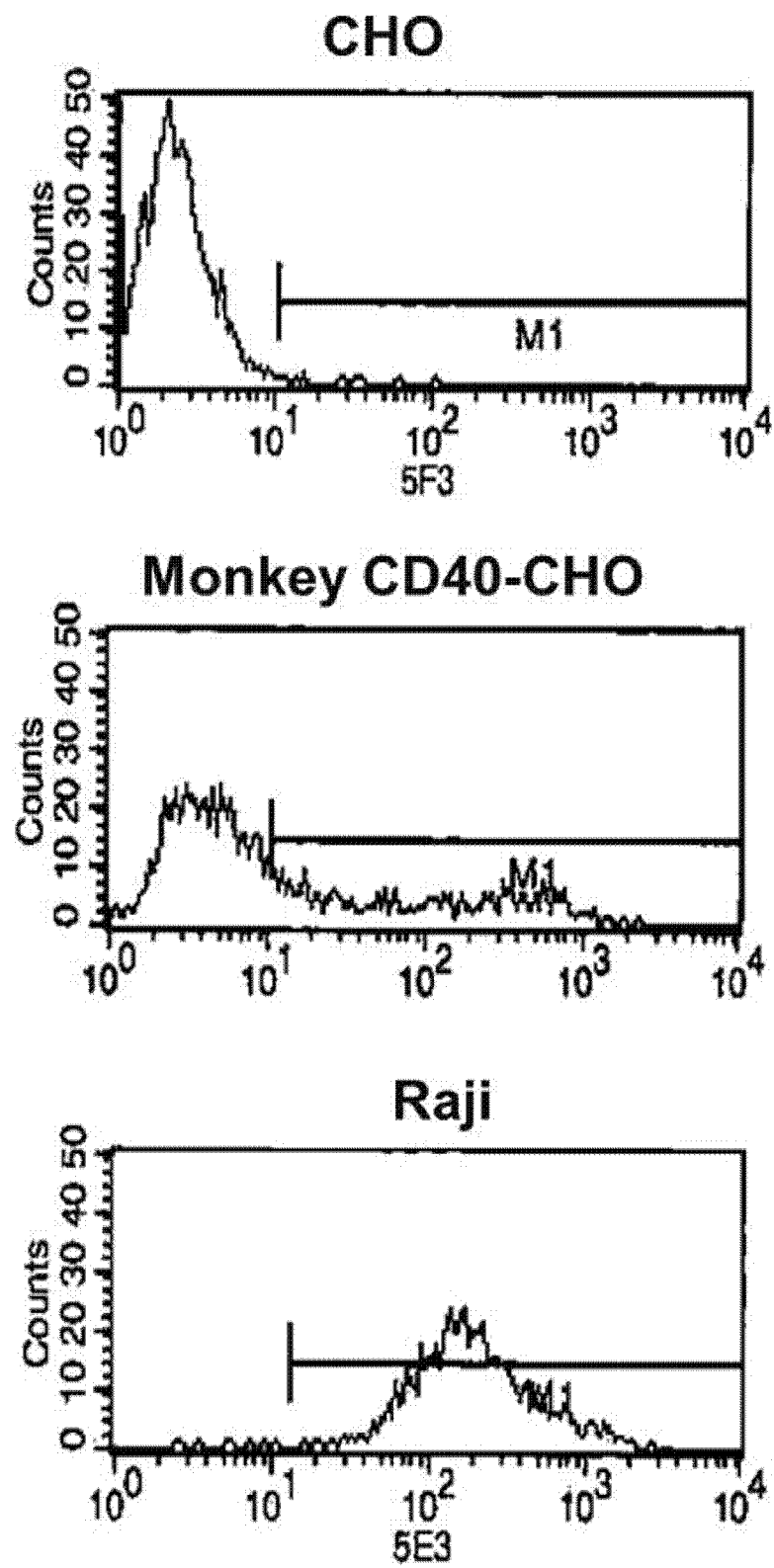
[도5a]



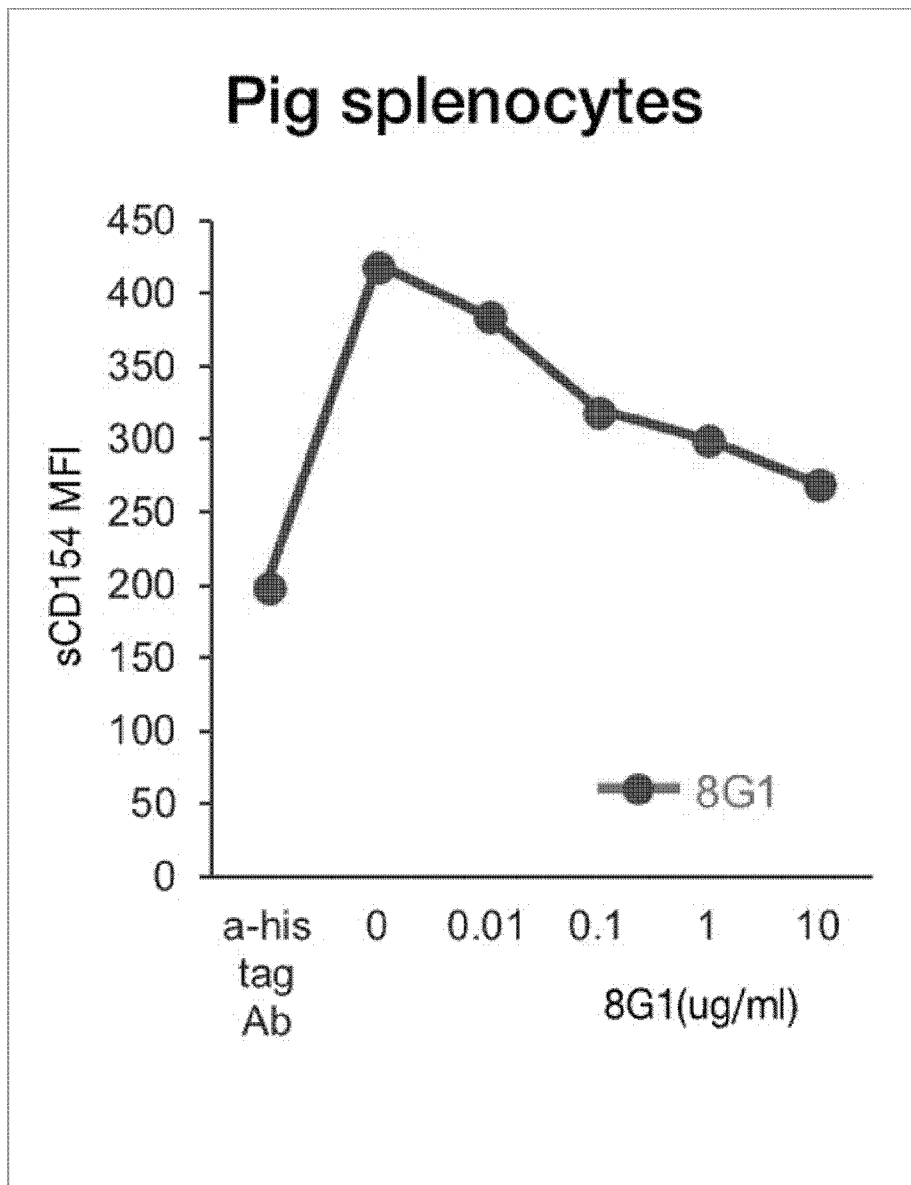
[도5b]

	Cytotoxicity (%)	
	4hr	20hr
PBMC/Raji/(-)	1.29	2.24
PBMC/Raji/RM8G-1 [10.0]-3.3 ug/mL	3.22	2.41
PBMC/Raji/RM8G-1 [1.0]-0.33 ug/mL	3.06	2.25
PBMC/Raji/RM8G-1 [0.1]-0.033 ug/mL	3.93	4.17
PBMC/Raji/Rituxan [10.0]	14.81	14.06
PBMC/Raji/Rituxan [1.0]	14.4	11.53
PBMC/Raji/Rituxan [0.1]	23.29	4.67

[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/006327

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i, A61K 39/00(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; A61K 39/395; C07K 16/00; C07K 16/18; C12N 15/13; A61K 39/00

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: CD44, antibody, epitope, ligand, combination, suppression

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2006-0111555 A (CHIRON CORPORATION) 27 October 2006 See paragraphs [0017], [0024].	1-20
A	US 2014-0234344 A1 (BAYLOR RESEARCH INSTITUTE) 21 August 2014 See the entire document.	1-20
A	US 2005-0136055 A1 (GLADUE, R. P. et al.) 23 June 2005 See the entire document.	1-20
A	WO 2012-125569 A2 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. et al.) 20 September 2012 See the entire document.	1-20
A	WO 01-83755 A2 (GEMINI SCIENCE, INC.) 08 November 2001 See the entire document.	1-20



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

07 SEPTEMBER 2018 (07.09.2018)

Date of mailing of the international search report

07 SEPTEMBER 2018 (07.09.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/006327

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.: **21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 21 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: **21**
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/KR2018/006327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2006-0111555 A	27/10/2006	AU 2004-287480 A1	19/05/2005
		AU 2004-287480 B2	15/09/2011
		AU 2004-287482 A1	19/05/2005
		AU 2004-287482 B2	14/04/2011
		AU 2004-287879 A1	19/05/2005
		AU 2004-287879 B2	06/01/2011
		AU 2011-201529 A1	28/04/2011
		AU 2011-201529 B2	01/11/2012
		CA 2544364 A1	19/05/2005
		CA 2544368 A1	19/05/2005
		CA 2544852 A1	19/05/2005
		CA 2544853 A1	19/05/2005
		CA 2544948 A1	19/05/2005
		CA 2544949 A1	19/05/2005
		CA 2544951 A1	19/05/2005
		CN 1901937 A	24/01/2007
		CN 1901937 B	03/08/2011
		CN 1905897 A	31/01/2007
		CN 1905897 B	05/09/2012
		CN 1929862 A	14/03/2007
		CN 1929862 B	15/02/2012
		CN 1938045 A	28/03/2007
		CN 1938045 B	26/03/2014
		EP 1680141 A2	19/07/2006
		EP 1680141 B1	11/08/2010
		EP 1680141 B8	12/01/2011
		EP 1682177 A2	26/07/2006
		EP 1682177 B1	21/07/2010
		EP 1682177 B8	01/09/2010
		EP 1682178 A2	26/07/2006
		EP 1682178 B1	07/07/2010
		EP 1682178 B8	01/09/2010
		EP 1682180 A2	26/07/2006
		EP 1682180 B1	04/11/2009
		EP 1684805 A2	02/08/2006
		EP 1684805 B1	21/07/2010
		EP 1684805 B8	25/08/2010
		EP 1684869 A2	02/08/2006
		EP 1684869 B1	20/07/2011
		EP 1694360 A2	30/08/2006
		EP 1694360 B1	04/08/2010
		EP 1844815 A1	17/10/2007
		EP 1844815 B1	14/09/2011
		EP 2149585 A1	03/02/2010
		EP 2149585 B1	14/08/2013
		EP 2236172 A1	06/10/2010
		EP 2243491 A1	27/10/2010
		EP 2243492 A1	27/10/2010
		EP 2248830 A1	10/11/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/006327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 2255828 A1	01/12/2010
		EP 2301575 A1	30/03/2011
		JP 2007-510664 A	26/04/2007
		JP 2007-510666 A	26/04/2007
		JP 2007-512243 A	17/05/2007
		JP 2007-513073 A	24/05/2007
		JP 2007-526908 A	20/09/2007
		JP 2008-500956 A	17/01/2008
		JP 2008-502309 A	31/01/2008
		JP 2011-072317 A	14/04/2011
		JP 2011-098987 A	19/05/2011
		JP 2011-098989 A	19/05/2011
		JP 2011-105769 A	02/06/2011
		JP 2011-105772 A	02/06/2011
		JP 2011-116760 A	16/06/2011
		JP 2011-126900 A	30/06/2011
		JP 4746552 B2	10/08/2011
		JP 4765037 B2	07/09/2011
		JP 4765038 B2	07/09/2011
		JP 4765039 B2	07/09/2011
		JP 4765040 B2	07/09/2011
		JP 4810431 B2	09/11/2011
		JP 5019881 B2	05/09/2012
		KR 10-1125127 B1	16/03/2012
		KR 10-1128777 B1	13/04/2012
		KR 10-2006-0132602 A	21/12/2006
		KR 10-2006-0135643 A	29/12/2006
		KR 10-2007-0028295 A	12/03/2007
		US 2007-0098717 A1	03/05/2007
		US 2007-0098718 A1	03/05/2007
		US 2007-0110754 A1	17/05/2007
		US 2007-0218060 A1	20/09/2007
		US 2008-0057070 A1	06/03/2008
		US 2008-0254026 A1	16/10/2008
		US 2013-0011405 A1	10/01/2013
		US 2014-0205602 A1	24/07/2014
		US 2017-081416 A1	23/03/2017
		US 8277810 B2	02/10/2012
		US 8637032 B2	28/01/2014
		WO 2005-044294 A2	19/05/2005
		WO 2005-044294 A3	15/09/2005
		WO 2005-044304 A2	19/05/2005
		WO 2005-044304 A3	25/08/2005
		WO 2005-044305 A2	19/05/2005
		WO 2005-044305 A3	11/08/2005
		WO 2005-044306 A2	19/05/2005
		WO 2005-044306 A3	15/09/2005
		WO 2005-044307 A2	19/05/2005
		WO 2005-044307 A3	25/08/2005
		WO 2005-044854 A2	19/05/2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/006327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0234344 A1	21/08/2014	WO 2005-044854 A3	11/08/2005
		WO 2005-044855 A2	19/05/2005
		WO 2005-044855 A3	15/09/2005
		AU 2009-270771 A1	21/01/2010
		AU 2009-270771 B2	23/08/2012
		AU 2010-222928 A1	06/10/2011
		AU 2010-222928 B2	29/11/2012
		AU 2010-222929 A1	06/10/2011
		AU 2010-222929 B2	25/07/2013
		AU 2010-222930 A1	06/10/2011
		AU 2010-222930 B2	25/07/2013
		AU 2010-222942 A1	06/10/2011
		AU 2010-222942 B2	10/01/2013
		AU 2012-202953 A1	14/06/2012
		AU 2012-202953 B2	29/05/2014
		AU 2012-261572 A1	10/01/2013
		AU 2012-261572 B2	19/11/2015
		CN 102448989 A	09/05/2012
		CN 102448989 B	30/09/2015
		CN 102625714 A	01/08/2012
		CN 102625714 B	19/08/2015
		CN 102741295 A	17/10/2012
		CN 102770457 A	07/11/2012
		CN 103415534 A	27/11/2013
		CN 105837691 A	10/08/2016
		CN 105884903 A	24/08/2016
		CN 106432493 A	22/02/2017
		EP 2307048 A2	13/04/2011
		EP 2307048 A4	29/02/2012
		EP 2406286 A2	18/01/2012
		EP 2406286 B1	18/05/2016
		EP 2406288 A2	18/01/2012
		EP 2406288 B1	14/12/2016
		EP 2406289 A2	18/01/2012
		EP 2406289 B1	22/02/2017
		EP 2406290 A2	18/01/2012
		EP 2406290 B1	05/07/2017
		EP 2966091 A1	13/01/2016
		EP 2966091 B1	25/04/2018
		EP 3091034 A1	09/11/2016
		EP 3138854 A1	08/03/2017
		EP 3219732 A1	20/09/2017
		JP 2011-528233 A	17/11/2011
		JP 2012-520073 A	06/09/2012
		JP 2012-520074 A	06/09/2012
		JP 2012-520303 A	06/09/2012
		JP 2012-520304 A	06/09/2012
		JP 2015-028021 A	12/02/2015
		JP 2015-071598 A	16/04/2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/006327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2015-120687 A	02/07/2015
		JP 2016-006078 A	14/01/2016
		JP 2016-026160 A	12/02/2016
		JP 2017-061463 A	30/03/2017
		JP 2017-101051 A	08/06/2017
		JP 5653945 B2	14/01/2015
		JP 5883653 B2	15/03/2016
		JP 5984388 B2	06/09/2016
		JP 5986382 B2	06/09/2016
		JP 6109800 B2	05/04/2017
		JP 6189379 B2	30/08/2017
		JP 6329842 B2	23/05/2018
		KR 10-1548143 B1	28/08/2015
		KR 10-2011-0036618 A	07/04/2011
		KR 10-2013-0081721 A	17/07/2013
		US 2010-0239575 A1	23/09/2010
		US 2010-0291082 A1	18/11/2010
		US 2010-0297114 A1	25/11/2010
		US 2010-0322929 A1	23/12/2010
		US 2010-135994 A1	03/06/2010
		US 2014-0127198 A1	08/05/2014
		US 2015-0299329 A1	22/10/2015
		US 2016-0022792 A1	28/01/2016
		US 2017-114142 A1	27/04/2017
		US 2018-000916 A1	04/01/2018
		US 2018-094071 A1	05/04/2018
		US 8518410 B2	27/08/2013
		US 8961991 B2	24/02/2015
		US 9102734 B2	11/08/2015
		US 9109011 B2	18/08/2015
		US 9416186 B2	16/08/2016
		US 9562104 B2	07/02/2017
		US 9567401 B2	14/02/2017
		WO 2010-009346 A2	21/01/2010
		WO 2010-009346 A3	29/04/2010
		WO 2010-009346 A8	19/08/2010
		WO 2010-104747 A2	16/09/2010
		WO 2010-104747 A3	17/02/2011
		WO 2010-104748 A2	16/09/2010
		WO 2010-104748 A3	03/03/2011
		WO 2010-104749 A2	16/09/2010
		WO 2010-104749 A3	24/02/2011
		WO 2010-104749 A8	15/09/2011
		WO 2010-104761 A2	16/09/2010
		WO 2010-104761 A3	06/01/2011
US 2005-0136055 A1	23/06/2005	AU 2004-308749 A1	14/07/2005
		AU 2004-308749 B2	28/10/2010
		CN 102552905 A	11/07/2012
		CN 1897971 A	17/01/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/006327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-125569 A2	20/09/2012	EP 1706143 A1	04/10/2006
		EP 2218461 A1	18/08/2010
		EP 2218461 B1	20/04/2016
		EP 3081933 A1	19/10/2016
		JP 2007-515469 A	14/06/2007
		JP 2011-184446 A	22/09/2011
		JP 2014-205692 A	30/10/2014
		JP 5634321 B2	03/12/2014
		KR 10-0847944 B1	22/07/2008
		KR 10-2007-0012626 A	26/01/2007
		KR 10-2008-0023766 A	14/03/2008
		US 2009-0311254 A1	17/12/2009
		US 2011-0104182 A1	05/05/2011
		US 2012-0263732 A1	18/10/2012
		WO 2005-063289 A1	14/07/2005
		AU 2012-229236 A1	24/10/2013
		AU 2012-229236 B2	18/05/2017
WO 2012-125569 A2	20/09/2012	AU 2017-216556 A1	07/09/2017
		CN 103596593 A	19/02/2014
		CN 103596593 B	21/09/2016
		CN 106279401 A	04/01/2017
		EP 2683406 A2	15/01/2014
		JP 2014-509855 A	24/04/2014
		JP 6170840 B2	26/07/2017
		US 2014-0093497 A1	03/04/2014
		US 9987356 B2	05/06/2018
		WO 2012-125569 A3	08/11/2012
WO 01-83755 A2	08/11/2001	AU 2001-059215 A1	12/11/2001
		AU 2002-251562 B2	14/12/2006
		AU 2006-203620 A1	07/09/2006
		AU 2009-200017 A1	05/02/2009
		CN 101289510 A	22/10/2008
		CN 101289510 B	17/04/2013
		CN 101508734 A	19/08/2009
		EP 1391464 A1	25/02/2004
		EP 1391464 B1	26/09/2007
		EP 1914243 A2	23/04/2008
		EP 1914243 A3	18/06/2008
		EP 2009027 A1	31/12/2008
		EP 2009027 B1	21/05/2014
		EP 2011802 A2	07/01/2009
		EP 2011802 A3	15/04/2009
		JP 2006-342173 A	21/12/2006
		JP 2007-284450 A	01/11/2007
		JP 2009-079062 A	16/04/2009
		JP 2010-013486 A	21/01/2010
		JP 3847715 B2	22/11/2006
		JP 4025881 B2	26/12/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/006327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 4242437 B2	25/03/2009
		KR 10-0918540 B1	21/09/2009
		KR 10-0937068 B1	15/01/2010
		KR 10-2003-0096337 A	24/12/2003
		KR 10-2008-0090531 A	08/10/2008
		KR 10-2008-0090576 A	08/10/2008
		US 2002-0142358 A1	03/10/2002
		US 2003-0059427 A1	27/03/2003
		US 2004-0120948 A1	24/06/2004
		US 2007-0077242 A1	05/04/2007
		US 2009-0123466 A1	14/05/2009
		US 2010-0234578 A1	16/09/2010
		US 7063845 B2	20/06/2006
		US 7193064 B2	20/03/2007
		US 7537763 B2	26/05/2009
		WO 01-83755 A2	08/11/2001
		WO 01-83755 A3	23/05/2002
		WO 02-088186 A1	07/11/2002

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28; A61K 39/395; C07K 16/00; C07K 16/18; C12N 15/13; A61K 39/00

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: CD44, 항체, 에피토프, 리간드, 결합, 억제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2006-0111555 A (카이론 코퍼레이션) 2006.10.27 단락 [0017], [0024] 참조.	1-20
A	US 2014-0234344 A1 (BAYLOR RESEARCH INSTITUTE) 2014.08.21 전체 문헌 참조.	1-20
A	US 2005-0136055 A1 (GLADUE, R. P. 등) 2005.06.23 전체 문헌 참조.	1-20
A	WO 2012-125569 A2 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. 등) 2012.09.20 전체 문헌 참조.	1-20
A	WO 01-83755 A2 (GEMINI SCIENCE, INC.) 2001.11.08 전체 문헌 참조.	1-20

☐ 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

2018년 09월 07일 (07.09.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 09월 07일 (07.09.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

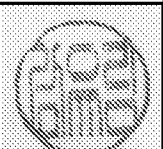
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



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: 21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 21은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 21
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 10-2006-0111555 A	2006/10/27	AU 2004-287480 A1	2005/05/19
		AU 2004-287480 B2	2011/09/15
		AU 2004-287482 A1	2005/05/19
		AU 2004-287482 B2	2011/04/14
		AU 2004-287879 A1	2005/05/19
		AU 2004-287879 B2	2011/01/06
		AU 2011-201529 A1	2011/04/28
		AU 2011-201529 B2	2012/11/01
		CA 2544364 A1	2005/05/19
		CA 2544368 A1	2005/05/19
		CA 2544852 A1	2005/05/19
		CA 2544853 A1	2005/05/19
		CA 2544948 A1	2005/05/19
		CA 2544949 A1	2005/05/19
		CA 2544951 A1	2005/05/19
		CN 1901937 A	2007/01/24
		CN 1901937 B	2011/08/03
		CN 1905897 A	2007/01/31
		CN 1905897 B	2012/09/05
		CN 1929862 A	2007/03/14
		CN 1929862 B	2012/02/15
		CN 1938045 A	2007/03/28
		CN 1938045 B	2014/03/26
		EP 1680141 A2	2006/07/19
		EP 1680141 B1	2010/08/11
		EP 1680141 B8	2011/01/12
		EP 1682177 A2	2006/07/26
		EP 1682177 B1	2010/07/21
		EP 1682177 B8	2010/09/01
		EP 1682178 A2	2006/07/26
		EP 1682178 B1	2010/07/07
		EP 1682178 B8	2010/09/01
		EP 1682180 A2	2006/07/26
		EP 1682180 B1	2009/11/04
		EP 1684805 A2	2006/08/02
		EP 1684805 B1	2010/07/21
		EP 1684805 B8	2010/08/25
		EP 1684869 A2	2006/08/02
		EP 1684869 B1	2011/07/20
		EP 1694360 A2	2006/08/30
		EP 1694360 B1	2010/08/04
		EP 1844815 A1	2007/10/17
		EP 1844815 B1	2011/09/14
		EP 2149585 A1	2010/02/03
		EP 2149585 B1	2013/08/14
		EP 2236172 A1	2010/10/06
		EP 2243491 A1	2010/10/27
		EP 2243492 A1	2010/10/27
		EP 2248830 A1	2010/11/10

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

EP 2255828 A1	2010/12/01
EP 2301575 A1	2011/03/30
JP 2007-510664 A	2007/04/26
JP 2007-510666 A	2007/04/26
JP 2007-512243 A	2007/05/17
JP 2007-513073 A	2007/05/24
JP 2007-526908 A	2007/09/20
JP 2008-500956 A	2008/01/17
JP 2008-502309 A	2008/01/31
JP 2011-072317 A	2011/04/14
JP 2011-098987 A	2011/05/19
JP 2011-098989 A	2011/05/19
JP 2011-105769 A	2011/06/02
JP 2011-105772 A	2011/06/02
JP 2011-116760 A	2011/06/16
JP 2011-126900 A	2011/06/30
JP 4746552 B2	2011/08/10
JP 4765037 B2	2011/09/07
JP 4765038 B2	2011/09/07
JP 4765039 B2	2011/09/07
JP 4765040 B2	2011/09/07
JP 4810431 B2	2011/11/09
JP 5019881 B2	2012/09/05
KR 10-1125127 B1	2012/03/16
KR 10-1128777 B1	2012/04/13
KR 10-2006-0132602 A	2006/12/21
KR 10-2006-0135643 A	2006/12/29
KR 10-2007-0028295 A	2007/03/12
US 2007-0098717 A1	2007/05/03
US 2007-0098718 A1	2007/05/03
US 2007-0110754 A1	2007/05/17
US 2007-0218060 A1	2007/09/20
US 2008-0057070 A1	2008/03/06
US 2008-0254026 A1	2008/10/16
US 2013-0011405 A1	2013/01/10
US 2014-0205602 A1	2014/07/24
US 2017-081416 A1	2017/03/23
US 8277810 B2	2012/10/02
US 8637032 B2	2014/01/28
WO 2005-044294 A2	2005/05/19
WO 2005-044294 A3	2005/09/15
WO 2005-044304 A2	2005/05/19
WO 2005-044304 A3	2005/08/25
WO 2005-044305 A2	2005/05/19
WO 2005-044305 A3	2005/08/11
WO 2005-044306 A2	2005/05/19
WO 2005-044306 A3	2005/09/15
WO 2005-044307 A2	2005/05/19
WO 2005-044307 A3	2005/08/25
WO 2005-044854 A2	2005/05/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0234344 A1	2014/08/21	WO 2005-044854 A3	2005/08/11
		WO 2005-044855 A2	2005/05/19
		WO 2005-044855 A3	2005/09/15
US 2014-0234344 A1	2014/08/21	AU 2009-270771 A1	2010/01/21
		AU 2009-270771 B2	2012/08/23
		AU 2010-222928 A1	2011/10/06
		AU 2010-222928 B2	2012/11/29
		AU 2010-222929 A1	2011/10/06
		AU 2010-222929 B2	2013/07/25
		AU 2010-222930 A1	2011/10/06
		AU 2010-222930 B2	2013/07/25
		AU 2010-222942 A1	2011/10/06
		AU 2010-222942 B2	2013/01/10
		AU 2012-202953 A1	2012/06/14
		AU 2012-202953 B2	2014/05/29
		AU 2012-261572 A1	2013/01/10
		AU 2012-261572 B2	2015/11/19
		CN 102448989 A	2012/05/09
		CN 102448989 B	2015/09/30
		CN 102625714 A	2012/08/01
		CN 102625714 B	2015/08/19
		CN 102741295 A	2012/10/17
		CN 102770457 A	2012/11/07
		CN 103415534 A	2013/11/27
		CN 105837691 A	2016/08/10
		CN 105884903 A	2016/08/24
		CN 106432493 A	2017/02/22
		EP 2307048 A2	2011/04/13
		EP 2307048 A4	2012/02/29
		EP 2406286 A2	2012/01/18
		EP 2406286 B1	2016/05/18
		EP 2406288 A2	2012/01/18
		EP 2406288 B1	2016/12/14
		EP 2406289 A2	2012/01/18
		EP 2406289 B1	2017/02/22
		EP 2406290 A2	2012/01/18
		EP 2406290 B1	2017/07/05
		EP 2966091 A1	2016/01/13
		EP 2966091 B1	2018/04/25
		EP 3091034 A1	2016/11/09
		EP 3138854 A1	2017/03/08
		EP 3219732 A1	2017/09/20
		JP 2011-528233 A	2011/11/17
		JP 2012-520073 A	2012/09/06
		JP 2012-520074 A	2012/09/06
		JP 2012-520303 A	2012/09/06
		JP 2012-520304 A	2012/09/06
		JP 2015-028021 A	2015/02/12
		JP 2015-071598 A	2015/04/16

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2015-120687 A	2015/07/02
		JP 2016-006078 A	2016/01/14
		JP 2016-026160 A	2016/02/12
		JP 2017-061463 A	2017/03/30
		JP 2017-101051 A	2017/06/08
		JP 5653945 B2	2015/01/14
		JP 5883653 B2	2016/03/15
		JP 5984388 B2	2016/09/06
		JP 5986382 B2	2016/09/06
		JP 6109800 B2	2017/04/05
		JP 6189379 B2	2017/08/30
		JP 6329842 B2	2018/05/23
		KR 10-1548143 B1	2015/08/28
		KR 10-2011-0036618 A	2011/04/07
		KR 10-2013-0081721 A	2013/07/17
		US 2010-0239575 A1	2010/09/23
		US 2010-0291082 A1	2010/11/18
		US 2010-0297114 A1	2010/11/25
		US 2010-0322929 A1	2010/12/23
		US 2010-135994 A1	2010/06/03
		US 2014-0127198 A1	2014/05/08
		US 2015-0299329 A1	2015/10/22
		US 2016-0022792 A1	2016/01/28
		US 2017-114142 A1	2017/04/27
		US 2018-000916 A1	2018/01/04
		US 2018-094071 A1	2018/04/05
		US 8518410 B2	2013/08/27
		US 8961991 B2	2015/02/24
		US 9102734 B2	2015/08/11
		US 9109011 B2	2015/08/18
		US 9416186 B2	2016/08/16
		US 9562104 B2	2017/02/07
		US 9567401 B2	2017/02/14
		WO 2010-009346 A2	2010/01/21
		WO 2010-009346 A3	2010/04/29
		WO 2010-009346 A8	2010/08/19
		WO 2010-104747 A2	2010/09/16
		WO 2010-104747 A3	2011/02/17
		WO 2010-104748 A2	2010/09/16
		WO 2010-104748 A3	2011/03/03
		WO 2010-104749 A2	2010/09/16
		WO 2010-104749 A3	2011/02/24
		WO 2010-104749 A8	2011/09/15
		WO 2010-104761 A2	2010/09/16
		WO 2010-104761 A3	2011/01/06
US 2005-0136055 A1	2005/06/23	AU 2004-308749 A1	2005/07/14
		AU 2004-308749 B2	2010/10/28
		CN 102552905 A	2012/07/11
		CN 1897971 A	2007/01/17

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 1706143 A1	2006/10/04
		EP 2218461 A1	2010/08/18
		EP 2218461 B1	2016/04/20
		EP 3081933 A1	2016/10/19
		JP 2007-515469 A	2007/06/14
		JP 2011-184446 A	2011/09/22
		JP 2014-205692 A	2014/10/30
		JP 5634321 B2	2014/12/03
		KR 10-0847944 B1	2008/07/22
		KR 10-2007-0012626 A	2007/01/26
		KR 10-2008-0023766 A	2008/03/14
		US 2009-0311254 A1	2009/12/17
		US 2011-0104182 A1	2011/05/05
		US 2012-0263732 A1	2012/10/18
		WO 2005-063289 A1	2005/07/14
WO 2012-125569 A2	2012/09/20	AU 2012-229236 A1	2013/10/24
		AU 2012-229236 B2	2017/05/18
		AU 2017-216556 A1	2017/09/07
		CN 103596593 A	2014/02/19
		CN 103596593 B	2016/09/21
		CN 106279401 A	2017/01/04
		EP 2683406 A2	2014/01/15
		JP 2014-509855 A	2014/04/24
		JP 6170840 B2	2017/07/26
		US 2014-0093497 A1	2014/04/03
		US 9987356 B2	2018/06/05
		WO 2012-125569 A3	2012/11/08
WO 01-83755 A2	2001/11/08	AU 2001-059215 A1	2001/11/12
		AU 2002-251562 B2	2006/12/14
		AU 2006-203620 A1	2006/09/07
		AU 2009-200017 A1	2009/02/05
		CN 101289510 A	2008/10/22
		CN 101289510 B	2013/04/17
		CN 101508734 A	2009/08/19
		EP 1391464 A1	2004/02/25
		EP 1391464 B1	2007/09/26
		EP 1914243 A2	2008/04/23
		EP 1914243 A3	2008/06/18
		EP 2009027 A1	2008/12/31
		EP 2009027 B1	2014/05/21
		EP 2011802 A2	2009/01/07
		EP 2011802 A3	2009/04/15
		JP 2006-342173 A	2006/12/21
		JP 2007-284450 A	2007/11/01
		JP 2009-079062 A	2009/04/16
		JP 2010-013486 A	2010/01/21
		JP 3847715 B2	2006/11/22
		JP 4025881 B2	2007/12/26

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

JP 4242437 B2	2009/03/25
KR 10-0918540 B1	2009/09/21
KR 10-0937068 B1	2010/01/15
KR 10-2003-0096337 A	2003/12/24
KR 10-2008-0090531 A	2008/10/08
KR 10-2008-0090576 A	2008/10/08
US 2002-0142358 A1	2002/10/03
US 2003-0059427 A1	2003/03/27
US 2004-0120948 A1	2004/06/24
US 2007-0077242 A1	2007/04/05
US 2009-0123466 A1	2009/05/14
US 2010-0234578 A1	2010/09/16
US 7063845 B2	2006/06/20
US 7193064 B2	2007/03/20
US 7537763 B2	2009/05/26
WO 01-83755 A2	2001/11/08
WO 01-83755 A3	2002/05/23
WO 02-088186 A1	2002/11/07