(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 4 월 16 일 (16.04.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/076105 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/013310

(22) 국제출원일: 2019 년 10 월 10 일 (10.10.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0120233 2018 년 10 월 10 일 (10.10.2018) KR

(71) 출원인: 주식회사 노벨티노빌리티 (**NOVELTY NOBILITY INC.**) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, 101호, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 박상규 (**PARK, Sang Gyu**); 16861 경기도 용인시 수지구 포은대로 219, 301동 604호, Gyeonggi-do (KR). 김진옥 (**KIM, Jin-Ock**); 27912 충청북도 증평군 증평읍 삼거리길 19-10, Chungcheongbuk-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인아이피센트 (**IPSCENT**); 06195 서울시 강남구 역삼로77길 6, 2층, Seoul (KR).

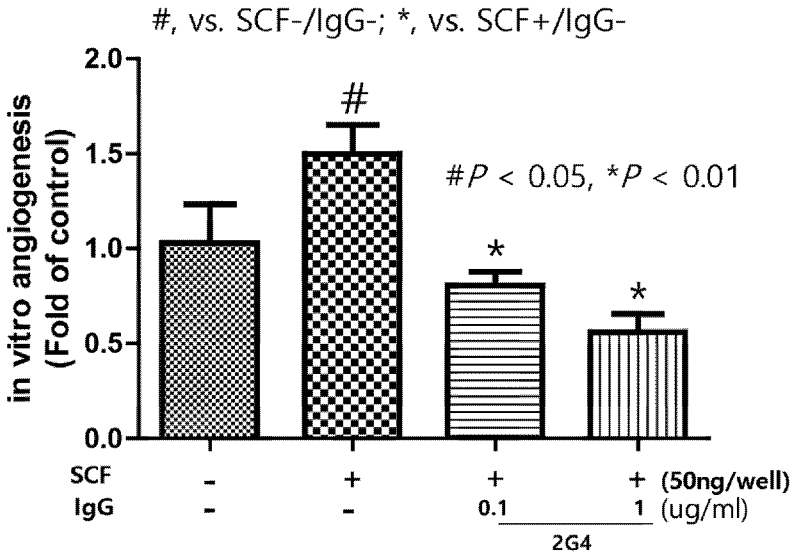
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** NOVEL ANTI-C-KIT ANTIBODY

(54) **발명의 명칭:** 신규 항-C-KIT 항체



(57) **Abstract:** The present invention relates to a novel anti-C-KIT antibody or an antibody fragment thereof. In addition, the present invention relates to a composition for preventing or treating angiogenesis-related diseases comprising the anti-C-KIT antibody or an antibody fragment thereof, or a kit for diagnosing angiogenesis-related diseases.

(57) **요약서:** 본 발명은 신규 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 또는 혈관신생 관련 질환 진단용 키트에 관한 것이다.

WO 2020/076105 A1

명세서

발명의 명칭: 신규 항-C-KIT 항체

기술분야

[1] 본 발명은 신규 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 또는 혈관신생 관련 질환 진단용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[2] 신생혈관형성(Angiogenesis)은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 기작을 의미한다. 비정상적이거나 과도한 혈관신생은 다양한 질환의 원인이 된다. 예를 들어, 혈관신생은 종양의 성장 뿐만 아니라 종양의 양성에서 악성으로의 발전의 원인 중 하나이며, 이외에도 연령-관련 황반변성(Age-related Macular Degeneration), 당뇨성 망막병증(Diabetic Retinopathy), 녹내장(Glaucoma) 등과 같은 안질환과 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 건선(Psoriasis), 만성 염증(Chronic inflammation) 등 다양한 질환에서 신생혈관의 과다 형성이 보고된 바 있다(Cameliet and Jain, Nature, 407:249, 2000). 이러한 이유로 인해 신생혈관형성 억제제를 이용하여 혈관신생 관련 질환을 치료하기 위한 연구가 이루어지고 있으며, 혈관내피세포의 성장, 이동, 분화 등과 같은 혈관형성 과정에 관여하는 다수의 신생혈관 촉진 및 억제 인자들이 발견되었다.

[3] 신생혈관형성 억제제는 작용기작에 따라 매트릭스-분해 억제제(Matrix-breakdown inhibitor), 내피세포 억제제(Endothelial cell inhibitor), 혈관생성 억제제(Angiogenesis inhibitor) 등 몇 개의 카테고리로 나뉠 수 있는데, 이 중에서 상기 혈관생성 억제제에는 VEGFR2, VEGFR1, PDGFR, C-KIT, FLT3 등을 타겟하여 이들의 활성, 신호전달, 생산 등을 저해하는 약물들이 포함된다.

[4] 상기 혈관생성 억제제의 타겟 중 하나인 C-KIT는 수용체 티로신 키나아제(Receptor Tyrosine Kinase, RTK)의 class III에 속하며, SCF(Stem Cell Factor)의 수용체로도 알려져 있다. 상기 SCF는 C-KIT 수용체에 결합하는 사이토카인으로서, 혈액세포, 정자, 멜라닌세포의 분화 및 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

[5] 상기 SCF는 C-KIT의 리간드 결합 도메인에 결합하여 상호작용한 결과 C-KIT 단백질은 인산화되어 활성을 가지게 되며 PI3K/AKT 시스템, RAS/MAP 키나아제 등의 신호전달 과정을 통해 세포 성장, 분화 및 증식 등 다양한 생물학적 기능을 조절하게 된다. 특히 신생혈관형성에 있어서 SCF/C-KIT 자극(stimulation)의 작용에 대해 보고된 바 있다(Angiogenesis in Health, Disease and Malignancy, pp 33-36).

[6] C-KIT을 타겟하는 시판 약물로서 글리벡(이마티닙 메실레이트) 및

수텐트(수니티닙 말레이트)가 있으나, 이들은 여러 키나아제를 억제하는 다중표적 치료제로서 이에 따른 많은 부작용, 낮은 특이성과 생체이용률, 항원성 및 부적합한 약물동태 등과 같은 치료적 한계점이 보고되고 있다. 따라서, C-KIT의 활성화에 의한 혈관신생과 관련된 질환에 대해 C-KIT에 특이적이면서 부작용이 없고 유효한 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[7] 본 발명자들은 혈관신생 관련 질환의 치료 물질을 찾기 위해 예의 노력한 결과, C-KIT에 특이적으로 결합하는 특정 항-C-KIT 항체가 신생혈관형성을 유의적으로 억제시킬 수 있고 이에 따라 혈관신생 관련 질환에 대해 우수한 치료능을 가질 수 있다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 C-KIT 단백질의 도메인 II에 특이적으로 결합하여 우수한 C-KIT 억제능을 가지는 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 진단 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 C-KIT에 특이적으로 결합하는 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 제공한다.

[10] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 C-KIT의 도메인 II에 특이적으로 결합한다.

[11] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자 또는 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미한다. 따라서, 본 발명에서 "항체"는 광범위한 의미로 사용되며, 폴리클로날항체, 모노클로날항체, 전장(whole) 항체(디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 이루어진 항체) 및 항체 단편을 모두 포함하는 것으로 해석된다. 상기 전장 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함한다. 또한 상기 IgG는 아형(subtype)으로서 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함할 수 있다.

[12] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체 단편"은 모 항체의 결합 특이성을 적어도 일부 보유하고, 모 항체의 항원 결합 영역의 일부(예를 들면, 하나 이상의 CDR) 또는 가변영역을 포함하는 항원-결합 단편 또는 항체의 유사체를 의미한다. 상기 항체 단편은 예를 들면 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, sc-Fv, 유니바디 (unibody), 디아바디, 선형 항체, 나노바디, 도메인 항체 또는 항체 단편으로부터 형성된 다특이적 항체일 수 있다.

[13] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄"는 중쇄 가변영역(Variable Region)과 중쇄 불변영역(Constant Region)을 포함하는 전장 중쇄 및 이의 단편을 의미한다.

중쇄에는 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ε) 형이 있다.

[14] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄"는 경쇄 가변영역과 경쇄 불변영역을 포함하는 전장 경쇄 및 이의 단편을 의미한다. 경쇄에는 카파(κ) 및 람다(λ) 형이 있다.

[15] 본 발명에서 항체는 전장 항체이거나 또는 항원 결합능을 갖는 항체 단편이며, 중쇄는 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ε)형 중 어느 하나일 수 있고 경쇄는 카파(κ) 또는 람다(λ) 형일 수 있다. 본 발명의 일 양태에 따르면, 경쇄는 카파형이다.

[16] 본 명세서에서 사용되는 용어 "C-KIT"는 수용체 티로신 키나아제(Receptor Tyrosine Kinase, RTK)의 class III에 속하며, SCF의 수용체로도 알려져 있다.

[17] 상기 혈관생성 억제제의 타겟 중 하나인 C-KIT는 수용체 티로신 키나아제(Receptor Tyrosine Kinase, RTK)의 class III에 속하며, 혈액생성(haematopoiesis)에서 중요한 역할을 하는 SCF(Stem Cell Factor)의 수용체이다.

[18] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항-C-KIT 항체"는 C-KIT에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 구체적으로 상기 항-C-KIT 항체는 C-KIT의 도메인 II에 특이적으로 결합하며, 이에 따라 C-KIT의 활성 또는 활성화를 억제 또는 중화시킬 수 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 서열번호 1로 표시되는 경쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함한다.

[20] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 서열번호 4로 표시되는 중쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함한다.

[21] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편의 경쇄 가변영역은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함한다.

[22] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편의 중쇄 가변영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함한다.

[23] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다.

[24] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함할 수 있다.

[25] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CDR(Complementarity determining region)"은 B 세포 및 T 세포에 의해 생성된 항체의 가변영역의 일부로서 항원결합부위를 형성하고 있는 초가변영역(Hypervariable region)의 아미노산 서열을 의미한다. 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열에는 각각 비연속적으로 배열된 3개의 CDR, 즉 중쇄 CDR_{H1}, CDR_{H2}, CDR_{H3} 및 경쇄 CDR_{L1}, CDR_{L2}, CDR_{L3}이 포함되어 있다. CDR은 항원의 인식에 관여하는 부위로 항체가 항원 또는 에피토프와 결합함에

있어 주요한 접촉 잔기를 제공하여 항원 특이성의 다양성에 결정적인 역할을 한다.

[26] 본 발명의 항체 또는 이의 항체 단편은 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성을 나타내는 서열을 포함한다. 상기 실질적인 동일성이란 두 개의 서열을 최대한 대응되도록 정렬한 후 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 사용하여 분석한 결과 80%, 90% 또는 95% 이상의 서열간 상동성을 나타내는 것을 의미한다.

[27] 또한, 본 발명의 항-C-KIT 항체는 C-KIT을 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 범위 내에서 본 명세서에 기재된 항-C-KIT 항체의 서열 뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 결합 친화도 및/또는 생물학적 특성 등을 개선시키기 위한 서열의 추가적인 변이를 포함할 수 있으며, 분자의 전체적 활성을 변경시키지 않는 범위 내에서 추가적인 변이를 포함할 수 있다.

[28] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 인간 IgG1 유래 불변영역을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역과 인간 IgG1 유래 불변영역을 포함하는 인간 항-C-KIT 항체를 제공한다.

[29] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역이 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변영역을 갖는 항체를 의미하는 것으로 이해된다. 본 발명에서 인간 항체는 인간 유래 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 상기 인간 항체는 전장 항체 형태 또는 항체 분자의 기능적인 단편을 포함하는 형태일 수 있다. 상기 인간 항체의 모든 구성요소는 인간으로부터 유래된 바, 인간화 항체 또는 마우스 항체에 비하여 인간에게 투여시 면역 반응이 일어날 확률이 적다. 따라서, 인간을 대상으로 하는 치료용 항체로서 유리한 이점을 갖는다.

[30] 후술하는 다양한 실시예들을 통해 신생혈관형성 억제 효과와 관련된 효과를 확인한 바에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 신생혈관형성을 유의적으로 억제함으로써 혈관신생 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료하는 것이 가능하다.

[31]

[32] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.

[33] 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11의 염기서열을 포함할 수 있다. 여기서, 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11의 염기서열은 각각 서열번호 1로 표시되는 경쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3으로

표시되는 경쇄 CDR3을 코딩한다. 서열번호 9 내지 11의 염기서열은 각각 CHO 세포에 대해 코돈 최적화될 수 있으며, 이와 같이 코돈 최적화된 염기서열을 포함하는 핵산은 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산의 범위 내에 포함되는 것으로 해석되어야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 17, 서열번호 18 및 서열번호 19를 포함할 수 있다.

[34] 선택적으로, 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 12, 서열번호 13 및 서열번호 14의 염기서열을 포함할 수 있다. 여기서, 서열번호 12, 서열번호 13 및 서열번호 14의 염기서열은 각각 서열번호 4로 표시되는 중쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 중쇄 CDR3을 코딩한다. 서열번호 12 내지 14의 염기서열은 각각 CHO 세포에 대해 코돈 최적화될 수 있으며, 이와 같이 코돈 최적화된 염기서열을 포함하는 핵산은 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산의 범위 내에 포함되는 것으로 해석되어야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 20, 서열번호 21 및 서열번호 22를 포함할 수 있다.

[35] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 15 또는 서열번호 23을 포함하는 경쇄 가변영역 코딩 핵산을 포함할 수 있다.

[36] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 16 또는 서열번호 24를 포함하는 중쇄 가변영역 코딩 핵산을 포함할 수 있다.

[37] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명에 따른 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 27 또는 서열번호 29를 포함하는 경쇄 코딩 핵산을 포함할 수 있다.

[38] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산은 서열번호 28 또는 서열번호 30을 포함하는 중쇄 코딩 핵산을 포함할 수 있다.

[39] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA를 포괄적으로 포함하는 의미를 가진다. 핵산 분자에서 기본 구성단위를 이루는 뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue) 뉴클레오타이드를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

[40] 본 발명의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 상기 실질적인 동일성이란 두 개의 서열을 최대한 대응되도록 정렬한 후 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 사용하여 분석한 결과

80%, 90% 또는 95% 이상의 서열간 상동성을 나타내는 것을 의미한다.

[41]

[42] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[43] 본 명세서에서 사용되는 용어 "벡터"는 숙주 세포에 삽입되어 유전자 복제를 할 수 있는 임의의 것을 의미한다. 이러한 벡터로서 플라스미드, 선형 핵산, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 등이 있으며, 상기 바이러스 벡터에는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 관련 바이러스 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 재조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있으며, 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.

[44] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 세포는 원핵세포, 진핵세포 또는 동물세포일 수 있다. 적절하게 선택된 숙주 세포를 상기 벡터로 형질전환시키고 표적 단백질의 발현 및/또는 분비시키는데 이용할 수 있다. 상기 숙주 세포는 불멸화된 하이브리도마세포, N/SO 골수종 세포, 293 세포, HuT 78 세포, CHO 세포, HELA 세포, COS 세포 등일 수 있으며, 바람직하게는 CHO 세포일 수 있다. 다만, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업계에 공지되어 있는 어떠한 숙주 세포도 본 발명의 숙주 세포로서 이용이 가능하다.

[45]

[46] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[47] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 혈관신생 관련 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 혈관신생 관련 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[48] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해혈관신생 관련 질환의 증상이 호전, 역전, 완치 등이 되는 모든 것을 의미한다.

[49] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 혈관신생 관련 질환의 발생 또는 재발의 억제, 지연, 방지 등이 되는 모든 것을 의미한다.

[50] 본 발명에서 사용되는 용어 "혈관신생 관련 질환"은 혈관신생으로부터 야기되는 질환을 의미한다. 여기에는 암, 백혈병, 안혈관 관련 질환, 류마티스 관절염, 건선, 만성 상처, 만성 염, 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형, 동맥경화, 혈관유착, 혈관염, 화농성 육아종, 수포질환, 폐고혈압증, 천식, 비폴립, 감염성 질환, 염증성 장 질환, 치주 질환, 복막 유착, 자궁내막, 자궁출혈, 난소낭종,

골수염, 골증, 패혈증 및 자가면역질환 등이 포함된다. 바람직하게는 암 및 안혈관 관련 질환일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[51] 상기 암은 골암, 폐암, 두부암, 경부 암, 갑상선암, 부갑상선암, 비소세포성폐암, 위암, 간암, 췌장암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 결장암, 자궁암, 유방암, 난소암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장암 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 중추신경계 림프종, 척수 종양, 교모세포종, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종일 수 있다.

[52] 상기 안혈관 관련 질환은 당뇨성 망막병증, 황반변성, 노인성 황반변성, 녹내장, 녹내장성 망막색소변성, 맥락막 혈관신생, 미숙아 망막증, 각막 이영양증 및 망막층간분리일 수 있다.

[53] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 항-C-KIT 항체 또는 이의 단편을 단독으로 함유할 수도 있으며, 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수도 있다.

[54] 상기 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 안정화제의 예로서 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 보존제의 예로서 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로서 당업계에 공지되어 있는 것을 이용할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[55] 본 발명의 약학 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구 투여방법으로서 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 본 발명의 약학 조성물을 주사형 제형으로 제조하여 이를 30게이지의 가는 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하는 방법, 또는 피부에 직접적으로 도포하는 방법으로 투여될 수 있다.

[56] 본 발명의 약학 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다. 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를

수득할 수 있다. 부형제의 예로서 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시 프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975 Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[57] 본 발명의 약학 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 질환의 중상 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물의 1일 투여량은 0.0001 내지 100 ㎎/㎏일 수 있다. 그러나 상기 본 발명의 약학 조성물의 용량은 투여 경로 및 치료 횟수 뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량을 고려하여, 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자가 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[58] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 다른 치료제와 병용하여 투여되는 경우, 본 발명의 조성물과 다른 치료제는 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 상기 다른 치료제는 신생혈관 관련 질환의 치료 또는 개선 효과를 갖는 것으로 이미 알려져 있는 물질일 수 있으며 방사선 치료 등 약물 요법 이외의 기타 항암 요법을 모두 포함한다.

[59] 본 발명의 약학 조성물이 다른 치료제와 병용하여 투여될 경우, 본 발명의 조성물에 함유되는 항-C-KIT 항체와 다른 치료제는 각각 별도의 용기로 분리시켜 제형화되거나, 동일한 용기에서 함께 제형화될 수 있다.

[60]

[61] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는 혈관신생 관련 질환 진단용 키트를 제공한다.

[62] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생물학적 시료"는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장,

조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[63] 본 발명의 항체를 생물학적 시료와 반응시켜 혈관신생 관련 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단할 수 있다. 구체적으로, 항-C-KIT 항체 또는 이의 기능적 단편과 생물학적 시료를 접촉시켜 항원-항체 복합체의 형성 여부를 확인함으로써 진단할 수 있다. 본 발명의 진단 키트는 항체를 포함하기 때문에, 다양한 면역분석(Immunoassay) 또는 면역염색(Immunostaining)에 적합하도록 제작될 수 있다. 상기 면역분석 또는 면역염색은 효소면역분석법(ELISA), 면역형광(Immunofluorescence), 웨스턴 블로팅(Western Blotting), 면역조직화학염색(Immunohistochemistry staining), 유세포분석법(Flow cytometry), 면역세포화학법, 방사능면역분석법(RIA), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 방사능면역분석법(RIA) 및 단백질칩(Protein Chip) 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[64] 항원-항체 복합체의 형성 여부를 정성적 또는 정량적으로 측정하기 위한 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[65] 본 발명에 따른 신규 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편은 C-KIT의 특정 도메인 II에 특이적으로 결합하며, 강한 친화도를 갖는다. 이에 따라, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항체 단편은 비정상적 또는 과도한 신생혈관의 생성을 유의적으로 억제시키는 효과가 매우 우수하며, 혈관신생 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항체 단편은 인간 외에도 마우스와 래트에 대해 교차반응성이 있으므로 혈관신생 관련 질환의 연구에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[66] 도 1은 HUVEC 세포를 SCF로 처리하였을 때 총 15종의 항-C-KIT 단일클론 항체의 튜브 형성 억제 효과를 비-처리 대조군 대비 상대적인 수준으로 나타낸 그래프이다.

[67] 도 2는 HUVEC 세포를 SCF로 처리하였을 때 2G4 항체의 농도별 튜브 형성 억제 효과를 비-처리 대조군 대비 상대적인 수준으로 나타낸 그래프이다.

[68] 도 3은 마우스 유래 내피세포 MS-1을 SCF로 처리하였을 때 2G4 항체의 농도별 튜브 형성 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

[69] 도 4 및 5는 각각 2G4 항체의 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역 밴드를 나타낸다.

[70] 도 6은 2G4 항체의 경쇄 가변영역의 염기 서열, 아미노산 서열 및 CDR 영역을 나타낸다.

[71] 도 7은 2G4 항체의 중쇄 가변영역의 염기 서열, 아미노산 서열 및 CDR 영역을 나타낸다.

[72] 도 8은 클로닝, 분리 및 정제를 통해 수득된 2G4 항체의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸다.

[73] 도 9는 2G4 항체의 C-KIT 친화도를 확인하기 위한 SPR 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

[74] 도 10은 2G4 항체의 C-KIT 결합 도메인을 확인하기 위한 실험결과를 나타낸다.

[75] 도 11은 마우스 산소 유도 망막증 모델을 이용하여 2G4 항체와 시판 중인 Eylea의 비정상적 혈관형성 억제능을 비교한 결과를 나타낸다.

[76] 도 12는 브라운 노르웨이 래트 황반변성 모델을 이용하여 2G4 항체와 시판 중인 Eylea의 비정상적 혈관형성 억제능을 비교한 결과를 나타낸다.

[77] 도 13은 HUVEC 세포주에서 SCF에 의한 AKT 인산화에 대해 2G4 항체의 억제능을 나타낸다.

[78] 도 14는 TF-1 세포주에서 AKT 인산화, C-KIT 인산화, ERK 1/2 인산화 및 β-카테닌에 대해 2G4 항체의 억제능을 나타내며, 이를 통해 백혈병 세포 증식 억제를 보여준다.

[79] 도 15는 2G4 항체에 의한 HUVEC과 TF-1 세포 증식 억제능을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

[80] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 특별히 정의되지 않은 용어들에 대해서는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것으로 이해되어야 할 것이다.

[81]

[82] **실시예 1. C-KIT 항체 생성 세포주 제작**

[83] **1-1. 면역화된 마우스 제작**

[84] Elabscience사로부터 구매한 재조합 C-KIT 단백질(cat# PKSH030939) 50 μg(마우스 1마리 기준)을 동일한 부피의 완전 프라운트 아주반트(Freund's Adjuvant)(sigma, USA)와 혼합하여 에멀젼을 제조하였다. 이와 같이 제조된 에멀젼을 7주령 암컷 human CD34+ 세포 주사로 제작된 인간화 NSG 마우스 6마리의 복강내에 주입하였다. 항원 50 μg을 총 부피 500 μl로 각각의 마우스에게 주입하였다. 1주 및 2주 경과 후, 각각 불완전 프라운트 아주반트(Sigma, USA)와 항원을 혼합한 에멀젼을 마우스의 복강내에 추가로 주입하였다.

[85]

[86] **1-2. 항체 생성 확인**

[87] 상기 방법을 통해 면역화된 마우스의 안구에서 혈액을 채취하고 1.5 ml 미세원심분리 튜브에 넣은 후, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 혈청을 분리하고 항체 생성을 확인하는 실험을 실시할 때까지 -20 ℃에서 보관하였다. 항원 단백질을 이용한 효소면역 측정법을 실시하여 항체 생성을

확인한 후, 세포 융합 3일 전에 불완전 프라운트 아주반트(Sigma, USA)와 항원을 혼합한 에멀젼을 한번 더 마우스의 복강내에 주입하였다.

[88]

[89] **1-3. 하이브리도마의 제조**

[90] 항체 생성을 확인한 후 마우스를 희생시켰다. 비장세포를 분리하여 골수종 세포 P3X63Ag 8.653(ATCC CRL-1580)와 융합시켜 하이브리도마를 제조하였다.

[91] 구체적으로, 10% 소태아혈청을 보충한 RPMI1640 배지를 사용하여 배양 플레이트 내에서 마우스의 P3X63Ag 8.653 세포를 배양하였다. 세포융합을 실시하기 위해 P3X63Ag 8.653 세포를 무혈청 RPMI1640 배지(Hyclone, USA)로 2회 세척하고, $1x10^7$ 세포농도가 되도록 조정하였다. 마우스를 경추탈구에 의해 희생시키고 비장을 채취한 후, 메시 용기(Sigma, USA)에 넣고 세포를 분리하였다. 비장세포의 현탁액을 제조한 후, 원심분리를 이용하여 현탁액을 세척하였다. 비장세포 용액을 Tris-NH_4Cl(TRIS 20.6 g/L, NH_4Cl 8.3 g/L)에 노출시켜 적혈구 세포를 용해하였다. 완전히 분리된 항체-생성세포를 400xg로 5분 동안 원심분리하였다. 그 후, 무혈청 배지에서 2회 세척하고, 10 ml 배지에서 재현탁시켰다. 림프세포를 혈구계를 이용하여 계수하고 림프구 $1x10^8$을 무혈청 배지 내에서 P3X63Ag 8.653 세포 1x10(10:1)와 혼합하였다.

[92] 400xg로 5분 동안 원심분리한 후, 37 ℃에서 데워진 50% (M/V) 폴리에틸렌글리콜 1500(sigma, USA)을 사용하여 1 ml 용액을 적하하여 1분 동안 혼합하였다. 이와 같이 제조된 융합 혼합용액을 무혈청 RPMI1640으로 희석하고 400xg로 3분 동안 원심분리하였다. 세포를 20% 소태아 혈청 및 HAT(100 μM 하이포잔틴, 0.4 μM 아미노프테린, 16 μM 티미딘)을 보충한 RPMI1640 선택배지 35 ml에서 현탁하였다. 현탁액 100 μl를 1일 전 피더세포(RPMI1640을 사용한 복강으로부터 분리된 대식세포)를 코팅한 96-웰 플레이트에 로딩하고, 37 ℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 5일 후, HAT 배지는 2~3일 간격으로 교체하고, 세포를 14일 동안 배양하였다. 14일 후, 20% 소태아혈청 및 HT(HAT로부터 0.4 μM 아미노프테린을 제거한 배지)를 보충한 RPMI1640 배지로 교체하여 2차 배양하였다.

[93]

[94] **1-4. 항체 생성 융합세포의 선택 및 분리**

[95] 앞서 제조한 융합된 세포 배양액의 상층액을 수집하고 효소면역 측정법을 실시하여, 상기 제조된 항원에 대해 특이적인 항체 생성 여부를 확인하였다. 음성대조군에 비해 4배 이상의 적정 농도를 나타낸 융합세포의 배양액을 선택하고, 24- 웰 플레이트로 옮겨 배양하였다. 추가로 96-웰 플레이트에 웰당 1개의 세포가 들어가도록 희석하여(limiting dilution) 배양한 후 배양액을 회수하여, 96-웰 플레이트에 항원으로 사용한 C-KIT 단백질을 웰당 0.1 μg으로 코팅하였다. 그 후, 효소면역측정법을 실시하여 최종적으로 15개의 단클론 항체(1C6, 1H2, 1A6, AFA, 2B3, 2G4, 4G5, 4C4, 4C7, 4D7, 1E1, 2H6, 1G3, 1A3,

1D3)를 생산하는 융합세포를 선택하였다.

[96]

[97] **실시예 2. C-KIT 항체 선별**

[98] **2-1. HUVEC을 이용한 튜브(Tube) 형성 분석**

[99] 매트리겔(Matriegel)(Corning, USA) 300 μl를 24-웰 플레이트에 분주한 후, HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial Cells)을 SCF(50 ng/ml) 또는 SCF(50 ng/ml) + 항-C-KIT 항체(1 μg/ml)를 매트리겔에 분주하였다. 이후, HUVEC의 튜브 형성을 관찰하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[100] 도 1에서, HUVEC을 이용한 튜브 형성 분석(in vitro angiogenesis) 결과에 따르면 SCF에 의해 유도되는 HUVEC 튜브 형성을 억제하는 효과는 15개의 항체 중 2G4가 가장 강력하다는 것이 확인되었다. 이는 2G4로 지칭되는 항-C-KIT 항체가 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

[101]

[102] **2-2. 2G4 항체의 농도별 처리에 따른 혈관신생 억제 효능**

[103] 매트리겔(Corning, USA) 300 μl를 24-웰 플레이트에 분주한 후 HUVEC을 SCF (50 ng/ml), SCF (50 ng/ml) + 2G4 항체 (0.1 μg/ml) 또는 SCF (50 ng/ml) + 2G4 항체 (1 μg/ml)를 매트리겔에 분주하였다. 이후, HUVEC의 튜브 형성을 관찰하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[104] 도 2에서, HUVEC을 이용한 튜브 형성 분석 결과에 따르면, 2G4 항체는 농도 의존적으로 HUVEC 튜브 형성을 억제한다는 것이 확인되었다. 특히, 2G4 항체는 농도 0.1 μg/ml에서도 혈관신생 억제능이 우수하였다.

[105]

[106] **2-3. 마우스에 대한 교차반응 시험**

[107] 2G4 항체의 마우스에 대한 교차반응력을 테스트하기 위하여, 마우스 유래 내피세포 MS-1을 이용하여 실시예 2-2의 방법과 동일하게 수행하였다.

[108] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 마우스 유래 내피세포 MS-1에서 2G4 항체가 마우스 내피세포의 혈관신생 억제능이 유의적으로 나타난다는 것이 확인되었다.

[109]

[110] **실시예 3. 항-C-KIT 항체 IgG 가변영역의 염기 서열 분석**

[111] 실시예 1 및 실시예 2로부터 수득한 융합세포 2G4 클론 $5x10^5$ 로부터 전체 RNA를 분리하였다. Random primer(bioneer, Korea)와 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

[112] PROGEN사의 human IgG library primer set를 이용하여 상기 cDNA로부터 카파경쇄 도메인을 증폭시켰다. 증폭시킨 핵산은 아가로즈 겔 전기영동으로 확인하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 중쇄 도메인에 대해서도 마찬가지로 PROGEN사의 human IgG library primer set를 이용하여 증폭시키고 그

결과를 도 5에 나타내었다.

[113] 도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 카파경쇄 도메인(414 bp)과 중쇄 도메인(483 bp) 사이에서 밴드가 발견되어 예상된 크기의 PCR 산물이 생성됨을 확인하였다.

[114] 이후, 상기 PCR 산물을 아가로즈 겔에 전개하여 밴드를 절단하고 아가로즈 겔을 60℃에서 녹인 후, 스핀 컬럼(Qiagen사)을 이용하여 핵산을 정제하였다. 이와 같이 정제된 핵산을 TOPO-TA 벡터에 클로닝하여, 대장균 DH5α에 형질전환(transformation)시켜 콜로니를 수득한 후, 콜로니를 배양하여 플라스미드를 추출하였다. 이후 다시 PCR을 수행하여 4개의 플라스미드를 수득한 후, 2G4 항체의 염기서열을 분석하였다.

[115] 도 6은 2G4 항체의 경쇄 가변영역의 아미노산 서열 및 염기 서열을 나타내며, 이는 각각 본 명세서에 첨부되는 서열목록에서 서열번호 7의 아미노산 서열 및 서열번호 15의 염기 서열에 상응한다. 또한, 도 6에서 경쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3은 빨간색으로 순서대로 표시되어 있으며, 이는 각각 본 명세서에 첨부되는 서열목록에서 서열번호 1 내지 3의 아미노산 서열 및 서열번호 9 내지 11의 염기 서열에 상응한다.

[116] 도 7은 2G4 항체의 중쇄 가변영역의 아미노산 서열 및 염기 서열을 나타내며, 이는 각각 본 명세서에 첨부되는 서열목록에서 서열번호 8의 아미노산 서열 및 서열번호 16의 염기 서열에 상응한다. 또한, 도 7에서 중쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3은 빨간색으로 순서대로 표시되어 있으며, 이는 각각 본 명세서에 첨부되는 서열목록에서 서열번호 4 내지 6의 아미노산 서열 및 서열번호 12 내지 14의 염기 서열에 상응한다.

[117]

[118] **실시예 4. 항-C-KIT 항체의 제조**

[119] **4-1. 완전 인간화 항체 클로닝**

[120] 실시예 3에서 수득한 2G4 항체의 가변영역을 인간 Fc 아미노산 서열에 그래프팅하고, pCHO 벡터(lifetechnology사) 내에 클로닝하였다.

[121] 경쇄 가변영역은 인간 카파 불변영역에 대한 프레임 내에 융합시키고, 중쇄 가변영역은 인간 IgG1 불변영역에 대한 프레임 내에 융합시켰다. 전장 IgG1 항체의 배지내 분비를 위한 리더 펩타이드 서열을 두 유전자에 첨가하여 유전자를 합성한 후, 서열분석을 통해 다시 한번 검증하였다. CHO 세포 내 발현 시험을 위해 3개의 클론을 선택하였다. 3개의 클론에 대한 글리세롤 스톡을 제조하고, 엔도톡신이 없는 플라스미드를 CHO 세포 내 발현시험을 위해 제조하였다.

[122]

[123] **4-2. 항체의 분리 정제**

[124] 상기에서 수득한 플라스미드 DNA를 CHO-S 세포 내에 형질감염시켰다. 형질감염 1주일 전 CHO-S 세포(Invitrogen, 10743-029)를 DMEM 보충 혈청 내 단층 배양물 내로 옮겼다. 그리고 형질감염 1일 전 세포를 분주한 후, 형질감염

시료에 대해 핵산-리포펙타민 복합체를 준비하여 밤새 인큐베이터에서 5% CO_2, 37 ℃에서 세포를 인큐베이션하였다. 배지를 2-3일에 한번씩 첨가하면서 일주일 동안 배양하였다. 그 후, 배양액을 회수하여 Protein A/G agarose(invitrogen사)에 결합시키고, PBS로 세척하였다. 이어서, 0.1 M 글리신(pH 2.8)으로 용출한 후, 1 M Tris-HCl(pH 8.0)로 중화시켰다. PBS로 투석(dialysis)한 후 -70 ℃에서 보관하였다.

[125] 이에 따라 분리 정제된 2G4 항체를 6% SDS-PAGE에 Non-reducing 및 Reducing 조건으로 running하여 항체의 순도 및 크기를 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타낸 바와 같이, SDS-PAGE 결과 50 kDa의 중쇄와 25 kDa의 경쇄 밴드가 관찰되었으며, 이를 통해 항체가 정확하게 생산되었음을 확인하였다.

[126]

[127] **실시예 5. 2G4 항체의 친화도**

[128] 2G4 항체의 C-KIT 결합능을 확인하기 위하여 SPR(Surface Plasmon Resonance)을 수행하였다. SR7500DC(Reichert, USA)를 이용하여, 항체 제작을 위해 사용된 인간 C-KIT(elabscience, PKSH030939) 20 μg, 마우스 C-KIT(SB, Lot#LC05DE2304) 20 μg, 래트 C-KIT(SB, Lot#LC06SE1787) 20 μg을 PEG(Reichert, USA) chip에 고정시켰다. 그 후, 2G4 항체를 농도별로 흘려준 후 C-KIT에 대한 친화도인 K_D 값을 Scrubber2 프로그램을 이용하여 분석하였다. K_D 값은 kd를 ka로 나눈 값으로, 수치가 낮을수록 해당 타겟에 대한 결합능이 크다는 것을 의미한다.

[129] 그 결과는 도 9에 나타내었다. 2G4 항체는 인간 C-KIT에 대한 K_D 값이 약 $2.8237(\pm0.9) \times 10^{-12}$ M으로서 강한 친화도를 나타내었다. 인간에 대한 친화력이 가장 높고, 그 다음으로 마우스, 래트 순으로 나타났다.

[130]

[131] **실시예 6. 도메인 맵핑**

[132] 인간 C-KIT 유전자(NM_000222)의 결실 변이체(Q26-P520, D113-P520 △domain I, A207-P520 △domain I - II, K310-P520 △domain I-III)를 c-말단에 FLAG을 태깅하여 HEK293에 형질감염시켰다. 그 후, 배양액으로 분비시킨 후 FLAG 항체 비드(Sigma-Aldrich)를 이용하여 정제하였다. 이어서, ELISA를 실시하였다.

[133] 도 10에 나타낸 바와 같이, 2G4 항체는 도메인 II가 결실되었을 때 C-KIT을 인식하지 못하였으며, 이로부터 2G4 항체의 C-KIT에 대한 구체적인 결합 부위는 도메인 II라는 점이 입증되었다.

[134]

[135] **비교예 1. 마우스 모델을 이용한 in vivo 효능 비교**

[136] 증식당뇨망막증 및 미숙망막증 질환의 동물모델로서 널리 이용되는 Mouse oxygen-induced retinopathy (OIR) 모델을 사용하였다. C57BL/6 마우스를 생후 7일부터 5일 동안 75%의 고산소 환경에 노출시키면 비정상적 혈관이 형성된다.

[137] 구체적으로, C57BL/6 마우스를 생후 0일부터 7일까지는 21%의 산소 환경에 노출시키고, 생후 7일부터 12일까지는 75%의 고산소 환경에 노출시켰다. 생후 12일째에 2G4 항체(2 μg/eye)와 Eylea(2 μg/eye)를 각각 우측 안구의 유리체내 주사하였으며, 좌측 안구는 PBS를 주사하여 대조군으로 비교하였다. 그리고, 생후 12일부터 17일까지 다시 21%의 산소 환경에 노출시켰으며, 생후 17일째에 희생시켰다.

[138] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 2G4 항체와 Eylea(2 μg/eye)를 주사한 우측 안구에서 비정상적 혈관 형성 억제가 관찰되었으며, 그 정도는 동등한 수준으로 확인되었다.

[139]

[140] **비교예 2. 래트 모델을 이용한 in vivo 효능 비교**

[141] brown Norway rat를 이용하여 황반변성 모델을 구축하였다.

[142] 구체적으로, 레이저를 이용하여 래트의 안구에 CNV(choroidal neovascularization: 맥락막혈관신생)를 유발시켰다. 이와 동시에 2G4 항체(6.28 μg/eye)와 Eylea(10 μg/eye)를 각각 4 μl/eye의 투여량으로 안구의 유리체내 주사하였다. IgG 항체(10 μg/eye)를 4 μl/eye의 투여량으로 주사한 그룹을 대조군으로 사용하였다.

[143] 14일 후 BS-1 렉틴을 이용하여 분석한 결과를 도 12에 나타내었다. 황반변성에 의한 비정상적 혈관형성이 Eylea 군과 2G4 항체 군에서 모두 유의적으로 억제되었다. 특히, 2G4 항체는 Eylea에 비해 투여 농도가 더 적음에도 불구하고 동등한 수준의 효능을 보였다는 것은 2G4 항체가 Eylea에 비해 유효성이 더 우수하다는 것을 나타낸다.

[144]

[145] **실시예 7. 2G4 항체에 의한 SCF/C-KIT 시그널링 억제능**

[146] SCF/C-KIT 시그널링은 기본적으로 AKT의 인산화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 도 13에서 확인할 수 있듯이, HUVEC에 SCF를 처리하였을 때 AKT의 인산화가 증가한다는 것이 확인되었다. 반면, 2G4 항체에 의하여 AKT 인산화가 감소하는 것이 확인되었다.

[147] 뿐만 아니라, 백혈병 세포주 TF-1에서도 SCF에 의한 AKT 인산화가 2G4 항체에 의해 억제되는 것을 도 14에서 확인할 수 있다. 더욱이, SCF에 의한 C-KIT의 인산화, 및 ERK1/2의 인산화도 또한 억제되는 것을 도 14에서 확인할 수 있다.

[148] β-카테닌(catenin)은 AKT 다운스트림 시그널로서 세포 증식에 중요한 인자로 알려져 있다. 2G4 항체는 SCF에 의한 β-카테닌의 증가를 농도의존적으로 억제하는 것을 도 14에서 확인할 수 있으며, 이는 2G4 항체가 백혈병 세포주 TF-1의 증식을 유의적으로 저해한다는 것을 의미한다. 백혈병은 C-KIT 돌연변이가 많아 항암제 저항성 또는 내성을 보이는 경우가 다수 발견되지만, 본 발명에 따른 항체는 백혈병에 대해서도 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수

있으므로 종래 항암제의 한계점을 극복할 수 있다.

[149]

[150] **실시예 8. 2G4 항체에 의한 HUVEC과 TF-1 세포 증식 억제능**

[151] TF-1과 HUVEC에 대해 2G4 항체를 농도별(0, 0.1, 1, 5, 10 μg/ml)로 30분 동안 전처리하였다. 그 후, 50 ng/ml의 SCF를 처리하고, 36시간 후에 세포수를 측정하여 세포 증식률을 비교하였다.

[152] 도 15에 나타낸 바와 같이, SCF를 처리한 군은 음성 대조군에 대비하여 TF-1 세포수가 약 26% 증가하였으며, HUVEC 세포수가 약 70% 증가하였다. 반면, 2G4 항체를 처리한 군에서는 SCF에 의한 세포 증식이 TF-1과 HUVEC에서 모두 농도 의존적으로 억제되었다. 이는 2G4 항체가 HUVEC과 TF-1 세포 증식 억제능이 매우 우수하다는 점을 의미한다.

청구범위

[청구항 1] C-KIT의 도메인 II에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 1로 표시되는 경쇄 CDR1, 서열번호 2로 표시되는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3으로 표시되는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변영역; 및 서열번호 4로 표시되는 중쇄 CDR1, 서열번호 5로 표시되는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6으로 표시되는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역;을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변영역; 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역;을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항체는 인간 IgG1 유래 불변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편.

[청구항 5] 제1항의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 코딩하는 핵산.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 핵산은 (i) 서열번호 9 내지 14, (ii) 서열번호 15 및 16, (iii) 서열번호 17 내지 22, 또는 (iv) 서열번호 23 및 24를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산.

[청구항 7] 제5항의 핵산을 포함하는 벡터.

[청구항 8] 제7항의 벡터로 형질전환된 세포.

[청구항 9] 제1항의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는, 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 혈관신생 관련 질환은 암, 백혈병, 안혈관 질환, 류마티스 관절염, 건선, 만성 상처, 만성 염, 혈관종, 혈관섬유종, 혈관기형, 동맥경화, 혈관유착, 혈관염, 화농성 육아종, 수포질환, 폐고혈압증, 천식, 비폴립, 감염성 질환, 염증성 장 질환, 치주 질환, 복막 유착, 자궁내막, 자궁출혈, 난소낭종, 골수염, 골증, 패혈증 및 자가면역질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

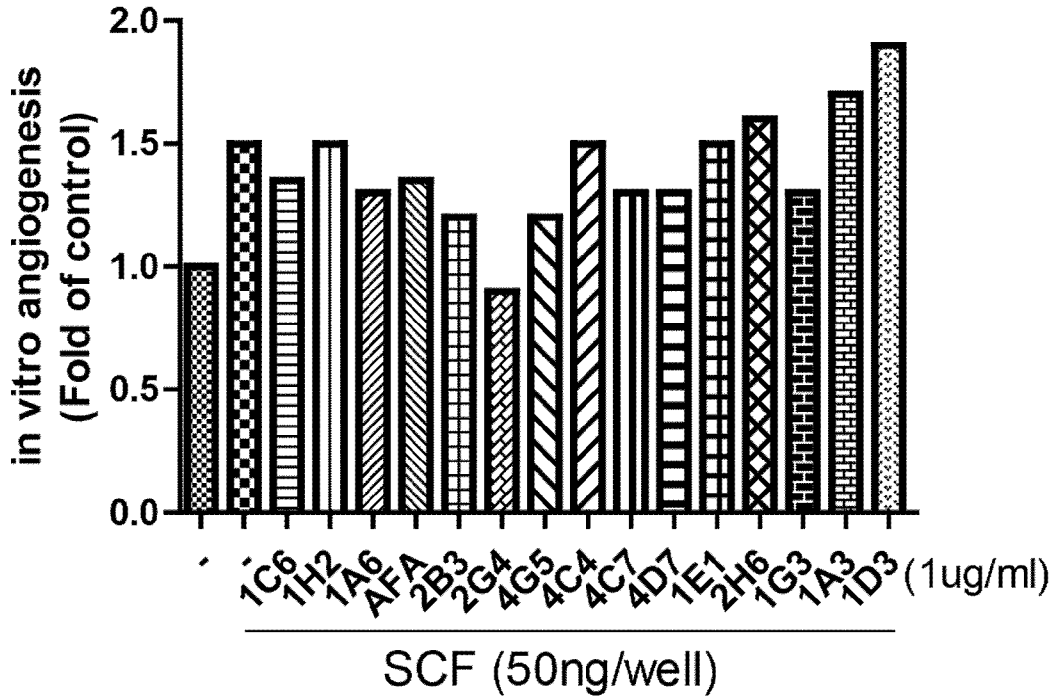
[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 암은 골암, 폐암, 두부암, 경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 비소세포성폐암, 위암, 간암, 췌장암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 결장암, 자궁암, 유방암, 난소암, 나팔관암종,

자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 중추신경계 림프종, 척수 종양, 교모세포종, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

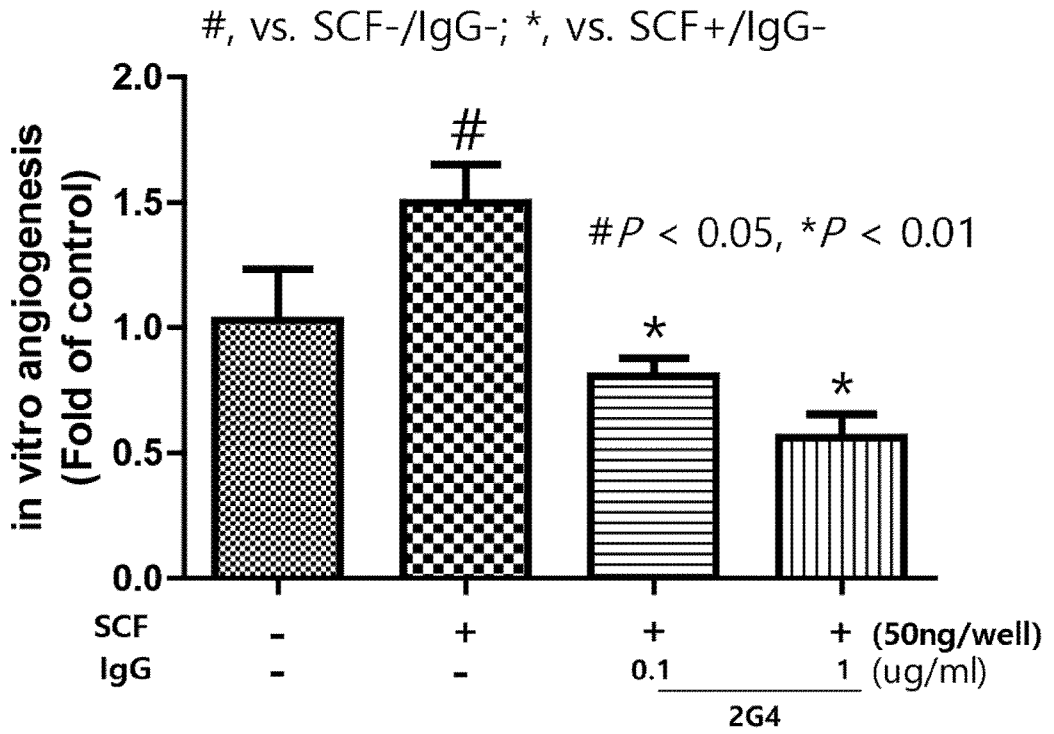
[청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 안혈관 질환은 당뇨성 망막병, 황반변성, 노인성 황반변성, 녹내장, 녹내장성 망막색소변성, 맥락막 혈관신생, 미숙망막증, 각막 이영양증 및 망막층간분리로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

[청구항 13] 제1항의 항-C-KIT 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하는 혈관신생 관련 질환 진단용 키트.

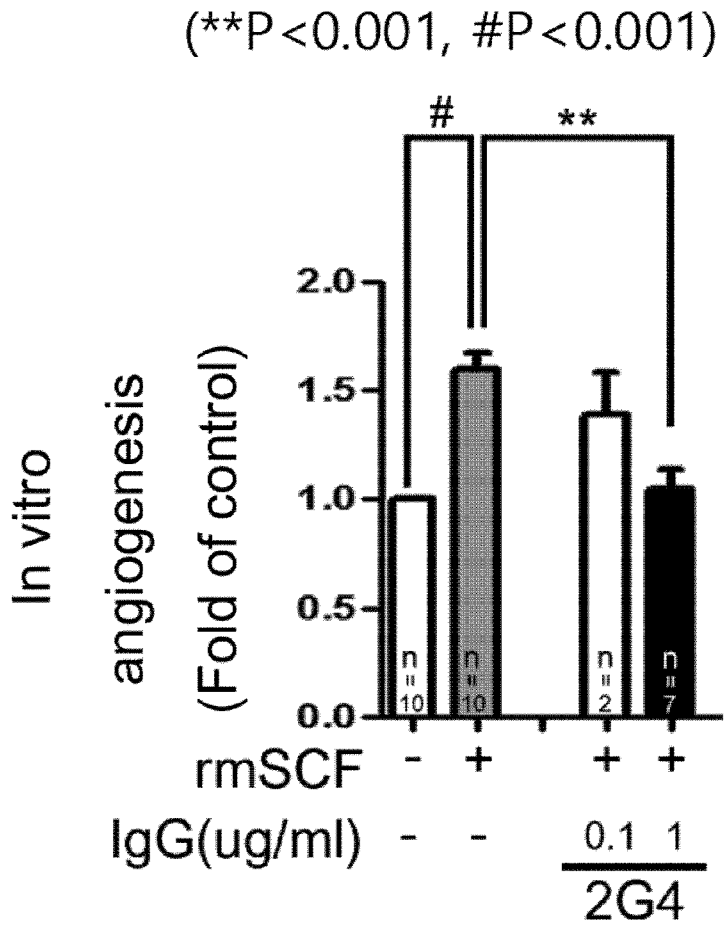
[도1]


in vitro angiogenesis
(Fold of control)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-
1C6
1H2
1A6
AFA
2B3
2G4
4G5
4C4
4C7
4D7
1E1
2H6
1G3
1A3
1D3
(1ug/ml)
SCF (50ng/well)

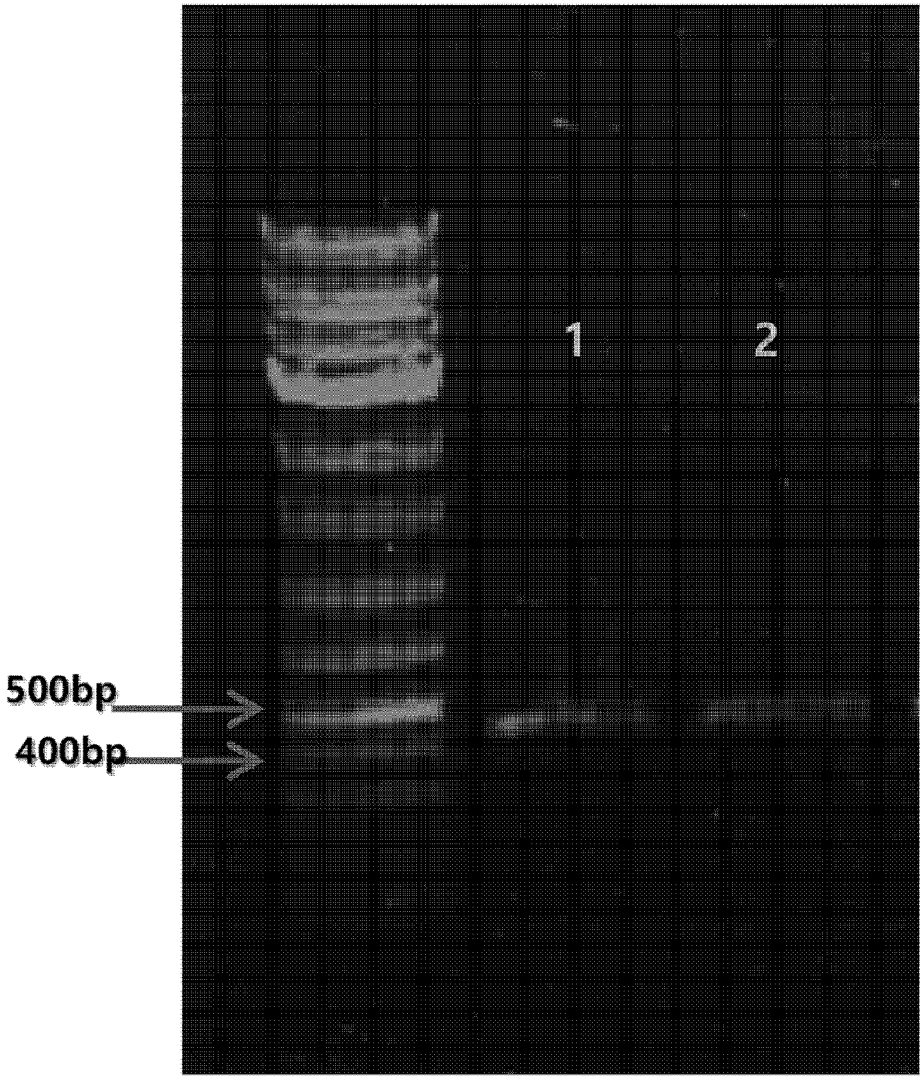
[도2]


#, vs. SCF-/IgG-; *, vs. SCF+/IgG-
in vitro angiogenesis
(Fold of control)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
#
*
*
#P < 0.05, *P < 0.01
SCF - + + + (50ng/well)
IgG - - 0.1 1 (ug/ml)
2G4

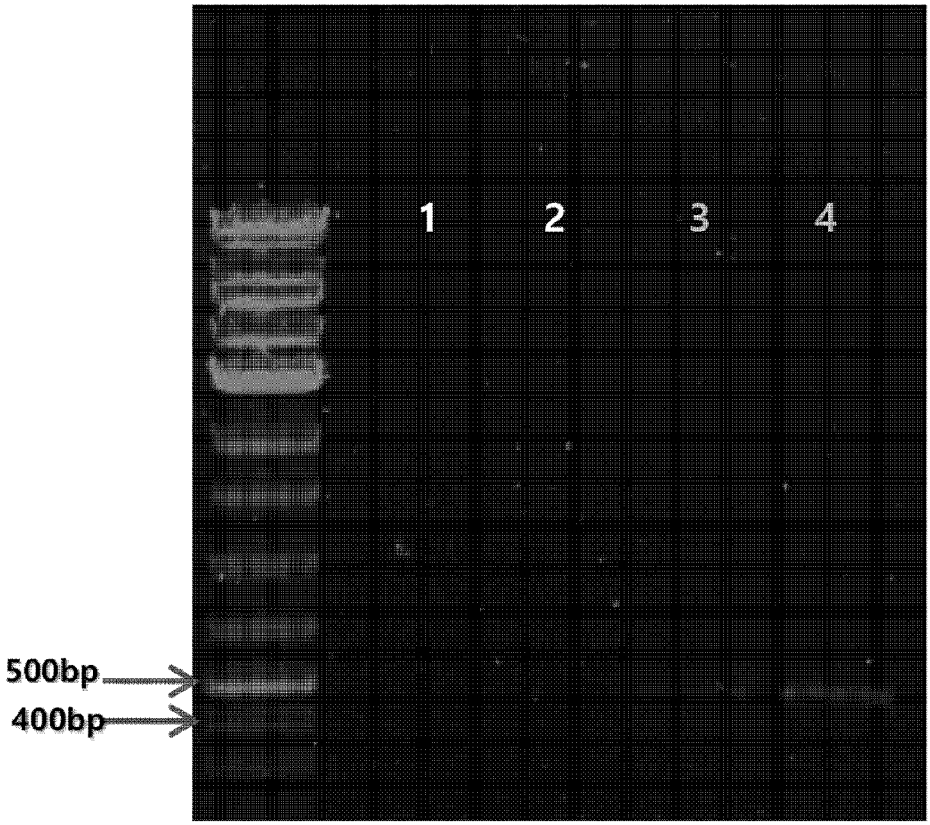
[도3]


(**P<0.001, #P<0.001)
#
**
In vitro angiogenesis (Fold of control)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
n = 10
n = 10
n = 2
n = 7
rmSCF - + + +
IgG(ug/ml) - - 0.1 1
2G4

[도4]



[도5]



[도6]

```
GAT ATT GTG ATG ACT CAG
D   I   V   M   T   Q

TCT CCA CTC TCC CTG CCC GTC ACC CCT GGA GAG CCG GCC TCC ATC
S   P   L   S   L   P   V   T   P   G   E   P   A   S   I

                                                CDR1
TCC TGC AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAC
S   C   R   S   S   Q   S   L   L   H   S   N   G   Y   N

TAT TTG GAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGG CAG TCT CCA CAG CTC
Y   L   D   W   Y   L   Q   K   P   G   Q   S   P   Q   L

        CDR2
CTG ATC TAT TTG GGT TCT AAT CGG GCC TCC GGG GTC CCT GAC AGG
L   I   Y   L   G   S   N   R   A   S   G   V   P   D   R

TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC AGC
F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   K   I   S

                                                    CDR3
AGA GTG GAG GCT GAG GAT GTT GGG GTT TAT TAC TGC ATG CAA GCT
R   V   E   A   E   D   V   G   V   Y   Y   C   M   Q   A

CTA CAA ACT ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
L   Q   T   I   T   F   G   Q   G   T   R   L   E   I   K
```

[도7]

```
CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG
Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V

GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA
V   Q   P   G   R   S   L   R   L   S   C   A   A   S   G
        CDR1
ITC ACC ITC AGT CGC TAT GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA
F   T   F   S   R   Y   G   M   H   W   V   R   Q   A   P
                                        CDR2
GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT GGA AGT
G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   W   Y   D   G   T

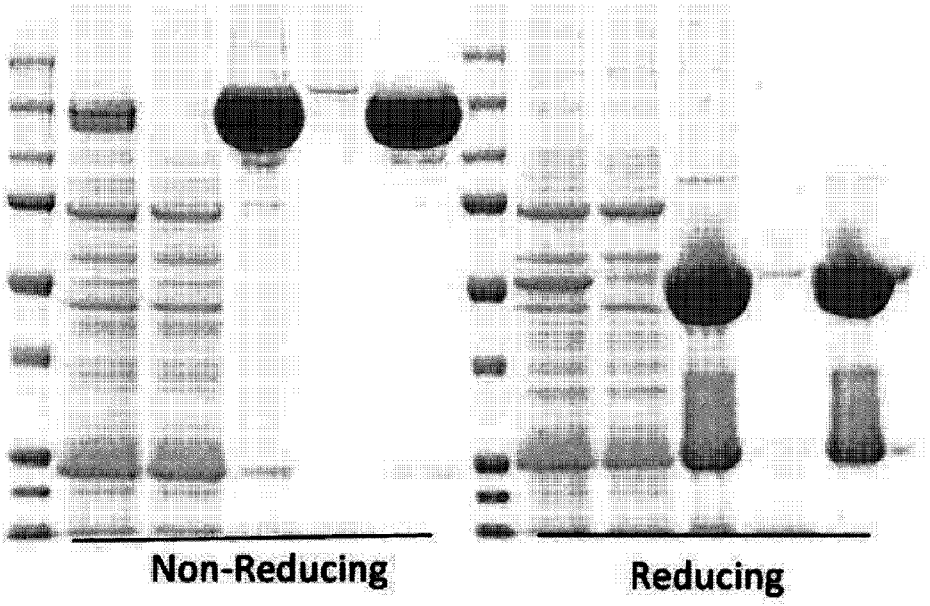
AAT AAA GAC TAT ACA GAC TCC GTG AGG GGC CGA TTC ACC ATC TCC
N   K   D   Y   T   D   S   V   R   G   R   F   T   I   S

AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG
R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L
                                                CDR3
AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA GAT TGG
R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   D   W

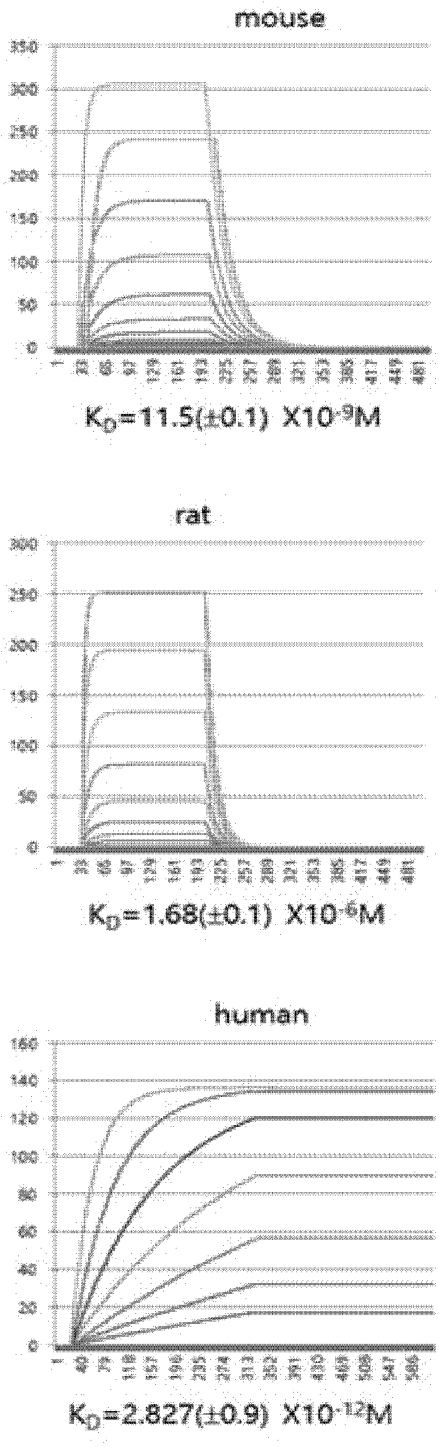
GCT GAG GCT TTT GAT ATG TGG GGC CAA GGG ACA ACG GTC ACC GTC
A   E   A   F   D   M   W   G   Q   G   T   T   V   T   V

TCT TCA
S   S
```

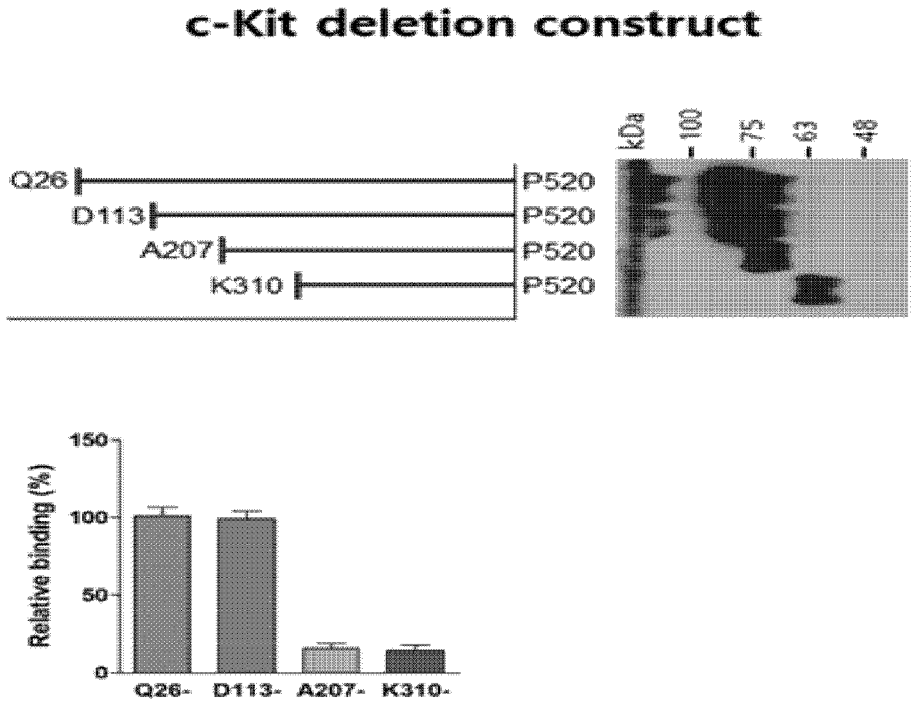
[도8]



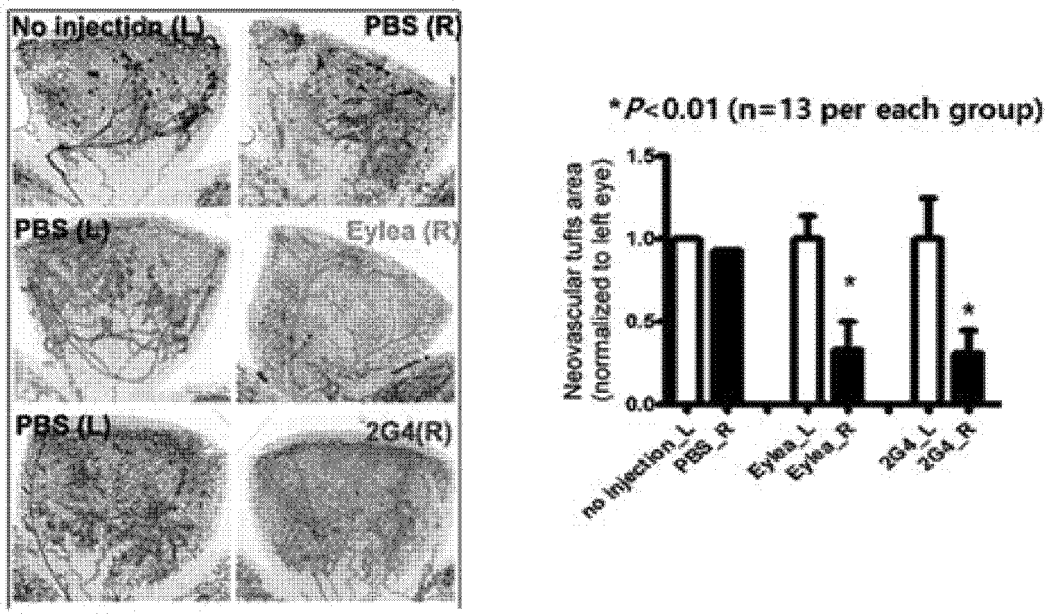
[도9]


mouse
K_D=11.5(±0.1) X10^{-9}M
rat
K_D=1.68(±0.1) X10^{-6}M
human
K_D=2.827(±0.9) X10^{-12}M

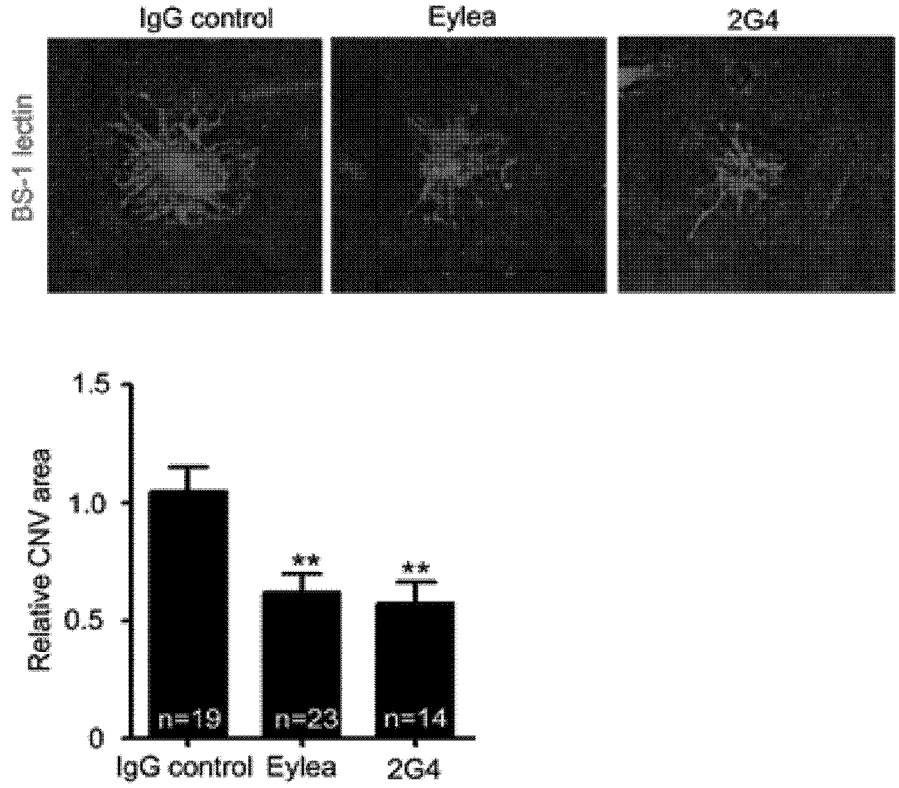
[도10]


c-Kit deletion construct
Q26
D113
A207
K310
P520
P520
P520
P520
kDa
100
75
63
48
Relative binding (%)
150
100
50
0
Q26-
D113-
A207-
K310-

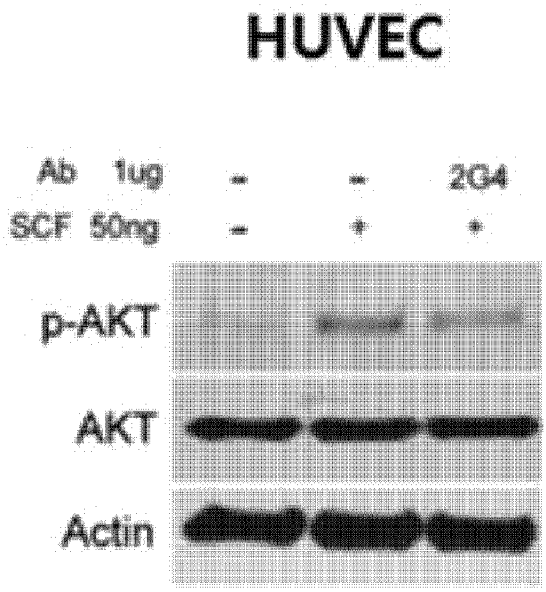
[도11]


No injection (L)
PBS (R)
PBS (L)
Eylea (R)
PBS (L)
2G4(R)
*P<0.01 (n=13 per each group)
Neovascular tufts area
(normalized to left eye)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
no injection_L
PBS_R
Eylea_L
Eylea_R
2G4_L
2G4_R

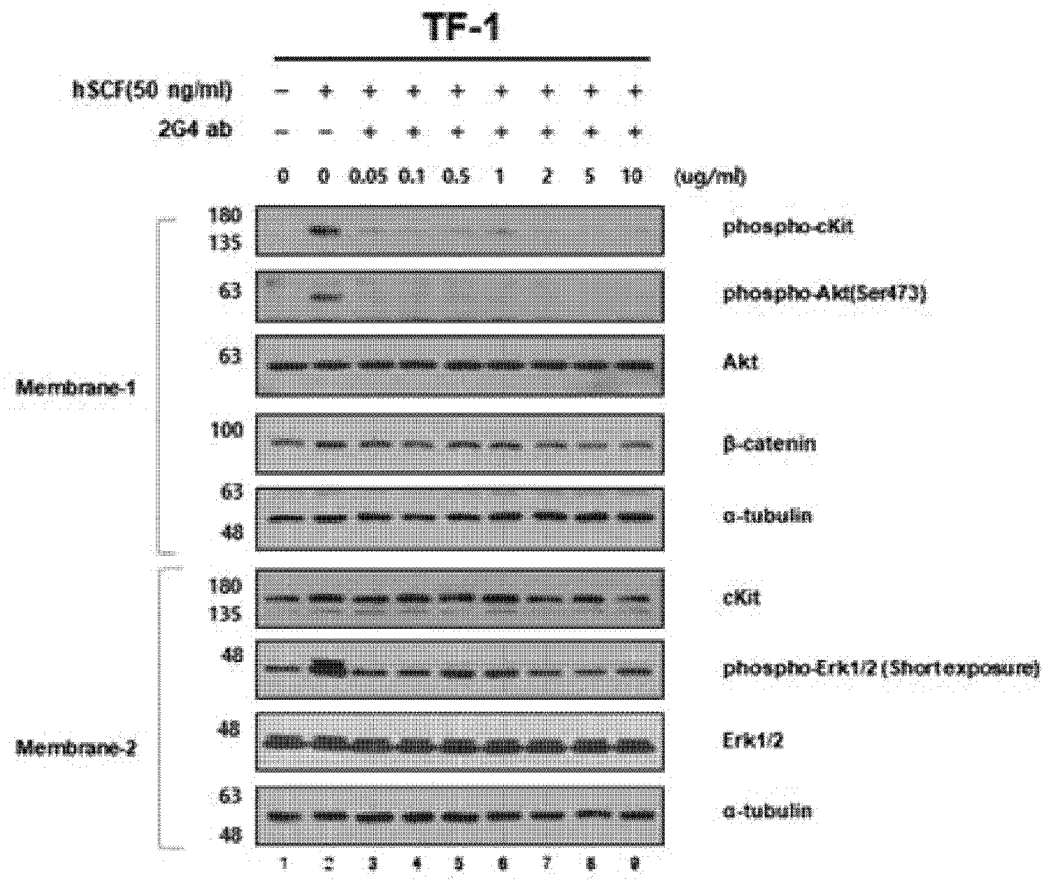
[도12]


IgG control
Eylea
2G4
BS-1 lectin
Relative CNV area
1.5
1.0
0.5
0
**
**
n=19
n=23
n=14
IgG control
Eylea
2G4

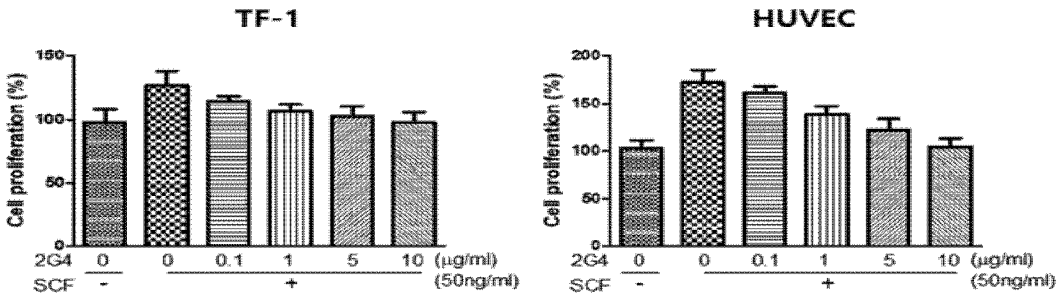
[도13]


HUVEC
Ab 1ug - - 2G4
SCF 50ng - + +
p-AKT
AKT
Actin

[도14]


TF-1
hSCF(50 ng/ml) - + + + + + + + +
2G4 ab - - + + + + + + +
0 0 0.05 0.1 0.5 1 2 5 10 (ug/ml)
Membrane-1
180
135
phospho-cKit
63
phospho-Akt(Ser473)
63
Akt
100
β-catenin
63
48
α-tubulin
Membrane-2
180
135
cKit
48
phospho-Erk1/2 (Short exposure)
48
Erk1/2
63
48
α-tubulin
1 2 3 4 5 6 7 8 9

[도15]


TF-1
HUVEC
Cell proliferation (%)
150
100
50
0
200
150
100
50
0
2G4 0 0 0.1 1 5 10 (μg/ml)
SCF - + (50ng/ml)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/013310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61P 27/02(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 31/4045; A61K 39/395; A61K 47/48; A61K 47/68; A61K 49/00; C07K 16/40; G01N 33/574; G01N 33/68; A61P 27/02; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: C-KIT, cKIT, SCF receptor, antibody, second domain, host cell, vector, transformation, angiogenesis, cancer, tumor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKAYAMA, Y. et al. Assessment of the anti-c-kit monoclonal antibody YB5.B8 in affinity magnetic enrichment of human lung mast cells. 1994, vol. 169, no. 2, pages 153-161. See abstract.	1,4
Y		5,7-13
A		2,3,6
Y	KR 10-2015-0131173 A (NOVARTIS AG.) 24 November 2015 See abstract; claims 1, 4, 31, 35, 39, 42-44; and paragraphs [0001], [0060]-[0073], [0300], [0331]-[0339].	5,7-13
A	KR 10-2014-0027239 A (IMCLONE LLC.) 06 March 2014 See the entire document.	1-13
A	US 2018-0193475 A1 (NOVARTIS AG.) 12 July 2018 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2015-0038278 A (CELLDEX THERAPEUTICS, INC.) 08 April 2015 See the entire document.	1-13

☐ 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	Date of mailing of the international search report
22 JANUARY 2020 (22.01.2020)	**22 JANUARY 2020 (22.01.2020)**

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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/013310

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0131173 A	24/11/2015	AR 095666 A1	04/11/2015
		AU 2014-235474 A1	27/08/2015
		AU 2014-235474 B2	25/05/2017
		BR 112015021134 A2	10/10/2017
		CA 2903772 A1	25/09/2014
		CL 2015002246 A1	04/12/2015
		CN 105007950 A	28/10/2015
		CN 105007950 B	15/01/2019
		CR 20150488 A	29/01/2016
		EA 201591801 A1	31/03/2016
		EP 2968590 A1	20/01/2016
		EP 2968590 B1	05/09/2018
		EP 3514178 A1	24/07/2019
		ES 2701051 T3	20/02/2019
		IL 241277 A	30/11/2015
		JP 2016-512832 A	09/05/2016
		JP 2018-123141 A	09/08/2018
		JP 6333943 B2	30/05/2018
		JP 6578400 B2	18/09/2019
		MA 38396 A1	30/04/2018
		MA 38396 B1	31/05/2019
		MX 2015013203 A	11/12/2015
		NZ 710929 A	23/02/2018
		PH 12015501902 A1	04/01/2016
		SG 11201506395 A	29/09/2015
		TN 2015000396 A1	03/01/2017
		TW 201446806 A	16/12/2014
		US 10117953 B2	06/11/2018
		US 2014-0271688 A1	18/09/2014
		US 2015-0320880 A1	12/11/2015
		US 2016-0030594 A1	04/02/2016
		US 2017-0035905 A1	09/02/2017
		US 2018-0125996 A1	10/05/2018
		US 9498543 B2	22/11/2016
		US 9789203 B2	17/10/2017
		UY 35490 A	31/10/2014
		WO 2014-150937 A1	25/09/2014
		ZA 201505656 B	30/11/2016
KR 10-2014-0027239 A	06/03/2014	AR 086044 A1	13/11/2013
		AU 2012-253943 A1	24/10/2013
		AU 2012-253943 B2	15/12/2016
		BR 112013028908 A2	31/01/2017
		CA 2835200 A1	15/11/2012
		CA 2835200 C	11/04/2017
		CN 103533960 A	22/01/2014
		CN 103533960 B	12/08/2015
		EA 023665 B1	30/06/2016
		EA 201391507 A1	31/03/2014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 2707028 A1	19/03/2014
		EP 2707028 B1	22/03/2017
		JP 2014-515030 A	26/06/2014
		JP 5899310 B2	06/04/2016
		MX 2013013226 A	12/12/2013
		MX 337577 B	10/03/2016
		TW 201247707 A	01/12/2012
		TW I532748 B	11/05/2016
		US 2012-0288506 A1	15/11/2012
		US 8552157 B2	08/10/2013
		WO 2012-154480 A1	15/11/2012
US 2018-0193475 A1	12/07/2018	WO 2016-020791 A1	11/02/2016
KR 10-2015-0038278 A	08/04/2015	AR 094996 A1	16/09/2015
		AU 2013-295848 A1	05/02/2015
		AU 2013-295848 B2	24/05/2018
		BR 112015001459 A2	04/07/2017
		CA 2880007 A1	30/01/2014
		CL 2015000168 A1	23/10/2015
		CN 104812775 A	29/07/2015
		CN 104812775 B	03/05/2019
		CN 110256559 A	20/09/2019
		CR 20150023 A	12/05/2015
		DK 2877493 T3	14/06/2018
		EP 2877493 A1	03/06/2015
		EP 2877493 B1	21/03/2018
		EP 3381943 A1	03/10/2018
		ES 2673847 T3	26/06/2018
		HK 1211038 A1	13/05/2016
		IL 236874 A	31/03/2015
		IL 236874 B	29/08/2019
		JP 2015-531752 A	05/11/2015
		JP 2018-138545 A	06/09/2018
		JP 6307075 B2	18/04/2018
		MX 2015000999 A	13/11/2015
		MX 360620 B	09/11/2018
		NZ 630363 A	28/09/2018
		PH 12015500113 A1	30/03/2015
		RU 2015106147 A	20/09/2016
		RU 2681730 C2	12/03/2019
		SG 11201500489 A	27/02/2015
		TW 201408699 A	01/03/2014
		TW I596113 B	21/08/2017
		US 10184007 B2	22/01/2019
		US 2014-0039334 A1	06/02/2014
		US 2014-0065168 A1	06/03/2014
		US 2016-0311924 A1	27/10/2016
		US 2017-0158778 A1	08/06/2017
		US 2019-0106510 A1	11/04/2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/013310

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 9334332 B2	10/05/2016
		US 9445765 B2	20/09/2016
		US 9605081 B2	28/03/2017
		WO 2014-018625 A1	30/01/2014

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/013310

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61P 27/02(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 16/28; A61K 31/4045; A61K 39/395; A61K 47/48; A61K 47/68; A61K 49/00; C07K 16/40; G01N 33/574; G01N 33/68; A61P 27/02; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: C-KIT, cKIT, SCF 수용체(SCF receptor), 항체(antibody), 도메인 2(second domain), 숙주세포(host cell), 벡터(vector), 형질전환(transformation), 혈관신생(angiogenesis), 암(cancer), 종양(tumor)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	OKAYAMA, Y. 등, "Assessment of the anti-c-kit monoclonal antibody YB5.B8 in affinity magnetic enrichment of human lung mast cells", 1994, 제169권, 제2호, 페이지 153-161. 초록	1,4
Y		5,7-13
A		2,3,6
Y	KR 10-2015-0131173 A (노파르티스 아게) 2015.11.24 요약; 청구항 1, 4, 31, 35, 39, 42-44; 및 단락 [0001], [0060]-[0073], [0300], [0331]-[0339]	5,7-13
A	KR 10-2014-0027239 A (임클론 엘엘씨) 2014.03.06 전체 문헌	1-13
A	US 2018-0193475 A1 (NOVARTIS AG) 2018.07.12 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2015-0038278 A (콜탄 파마슈티컬스 인코포레이티드) 2015.04.08 전체 문헌	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 01월 22일 (22.01.2020)	2020년 01월 22일 (22.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/013310

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0131173 A	2015/11/24	AR 095666 A1	2015/11/04
		AU 2014-235474 A1	2015/08/27
		AU 2014-235474 B2	2017/05/25
		BR 112015021134 A2	2017/10/10
		CA 2903772 A1	2014/09/25
		CL 2015002246 A1	2015/12/04
		CN 105007950 A	2015/10/28
		CN 105007950 B	2019/01/15
		CR 20150488 A	2016/01/29
		EA 201591801 A1	2016/03/31
		EP 2968590 A1	2016/01/20
		EP 2968590 B1	2018/09/05
		EP 3514178 A1	2019/07/24
		ES 2701051 T3	2019/02/20
		IL 241277 A	2015/11/30
		JP 2016-512832 A	2016/05/09
		JP 2018-123141 A	2018/08/09
		JP 6333943 B2	2018/05/30
		JP 6578400 B2	2019/09/18
		MA 38396 A1	2018/04/30
		MA 38396 B1	2019/05/31
		MX 2015013203 A	2015/12/11
		NZ 710929 A	2018/02/23
		PH 12015501902 A1	2016/01/04
		SG 11201506395 A	2015/09/29
		TN 2015000396 A1	2017/01/03
		TW 201446806 A	2014/12/16
		US 10117953 B2	2018/11/06
		US 2014-0271688 A1	2014/09/18
		US 2015-0320880 A1	2015/11/12
		US 2016-0030594 A1	2016/02/04
		US 2017-0035905 A1	2017/02/09
		US 2018-0125996 A1	2018/05/10
		US 9498543 B2	2016/11/22
		US 9789203 B2	2017/10/17
		UY 35490 A	2014/10/31
		WO 2014-150937 A1	2014/09/25
		ZA 201505656 B	2016/11/30
KR 10-2014-0027239 A	2014/03/06	AR 086044 A1	2013/11/13
		AU 2012-253943 A1	2013/10/24
		AU 2012-253943 B2	2016/12/15
		BR 112013028908 A2	2017/01/31
		CA 2835200 A1	2012/11/15
		CA 2835200 C	2017/04/11
		CN 103533960 A	2014/01/22
		CN 103533960 B	2015/08/12
		EA 023665 B1	2016/06/30
		EA 201391507 A1	2014/03/31

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/013310

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2707028 A1	2014/03/19
		EP 2707028 B1	2017/03/22
		JP 2014-515030 A	2014/06/26
		JP 5899310 B2	2016/04/06
		MX 2013013226 A	2013/12/12
		MX 337577 B	2016/03/10
		TW 201247707 A	2012/12/01
		TW I532748 B	2016/05/11
		US 2012-0288506 A1	2012/11/15
		US 8552157 B2	2013/10/08
		WO 2012-154480 A1	2012/11/15
US 2018-0193475 A1	2018/07/12	WO 2016-020791 A1	2016/02/11
KR 10-2015-0038278 A	2015/04/08	AR 094996 A1	2015/09/16
		AU 2013-295848 A1	2015/02/05
		AU 2013-295848 B2	2018/05/24
		BR 112015001459 A2	2017/07/04
		CA 2880007 A1	2014/01/30
		CL 2015000168 A1	2015/10/23
		CN 104812775 A	2015/07/29
		CN 104812775 B	2019/05/03
		CN 110256559 A	2019/09/20
		CR 20150023 A	2015/05/12
		DK 2877493 T3	2018/06/14
		EP 2877493 A1	2015/06/03
		EP 2877493 B1	2018/03/21
		EP 3381943 A1	2018/10/03
		ES 2673847 T3	2018/06/26
		HK 1211038 A1	2016/05/13
		IL 236874 A	2015/03/31
		IL 236874 B	2019/08/29
		JP 2015-531752 A	2015/11/05
		JP 2018-138545 A	2018/09/06
		JP 6307075 B2	2018/04/18
		MX 2015000999 A	2015/11/13
		MX 360620 B	2018/11/09
		NZ 630363 A	2018/09/28
		PH 12015500113 A1	2015/03/30
		RU 2015106147 A	2016/09/20
		RU 2681730 C2	2019/03/12
		SG 11201500489 A	2015/02/27
		TW 201408699 A	2014/03/01
		TW I596113 B	2017/08/21
		US 10184007 B2	2019/01/22
		US 2014-0039334 A1	2014/02/06
		US 2014-0065168 A1	2014/03/06
		US 2016-0311924 A1	2016/10/27
		US 2017-0158778 A1	2017/06/08
		US 2019-0106510 A1	2019/04/11

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/013310

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 9334332 B2	2016/05/10
		US 9445765 B2	2016/09/20
		US 9605081 B2	2017/03/28
		WO 2014-018625 A1	2014/01/30