

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 6월 3일 (03.06.2021)



(10) 국제공개번호

WO 2021/107566 A1

- (51) 국제특허분류: C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/016704
- (22) 국제출원일: 2020년 11월 24일 (24.11.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0152304 2019년 11월 25일 (25.11.2019)KR
- (71) 출원인: 주식회사 노벨티노빌리티 (NOVELTY NOBILITY INC.) [KR/KR]; 13477 경기도 성남시 분당구 운중로 227 6층, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 박상규 (PARK, Sang Gyu); 08270 서울시 구로구 경인로 248, Seoul (KR). 김광혁 (KIM, Kwang-Hyeok); 10893 경기도 파주시 해솔로 20 #409-301, Gyeonggi-do (KR). 김진옥 (KIM, Jin-Ock); 16497 경기도 수원시 팔달구 아주로 17-17 #303, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 언주로 430 16, 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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

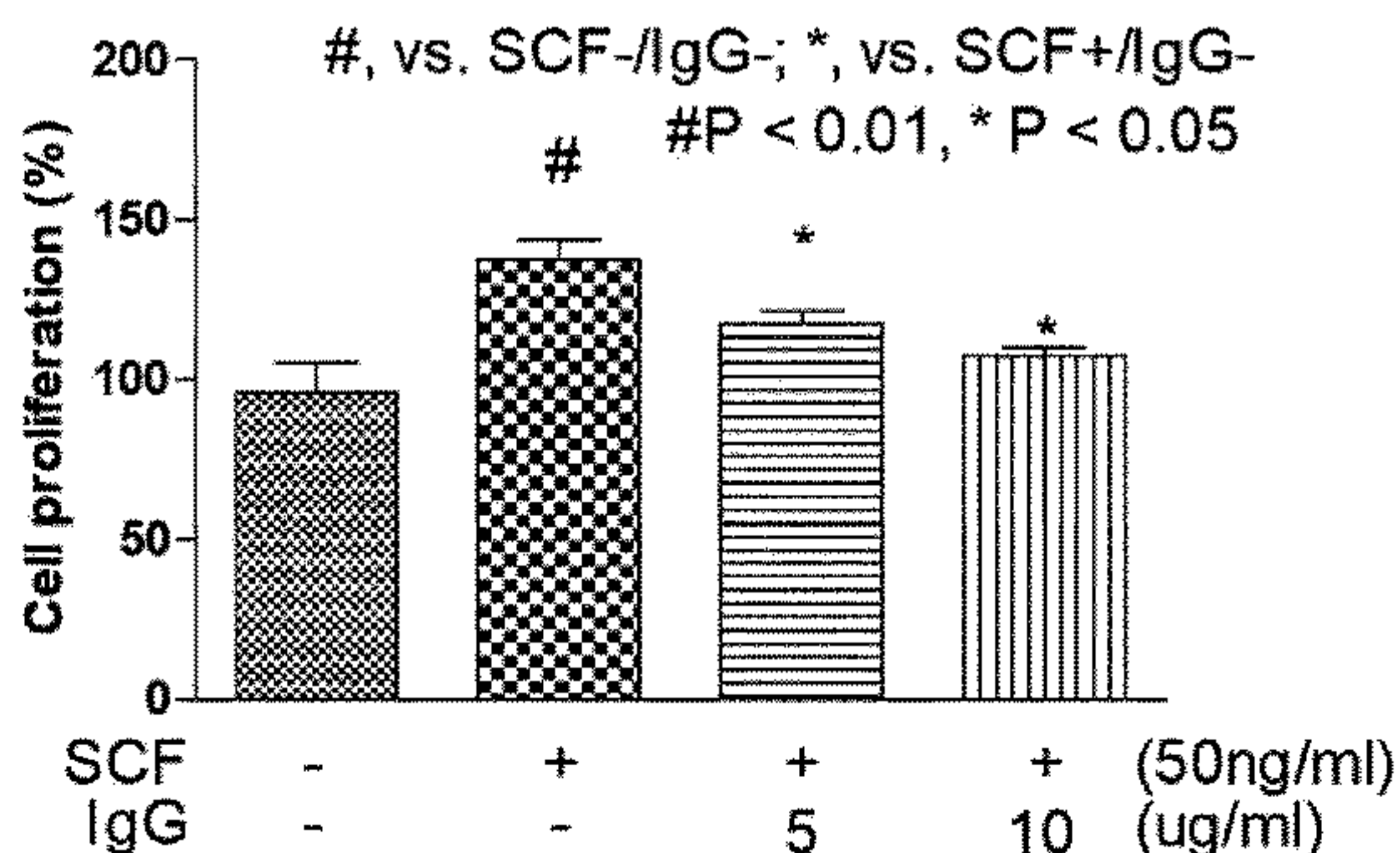
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

(54) Title: ANTIBODY AGAINST C-KIT AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: C-KIT에 대한 항체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to an antibody against c-kit or an antigen-binding fragment thereof, a nucleic acid encoding same, a vector comprising the nucleic acid, a cell transformed with the vector, a method for producing the antibody or an antigen-binding fragment thereof, a composition for the prevention or treatment of an angiogenic disease comprising same, and a composition for the prevention or treatment of cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 c-kit에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법, 이를 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

WO 2021/107566 A1

명세서

발명의 명칭: C-KIT에 대한 항체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 c-kit에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법, 이를 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 혈관의 생성 및 혈관 투과성의 조절은 저산소증(hypoxia)과 밀접한 연관성이 있다. 특히, 배아 발생 단계나 세포 증식이 활발한 암 조직, 혹은 혈관이 손상된 조직에서 나타나는 저산소증 상태는 기존 혈관과 내피 세포 간의 결합이 끊어지고 투과성이 증가하는 불안정한 상태가 되며, 이러한 상황에서 혈관 내피세포의 증식 및 이동이 촉진되어 새로운 혈관이 형성된다. 이러한 혈관 불안정화 및 혈관 신생과정을 조절하는 기전에는 저산소 상태에서

HIF-1(hypoxia inducible factor-1) 등의 전사인자를 통해 차등 발현되는 다양한 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 유전자들의 상당수는 성장인자/사이토카인으로 혈관 내피세포의 세포간 결합을 감소시켜 혈관의 투과성을 높이거나 혈관 내피세포의 성장/이동능을 촉진하여 신생 혈관을 형성한다.

- [4] 비정상적인 혈관신생 및 혈관 투과성 조절 과정은 배아 발생 과정에서의 기관 형성뿐 아니라, 출생 후 성인에서의 수많은 질병의 발생과 직결되어 있다. 혈관신생은 종양의 성장 뿐만 아니라 종양의 양성에서 악성으로 발전되는 원인 중 하나이며, 이외에도 연령-관련 황반변성(Age-related Macular Degeneration), 당뇨병 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).

- [5] 한편, 혈관내피세포의 성장, 이동, 분화 등과 같은 혈관형성 과정에 관여하는 다수의 신생혈관 촉진 및 억제 인자들이 발견되었다. 신생혈관형성 억제제는 작용기작에 따라 매트릭스-분해 억제제 (Matrix-breakdown inhibitor), 내피세포 억제제(Endothelial cell inhibitor), 혈관생성 억제제(Angiogenesis inhibitor) 등 몇 개의 카테고리로 나눌 수 있는데, 이 중에서 상기 혈관생성 억제제에는 VEGFR2, VEGFR1, PDGFR, c-KIT, FLT3 등을 타겟하여 이들의 활성화, 신호전달, 생산 등을 저해하는 약물들이 포함될 수 있다.

- [6] 특히, 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] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 c-kit에 특이적으로 결합하는 항체를 개발하기 위하여 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 c-kit에 특이적으로 결합하는 항-c-kit 항체를 개발하고, 목적하는 혈관신생 질환 특히, 황반변성의 치료제 역할을 할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

[9] **발명의 요약**

[10] 본 발명의 목적은 c-kit에 대한 신규 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공하는 데 있다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공하는 데 있다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 세포 및 그의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 4의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 서열번호 6의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는, c-kit에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합단편을 제공한다.

[15] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 제공한다.

[16] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[18] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법을 제공한다: (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.

[19] 본 발명은 또한, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 암의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 HUVEC에서 SCF에 의한 세포증식을 c-kit 항체가 농도의존적으로 억제함을 보여주는 결과를 나타낸 것이다.
- [22] 도 2는 in vitro angiogenesis 억제에 대한 효능을 검증하기 위하여 HUVEC에 c-kit 항체를 농도별로 처리한 결과를 나타낸 것이다.
- [23] 도 3은 c-kit 항체를 농도별로 처리한 후 KD value를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [24] 도 4는 c-kit 항체의 c-kit에 대한 결합 부위를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [25] 도 5는 c-kit 항체의 도메인 매핑 결과를 나타낸 것이다.
- [26] 도 6은 c-kit 항체의 경쟁 ELISA (Competitive ELISA) 결과를 나타낸 것이다.
- [27] 도 7은 c-kit 항체의 당뇨병성 망막증 및 미숙아 망막병증 모델인 OIR 마우스 모델에서 in vivo 효능 검증 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 8은 c-kit 항체가 황반변성 모델에서 비정상적 혈관형성을 감소시킨 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 9은 c-kit 항체가 농도의존적으로, c-kit, akt, ERK의 인산화 억제, c-kit의 단백질 및 beta-catenin 단백질의 감소를 보여주는 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 10은 c-kit 항체를 농도별로 처리한 결과, 백혈병 세포주 및 혈관 내피세포에서 SCF에 의한 세포 증식을 효과적으로 억제함을 보여주는 결과를 나타낸 것이다.
- [31]
- [32] **발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예**
- [33] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [34] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 4의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 서열번호 6의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는, c-kit에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편에 관한 것이다.
- [35] 본 명세서의 "c-kit"는 CD117 또는 SCFR (줄기 세포 인자 수용체: stem cell factor receptor)로 명명될 수 있다. SCF는 세포와 세포막 관련 티로신 키나제 수용체를 통해 신호하는 당 단백질이며, 이러한 신호 전달 경로는 양성 및 음성 조절자로서 조혈작용을 한다. c-kit은 림프계 및 적혈구 계에 속하는 성숙세포의 전구체인 다능성 조혈 줄기 세포 상에서 발현한다. 다른 조혈 세포와는 달리 비만세포 전구체 및 성숙 비만세포는 높은 수준의 c-kit 발현을 유지한다. 따라서, c-kit을 통해 SCF 신호는 비만세포의 발달, 기능, 생존에 필수적이다. 인간 c-kit 변이 활성화는 비만세포 질환과 관련되어 있다. 비만세포는 혈관신생 등의

지속적 공급원을 제공할 수 있음이 보고되어 있다.

- [36] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 c-kit 특히, c-kit의 도메인 I에 특이적으로 결합하는 항-c-kit 항체를 의미한다. 본 발명의 범위에는 c-kit 특히, c-kit의 도메인 I 및/또는 II에 특이적으로 결합하는 완전한 항체 형태 뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.
- [37] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 디설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [38] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각이다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.
- [39] 하나의 실시예에서, 본 발명에 따른 항체는 Fv 형태(예컨대, scFv)이거나, 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 불변영역은 감마1(IgG1), 감마 3(IgG3) 또는 감마 4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [40] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [41] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체,

키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [42] 상기 단일클론 항체는 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득한 항체, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 지칭한다. 단일클론 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다.
- [43] "에피토프"은 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정부위 (determinant)를 의미한다. 에피토프는 통상 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특성을 갖는다. 입체적 에피토프 및 비입체적 에피토프는 변성 용매의 존재하에서 전자에 대한 결합은 소실되지만 후자에 대해서는 소실되지 않는다는 점에서 구별된다.
- [44] 본 발명에 따른 항체는 c-kit의 도메인 I 및/또는 도메인 II에 결합하며, 예를 들어 서열번호 11의 c-kit 중 domain I의 R49부터 domain II의 C186의 부위까지 결합함을 확인하였다.
- [45] 상기 "인간화" 형태의 비-인간 (예: 뮤린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 종 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다.
- [46] 상기 "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간의 면역글로불린으로 구성되어 있는 것을 의미한다.
- [47] 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린) 뿐 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다.
- [48] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역 (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3), 및 골격 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. VH는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. VL은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다.

- [49] "상보성 결정 영역" (CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 항원 결합을 위해 필요한 존재인, 항체 가변 도메인의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 도메인은 전형적으로, CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 확인된 3개의 CDR 영역을 갖는다.
- [50] 본 발명에 있어, 상기 c-kit에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 1의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 4의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 서열번호 6의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함한다.
- [51] "골격 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 각 가변 도메인은 전형적으로, FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인된 4개의 FR을 가진다.
- [52] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로 단단하게 사실상 공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다.
- [53] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. F(ab')₂ 항체 단편은 일반적으로 그들 사이에 힌지 시스테인에 의해 그들의 카복시 말단 근처에 공유적으로 연결되는 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다.
- [54] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다.
- [55] c-kit 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇄를 포함한다. 기능적으로, c-kit 항체의 c-kit 특히, c-kit의 도메인 I 및/또는 도메인 2에 대한 결합 친화성은 10⁻⁵M 내지 10⁻¹² M 범위 내에 있다. 예를 들어, c-kit 항체의 결합 친화성은 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹² M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻¹⁰ M 내지 10⁻¹¹ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹⁰ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M 내지 10⁻⁹ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M 내지 10⁻⁸ M, 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M 내지 10⁻⁷ M 또는 10⁻⁵ M 내지 10⁻⁶ M이다.
- [56] 상기 c-kit에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 7의 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 또한, 상기 c-kit에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 서열번호 8의 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

- [57] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 c-kit을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 항-c-kit 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [58] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [59] 이에 기초하여, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 명세서에 기재된 명시된 서열 또는 전체와 비교하여 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 상동성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열 비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 상동성을 결정할 수 있다.
- [60] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [61] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 분리하여 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 재조합적으로 생산할 수 있다. 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는

추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

- [62] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [63] 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [64] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 상기 벡터에서 항체를 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.
- [65] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [66] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [67] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기

위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG(ABI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.

- [68] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [69] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 언급된 벡터로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [70] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 쉐린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [71] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [72] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법에 관한 것이다.
- [73] 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [74] 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [75] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [76] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 c-kit에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는

혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 c-kit에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

- [77] 혈관신생 질환은 혈관신생의 발생 또는 진행과 관련된 질환을 의미한다. 상기 항체로 치료될 수 있다면, 그 질병은 한정 없이 혈관신생 관련 질환의 범위에 포함될 수 있다. 혈관신생 질환의 예로는 당뇨병망막병증(diabetic retinopathy), 미숙아 망막병증(retinopathy of prematurity), 각막 이식 거부(corneal graft rejection), 황반변성(macular degeneration), 혈관신생성녹내장(neovascular glaucoma), 전신홍색증(erythrosis), 증식성망막증(proliferative retinopathy), 건선(psoriasis), 혈우병성 고관절염(hemophilic arthritis), 동맥경화성 플라크(atherosclerotic plaques)의 모세혈관 형성, 켈로이드(keloid), 상처 과립화(wound granulation), 혈관 유착(vascular adhesion), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 퇴행성 관절염(osteoarthritis), 자기면역질환(autoimmune diseases), 크론병(Crohn's disease), 레스테노시스(restenosis), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 장협착(intestinal adhesions), 고양이 찰과상 감염증(cat scratch disease), 궤양(ulcer), 간경변증(liver cirrhosis), 신장염(nephritis), 당뇨병성 신장질환(diabetic nephropathy), 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 염증 질환(inflammatory diseases) 및 신경변성 질환(neurodegenerative diseases)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [78] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [79] 본 발명은 예를 들어, (a) 본 발명에 따른 c-kit에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물일 수 있다. 본 발명은 또한, 환자에게 필요한 유효량으로 본 발명에 따른 c-kit에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [80] 상기 암은 식도암(esophageal cancer), 위암(stomach cancer), 대장암(large intestine cancer), 직장암(rectal cancer), 구강암(oral cancer), 인두암(pharynx cancer), 후두암(larynx cancer), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 유방암(breast cancer), 자궁경부암(uterine cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 전립선암(prostate cancer), 고환암(testis cancer), 방광암(bladder cancer), 신장암(renal cancer), 간암(liver cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 뼈암(bone cancer), 결합조직암(connective tissue cancer), 피부암(skin cancer), 뇌종양(brain cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 백혈병(leukemia), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 림프종(lymphoma) 및 다발성 골수혈액암(multiple myeloid blood cancer)으로 구성된 군에서 선택되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 경우에 따라서, 상기 암은 전이(metastasis) 상태의 암도 포함할 수 있다.

- [81] 본 발명에 따르면, c-kit 유전자 amplification, c-kit 단백질 과발현, c-kit 돌연변이에 의한 글리벡 저항성 암을 치료할 수 있다. 상기 글리벡 저항성 암은 예를 들어, 백혈병, GIST (gastrointestinal stromal tumors), 흑색종 (melanoma), SCLC (Small Cell Lung Cancer), NSCLC (Non Small Cell Lung Cancer), 신경교종 (glioma), GBM (glioblastoma multiforme), 결장 직장암, 또는 비만 세포증 (mastocytosis)일 수 있다.
- [82] 경우에 따라서, 상기 조성물은 섬유증 (fibrosis)의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. c-kit positive cell인 mast cell이 섬유증을 유발할 수 있다는 다수의 연구 결과가 보고된 바 있다.
- [83] 상기 조성물은 상술한 본 발명의 항-c-kit 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효성분으로 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 기재를 생략한다.
- [84] "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 혈관신생 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 혈관신생 질환 발전의 억제, 혈관신생 질환의 경감 또는 제거를 의미한다.
- [85] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [86] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장 내 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [87] 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [88] 본 발명에 따른 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [89] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는

다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이 때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [90] 본 발명은 또한, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 병용 투여용 조성물에 관한 것이다.
- [91] 본 발명의 조성물은 항-종양 T 세포 활성을 증가시켜, 종양 세포를 표적화하는 면역 반응을 증대시킬 수 있다. 기타 항-신생물제 또는 면역원성 제제[(예를 들면, 약화된 암 세포, 종양 항원(재조합 단백질, 펩타이드 및 탄수화물 분자를 포함함), 항원 전달 세포, 예를 들면, 종양 기원된 항원 또는 핵산으로 펄스된 가지세포, 면역 자극 사이토킨(예를 들면, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), 및 면역 자극 사이토킨을 암호화하는 유전자로 형질감염된 세포(예를 들면, GM-CSF를 포함하지만 이에 제한되지 않는다)]; 표준 암 치료요법(예를 들면, 화학 치료요법, 방사선치료요법 또는 수술); 또는 기타 항체(PD-1, PD-L1, VEGF, EGFR, Her2/neu, VEGF 수용체, 기타 성장 인자 수용체, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, 및 ICOS를 포함하지만 이에 제한되지 않는다)와 함께 사용될 수 있다.
- [92] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 투여량, 투여 방법 및 다른 약물의 종류는 환자의 상태에 따라서 적절하게 처방될 수 있다.
- [93] 본 발명은 다른 관점에서 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 다중특이적 항체에 관한 것이다. 다중특이적(Multi-specific) 항체는 사중특이적(Tetra-specific) 항체, 삼중특이적(Tri-specific) 항체 또는 이중특이적(Bi-specific) 항체를 포함한다. 일 예로 이중특이적 항체란 서로 다른 두 종류의 항원 (표적 단백질)에 결합할 수 있는 항체를 의미하고, 유전공학 또는 임의의 방법에 의해 제조된 형태이다.
- [94] 다중특이적 항체는 적어도 2 이상의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 가지는 항체로, 다중특이적 항체에 속하는 항체들은 scFv 기반 항체, Fab 기반 항체 및 IgG 기반 항체 등으로 구분할 수 있다. 이중특이적 항체의 경우 두 개의 신호를 동시에 억제 또는 증폭시킬 수 있기 때문에 하나의 신호를 억제/증폭하는 경우보다 더욱 효과적일 수 있으며, 각각의 신호를 각각의 신호억제제로 처리했을 경우와 비교하면, 저용량 투약이 가능하며, 동일한 시간 및 공간에서의 두 개의 신호를 억제/증폭시킬 수 있다.
- [95] 이중특이적 항체의 제조 방법은 널리 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 두 개의 중쇄가 상이한 특이성을 가지는 조건에서 두 개의 면역글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공동 발현을 근간으로 한다.
- [96] scFv를 기반으로 하는 이중특이적 항체의 경우, 상이한 scFv들의 VL과 VH를 각기 서로 조합하여 혼성 scFv를 heterodimeric 형태로 제조하여

디아바디(diabody)를 만들 수 있고, 상이한 scFv를 서로 연결해서 tandem ScFv를 제조할 수 있으며, Fab의 CH1과 CL을 각각의 scFv의 말단에 발현시켜 heterodimeric 미니항체(miniantibody)를 제조할 수 있고, Fc의 homodimeric 도메인인 CH3 도메인의 일부 아미노산을 치환하여 'knob into hole' 형태의 heterodimeric 구조로 변경시켜, 이들 변경된 CH3 도메인을 상이한 각각의 scFv 말단에 발현시킴으로써 heterodimeric scFv형태의 미니바디(minibody)를 제조할 수 있다.

[97] Fab을 기반으로 하는 이중특이적 항체의 경우, 특정 항원에 대한 개별 Fab'를 이황화결합 또는 매개체를 이용해서 서로 조합하여 heterodimeric Fab 형태로 제조할 수 있고, 특정 Fab의 중쇄 또는 경쇄의 말단에 상이한 항원에 대한 scFv를 발현시킴으로써 항원 결합가(valency)를 2개로 하거나, Fab과 scFv 사이에 경첩부위(hinge region)를 둠으로써 homodimeric 형태로 4개의 항원결합가를 가지도록 제조할 수 있다. 또한, Fab의 경쇄 말단과 중쇄 말단에 상이한 항원에 대한 scFv를 융합시킴으로써 항원에 대한 결합가를 3개로 만든 이중표적 바이바디(bibody), Fab의 경쇄말단과 중쇄말단에 상이한 scFv를 각각 융합시킴으로써 항원에 대한 결합가를 3개로 가지도록 한 삼중표적 바이바디, 상이한 Fab 3개를 화학적으로 접합시킴으로써 수득할 수 있다.

[98] IgG를 기반으로 하는 이중특이적 항체의 경우, 트리온파마(Trion Pharma)사에 의해 마우스와 랫트 하이브리도마를 다시 교잡함으로써, 하이브리드 하이브리도마, 일명 쿼드로마(quadromas)를 제조하여 이중특이적 항체를 생산하는 방법이 알려져 있다. 또한, 경쇄부분은 공유하면서, 상이한 중쇄에 대해서 Fc의 CH3 homodimeric 도메인의 일부 아미노산을 변형시켜 heterodimeric 형태로 제작한 이른 바 'Holes and Knob' 형태로 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. heterodimeric 형태의 이중특이적 항체 이외에, 상이한 2종의 scFv를 IgG의 경쇄와 중쇄의 가변 도메인 대신 constant 도메인에 각각 융합 발현시켜 homodimeric 형태의 (scFv)₄-IgG로 제조할 수 있다. 또한, 임클론(ImClone)사는 인간 VEGFR-2에 대한 키메릭 단클론항체인 IMC-1C11을 기반으로하여, 이 항체의 경쇄 아미노 말단에 마우스 혈소판유도성장인자수용체-알파(Platelet-derived Growth Factor Receptor- α)에 대한 single variable domain만을 융합시켜 이중특이적 항체를 제작하여 보고하였다. 또한, 단백질 카이네이즈 A(protein kinase A, PKA) R 서브유닛의 dimerization and docking domain(DDD)과 PKA의 anchoring domain을 이용한 이른 바 'dock and lock(DNL)' 방법을 통해서 CD20에 대한 다수의 항원결합가를 지니는 항체로 제작할 수 있다.

[99] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합단편 및 약물을 포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다.

[100] 항체-약물 접합체는 타겟 암세포로 항암 약물을 전달하기 전까지 항암 약물이 항체에 안정적으로 결합되어 있어야 한다. 타겟으로 전달된 약물은 항체로부터

유리되어 타겟 세포의 사멸을 유도해야 한다. 이를 위해서는 약물이 항체에 안정적으로 결합함과 동시에 타겟 세포에서 유리될 때는 타겟 세포의 사멸을 유도할 충분한 세포독성을 가져야 한다.

- [101] 상기 약물은 약리학적 효과를 나타내는 제제로 본 발명의 항체 또는 이의 절편에 결합될 수 있고, 산성조건에 의하여 상기 항체 또는 이의 절편과 분리될 수 있으며, 표적 세포에 대한 치료 효과를 나타내는 화합물을 의미하는데, 상기 약물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 세포독소(cytotoxin), 방사성 동위원소, 항증식제, 아폽토시스 촉진제(pro-apoptotic agent), 화학요법제 및 치료용 핵산이 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [102] 상기 항체-약물 접합체는 세포로 내재화될 수 있으며 항체 의존성 세포독성을 매개할 수 있다.
- [103] 용어 "세포독성 활성"은 항체-약물 접합체 또는 항체-약물 접합체의 세포 내 대사물질의 세포-사멸, 세포증식 억제 또는 성장 억제 효과를 의미한다. 세포독성 활성은 1/2의 세포가 생존하는 단위 부피당 농도(몰 또는 질량)인 IC50 값으로서 표현될 수 있다.
- [104] 세포독소란 용어는 일반적으로 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/하거나 세포를 파괴하는 제제를 말한다. 대표적인 세포독소에는 항생제, 튜블린 중합 억제제, DNA에 결합하여 이를 파괴하는 알킬화제, 및 단백질 키나제, 포스파타제, 토포아이소머라제, 효소 및 사이클린과 같은 필수적인 세포 단백질의 기능 또는 단백질 합성을 파괴하는 제제가 포함된다. 세포독소의 예는 택솔, 사이토칼라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D(gramicidin D), 에티뎀 브로마이드(ethidium bromide), 에메틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시안트라신디온(dihydroxy anthracin dione), 미톡산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 악티노마이신 D(actinomycin D), 1-디하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoids), 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라노롤(propranolol), 및 퓨로마이신(puromycin) 및 이들의 유사체 또는 동족체가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.
- [105] 방사선요법 적용을 위해, 본 발명의 항체는 고 에너지 방사성 동위원소를 포함할 수 있다. 당해 동위원소는 예를 들면, 항체 내에 존재하는 시스테인 잔기에서 항체에 직접적으로 결합될 수 있거나, 또는 킬레이트를 사용하여 항체와 방사성 동위원소의 결합을 매개할 수 있다. 방사선요법에 적합한 방사성 동위원소에는, α -방출기, β -방출기 및 오제 전자(auger electron)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 진단상 적용에 유용한 방사성 동위원소에는 양전자방출기 및 γ -방출기가 포함된다.
- [106] 항증식제 및 아폽토시스 촉진제에는 PPAR-감마(예를 들면, 사이클로펜테논

프로스타글란딘(cyPGs)), 레티노이드, 트리테르페노이드(예를 들면, 사이클로아르탄, 루판, 우르산, 올레아난, 프리에델란, 담마란, 쿠쿠르비타신 및 리모노이드 트리테르페노이드), EGF 수용체의 억제제(예를 들면, HER4), 라파마이신, CALCITRIOL (1,25-디하이드록시콜레칼시페롤(비타민 D)), 아로마타제 억제제(FEMARA (레트로존)), 텔로머라제 억제제, 철킬레이트제(예를 들면, 3-아미노피리딘-2-카복스알데하이드 티오세미카르바존(트리아핀)), 아포틴(바이러스 단백질 3-닭 빈혈 바이러스로부터의 VP3), Bcl-2 및 Bcl-X(L)의 억제제, TNF-알파, FAS 리간드, TNF-관련 아포토시스-유도 리간드(TRAIL/Apo2L), TNF-알파/FAS 리간드/TNF-관련 아포토시스-유도 리간드(TRAIL/Apo2L) 신호전달의 활성화제, 및 PI3K-Akt 생존 경로 신호전달의 억제제(예를 들면, UCN-01 및 겔다나마이신)가 포함된다.

- [107] "화학요법제"는 작용의 메커니즘과는 관계없이, 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 부류는 알킬화제, 대사길항물질, 방추체 독성 식물 알칼로이드, 세포독성/항종양 항생제, 국소이성화효소 억제물질, 항체, 감광제, 그리고 키나아제 억제물질을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 화학요법제는 "표적화된 요법" 및 전통적인 화학요법에 이용되는 화합물을 포함한다.
- [108] 상기 접합체는 약물을 항체 또는 기능적 균등물을 결합하여 공지된 방법으로 제작할 수 있다. 항체와 약물은 그들 자신이 가진 연결기 등을 통해 직접 결합할 수도 있고 또는 링커나 다른 물질을 통해 간접적으로 결합할 수 있다. 약물이 항체로부터 절단되도록 하는 주요 기전에는 리소좀(히드라존, 아세탈 및 시스-아코니테이트-유사 아미드)의 산성 pH에서의 가수분해, 리소좀 효소(카텝신 및 기타 리소좀 효소)에 의한 펩타이드 절단 및 디설파이드의 환원이 포함된다. 이러한 다양한 절단 기전의 결과로서, 약물을 항체에 연결시키는 기전은 매우 다양하며 어떠한 적합한 링커라도 사용될 수 있다.
- [109] 항체와 약물이 결합하기 위한 적절한 연결기는 당해 분야에 널리 공지되며 예로써, 이황화기, 티오에테르기, 산분해성기, 광분해성기, 펩티다제 분해성기 및 에스테라아제 분해성기를 포함한다.
- [110] 약물이 직접 결합될 경우 연결기(linking group)는 예로서는, SH기를 이용한 이황화결합이나 말레이미드를 매개로 하는 결합을 들 수 있다. 예를 들면, 항체 Fc영역의 분자 내 이황화결합과 약물의 이황화결합을 환원하여, 양자를 이황화결합으로 연결한다. 또한, 말레이미드를 통하는 방법 및 항체 내에 시스테인을 유전공학적으로 도입하는 방법도 있다.
- [111] 항체와 약물을 다른 물질(링커)을 통해 간접적으로 결합할 수도 있다. 링커로는 항체, 약물 또는 모두와 반응하는 작용기를 1 또는 2종류 이상 가지는 것이 바람직하다. 작용기의 예로는 아미노기, 카르복실기, 머캡토기, 말레이미드기, 피리디닐기 등을 들 수 있다.

[112] 실시예

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

[114] 실시예 1. c-kit 항체의 제조

[115] 1. 항원면역

[116] Elabscience로부터 구매한 재조합 c-kit 단백질 (cat# PKSH030939) 50ug/마우스를 동일한 부피의 완전 프라운트 아주반트(Freund's Adjuvant) (sigma, USA)와 혼합하여 에멀전을 제조하였다. 에멀전을 7주령 암컷 human CD34+ 세포 주사로 제작된 인간화 NSG 마우스 6마리의 복강내에 주입하였다. 항원 50 μ g을 총부피 500 μ l로 각각의 마우스에게 주입하였다. 1주, 2주 후, 각각 불완전 프라운트 아주반트 (Sigma, USA)와 항원을 혼합한 에멀전을 마우스의 복강내에 주입하였다. 효소면역 측정법을 실시하여 항체 생성을 확인한 후, 세포 융합 3일전에 한번 더 불완전 프라운트 아주반트 (Sigma, USA)와 항원을 혼합한 에멀전을 마우스의 복강내에 주입하였다.

[117] 2. 항체-생성세포의 확인 및 선별

[118] 상기 기재된 방법에 따라서 면역화된 마우스의 안구에서 혈액을 채취하고 1.5 ml 미세원심분리 튜브에 넣고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 혈청을 분리하고 항체생성을 확인하는 실험을 실시할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 항원 단백질을 사용하여 효소면역 측정법을 실시하여 항체 생성을 확인한 후 항체-생성 마우스의 비장세포의 융합을 실시하였다.

[119] 3. 하이브리도마의 제조

[120] 항체생성을 확인한 후 마우스를 희생시켜 비장세포를 분리하여 골수종 세포 P3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580)와 융합시켰다. 10% 소태아 혈청을 보충한 RPMI1640배지를 사용하여 배양 플레이트 내에서 마우스의 P3X63Ag8.653 세포를 배양하였다. 세포융합을 실시하기 위해 P3X63Ag8.653 세포를 무혈청 RPMI1640 배지(Hyclone, USA)로 2회 세척하고 1X10⁷ 세포농도가 되도록 조정하였다. 마우스를 경추탈구에 의해 희생시키고 비장을 채취한 후, 메시 용기(Sigma, USA)에 넣고 세포를 분리하였다. 비장세포의 현탁액을 제조한 후, 현탁액을 원심분리를 이용하여 세척하였다. 비장세포 용액을 트리스-NH₄Cl (트리스 20.6g/L, NH₄Cl 8.3g/L)에 노출시켜 적혈구 세포를 용해하였다. 완전히 분리된 항체-생성세포를 400g로 5분간 원심분리한 후, 이들은 무혈청 배지에서 2회 세척하고 10ml 배지에서 재현탁시켰다. 림프세포를 혈구계를 이용하여 계수하고 림프구 1x10⁸을 무혈청 배지 내에서 P3X63Ag 8.653 세포 1 x 10 (10:1)와 혼합하였다. 원심분리는 400xg로 5분간 실시하였다.

[121] 37도씨에서 데워진 50% (M/V) 폴리에틸렌글리콜 1500 (sigma, USA))를 사용하여 1ml 용액을 적하하여 1분간 혼합하였다. 상기에서 제조된 융합

혼합용액을 무혈청 RPMI1640으로 희석하고 400g로 3분간 원심분리 하였다. 세포를 20% 소태아 혈청 및 HAT (100 uM 하이포잔틴, 0.4uM 아미노프테린, 16 uM 티미딘)을 보충한 RPMI 1640선택배지 35ml에서 현탁하였다.

- [122] 현탁액 100ul를 1일전 피더세포(RPMI1640을 사용한 복강으로부터 분리된 대식세포)를 코팅한 96well 플레이트에 로딩하고 37도씨, 5% CO2에서 배양하였다. 5일 후, HAT 배지는 2-3일 간격으로 교체하고 세포를 14일간 배양하였다. 14일 후, 20% 소태아혈청 및 HT(HAT로부터 0.4 uM 아미노프테린을 제거한 배지) 보충한 RPMI1640배지를 교체하여 2차 배양하였다.
- [123] 4. 항체 생성 융합세포의 선택 및 분리
- [124] 위에서 융합된 세포 배양액의 상층액을 수집하고 효소면역 측정법을 실시하여, 상기 제조된 항원에 특이적인 항체의 제조를 확인하였다. 음성대조군에 비해 4배 이상의 적정 농도를 나타낸 융합세포의 배양액을 선택하고 24 well 배양 플레이트로 옮겨 배양 하였다. 추가로 96웰 플레이트에 well당 1개의 세포가 들어가도록 희석하여 (limiting dilution) 배양한 후 배양액을 회수하여, 96웰 플레이트에 항원으로 사용한 c-kit 단백질을 웰당 0.1ug을 코팅한후, 효소면역 측정법을 실시하여 단클론 항체를 생산하는 융합세포를 선택하였다.
- [125] 도 1에 따르면, HUVEC에서 SCF에 의한 세포증식을 항체가 농도의존적으로 억제하는 것으로 나타났다.
- [126] 도 2에 따르면, 항체의 *in vitro* angiogenesis 억제에 대한 효능을 검증하기 위하여 HUVEC에 항체를 농도별로 처리한 결과 0.1ug/ml에서도 강력하게 *in vitro* angiogenesis를 억제하는 것으로 나타났다.
- [127] 실시예 2. c-kit 항체 클로닝, 분리 및 정제
- [128] 1. 항체 서열
- [129] 항체를 coding하는 CDR 유전자를 Genescript에서 표 1과 같이 확인하였다.
- [130]

[131] [표 1]

| | CDR1 | CDR2 | CDR3 |
|----|---|-----------------------------------|------------------------------|
| | SYWWS (SEQ ID No:1) | YIFYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID No:2) | GYSSGWLDFHH (SEQ ID No:3) |
| VH | [MKHLWFFLLLVAAPRWVLS: signal peptide] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGSYWWSWIRQPPGKGL EWIGYIFYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARGYSSGWLDFHHWGQGLVAVSS (SEQ ID No:7) | | |
| | [ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCA GATGGGTCCTGTCC] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCA TCGGTAGCTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGA AGGGACTGGAGTGGATTGGGTATACTTTTACAGTGGGAGCAC CAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTA GACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTG ACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATA GCAGTGGCTGGTTAGACTTCCACCACTGGGGCCAGGGCACCC TGGTCGCCGTCTCCTCA (SEQ ID No:9) | | |

[132]

| | RASQSISSYLN (SEQ ID No:4) | AASSLQS (SEQ ID No:5) | QQSYSTPIT (SEQ ID No:6) |
|----|--|--------------------------|----------------------------|
| VL | [MRVPAQLLGLLLLWLRGARC : signal peptide] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSY STPITFGQGRLEIK (SEQ ID No:8) | | |
| | [ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGG CTCCGAGGTGCCAGATGT] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCAT TAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTAC TACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGATCACCTTCGGCCAAG GGACACGACTGGAGATTAATAA (SEQ ID No:10) | | |

[133] 2. Full 인간화 항체 클로닝

- [134] 위에서 얻어진 항-c-kit 항체의 가변 도메인을 인간 Fc 아미노산 서열에 grafting하고 pCHO vector(lifetechnology)내에 클로닝 하였다.
- [135] 경쇄가변 도메인은 인간 카파 불변영역에 대한 프레임 내에 융합시키고, 중쇄 가변 도메인은 인간 IgG1 불변 영역에 대한 프레임 내에 융합시켰다. 전장 IgG1 항체의 배지내 분비를 위한 리더 펩타이드 서열을 두 유전자에 첨가하여 유전자를 합성 후 서열분석을 통해 다시한번 검증하였다. CHO 세포내에서 발현 시험을 위해 3개의 클론을 선택하였다. 3개의 클론에 대한 글리세롤 스톱을 제조하고 엔도톡신이 없는 plasmid 음를 CHO세포내에서 발현 시험 위해 제조하였다.
- [136] 3. CHO 세포에 형질 감염 후 항체의 분리 정제
- [137] 위에서 얻어진 플라스미드 DNA를 CHO-S세포 내에 형질감염시켰다. 형질감염 1주일 전 CHO-S(Invitrogen, 10743-029)을 DMEM보충 혈청내 단층 배양물 내로 옮겼다. 형질감염 1일 전, 세포를 분주 한 다음, 형질 감염 시료체 대해 DNA-리포펙타민 복합체를 준비하여 밤새 인큐베이터에서 5% CO₂, 37도씨에서 세포를 인큐베이션한 후, 배지를 2-3일에 한번씩 첨가해 주면서 일주일 간 배양한 후, 배양액을 회수하여 Protein A/G agarose (invitrogen)에 결합시킨 후 PBS로 wash한 후, 0.1 M글리신 (pH 2.8)로 elution 후, 1M Tris-HCl (pH 8.0)으로 중화시킨 후 다시 PBS로 dialysis한 후, -70도씨에 보관하였다. 분리정제된 4C9 항체를 6%의 SDS-PAGE에 non-reducing 및 reducing 조건으로 running하여 항체의 순도 및 사이즈를 확인하였다.
- [138] 실시예 3. c-kit 항체 친화력 검증
- [139] 항-c-kit 항체가 c-kit에 결합하는 능력을 확인하기 위하여 SPR 을 실시하였다. SR7500DC (Reichert, USA)를 이용하여, 항체 제작을 위해 사용된 인간 c-kit (elabscience, PKSH030939) 20ug을 PEG(Reichert, USA) chip에 고정한 후 항체를 농도별로 흘려준 후, KD value를 Scrubber2 program을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [140] 실시예 4. 도메인 매핑
- [141] 인간 c-kit 유전자 (NM_000222)의 deletion mutant(Q26-P520, D113-P520 Ddomain I, A207-P520 Ddomain I - II, K310-P520 Ddomain I-III, T411-P520 Ddomain I-IV)를 c-terminal에 FLAG을 tagging하여 HEK293에 transfection한 후, 배양액으로 분비시킨 후 FLAG antibody bead (Sigma-Aldrich)를 이용하여 정제한 후, ELISA를 실시하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 따르면, 항체는 domain I가 deletion되었을 때 c-kit을 인지하지 못하는 것으로 나타나 항체의 c-kit에 대한 결합 부위는 domain I인 것으로 나타났다.
- [142] 실시예 5. 도메인 매핑
- [143] 인간 c-kit 유전자 (NM_000222, 서열번호 11)의 deletion mutant(Q26-P520, R49-P520, I70-P520, K100-P520, K116-P520, N130-P520, S187-P520)를 c-terminal에 FLAG을 tagging하여 HEK293에 transfection한 후, 배양액으로

분비시킨 후 FLAG antibody bead (Sigma-Aldrich)를 이용하여 정제한 후, ELISA를 실시하였다.

[144] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 따르면, 항체는 domain I의 R49부터 domain II의 C186의 부위까지 결합하는 것으로 나타났다. 특히, SCF (stem cell factor)의 경우 domain II의 R122, Y125, R181부위에 결합하는 것으로 나타났는데, 이 역시 SCF와 c-kit에 대해 경쟁적인 결합을 하는 것으로 판단된다.

[145] 96well plate에 20ng의 c-kit을 코팅하고, SCF를 농도별(2, 5, 10, 20, 50, 100 ug/ml짜리 100ul)에 상기 항체(5ng)를 30분간 미리 섞어 4도씨에서 incubation 한 후, 96well plate에 첨가하여 anti-human IgG-HRP를 이용하여 c-kit에 대한 competitive ELISA를 실시하였다.

[146] 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 따르면, 항체가 SCF와 경쟁적으로 c-kit에 결합하는 것으로 나타났으며, SCF 농도를 100ug/ml까지 처리했음에도 불구하고, 항체의 c-kit에 대한 결합을 완전히 억제하지는 못하였다.

[147] 실시예 6. in vivo 효능 검증

[148] Mouse oxygen-induced retinopathy (OIR) 모델은 proliferative diabetic retinopathy와 retinopathy of prematurity 질환의 동물모델로 널리 이용되고 있다. C57BL/6 마우스를 생후 7일부터 5일간 75%의 고산소 환경에 노출후 다시 정상 산소농도로 노출하면 비정상적 혈관이 형성되게 되는데, 본 발명에 따른 c-kit 항체 (2ug/eye)가 EYLEA[®] (aflibercept) (2ug/eye)보다 우수한 수준으로 비정상적 혈관 형성을 억제하는 것으로 나타났다 (도 7).

[149] 또한 황반변성 모델인 brown Norway rat에 laser로 CNV(choroidal neovascularization)를 유발한 후, EYLEA[®]와 본 발명에 따른 c-kit 항체를 intravitreal injection을 한 결과 4C9 항체의 투여 농도가 EYLEA[®]에 비해 적용 용량임에도 불구하고, 황반변성에 의한 비정상적 혈관형성을 EYLEA[®]와 동등한 수준으로 감소시켰다 (도 8).

[150] 실시예 7. 항체에 의한 SCF/c-kit signaling 억제능 검증

[151] SCF/c-kit signaling은 기본적으로 Akt의 ERK 인산화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 백혈병 세포주인 TF-1에 SCF를 처리했을 때, 수용체인 c-kit의 인산화 및 Akt/ERK의 인산화가 증가하였고, 본 발명에 따른 항체에 의하여 c-kit의 인산화 및 Akt와 ERK 인산화가 억제되는 것을 확인하였다. 특히 상기 항체가 농도의존적으로 c-kit의 단백질을 감소시키는 결과를 보였다 (문장이 겹침). (도 9).

[152] beta-catenin의 경우 Akt downstream signal로서 세포의 증식에 중요한 인자로 알려져 있다. 본 발명에 따른 항체가 농도의존적으로 beta-catenin의 발현을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (도 9).

[153] 실시예 8. 항체에 의한 HUVEC 과 TF-1 세포 증식 억제효과

[154] TF-1과 HUVEC에 항체를 농도별로 30분간 전처리하고, 50ng/ml의 SCF를 처리한 후, 72시간 뒤에 각각의 세포증식을 cell counting을 통해 세포 증식률을

비교하였다.

- [155] 그 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10에 따르면, SCF는 음성 대조군 대비 TF-1에서 약 26%, HUVEC에서 약 30%의 세포수가 증가하는 것을 관찰하였다. 반면 상기 항체를 농도별로 처리한 결과, SCF에 의한 세포의 증식을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[156]

산업상 이용가능성

- [157] 본 발명에 따른 c-kit에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 c-kit 특히 도메인 I 및/또는 도메인 II에 높은 친화력으로 결합하면서도, 우수한 수준으로 비정상적 혈관 형성을 억제할 수 있다. 이를 통해, 본 발명에 따른 c-kit에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편은 목적하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[158]

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

[160]

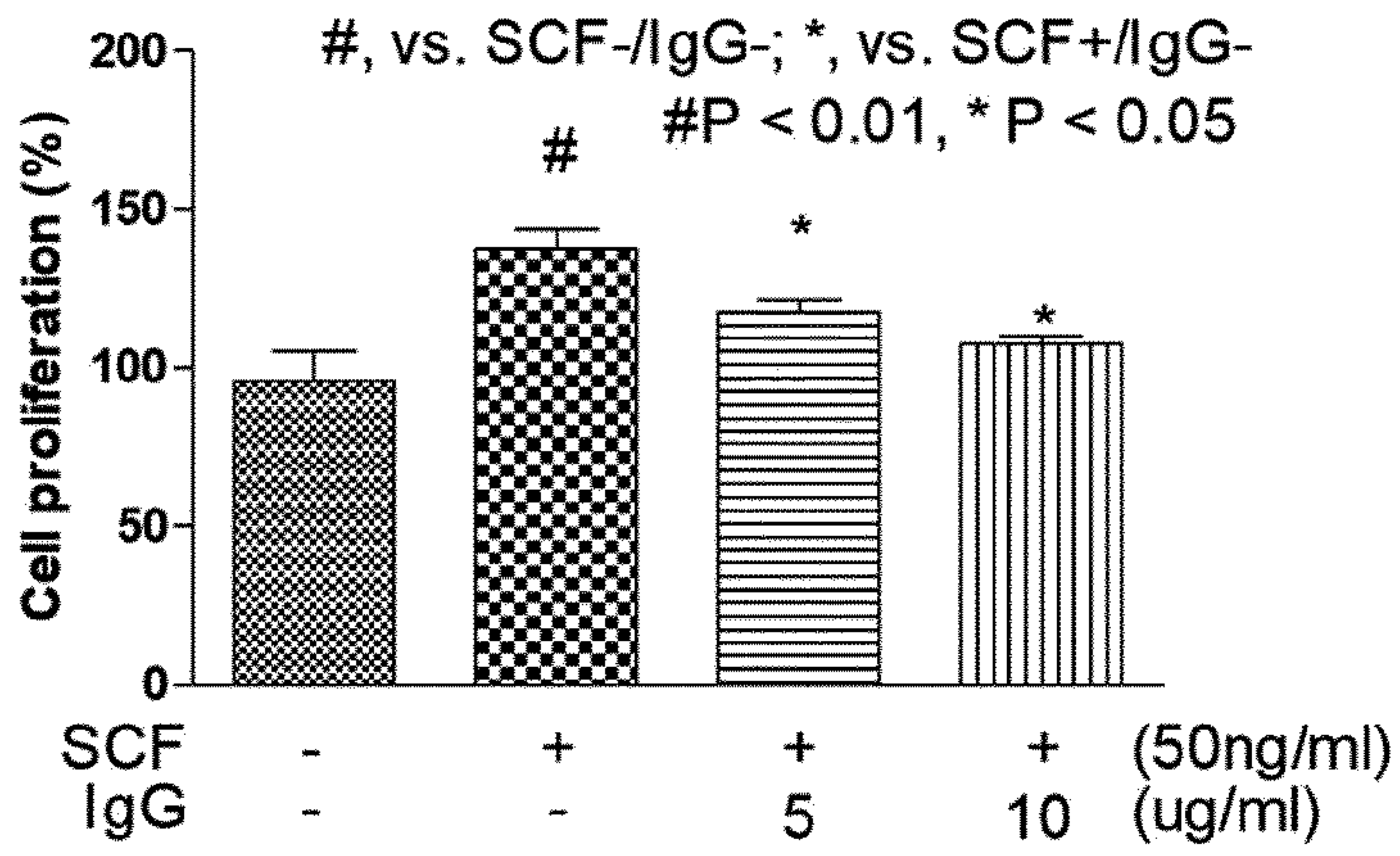
서열목록 Free Text

- [161] 전자파일 첨부하였음.

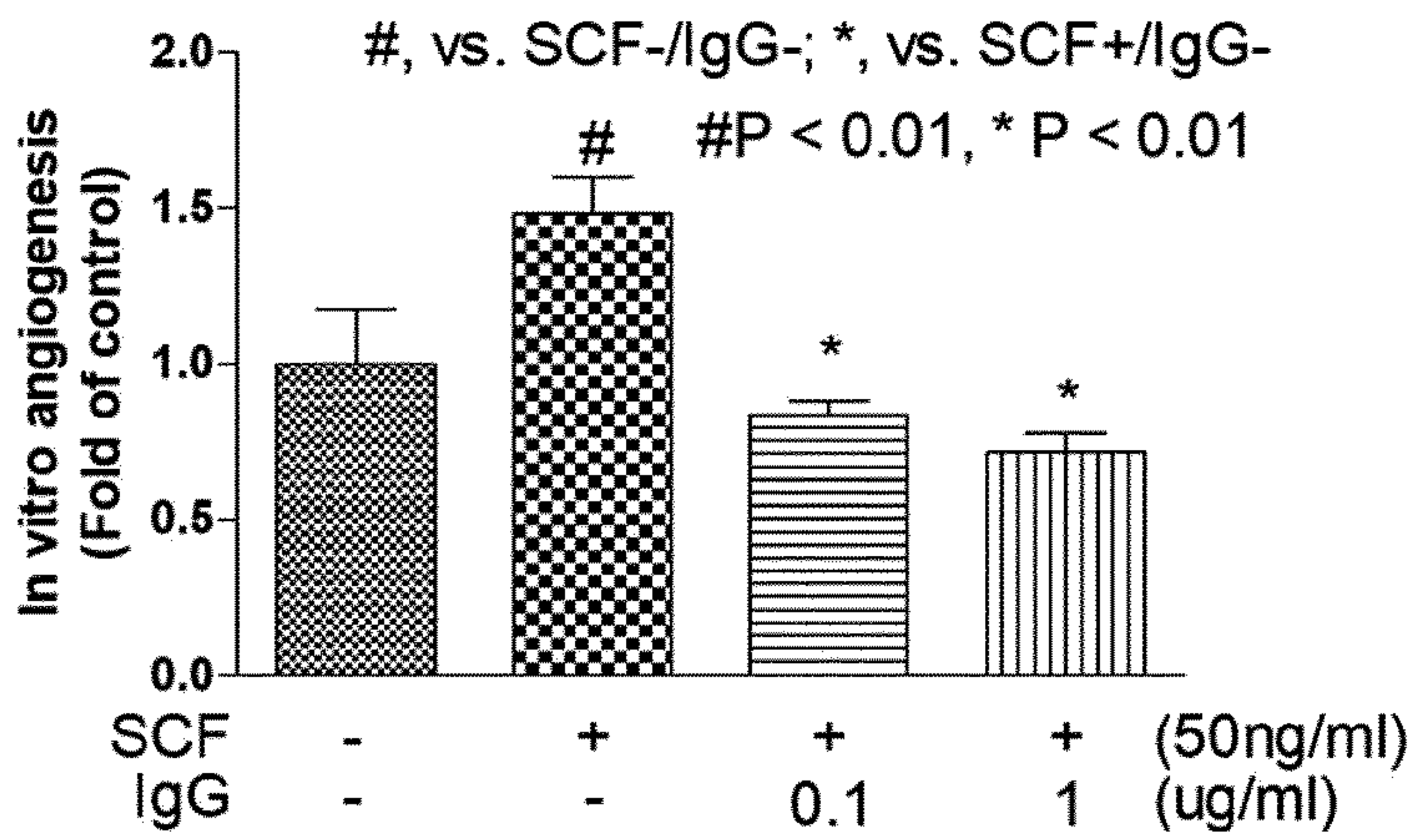
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 2의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 서열번호 3의 서열을 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 서열번호 4의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 5의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 6의 서열을 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는, c-kit에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 11의 c-kit 중 도메인 I의 R49부터 도메인 II의 C186의 부위에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 7의 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 8의 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합단편.
- [청구항 5] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 코딩하는 핵산.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 서열번호 9 또는 서열번호 10의 서열을 포함하는 핵산.
- [청구항 7] 제5항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 8] 제7항의 발현 벡터로 형질전환된 세포.
- [청구항 9] 다음 단계를 포함하는 c-kit에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조방법:
 (a) 제8항의 세포를 배양하는 단계; 및
 (b) 상기 배양된 세포에서 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계.
- [청구항 10] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 혈관신생 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합단편을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

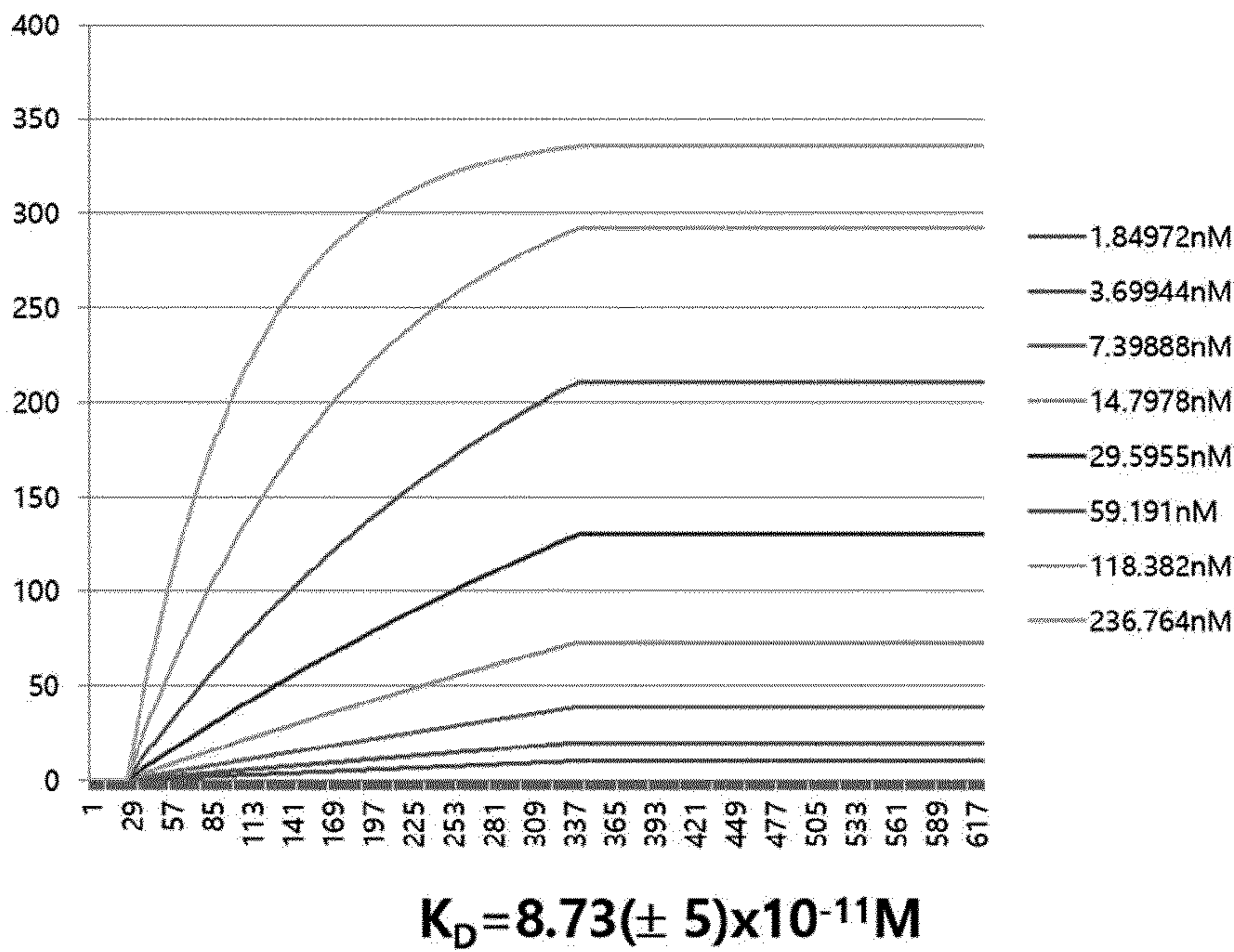
[도1]



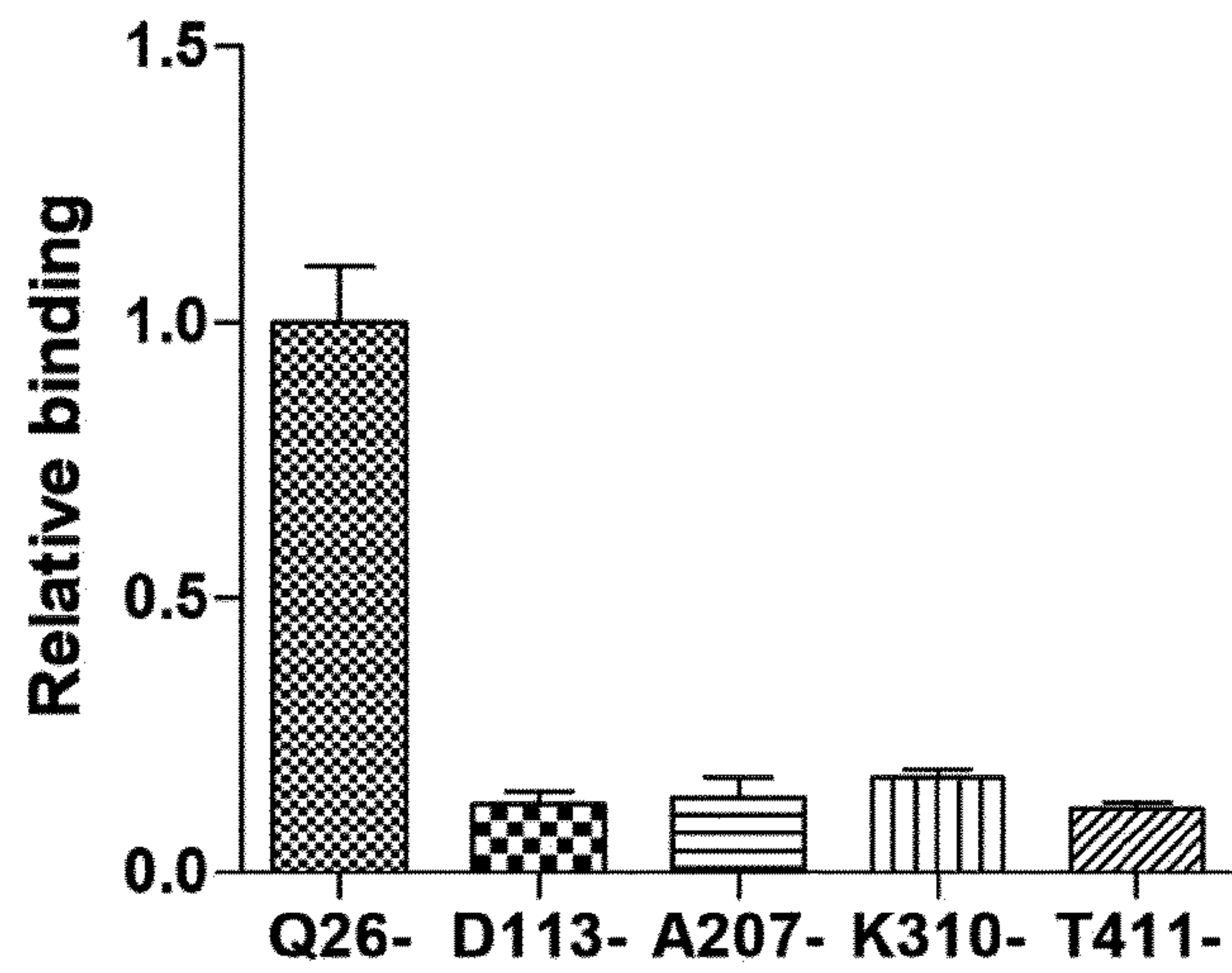
[도2]



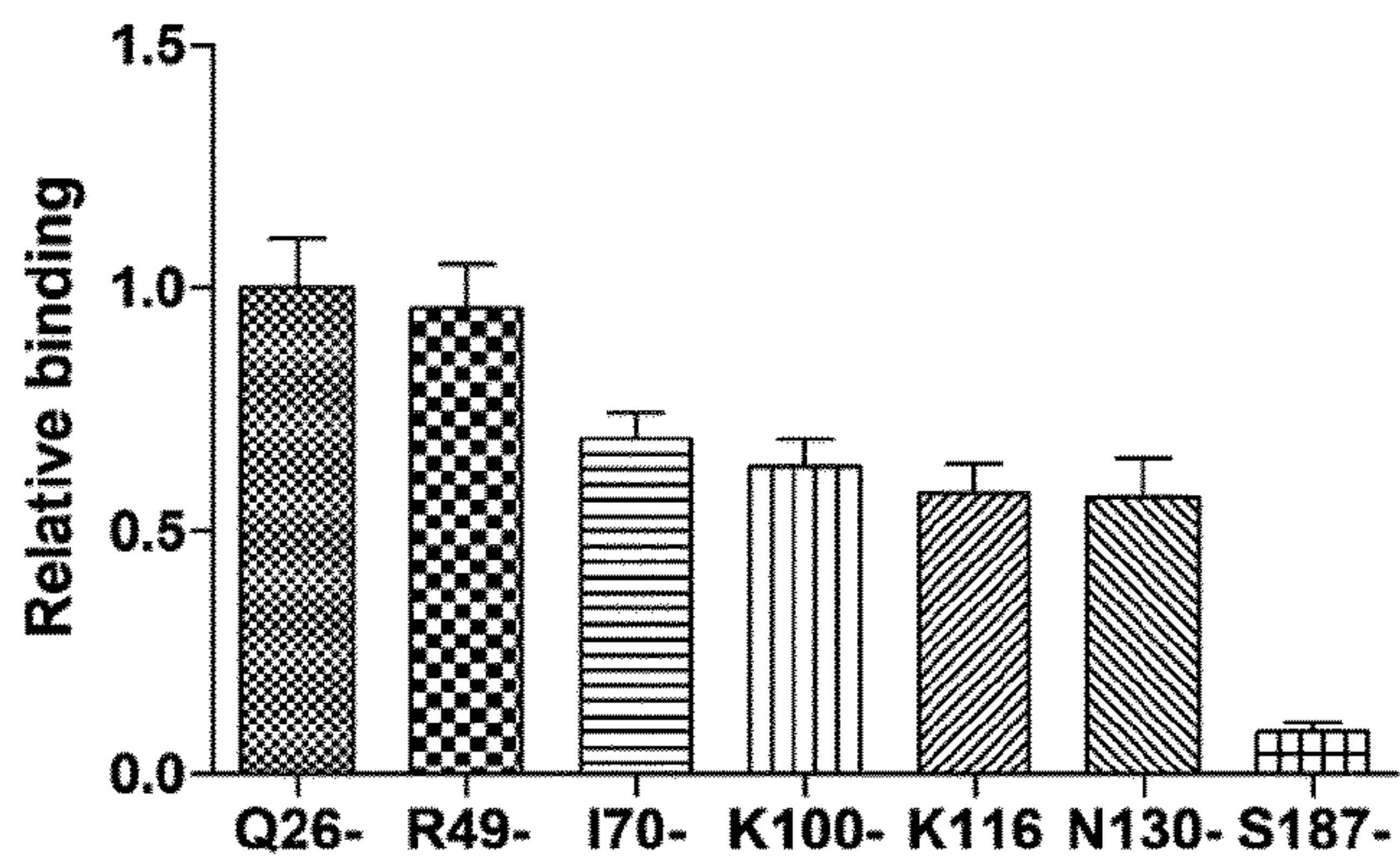
[도3]



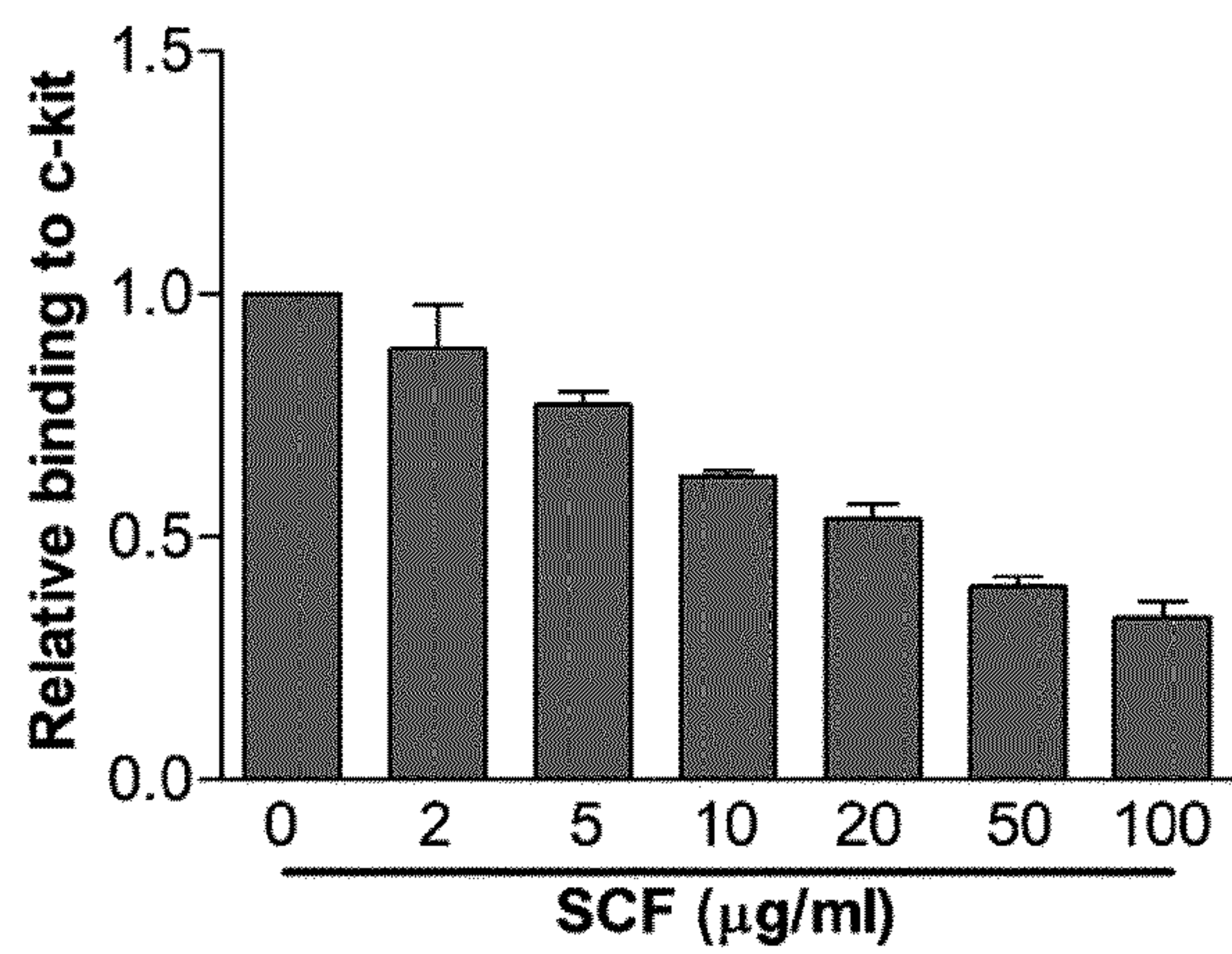
[도4]



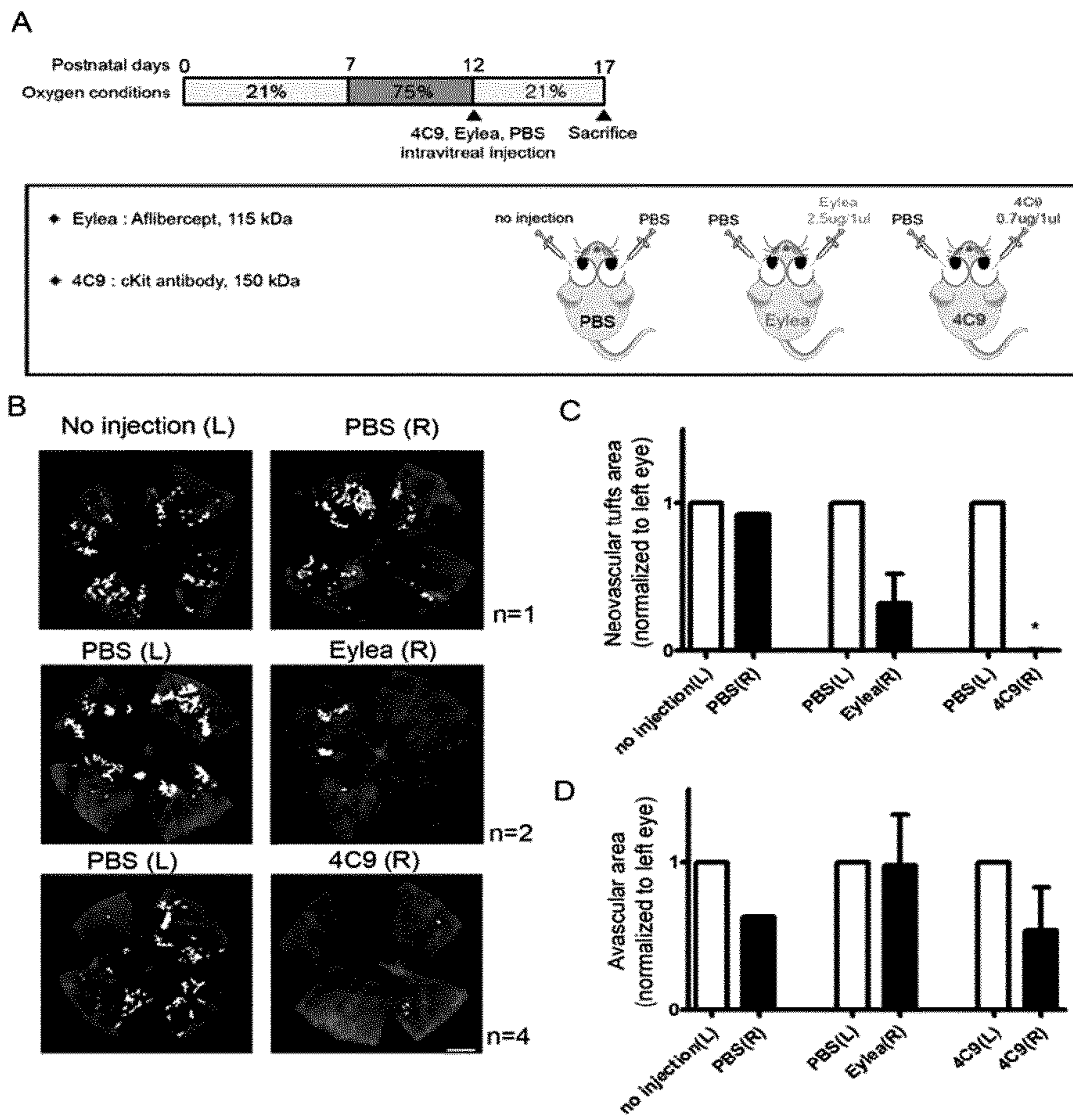
[도5]



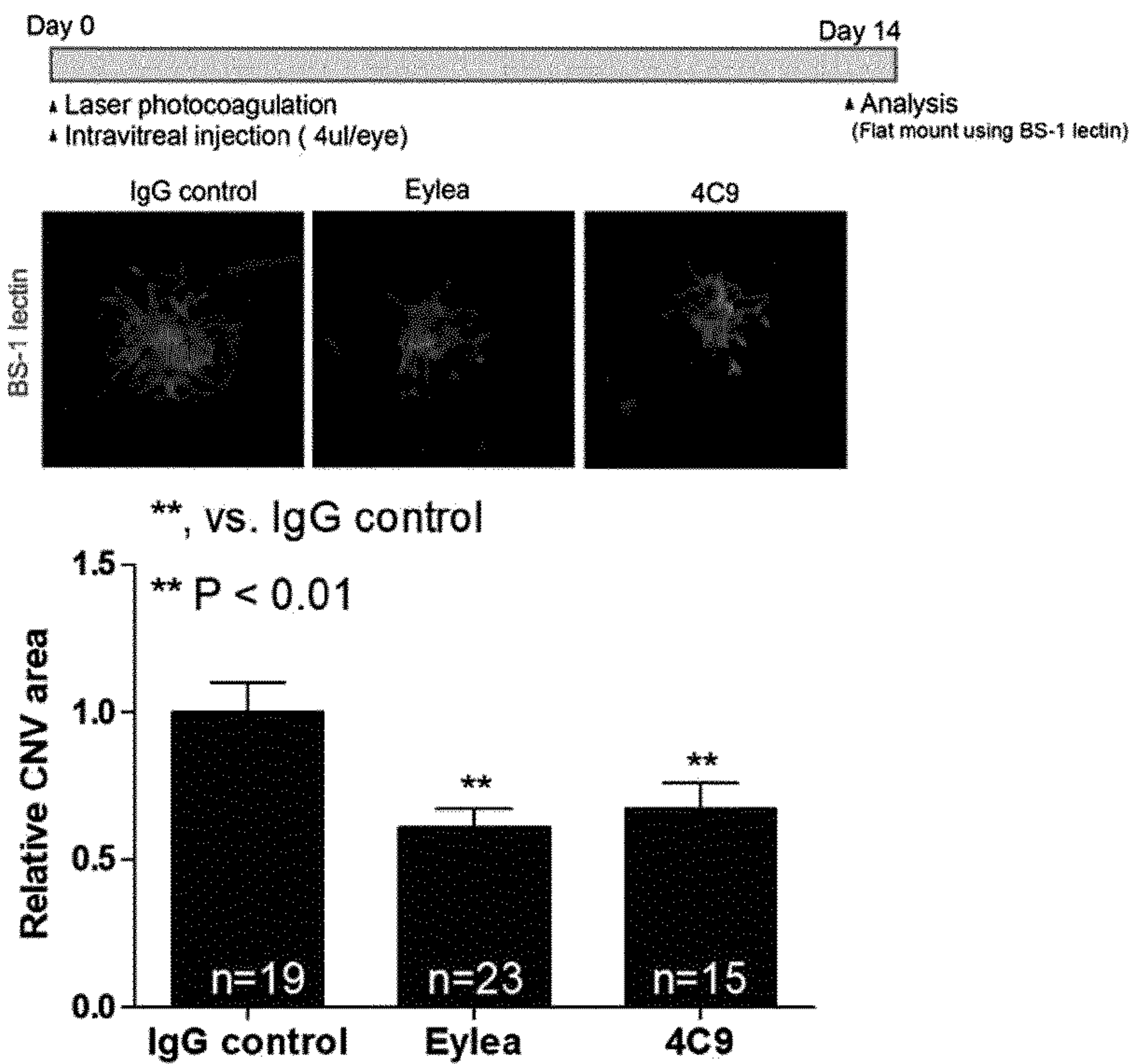
[도6]



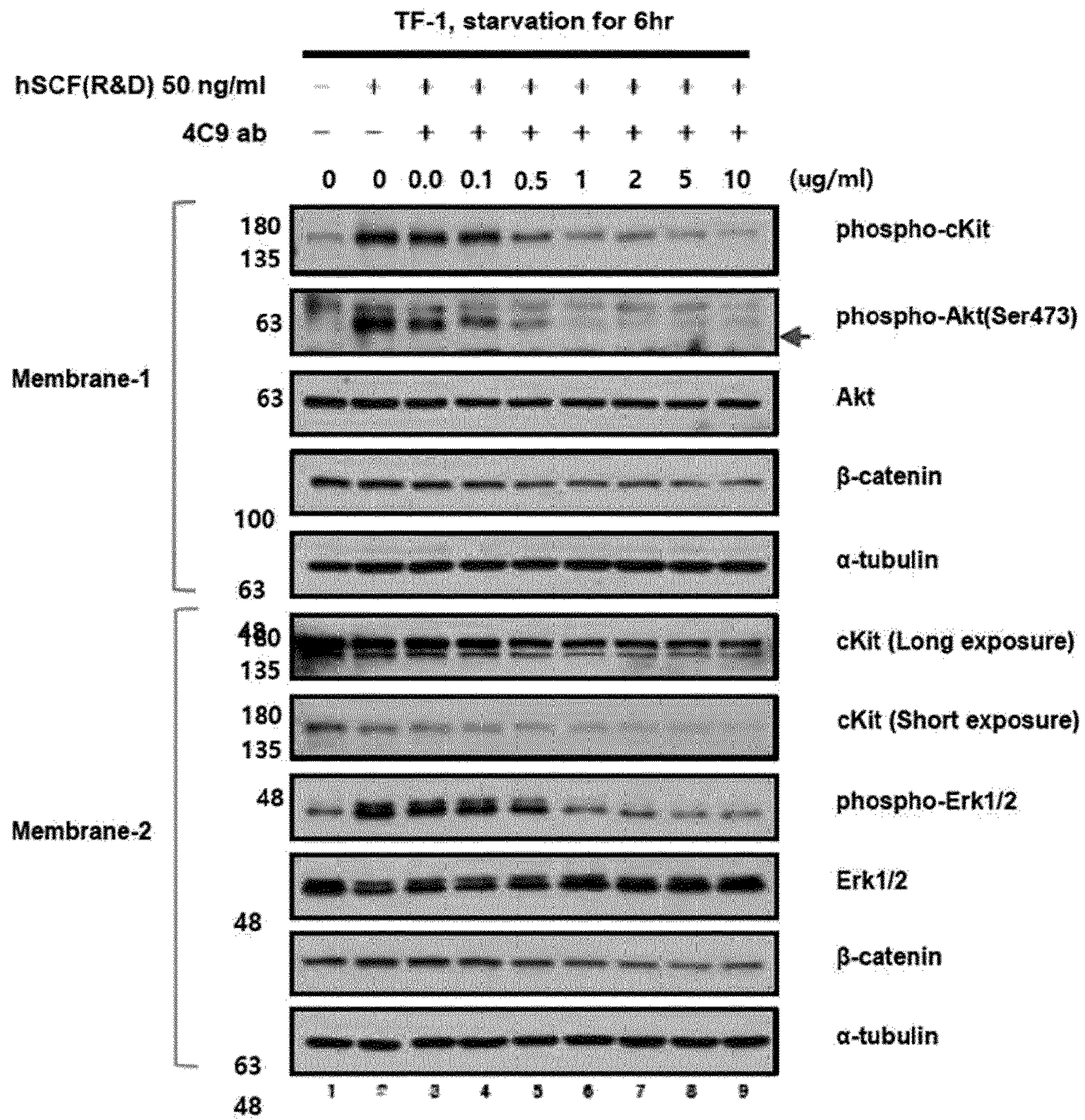
[도7]



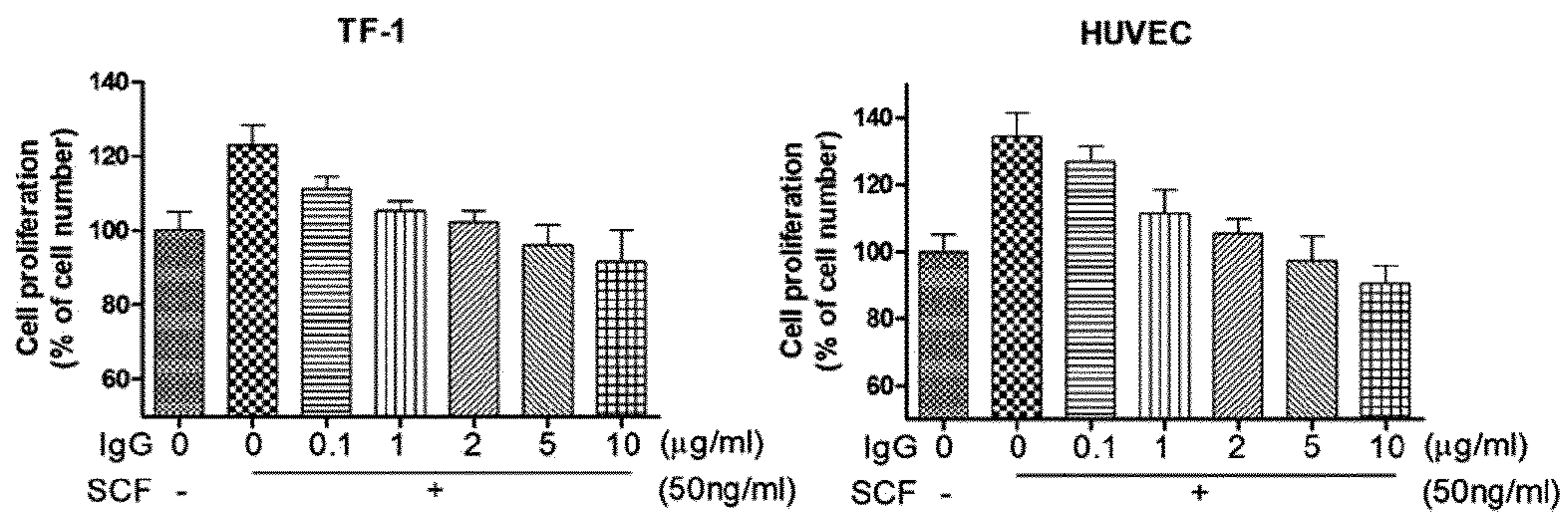
[도8]



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016704

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(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(2006.01); A61K 38/19(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 16/32(2006.01) | | |
| 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, 항체(antibody), 혈관신생(angiogenesis), 암(cancer), 도메인 1(domain I), 도메인 2(domain II), 숙주세포(host cell), 벡터(vector), 형질전환(transformation) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | KR 10-1110547 B1 (AMGEN INC.) 09 February 2012 (2012-02-09) See abstract; and claims 1-22. | 1-11 |
| A | WO 2012-154480 A1 (IMCLONE, LLC et al.) 15 November 2012 (2012-11-15) See abstract; and claims 1-13. | 1-11 |
| A | WO 2019-155067 A1 (ULTRAHUMAN FIVE LIMITED) 15 August 2019 (2019-08-15) See abstract; and claims 1-39. | 1-11 |
| A | WO 2019-084067 A1 (MAGENTA THERAPEUTICS, INC.) 02 May 2019 (2019-05-02) See abstract; and claims 1-44. | 1-11 |
| A | LEBRON, Maria B. et al. A human monoclonal antibody targeting the stem cell factor receptor (c-Kit) blocks tumor cell signaling and inhibits tumor growth. Cancer Biology & Therapy. September 2014, vol. 15, no. 9, pp. 1208-1218. See pages 1208-1218. | 1-11 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 02 March 2021 | | Date of mailing of the international search report 02 March 2021 |
| Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578 | | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016704

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | GARTON, Andrew J. et al. Anti-kit monoclonal antibody treatment enhances the antitumor activity of immune checkpoint inhibitors by reversing tumor-induced immunosuppression. <i>Molecular Cancer Therapeutics</i> . 30 January 2017 (online publication date). vol. 16, no. 4, pp. 671-680. See pages 671-680. | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016704

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/016704

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|-------------|----|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| KR | 10-1110547 | B1 | 09 February 2012 | AR 060583 A1 | 25 June 2008 |
| | | | | AU 2007-243318 A1 | 08 November 2007 |
| | | | | AU 2007-243318 B2 | 28 July 2011 |
| | | | | BR PI0712920 A2 | 02 October 2012 |
| | | | | CA 2648882 A1 | 08 November 2007 |
| | | | | CA 2648882 C | 20 October 2015 |
| | | | | CN 101472949 A | 01 July 2009 |
| | | | | CR 10444 A | 10 February 2009 |
| | | | | EA 015923 B1 | 30 December 2011 |
| | | | | EA 200802168 A1 | 30 June 2009 |
| | | | | EP 2010571 A2 | 07 January 2009 |
| | | | | EP 2010571 B1 | 17 October 2018 |
| | | | | EP 3453724 A1 | 13 March 2019 |
| | | | | ES 2705480 T3 | 25 March 2019 |
| | | | | IL 194776 A | 31 October 2012 |
| | | | | IL 194776 B | 31 October 2012 |
| | | | | IL 194776 D0 | 03 August 2009 |
| | | | | JP 2009-534052 A | 24 September 2009 |
| | | | | JP 2012-126746 A | 05 July 2012 |
| | | | | JP 2015-071649 A | 16 April 2015 |
| | | | | JP 5094842 B2 | 12 December 2012 |
| | | | | JP 5906120 B2 | 20 April 2016 |
| | | | | KR 10-2009-0029190 A | 20 March 2009 |
| | | | | MX 2008013640 A | 04 November 2008 |
| | | | | MY 153710 A | 13 March 2015 |
| | | | | NO 20084878 A | 19 November 2008 |
| | | | | NO 20084878 L | 19 November 2008 |
| | | | | NZ 572397 A | 28 October 2011 |
| | | | | NZ 594968 A | 28 March 2013 |
| | | | | PE 06942008 A1 | 01 August 2008 |
| | | | | PE 20080694 A1 | 01 August 2008 |
| | | | | TW 200808826 A | 16 February 2008 |
| | | | | TW I395754 B | 11 May 2013 |
| | | | | UA 95478 C2 | 10 August 2011 |
| | | | | US 2007-0253951 A1 | 01 November 2007 |
| | | | | US 2011-0223165 A1 | 15 September 2011 |
| | | | | US 2013-0288303 A1 | 31 October 2013 |
| | | | | US 7915391 B2 | 29 March 2011 |
| | | | | US 8436150 B2 | 07 May 2013 |
| | | | | US 8791249 B2 | 29 July 2014 |
| | | | | WO 2007-127317 A2 | 08 November 2007 |
| | | | | WO 2007-127317 A3 | 07 February 2008 |
| | | | | ZA 200809065 A | 30 September 2009 |
| | | | | ZA 200809065 B | 30 September 2009 |
| WO | 2012-154480 | A1 | 15 November 2012 | AR 086044 A1 | 13 November 2013 |
| | | | | AU 2012-253943 A1 | 24 October 2013 |
| | | | | AU 2012-253943 A1 | 15 November 2012 |
| | | | | AU 2012-253943 B2 | 15 December 2016 |
| | | | | BR 112013028908 A2 | 31 January 2017 |
| | | | | CA 2835200 A1 | 15 November 2012 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/016704

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|--|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| | | CA 2835200 C | 11 April 2017 |
| | | CN 103533960 A | 22 January 2014 |
| | | CN 103533960 B | 12 August 2015 |
| | | EA 023665 B1 | 30 June 2016 |
| | | EA 201391507 A1 | 31 March 2014 |
| | | EP 2707028 A1 | 19 March 2014 |
| | | EP 2707028 B1 | 22 March 2017 |
| | | JP 2014-515030 A | 26 June 2014 |
| | | JP 5899310 B2 | 06 April 2016 |
| | | KR 10-1601387 B1 | 08 March 2016 |
| | | KR 10-2014-0027239 A | 06 March 2014 |
| | | MX 2013013226 A | 12 December 2013 |
| | | MX 337577 B | 10 March 2016 |
| | | TW 201247707 A | 01 December 2012 |
| | | TW I532748 B | 11 May 2016 |
| | | US 2012-0288506 A1 | 15 November 2012 |
| | | US 8552157 B2 | 08 October 2013 |
| WO 2019-155067 A1 | 15 August 2019 | AU 2019-219312 A1 | 25 June 2020 |
| | | AU 2019-219312 A1 | 15 August 2019 |
| | | CA 3085246 A1 | 15 August 2019 |
| | | CN 111683970 A | 18 September 2020 |
| | | EP 3749694 A1 | 16 December 2020 |
| | | GB 201802201 D0 | 28 March 2018 |
| | | GB 201806468 D0 | 06 June 2018 |
| | | IL 275657 D0 | 31 August 2020 |
| | | SG 11202005357 A | 29 July 2020 |
| | | US 10611838 B2 | 07 April 2020 |
| | | US 2020-0010548 A1 | 09 January 2020 |
| | | US 2020-0283521 A1 | 10 September 2020 |
| WO 2019-084067 A1 | 02 May 2019 | AU 2018-354189 A1 | 23 April 2020 |
| | | AU 2018-354189 A1 | 02 May 2019 |
| | | CA 3079215 A1 | 02 May 2019 |
| | | CN 111601616 A | 28 August 2020 |
| | | EP 3700540 A2 | 02 September 2020 |
| | | JP 2021-500391 A | 07 January 2021 |
| | | TW 201922782 A | 16 June 2019 |
| | | US 2019-144558 A1 | 16 May 2019 |
| | | WO 2019-084057 A2 | 02 May 2019 |
| | | WO 2019-084057 A3 | 06 June 2019 |

| | | |
|--|---|--------|
| A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i | | |
| B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28(2006.01); A61K 38/19(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C07K 16/32(2006.01) | | |
| 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, 항체(antibody), 혈관신생(angiogenesis), 암(cancer), 도메인 1(domain I), 도메인 2(domain II), 숙주세포(host cell), 벡터(vector), 형질전환(transformation) | | |
| C. 관련 문헌 | | |
| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
| A | KR 10-1110547 B1 (암젠 인코퍼레이티드) 2012.02.09 요약; 및 청구항 1-22 | 1-11 |
| A | WO 2012-154480 A1 (IMCLONE, LLC 등) 2012.11.15 요약; 및 청구항 1-13 | 1-11 |
| A | WO 2019-155067 A1 (ULTRAHUMAN FIVE LIMITED) 2019.08.15 요약; 및 청구항 1-39 | 1-11 |
| A | WO 2019-084067 A1 (MAGENTA THERAPEUTICS, INC.) 2019.05.02 요약; 및 청구항 1-44 | 1-11 |
| A | LEBRON, MARIA B. 등, `A human monoclonal antibody targeting the stem cell factor receptor (c-Kit) blocks tumor cell signaling and inhibits tumor growth, Cancer Biology & Therapy, 2014년 9월, 15권, 9호, 페이지 1208-1218 페이지 1208-1218 | 1-11 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 | |
| 2021년03월02일(02.03.2021) | 2021년03월02일(02.03.2021) | |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소 | 심사관 | |
| 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578 | 정다원 | |
| | 전화번호 +82-42-481-5373 | |

| C. 관련 문헌 | | |
|----------|--|--------|
| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
| A | GARTON, ANDREW J. 등, 'Anti-kit monoclonal antibody treatment enhances the antitumor activity of immune checkpoint inhibitors by reversing tumor-induced immunosuppression', Molecular Cancer Therapeutics, 2017년 1월 30일 (온라인 게재일), 16권, 4호, 페이지 671-680 페이지 671-680 | 1-11 |

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

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

- a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
- b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

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

3. 추가 의견:

| 국제조사보고서에서 인용된 특허문헌 | 공개일 | 대응특허문헌 | 공개일 |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|
| KR 10-1110547 B1 | 2012/02/09 | AR 060583 A1 | 2008/06/25 |
| | | AU 2007-243318 A1 | 2007/11/08 |
| | | AU 2007-243318 B2 | 2011/07/28 |
| | | BR PI0712920 A2 | 2012/10/02 |
| | | CA 2648882 A1 | 2007/11/08 |
| | | CA 2648882 C | 2015/10/20 |
| | | CN 101472949 A | 2009/07/01 |
| | | CR 10444 A | 2009/02/10 |
| | | EA 015923 B1 | 2011/12/30 |
| | | EA 200802168 A1 | 2009/06/30 |
| | | EP 2010571 A2 | 2009/01/07 |
| | | EP 2010571 B1 | 2018/10/17 |
| | | EP 3453724 A1 | 2019/03/13 |
| | | ES 2705480 T3 | 2019/03/25 |
| | | IL 194776 A | 2012/10/31 |
| | | IL 194776 B | 2012/10/31 |
| | | IL 194776 D0 | 2009/08/03 |
| | | JP 2009-534052 A | 2009/09/24 |
| | | JP 2012-126746 A | 2012/07/05 |
| | | JP 2015-071649 A | 2015/04/16 |
| | | JP 5094842 B2 | 2012/12/12 |
| | | JP 5906120 B2 | 2016/04/20 |
| | | KR 10-2009-0029190 A | 2009/03/20 |
| | | MX 2008013640 A | 2008/11/04 |
| | | MY 153710 A | 2015/03/13 |
| | | NO 20084878 A | 2008/11/19 |
| | | NO 20084878 L | 2008/11/19 |
| | | NZ 572397 A | 2011/10/28 |
| | | NZ 594968 A | 2013/03/28 |
| | | PE 06942008 A1 | 2008/08/01 |
| | | PE 20080694 A1 | 2008/08/01 |
| | | TW 200808826 A | 2008/02/16 |
| | | TW I395754 B | 2013/05/11 |
| | | UA 95478 C2 | 2011/08/10 |
| | | US 2007-0253951 A1 | 2007/11/01 |
| | | US 2011-0223165 A1 | 2011/09/15 |
| | | US 2013-0288303 A1 | 2013/10/31 |
| | | US 7915391 B2 | 2011/03/29 |
| | | US 8436150 B2 | 2013/05/07 |
| | | US 8791249 B2 | 2014/07/29 |
| | | WO 2007-127317 A2 | 2007/11/08 |
| | | WO 2007-127317 A3 | 2008/02/07 |
| | | ZA 200809065 A | 2009/09/30 |
| ZA 200809065 B | 2009/09/30 | | |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO 2012-154480 A1 | 2012/11/15 | AR 086044 A1 | 2013/11/13 |
| | | AU 2012-253943 A1 | 2013/10/24 |
| | | AU 2012-253943 A1 | 2012/11/15 |
| | | AU 2012-253943 B2 | 2016/12/15 |
| | | BR 112013028908 A2 | 2017/01/31 |
| | | CA 2835200 A1 | 2012/11/15 |

| 국제조사보고서에서 인용된 특허문헌 | 공개일 | 대응특허문헌 | 공개일 |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|
| | | 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 |
| | | 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 |
| | | KR 10-1601387 B1 | 2016/03/08 |
| | | KR 10-2014-0027239 A | 2014/03/06 |
| | | 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 2019-155067 A1 | 2019/08/15 | AU 2019-219312 A1 | 2020/06/25 |
| | | AU 2019-219312 A1 | 2019/08/15 |
| | | CA 3085246 A1 | 2019/08/15 |
| | | CN 111683970 A | 2020/09/18 |
| | | EP 3749694 A1 | 2020/12/16 |
| | | GB 201802201 D0 | 2018/03/28 |
| | | GB 201806468 D0 | 2018/06/06 |
| | | IL 275657 D0 | 2020/08/31 |
| | | SG 11202005357 A | 2020/07/29 |
| | | US 10611838 B2 | 2020/04/07 |
| | | US 2020-0010548 A1 | 2020/01/09 |
| | | US 2020-0283521 A1 | 2020/09/10 |
| ----- | | ----- | |
| WO 2019-084067 A1 | 2019/05/02 | AU 2018-354189 A1 | 2020/04/23 |
| | | AU 2018-354189 A1 | 2019/05/02 |
| | | CA 3079215 A1 | 2019/05/02 |
| | | CN 111601616 A | 2020/08/28 |
| | | EP 3700540 A2 | 2020/09/02 |
| | | JP 2021-500391 A | 2021/01/07 |
| | | TW 201922782 A | 2019/06/16 |
| | | US 2019-144558 A1 | 2019/05/16 |
| | | WO 2019-084057 A2 | 2019/05/02 |
| | | WO 2019-084057 A3 | 2019/06/06 |
| ----- | | ----- | |