

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 11월 26일 (26.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/178689 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/46 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/005079
- (22) 국제출원일: 2015년 5월 21일 (21.05.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0062391 2014년 5월 23일 (23.05.2014) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-338 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김학성 (KIM, Hak-Sung); 305-773 대전시 유성구 지족로 362, 310-304, Daejeon (KR). 이종재 (LEE, Joong-Jae); 305-338 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3220 호, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 135-748 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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).

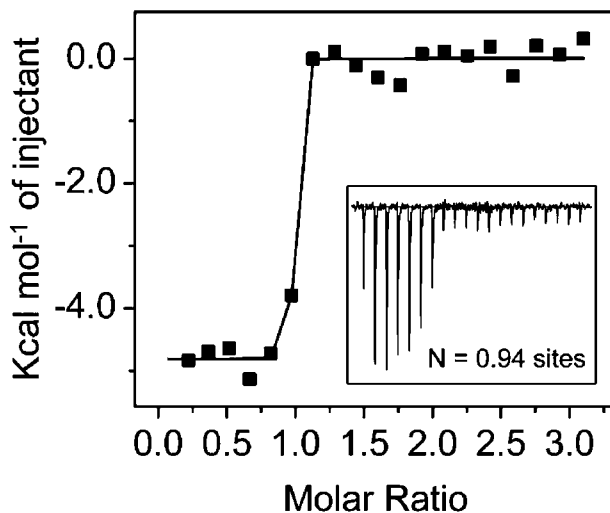
공개:

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

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE BINDING TO EXTRACELLULAR DOMAIN OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

(54) 발명의 명칭: 상피세포 성장인자 수용체의 세포외 도메인과 결합하는 신규 폴리펩타이드

Binding affinity ($K_D = 301.2$ pM)



(57) Abstract: The present invention relates to a polypeptide specifically bindable to an extracellular domain of the epidermal growth factor receptor, a polynucleotide encoding the polypeptide, an expression vector comprising the polynucleotide, a recombinant microorganism having the expression vector introduced thereto, and a method for producing the polypeptide using the recombinant microorganism. The polypeptide according to the present invention can bind to the epidermal growth factor receptor at high affinity, which is second only to that of monoclonal antibody previously widely used for the treatment, to inhibit activity of the epidermal growth factor receptor, and is useful in developing preparations for preventing or treating various diseases associated with the overexpression of the epidermal growth factor receptor.

(57) 요약서: 본 발명은 상피세포 성장인자의 세포외 도메인과 특이적으로 결합 가능한 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 도입된 재조합 미생물 및 재조합 미생물을 사용하여 상기 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 기존에 치료용으로 널리 사용되고 있는 단일클론항체에 버금가는 높은 친화력으로 상피세포 성장인자 수용체에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있고, 상피세포

성장인자 수용체의 과발현과 연관된 다양한 질환의 예방 또는 치료용 제제개발에 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 상피세포 성장인자 수용체의 세포외 도메인과 결합하는 신규 폴리펩타이드

기술분야

- [1] 본 발명은 상피세포 성장인자 수용체의 세포외 도메인과 결합하는 신규 폴리펩타이드에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 상피세포 성장인자 수용체의 세포외 도메인과 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물을 이용한 상기 폴리펩타이드의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 항체 치료제는 화학제제와 비교해서 다양한 질병 치료에 높은 효능과 더불어 낮은 부작용을 보여줌으로써 글로벌 제약기업과 생명공학 기업들의 연구목표가 되고 있고 현재 다수의 항체 치료제가 임상에 사용되고 있으며 많은 치료제 후보가 임상실험 중에 있다.
- [4] 그러나 항체 치료제는 이런 장점에도 불구하고 큰 분자량으로 인한 낮은 조직 침투력, 복잡한 생산 공정으로 인한 높은 제품단가, 그리고 기존의 특허에 의한 진입장벽 등의 문제점으로 인해 최근 항체 치료제를 대체하기 위한 인공항체의 개발이 활발하게 진행되고 있다. 이러한 인공항체 골격 단백질은 항체 치료제와 달리 암 조직 내로 침투되는 효율이 크게 향상되어 결과적으로 치료 효과를 향상시킬 수 있다는 장점이 많은 연구를 통해 밝혀지고 있다.
- [5] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 기존의 항체를 대체할 수 있는 비항체 단백질 골격(non-antibody protein scaffold)인 리피바디(repebody)를 성공적으로 개발하였다. 리피바디는 크기가 항체의 1/5 수준이고 대장균에서 대량생산되며 동물 실험결과 면역원성이 거의 없음을 보여주었다. 열 및 pH 안정성이 매우 우수하고 타겟에 대한 결합력을 pico-mole 수준까지 매우 용이하게 증대시킬 수 있으며 타겟에 대한 특이성이 매우 탁월함을 입증한 바가 있다(KR2013-0098089A).
- [6] 상피세포 성장인자 수용체(Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR)는 대장암 및 다양한 암과 관련하여 검증된 질환유발인자로 전체 대장암환자의 90%이상이 상피 세포기원의 암종으로 알려져 있다. 이러한 암에서 EGFR의 과발현 및 돌연변이가 50~90%이상 발견되며, EGFR에 의한 신호 전달계의 이상이 대다수 암에서 공통적으로 발견되기 때문에 EGFR이 항암제 개발의 주요 표적으로 인식되고 있다. 또한, EGFR을 통한 신호 전달 체계가 현재까지는 다른 신호 전달 체계에 비해 가장 명확하게 알려져 있어서, EGFR을 표적으로 하는 치료제 개발

연구가 가장 활발하게 진행되고 있는 실정이다.

- [7] 현재 EGFR의 세포외 도메인을 표적하는 약물로는 키메릭 단일 항체 약물인 Cetuximab이 있으나, 다른 단일 항체 신약에 비해 결합력과 치료효과가 낮은 것으로 보고되었고, 지속적으로 투여할 경우 약물 저항성이 나타나며 약물 독성에 의한 부작용 및 키메릭 항체로 인한 부작용 발생이 보고되었다. 이를 극복하고자 약물혼용치료(multi-drug therapy)등 새로운 치료법의 개발 및 신약 개발(Nimotuzumab)이 시도되고 있다. 따라서, 기존 약물이 가진 한계를 극복한 새로운 개념의 EGFR 표적 치료제의 개발이 필요한 시점이다.
- [8] 본 발명자들은 상기 리피바디 골격을 이용하여 다양한 질환 관련 표적 단백질들에 대한 특이적인 결합 단백질(specific protein binder)을 성공적으로 제조하고, 세포 기반의 방법으로 생물학적 저해효과가 있음을 검증하였으나, 이에 대한 응용연구는 아직 시작 단계에 불과하여, 추가적인 연구를 필요로 하고 있다. 또한, 아직까지는 암세포에서 과발현되는 다양한 수용체에 결합하는 선도 물질 발굴과 이에 대한 응용이 보고되지 않고 있는 실정이다.
- [9] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 상기 리피바디 골격을 이용하여 다양한 암에서 과발현되는 EGFR의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 단백질을 동정하기 위해 리피바디의 구조적 특징인 모듈성과 전체구조분석을 통해 구축한 무작위 돌연변이 라이브러리를 바탕으로 상피세포 성장인자 수용체에 특이적 결합력을 갖는 신규 단백질을 선별하고, 반복 모듈 기반의 친화력 증대방식을 통해 결합력을 향상시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [10]
- [11] 발명의 요약
- [12] 본 발명의 목적은 상피세포 성장인자 수용체와 특이적으로 강하게 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 폴리펩타이드를 제공하는데 있다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는데 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용한 폴리펩타이드의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [15]
- [16] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 실시양태로서, 본 발명은 서열번호 6 내지 8 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고, 상피세포 성장인자 수용체와 효과적으로 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 폴리펩타이드를 제공한다.
- [17] 본 발명은 또한, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합벡터를 제공한다.
- [18] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 재조합벡터가 포함되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 상기 폴리펩타이드를

생성시키는 단계 및 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 선행특허(KR2013-0098089A)에서 구축된 파지 라이브러리를 이용하여, EGFR의 세포외 도메인에 대한 파지 디스플레이의 바이오 패닝을 수행한 결과이다. BSA 대비 EGFR의 세포외 도메인에 대한 효소면역측정법(ELISA)에 의한 결합 신호를 평균화(normalization) 하였으며, 이때 3배 이상의 신호가 증가한 클론에 대해 특이적 결합력을 갖는 리피바디 클론으로 정의하였다.
- [22] 도 2는 도 1에서 얻어진 특이적인 결합능을 가진 클론을 변화된 아미노산을 기준으로 그룹화 하였다. 각 아미노산의 위치는 리피바디의 오목한 부분에 위치하며, 3번째와 4번째 모듈에 대해 라이브러리를 구축하여 선별한 결과이다.
- [23] 도 3은 EGFR의 세포외 도메인에 대한 특이적 결합여부를 확인한 ELISA 결과이다. 3개의 그룹에 대해 실시한 결과이며, BSA에는 결합하지 않고 EGFR의 세포외 도메인에 대해서만 특이적인 결합함을 확인할 수 있다. 이때, 경쟁자로 넣어준 Cetuximab으로 인해 EGFR의 세포외 도메인의 ELISA 신호가 감소한 클론을 EGFR의 세포외 도메인 중 3번째 도메인에 결합되어 있다고 추정할 수 있다.
- [24] 도 4는 리피바디의 대략적인 결합력(apparent binding affinity)을 확인하고자 수용성의 EGFR의 세포외 도메인을 처리하여 농도에 비례하게 결합 감소 여부를 확인하였다. 이때, ELISA 신호가 50%가 감소하는 EGFR의 세포외 도메인의 농도를 해리상수로 정의하였다.
- [25] 도 5는 2번째 결합력을 증가하고자 선택한 모듈로 이 경우 5번째 모듈을 결합력 증대 라이브러리 구축에 사용하였다. 이때, 녹색 모듈은 기존의 라이브러리가 구축된 위치를 적색 모듈은 새롭게 구축되는 라이브러리의 해당 위치를 나타낸다.
- [26] 도 6은 ELISA를 rA11이 표면에 발현된 파지의 결합력 저해능을 각 리피바디 클론을 경쟁자로 넣어주면서 EGFR에 대한 결합신호의 저해를 통해 상대적인 결합력을 확인한 결과이다. 보다 낮은 농도에서 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합을 저해할수록 더 강한 결합력으로 EGFR의 세포외 도메인에 결합하는 클론으로 정의하였다.
- [27] 도 7은 3번째 결합력을 증가하고자 선택한 모듈로 이 경우 6번째 모듈을 결합력 증대 라이브러리 구축에 이용하였다.
- [28] 도 8은 4번째 결합력을 증가하고자 선택한 모듈로 이 경우 2번째 모듈을 결합력 증대 라이브러리 구축에 이용하였다.
- [29] 도 9는 도 6과 동일하게 최종 리피바디 클론인 rEgH9의 상대적 결합력을

확인하는 ELISA 실험 결과이다.

- [30] 도 10은 본 발명에서 확보한 가장 강한 결합력을 보이는 rEgH9에 대한 등온열량측정기(Isothermal Titration Calorimetry; ITC)를 이용하여 해리상수를 측정한 결과로, EGFR의 세포외 도메인에 대해 200 pM의 높은 결합력을 가지고 있음을 확인하였다.

[31]

[32] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [33] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[34]

- [35] 본 발명자들은 EGFR의 세포 외 도메인과 특이적으로 결합할 수 있는 신규 폴리펩타이드를 개발하기 위하여, 인터날린 B (Internalin B) 단백질의 -말단, 가변 림프구 수용체(Variable Lymphocyte Receptor, VLR)의 LRR(Leucine-rich repeat) 단백질 부분이 융합된, 폴리펩타이드의 반복 모듈을 무작위적으로 포함하는 라이브러리를 구축하였다. 상기 라이브러리에 포함된 폴리펩타이드는 본 발명자의 선행특허(KR2013-0098089A)에 기술된 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 코딩되거나 또는 해당 폴리뉴클레오티드 서열과 75%, 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 코딩될 수 있다.

- [36] 또한, 상기 라이브러리는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 파지미드의 형태가 될 수 있다. 본 발명의 용어 "파지미드"란, 대장균을 숙주로 하는 바이러스인 파지로 부터 유래된 원형의 폴리뉴클레오티드 분자를 의미하는데, 번식과 증식에 필요한 단백질 및 표면 단백질들 서열이 포함되어 있다. 재조합 파지미드는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 파지미드는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있고, 주로 원하는 단백질을 파지의 표면 단백질과 융합하여 파지 표면에 표지하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 파지미드의 프로모터는 주로 유도성이며, 숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 파지미드는 상기 라이브러리를 구성하는 폴리뉴클레오티드의 발현 및 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열인 MalEss, DsbAss 또는 PelBss를 포함하고, 파지 표면에 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위한 히스티딘-태그와 파지 표면 발현을 위한 M13 파지의 표면 단백질의 일종인 gp3 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 선행특허(KR2013-0098089A)의 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드가 될

수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

- [37] 본 발명자들은 상기 파지미드를 포함하는 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합력이 우수한 리피바디 형태의 신규 폴리펩타이드(서열번호 1 내지 5)를 선별하였다 (도 1 내지 2). 그러나, 이들 선별된 폴리펩타이드는 자연계에 존재하는 상피세포 성장인자(EGF) 보다 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합력이 낮은 수준이어서 (도 3), 상기 선별된 폴리펩타이드에 돌연변이를 가하여 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합력이 향상된 변이 폴리펩타이드를 제작하고자 하였다. 이를 위하여, 상기 선별된 폴리펩타이드 중에서 EGFR의 세포외 도메인 중 3번째 도메인과 결합하는 것으로 확인된 서열번호 2의 폴리펩타이드를 대상으로 5번째 모듈에 위치한 4개의 아미노산 잔기를 돌연변이 시킨 두 번째 라이브러리를 구축하였고 (도 4), 상기 두 번째 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합력이 증대된 신규 폴리펩타이드(서열번호 6)을 2차 선별하였다 (도 5).
- [38] 다음으로, 선별된 클론인 서열번호 6의 폴리펩타이드를 바탕으로 동일한 방식으로 다른 모듈에 돌연변이를 수행하여 세 번째 라이브러리를 구축하였고 (도 6), 상기 세 번째 라이브러리로부터 파지 디스플레이 방법을 사용하여 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합력이 더욱 증대된 리피바디 형태의 신규 폴리펩타이드(서열번호 7)을 3차 선별하였다. 최종적으로 상기 3차 선별된 폴리펩타이드를 대상으로 동일한 방법으로 돌연변이를 가하여 (도 7), 네 번째 라이브러리를 구축하였고 이로부터 pM 수준의 결합력을 갖는 리피바디 형태의 신규 폴리펩타이드(서열번호 8)를 최종적으로 선별하였다.
- [39] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 6 내지 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드에 관한 것이다.
- [40] 본 발명에서 용어 "인터날린 B 단백질"이란, 리스테리아(*Listeria*) 균주에서 발현되는 LRR 패밀리 단백질의 일종으로, 다른 소수성 코어가 전 분자에 걸쳐서 일정하게 분포되어 있는 다른 LRR 패밀리 단백질들과는 상이한 N-말단 구조를 가지고 있어 미생물에서도 안정적으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 이러한 인터날린 단백질의 N-말단은 반복 모듈의 접힘(folding)에 가장 중요한 N-말단 부위가 미생물 유래일 뿐만 아니라 그 형태가 알파 나선을 포함하는 안정적인 모양을 가졌기에 미생물에서 LRR 패밀리 단백질들의 안정적인 발현을 위하여 효과적으로 사용될 수 있다.
- [41] 본 발명에서 용어, "인터날린 단백질의 N-말단"은 단백질의 수용성 발현 및 접힘에 있어서 필요한 인터날린 단백질의 N-말단을 의미하며 알파 나선형 캡핑 모티프(capping motif) 및 인터날린 단백질의 반복 모듈을 의미한다. 인터날린 단백질의 N-말단은 단백질의 수용성 발현 및 접힘에 있어서 필요한 인터날린 단백질의 N-말단을 제한 없이 포함하며, 그 예로 알파 나선형 캡핑 모티프인 "ETITVSTPIKQIFPDDAFAETIKANLKKKSVTDAVTQNE" 및 반복 모듈을

포함할 수 있다. 또한 반복 모듈 패턴은 "LxxLxxLxLxxN"을 포함할 수 있다. 반복 모듈 패턴 중 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판; N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌, x는 임의의 친수성 아미노산을 의미한다. 인터날린 단백질의 N-말단은 융합될 수 있는 LRR 패밀리의 단백질의 종류에 따라 높은 구조 유사도를 갖는 N-말단이 선택될 수 있으며 결합 에너지 등의 계산을 통해 가장 안정적인 아미노산을 선택하여 해당 모듈의 아미노산의 변이가 가능하다.

[42] 본 발명의 용어 "상피세포 성장인자 수용체(EGFR)"는 다양한 세포의 세포막에 존재하는 약 170 KDa 크기의 막투과성 단백질로, 세포의 성장, 증식, 이동, 생존에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 해당 수용체로 인해 활성화되는 세포 증식 신호 전달은 암세포 내에서의 상피세포 성장인자(EGF)의 과발현으로 인한 EGFR의 이합체를 과도하게 유도하여 비정상적인 세포 증식을 유발하며, 이러한 현상은 폐암, 췌장암, 유방암 그리고 대장암과 같은 다양한 암에서 발견되고 있다.

[43] 본 발명의 용어 "리피바디(Repebody)"란, LRR 구조를 갖는 인터날린의 N-말단과 VLR 구조의 유사성을 바탕으로 융합하여 컨센서스 디자인으로 최적화시킨 폴리펩타이드이다. 리피바디 단백질은 구조상 오목한 지역(concave)과 볼록한 지역(convex)으로 나누어 질 수 있다(도 4). 여기서 오목한 지역은 서열의 다양성이 높으며 단백질 상호작용에 중요한 부위로 알려져 있다. 이와 반대로 볼록한 지역은 보존성이 높은 서열을 바탕으로 단백질의 전체구조를 안정하게 유지하는 역할을 수행한다. 리피바디 단백질은 반복 모듈을 갖는 LRR 패밀리에 속하는 모든 단백질을 상기 방법으로 수용성 발현 및 단백질의 생물리화학적 성질을 향상 시킨 융합 LRR 패밀리의 단백질을 모두 포함할 수 있다.

[44] 본 발명의 용어 "가변 림프구 수용체(Variable Lymphocyte Receptor, VLR)"란, 먹장어와 칠성장어에서 발현되는 LRR 패밀리의 단백질의 일종을 의미하는데, 먹장어와 칠성장어에서 발현되는 면역 기능 단백질로 다양한 항원 물질에 결합할 수 있는 골격으로 유용하게 사용될 수 있다. 상기 인터날린 B 단백질의 N-말단 및 VLR 단백질이 융합된 폴리펩타이드는 인터날린 B 단백질이 융합되지 않은 VLR 단백질보다 수용성 및 발현양이 증가하므로, 이를 기반으로 한 신규 단백질 치료제 제조에 사용될 수 있다.

[45] 본 발명에서 용어 "LRR(Leucine Rich Repeat) 단백질"이란, 루이신이 일정한 위치에 반복되는 모듈의 조합으로 이루어진 단백질을 의미하는 것으로, (i) 하나 이상의 LRR 반복 모듈을 갖고 있고, (ii) 상기 LRR 반복 모듈은 20 내지 30개의 아미노산으로 이루어져 있고, (iii) LRR 반복 모듈은 보존 패턴으로 "LxxLxxLxLxxN"을 갖고 있으며, 여기서 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 및 트립토판과 같은 소수성 아미노산을, N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌을, x는 임의의 아미노산을

의미하며, (iv) LRR 패밀리 단백질은 말발굽과 같은 삼차원 구조를 갖고 있는 단백질을 의미한다. 본 발명의 LRR 패밀리 단백질은 이미 그 서열이 알려져 있거나, 생체 내에서 새로 유도된 mRNA나 cDNA를 이용하여 찾아낸 것과 더불어 컨센서스 디자인(consensus design) 등의 설계를 통하여 자연계에 알려지지 않은 서열을 가지면서 반복모듈의 골격 구조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

[46] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드; 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물에 관한 것이다.

[47] 본 발명의 용어 "벡터"란 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질 전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[48] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주세포 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당 업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pET-21a, pET-32a 벡터 등을 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 pET-21a, pET-32a 벡터를 사용할 수 있다.

[49] 본 발명의 용어 "재조합 미생물"이란, 하나 이상의 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 갖는 벡터가 숙주세포에 도입되어 목적 단백질을 발현시키도록 형질이 감염된 세포를 의미하며, 진핵세포, 원핵세포 등의 모든 세포가 될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물세포가 될 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 숙주세포는 특별히 제한되는 것이 아니며, 바람직하게는 대장균을 숙주세포로 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 대장균 BL21(DE3), OrigamiB(DE3)를 숙주세포로 사용할 수 있다.

- [50] 본 발명에서 용어 "형질전환"이란, 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에 발현될 수 있는 것이면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하든지 상관없이 이들 모두를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되는 것일 수도 있다.
- [51] 본 발명은 다른 관점에서, (i) 상기 재조합 미생물을 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (ii) 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법에 관한 것이다.
- [52] 상기 방법에 있어서, 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계는 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행됨이 바람직하고, 배양조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물(예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물(예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH(pH 5 내지 9, 바람직하게는 pH 6 내지 8, 가장 바람직하게는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있으며, 배양온도는 20 내지 45, 바람직하게는 25 내지 40를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간 배양함이 바람직하다. 상기 배양에 의하여 생산된 상기 폴리펩타이드는 배지 중으로 분비되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [53] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알콜(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물(예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을

개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으며; 인 공급원으로서 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 기타 금속염(예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.

- [54] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 폴리펩타이드 회수 방법은 배양 방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적 폴리펩타이드를 수집할 수 있다.
- [55]
- [56] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [57] 본 발명에서 용어 "암" 또는 "종양"은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미하는 것이다. 상피세포 성장인자 수용체(EGFR)은 종양의 증식을 유도하는 성장 인자인바, 본 발명에서의 암 또는 종양은, 상피세포 성장인자 수용체가 과량 분비되는 대장암, 비소세포폐암, 난소암, 다발성 골수종, 캐슬만씨 병, 간암 등을 모두 포함하는 것을 의미한다.
- [58] 본 발명에서 용어 "치료"란 조성물의 투여로 암이나 그로부터 야기된 하나 또는 그 이상의 증상을 억제하거나 완화하는 것뿐만 아니라 질환의 증상을 반전시키는 암의 치료 또는 암의 진행을 방지하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어 "예방"이란 조성물의 투여로 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [59] 본 발명에서는, 암의 예방 또는 치료는 본 발명에서 확보한 폴리펩타이드가 상피세포 성장인자 수용체와 결합하여 이루어지는 것으로, 상피세포 성장인자 수용체의 세포외 도메인에 결합하여 그의 활성을 유의하게 억제하여 암을 예방 또는 치료하는 것이다.
- [60] 본 발명의 선행 특허(KR10-1356075)에서는 인터루킨-6와 결합할 수 있는 신규한 리피바디가 비소세포폐암에 대하여 유의미한 항암 작용을 한다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 상피세포 성장인자 수용체와 특이적으로 결합하는 리피바디 역시, 상피세포 성장인자 수용체의 과발현에 의해 발생하는 질환의 예방 또는 치료에도 사용될 수 있음은 명백하다.
- [61] 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다.
- [62] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라

항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[63] 본 발명의 상기 폴리펩타이드 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입 (inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.

[64] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.

[65] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[66] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[67] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내, 흡입, 안구 내 또는 피내경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.

- [68] 본 발명의 치료방법은 본 발명의 암 예방 또는 치료용 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 암의 예방 또는 치료용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.
- [69] 또한, 본 발명의 치료 방법은 상피세포 성장인자 수용체의 과도한 분비로 인하여 종양 발달과 신생혈관생성 등의 질병이 발생할 수 있는 임의의 동물에 적용가능하며, 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.
- [70]
- [71] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한, 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [72]
- [73] 실시예 1: 무작위적인 파지 라이브러리를 통한 EGFR의 세포외 도메인과 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 선별
- [74] 발명의 구성요소로 선행특허(KR2013-0098089A)의 실시예 2에서 이미 구축된 리피바디 라이브러리 파지를 사용하였다. 파지 라이브러리는 총 6개의 아미노산 위치가 돌연변이 되었으며, 선행특허(KR2013-0098089A)에서의 도 5와 동일한 위치에 돌연변이 서열을 갖는다.
- [75]
- [76] 실시예 1-1: 리피바디 라이브러리의 패닝 과정을 통한 EGFR의 세포외 도메인과 결합하는 폴리펩타이드 선별
- [77] 선행특허(KR2013-0098089A)에서 구축된 라이브러리를 사용하여 EGFR의 세포외 도메인에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 선별 정제하였다. EGFR의 세포외 도메인과 결합할 수 있는 후보를 선별하기 위하여, EGFR의 세포외 도메인을 면역튜브(Immuno-tube)에 100 /의 농도로 가하고, 4에서 12시간 코팅하였다. 상기 코팅된 면역튜브를 PBS으로 3회 세척하고, 1% BSA와 0.1% Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBSA)으로 4에서 2시간 블로킹(Blocking)하였다. 그런 다음, 상기 정제된 파지를 1012 cfu/ml의 농도로 상기 코팅된 면역튜브에 가하고, 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 종료된 후,

0.1% Tween 20을 포함하는 PBS 용액 (TPBS)으로 총 2분간 5번씩 및 PBS으로 2번 세척하였다. 마지막으로, 1 ml 0.2 M Gly-HCl(pH 2.2)를 상기 면역튜브에 가하고, 상온에서 10분간 반응시킴으로써, EGFR의 세포외 도메인과 결합할 수 있는 리피바디 후보를 표면에 발현시킨 파지를 용출시켰다. 용출액에 60의 1.0M Tris-HCl(pH 9.1)를 가하여 중화시키고, 숙주세포인 10ml 대장균 XL1-Blue 용액(OD600 = 0.5)에 가한 다음, 2x YT플레이트에 도말하는 바이오패닝(Bio-panning) 과정을 동일하게 4회 반복 수행하였다. 그 결과, 각 패닝 과정을 통해 EGFR의 세포외 도메인과 특이적으로 결합하는 파지가 농축됨을 확인하였다. 이러한 결과는 EGFR의 세포외 도메인에 결합하는 라이브러리 파지가 특이적으로 증가함을 의미하는 것으로 분석되었다.

[78]

[79] 실시예 1-2: 선별된 리피바디의 EGFR에 대한 특이적인 결합여부 확인 및 서열 분석

[80] 실시예 1-1의 방법을 통하여 선별된 파지를 EGFR의 세포외 도메인과 BSA가 코팅된 96-웰 플레이트를 이용하여 ELISA를 수행함으로써, BSA 대비 EGFR의 세포외 도메인의 흡광도(OD450)가 3배 이상 높은 17개의 리피바디 후보들을 선별하고 (도 1), 이들 각각의 아미노산 서열을 확인한 후, 동일한 아미노산 서열을 갖는 클론을 그룹화 하였다. 그 결과, 선별된 파지에서 발현되는 EGFR의 세포외 도메인과 특이적으로 결합하는 단백질 아미노산 서열 중에서 동일한 서열로 이루어진 A 내지 E에서 총 5개의 폴리펩타이드 그룹서열을 확인하였다. 즉, 126번 아미노산인 이소류신이 메타오닌, 아스파라진, 프롤린, 아스파라긴산으로 치환되고, 128번 아미노산인 트레오닌이 히스티딘, 류이신, 아르기닌 또는 시스테인으로 치환되며, 129번 아미노산인 글리신이 타이로신, 세린, 또는 트립토판으로 치환되고, 150번 아미노산인 발린이 타이로신, 세린, 메타오닌 또는 시스테인으로 치환되며, 152번 아미노산인 발린이 세린, 히스티딘, 아르지닌, 아스파라진 또는 페닐알라닌으로 치환되고, 153번 아미노산인 글루탐산이 글루타민, 아르지닌, 프롤린 또는 세린으로 치환되었음을 확인하였다 (도 2).

[81] 이러한 결과는 EGFR의 세포외 도메인과 결합하는데 중요한 역할을 수행하는 잔기가 존재함을 의미하는 것으로 분석되었다.

[82]

[83] 실시예 1-3: 선별된 리피바디의 EGFR의 3번째 세포외 도메인과의 결합 여부 확인

[84] 실시예 1-1에서 확보한 EGFR의 세포외 도메인에 결합하는 리피바디 중에서 3번째 도메인에 결합하는 리피바디를 선별하는 것은 매우 중요하다. 많은 암에서 EGFR은 과발현되지만, EGFR 자체의 돌연변이 또한 많이 발생하고 있음이 널리 보고되었다. 그 중, 단일 클론항체로 외부에서 EGFR의 세포외 도메인을 표적으로 하여 암을 치료하는 전략을 사용하는 경우에 범용적 사용을

위해서는 돌연변이로 인해 첫 번째와 두 번째 도메인이 제거된 형태의 EGFR의 세포외 도메인에 대해서도 결합이 가능해야 한다. 따라서 많은 발명자들은 EGFR의 세포외 도메인에 효과적인 표적능을 얻고자 주로 3번째 도메인에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 개발하여 선발하고 있는 실정이다.

- [85] 이러한 배경아래, 실시예 1-2를 통해 얻어진 총 5개의 개별적인 폴리펩타이드 중에서, A, B 그리고 D에 해당하는 대표 클론인 rA11(서열번호 1), rC1(서열번호 2) 그리고 rC3(서열번호 4)을 이용하여 ELISA를 수행하였다. 그 결과, 세 클론 모두 BSA에는 결합하지 않으나 EGFR의 세포외 도메인에는 결합하는 특이적인 결합력을 확인하였다 (도 3). 또한 EGFR의 세포외 도메인을 코팅한 플레이트에서 수용성 EGFR의 세포외 도메인(Soluble EGFR)을 첨가한 결과, ELISA 신호가 감소됨을 통해서 다시 한 번 수용액 상에서도 선발된 리피바디가 EGFR의 세포외 도메인에 효과적으로 결합함을 확인하였다. 마지막으로 EGFR의 3번째 세포외 도메인에 결합하는 것으로 알려진 단일클론항체인 Cetuximab과 경쟁적 ELISA를 수행한 결과, D의 대표 클론을 제외한 A 와 B 클론 모두에서 Cetuximab에 의해 결합신호가 감소하는 것으로 확인됨에 따라 해당 클론은 EGFR의 3번째 세포외 도메인에 특이적으로 결합함을 입증할 수 있었다 (도 3).

[86]

- [87] 실시예 2: 모듈 기반 방법을 이용한 리피바디의 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합력 증대 수행

- [88] 발명의 구성요소로 상기 선행특허의 실시예 4에서 기술된 모듈 기반 친화력 증대 방식을 수행하였다. 해당 방법은 반복 모듈을 갖는 단백질에 대해 보편적으로 사용할 수 있는 기술로서, 본 특허에서 성공적으로 재현되어 높은 수준의 친화력을 갖는 단백질 설계를 가능하게 하였다.

[89]

- [90] 실시예 2-1: 모듈을 이용한 추가적인 라이브러리 구축 및 결합력 증가 확인

- [91] 실시예 1-3의 결과에서 가장 효과적으로 EGFR의 3번째 세포외 도메인에 결합할 수 있는 것으로 확인된 클론인 rA11의 EGFR의 세포외 도메인에 대한 해리상수는 92 nM 이지만 (도 4), 대부분의 항암치료에 사용되는 단일클론항체는 수 nM 혹은 수백 pM 수준의 결합력으로 효과적인 표적 치료제에 이용된다. 따라서 본 발명의 리피바디 후보로는 EGFR의 활성을 충분히 억제할 수 없을 것으로 예상되었다.

- [92] 이러한 문제점을 해결하고자, 선행특허(KR2013-0098089A)의 실시예 4에서 사용한 모듈을 이용한 추가적인 라이브러리 구축방법을 이용하여 결합력이 향상된 돌연변이체를 개발하고자 하였다.

- [93] 구체적으로, 선행특허(KR2013-0098089A)의 실시예 4-2와 동일한 방식으로 오목한 지역의 네 개의 잔기를 돌연변이 시켰다 (도 5). 첫 번째 모듈 기반 친화력 증대를 위한 라이브러리는 5번째 모듈을 돌연변이 시켜, 총 4번의 패닝과정을

거쳐서 결합력이 증대된 rAC1(서열번호 6)을 확보하였으며, ELISA를 통해서 rA11에 비해 상대적으로 낮은 단백질 농도에서 rA11의 EGFR의 세포외 도메인에 대해 결합을 저해하는 것을 확인하였다 (도 6).

- [94] 한편, 더욱 향상된 결합력을 갖는 돌연변이체를 개발하기 위해서 rAC1을 기본 폴리펩타이드로 하여 주변 모듈인 6번째 모듈의 네 개의 잔기를 돌연변이 시킨 후 (도 7), 동일한 패닝과정을 거쳐, rEgA(서열번호 7)을 선별하여 rAC1에 비해 높은 결합력을 갖고 있음을 ELISA를 통해 확인하였다 (도 6). 세 번째 친화력 증대 과정에서는 rEgA를 기반으로 2번째 모듈의 네 개의 잔기에 라이브리리를 구축한 결과, rEgA에 비해 결합력이 향상된 rEgH9(서열번호 8)라는 클론을 성공적으로 확보할 수 있었다 (도 8 내지 9).

- [95] 한편, 상피세포 EGFR의 세포외 도메인에 대한 상기 리피바디 rEgH9 클론의 해리상수(dissociation constant)를 측정하였다. 구체적으로, PBS에 0.3 mM (6 mg/ml)로 용해된 리피바디와 PBS에 0.02 mM(1.4 mg/ml)로 용해된 EGFR의 세포외 도메인을 사용하고, 등온열량측정기(Isothermal Titration Calorimetry; ITC)를 이용하여, 37 에서 EGFR의 세포외 도메인에 대한 rEgH9의 해리상수를 측정하였다 (도 10). 도 10은 본 발명의 폴리펩타이드의 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합력을 등온열량측정기로 확인한 실험결과를 나타내는 도면이다. 도 10에서 나타난 바와 같이, 최종 클론인 rEgH9의 EGFR의 세포외 도메인에 대한 해리상수가 301 pM로 매우 강하게 결합할 수 있음을 확인하고 최종적인 클론으로서 확보하였다.

- [96] 이러한 결과를 통해 본 발명자는 효과적인 표적 치료제로 사용되는 다양한 종류의 단일클론항체가 갖는 높은 수준의 결합력을 갖는 리피바디를 성공적으로 확보하였으며, 이는 EGFR의 세포외 도메인에 특이적 결합력을 갖는 폴리펩타이드임을 확보하였다.

[97]

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

[99]

산업상 이용가능성

- [100] 본 발명의 폴리펩타이드는 표적 치료제로 널리 사용되는 단일클론항체에 버금가는 높은 친화력으로 EGFR의 세포외 도메인에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있어 EGFR 관련 질환의 예방 또는 치료용 제제의 개발에 유용하다.

[101]

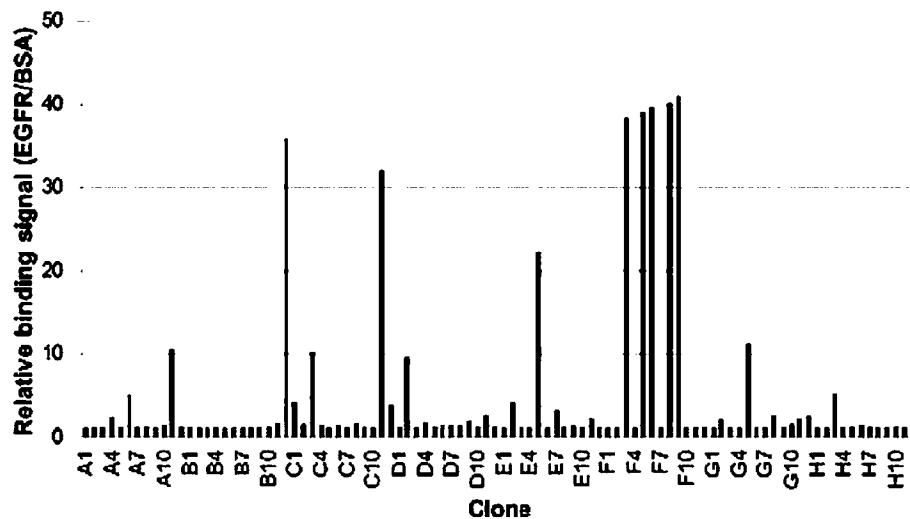
서열목록 Free Text

[102] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 상피세포 성장인자 수용체 단백질에 특이적 결합능을 갖는 폴리펩타이드로서 서열번호 1 내지 8 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 상피세포 성장인자 수용체의 세포외 도메인에 결합하여 그의 활성 저해능을 가지는 폴리펩타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 VLR 단백질의 변형된 반복모듈은 하기의 반복 모듈 패턴을 포함하는 폴리펩타이드:
LxxLxxLxLxxN
(상기 패턴에서, L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이며; N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며 및 x는 모든 종류의 20개의 아미노산이다).
- [청구항 5] 제1항의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제5항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합백터
- [청구항 7] 제5항의 폴리뉴클레오티드 또는 제6항의 재조합백터가 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 8] 다음 단계를 포함하는 상피세포 성장인자 수용체 단백질에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드의 제조방법;
(i) 제7항의 재조합 미생물을 배양하여 제1항의 폴리펩타이드를 생성시키는 단계; 및
(ii) 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 제1항의 폴리펩타이드를 회수하는 단계.
- [청구항 9] 제1항 내지 제4항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 암 예방 또는 치료는 상기 폴리펩타이드가 상피세포 성장인자 수용체와 결합하여 이루어지는 것인 암 예방 또는 치료용 조성물.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

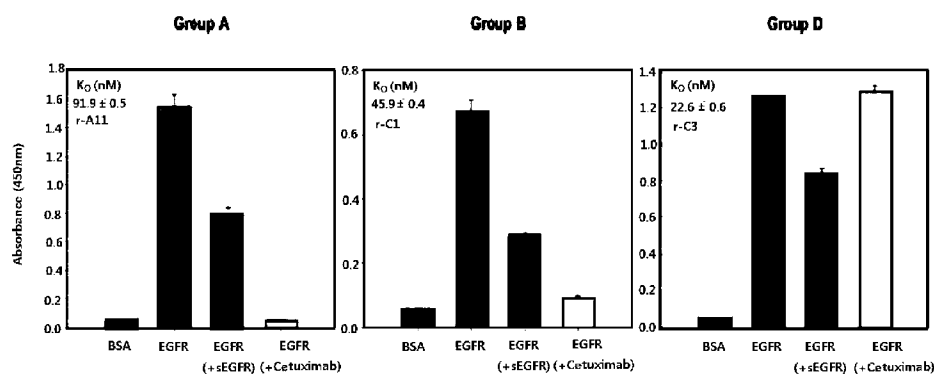
Table List of the sequences of selected repebodies

Group	Module 3				Module 4		# of clones
	I126	T128	G129	V150	V152	E153	
A	Met	His	Tyr	Tyr	Ser	Glu	12
B	Asn	Leu	Tyr	Tyr	His	Gln	1
C	Pro	Thr	Ser	Ser	Arg	Arg	1
D	Asp	Arg	Trp	Met	Asn	Pro	2
E	Leu	Cys	Gly	Cys	Phe	Ser	1

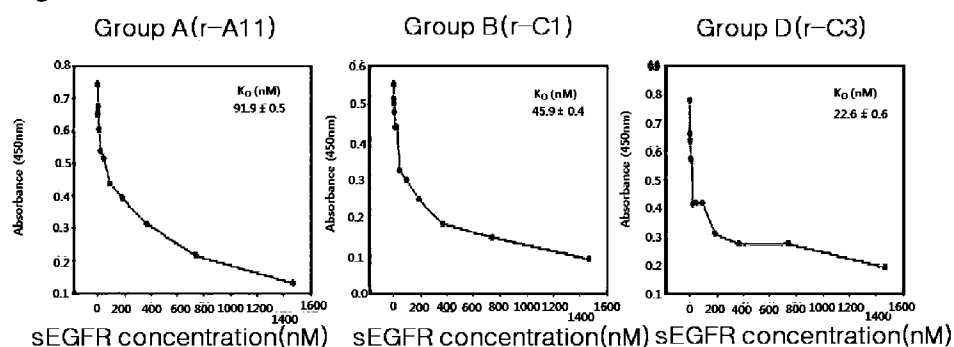
>group A and B_deletion of module 5

>group C_deletion of module 5 and 6

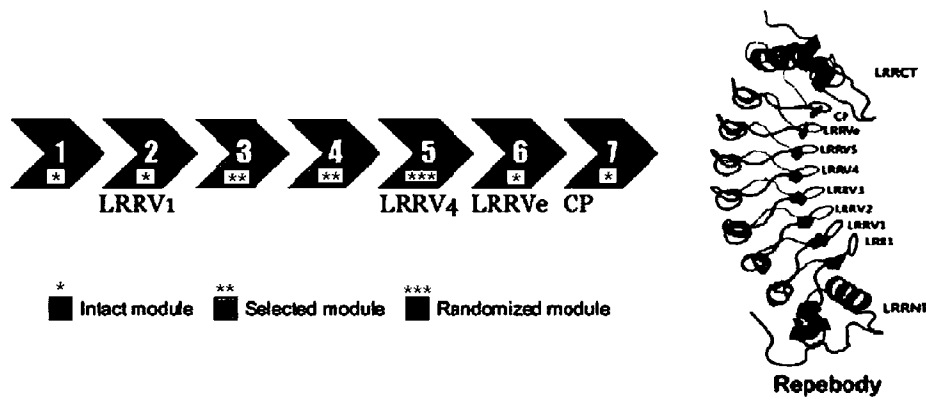
[Fig. 3]



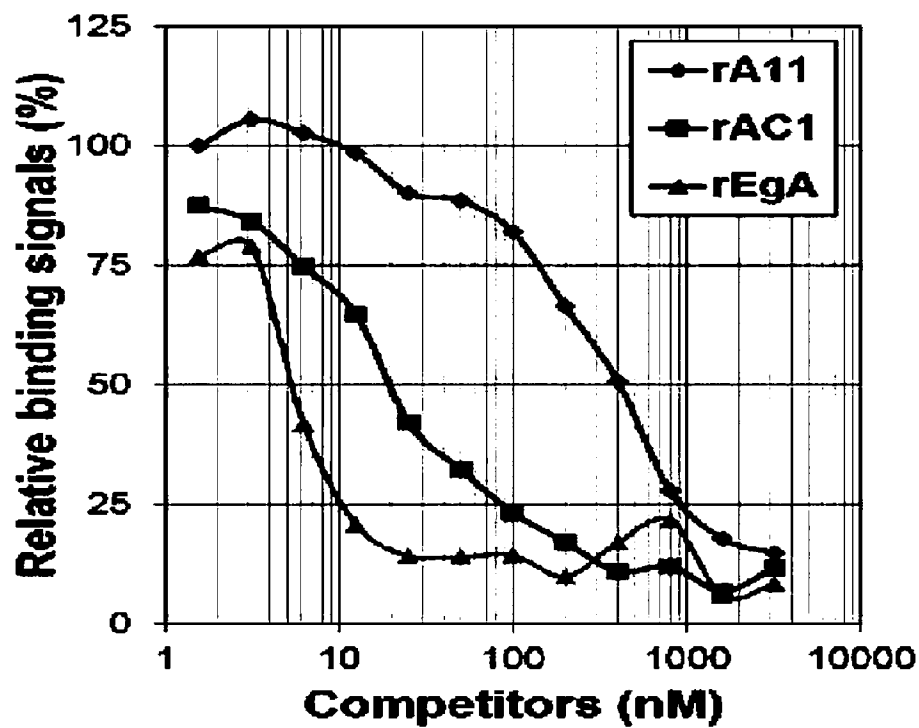
[Fig. 4]



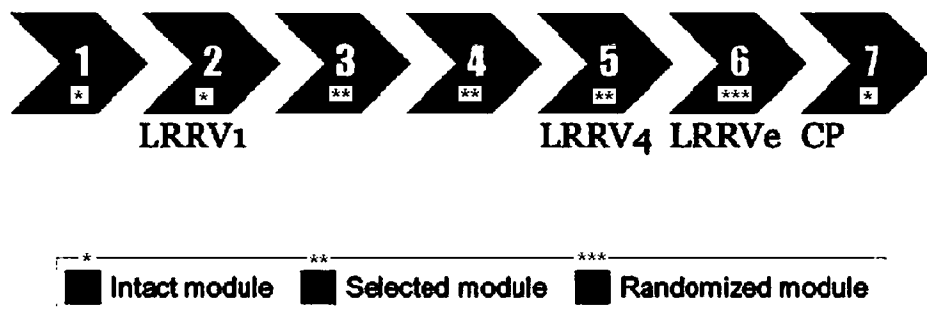
[Fig. 5]



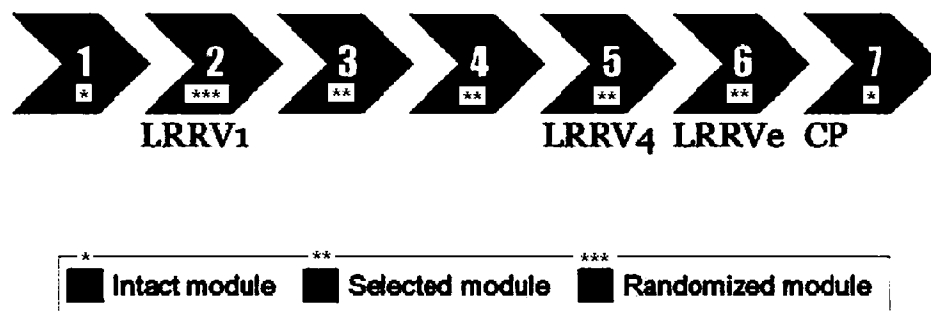
[Fig. 6]



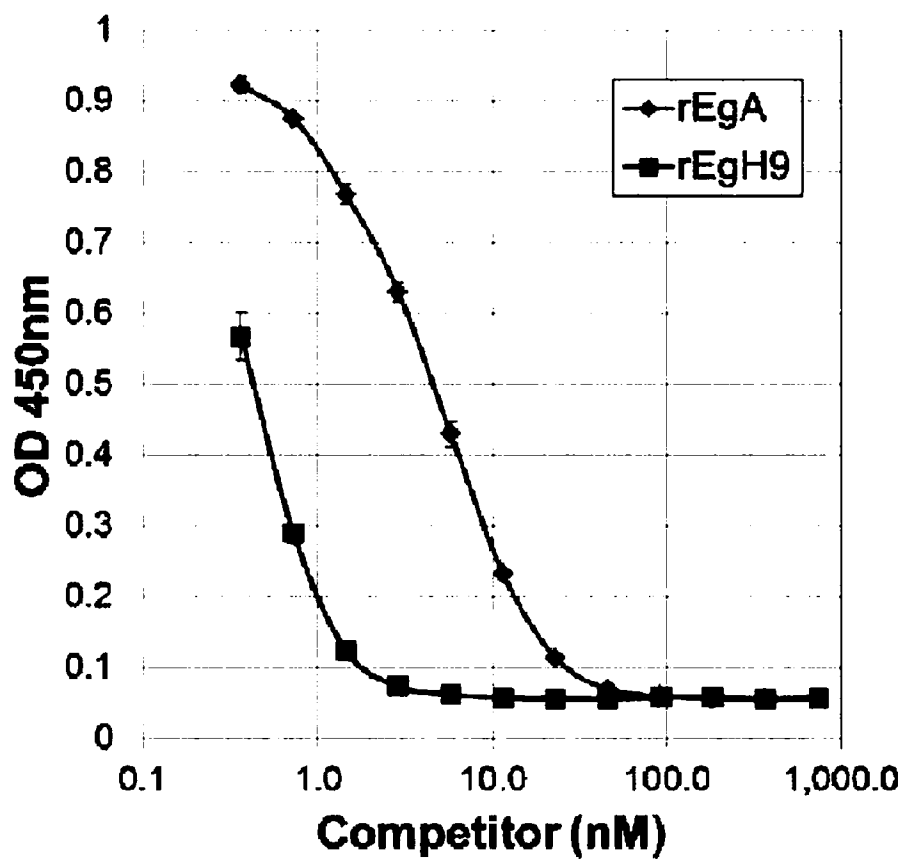
[Fig. 7]



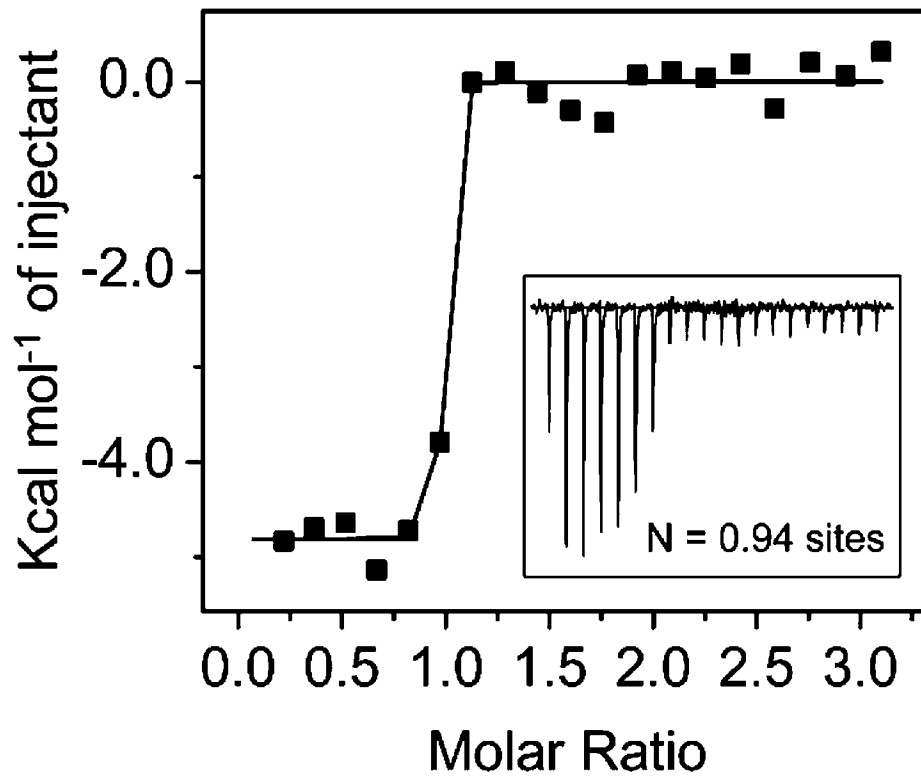
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

Binding affinity ($K_D = 301.2$ pM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005079**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 19/00(2006.01)i, C07K 14/195(2006.01)i, C07K 14/46(2006.01)i, C12N 15/62(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 19/00; A61P 35/00; C07K 14/195; A61K 38/17; C07K 14/46; C12N 15/62

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: EGFR, internalin, receptor, VLR, epidermal growth factor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Lee S-C., et al., "Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering", Proc. Natl. Acad. Sci., 109(9): pp. 3299-3304, (28 February 2012) See the entire document, especially, page 3299.	1-10
Y	Bella J., et al., "The leucine-rich repeat structure", Cell. Mol. Life Sci., 65: pp. 2307-2333 (14 April 2008) See table 1, page 2326.	1-10
A	KR 10-2013-0098089 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 04 September 2013 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2006-0017585 A (UNIVERSITE DE LAUSANNE) 24 February 2006 See the entire document.	1-10



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

"I" 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

25 AUGUST 2015 (25.08.2015)

Date of mailing of the international search report

25 AUGUST 2015 (25.08.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/005079

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0098089 A	04/09/2013	KR 10-1517196 B1	04/05/2015
		US 2015-0094450 A1	02/04/2015
		WO 2013-129852 A1	06/09/2013
KR 10-2006-0017585 A	24/02/2006	AU 2004-226162 A1	14/10/2004
		CA 2521393 A1	14/10/2004
		CN 1798770 A	05/07/2006
		CN 1798770 B	09/06/2010
		CN 1798770 C	05/07/2006
		EP 1613661 A2	11/01/2006
		EP 1613661 B1	29/06/2011
		JP 2007-527206 A	27/09/2007
		US 2006-0233808 A1	19/10/2006
		WO 2004-087766 A2	14/10/2004
		WO 2004-087766 A3	16/12/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 19/00(2006.01)i, C07K 14/195(2006.01)i, C07K 14/46(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 19/00; A61P 35/00; C07K 14/195; A61K 38/17; C07K 14/46; C12N 15/62

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: EGFR, 인터날린, receptor, VLR, 상피세포 성장인자

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	Lee S-C., et al., "Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering", Proc. Natl. Acad. Sci., 109(9):pp3299-3304, (2012. 2.28.) 전체문헌 참조, 특히, 페이지 3299 참조.	1-10
Y	Bella J., et al., "The leucine-rich repeat structure", Cell. Mol. Life Sci., 65:pp.2307-2333 (2008. 4.14) 표1, 페이지 2326 참조.	1-10
A	KR 10-2013-0098089 A (한국과학기술원) 2013.09.04 전체문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2006-0017585 A (유니베르시페 드 로잔느) 2006.02.24 전체문헌 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 08월 25일 (25.08.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 08월 25일 (25.08.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

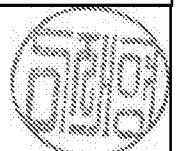
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이재영

전화번호 +82-42-481-8169



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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 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 10-2013-0098089 A	2013/09/04	KR 10-1517196 B1	2015/05/04
		US 2015-0094450 A1	2015/04/02
		WO 2013-129852 A1	2013/09/06
KR 10-2006-0017585 A	2006/02/24	AU 2004-226162 A1	2004/10/14
		CA 2521393 A1	2004/10/14
		CN 1798770 A	2006/07/05
		CN 1798770 B	2010/06/09
		CN 1798770 C	2006/07/05
		EP 1613661 A2	2006/01/11
		EP 1613661 B1	2011/06/29
		JP 2007-527206 A	2007/09/27
		US 2006-0233808 A1	2006/10/19
		WO 2004-087766 A2	2004/10/14
		WO 2004-087766 A3	2004/12/16