(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 2 월 4 일 (04.02.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/018133 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/008094

(22) 국제출원일: 2015 년 8 월 3 일 (03.08.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0098833 2014 년 8 월 1 일 (01.08.2014) KR

(71) 출원인: **한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **김학성 (KIM, Hak-Sung)**; 34076 대전시 유성구 지족로 362 310-304, Daejeon (KR). **황다은 (HWANG, Da Eun)**; 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3201, Daejeon (KR). **최정민 (CHOI, Jung-Min)**; 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3201, Daejeon (KR). **이중재 (LEE, Joong-Jae)**; 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3201, Daejeon (KR). **허우성 (HEU, Woosung)**; 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생명과학과 3201, Daejeon (KR).

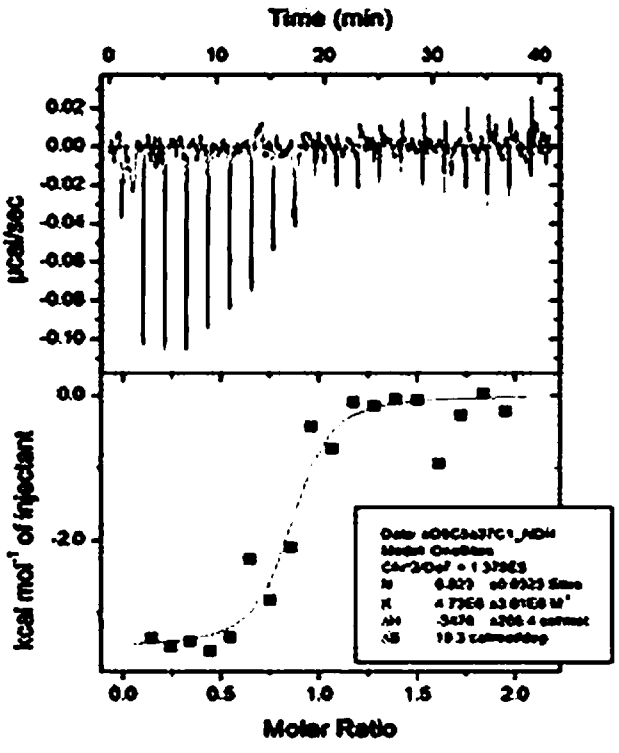
(74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo Young)** 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11 층, Seoul (KR).

(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.

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: NOVEL POLYPEPTIDE FOR BINDING TO COMPLEMENT PROTEIN C5A, AND USE OF SAME

(54) **발명의 명칭** : 보체 단백질 C5a 와 결합할 수 있는 신규한 폴리펩타이드 및 그 용도



D5

(57) **Abstract**: The present invention relates to novel polypeptide for binding to a complement protein C5a. More particularly, the present invention relates to polypeptide which can be bound to a complement protein C5a and inhibit the activation of same, polynucleotide which codes for the polypeptide, a recombinant vector which comprises the polynucleotide, a recombinant microorganism to which the recombinant vector has been introduced, a method for producing the polypeptide by means of the recombinant microorganism, and a pharmaceutical composition, for treating immune diseases or sepsis, containing the polypeptide. A polypeptide, according to the present invention, can be bound to a complement protein C5a, with higher affinity compared to being bound to a complement protein C5a receptor which is present in nature, and inhibits the activation of same, thus being widely utilized for development of formulation for preventing or treating diseases related to a complement protein C5a.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/018133 A1

(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))

본 발명은 보체 단백질 C5a 와 결합할 수 있는 신규한 폴리펩타이드에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 보체 단백질 C5a 와 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물, 상기 재조합 미생물을 이용한 상기 폴리펩타이드 생산방법 및 상기 폴리펩타이드를 함유하는 면역질환 또는 패혈증 치료용 의약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드는 자연계에 존재하는 보체 단백질 C5a 수용체보다도 높은 친화력으로 보체 단백질 C5a 에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로, 보체 단백질 C5a 관련 질환의 예방 또는 치료용 제제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 보체 단백질 C5a와 결합할 수 있는 신규한 폴리펩타이드 및 그 용도

기술분야

[1] 본 발명은 보체 단백질 C5a와 결합할 수 있는 신규한 폴리펩타이드에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 보체 단백질 C5a와 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물, 상기 재조합 미생물을 이용한 상기 폴리펩타이드 생산방법 및 상기 폴리펩타이드를 함유하는 면역질환 또는 패혈증 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 생체 내에 존재하는 다양한 물질 중에서, 단백질은 생명 현상의 유지 및 기능을 수행하는 거대 분자로서 넓은 범위의 생물학적 역할을 담당하고 있다. 이런 역할을 수행하기 위해서는 우선 단백질-단백질 간 상호작용이 이루어져야 하며, 이는 모든 생명현상의 기초라고 할 수 있다. 만약 단백질 상호작용이 제대로 조절되어지지 않게되면 체내의 항상성은 망가지게 되어 결과적으로 다양한 질병을 일으키게 된다. 따라서 단백질 상호작용을 인위적으로 조절함으로써 질병을 치료하기 위한 다양한 방법이 연구 및 개발되어 왔으며 실제로 치료 목적에 사용가능한 다양한 의약품들이 성공적으로 개발되어 왔다.

[4] 항체는 면역반응의 중요단백질로 항원과의 특이적 상호작용을 통해 생물학적 기능을 수행한다. 이런 특이적인 결합력은 기존의 저분자 화학제재와 달리 부작용 없이 높은 치료효과를 가능하게 한다. 따라서, 많은 연구기관과 제약회사들은 다양한 선별기술을 활용하여 잘 알려진 치료제 표적에 대해 결합력을 갖는 항체들을 개발하기 위한 연구를 활발히 진행하고 있다. 항체 치료제는 화학제재에 비해 낮은 부작용과 높은 치료 효능 때문에 글로벌 제약기업과 생명공학 기업들이 개발에 집중 투자를 하여 현재 다수의 항체 치료제가 임상에 사용되고 있으며 많은 치료제 후보가 임상실험 중에 있다. 또한, 치료용 목적만이 아닌 생체물질의 분리정제 및 분자 의학적 진단기술 등 다양한 분야에서 폭 넓게 이용되고 있다. 하지만, 이런 장점에도 불구하고, 생산 비용이 비싸고 기존 특허 장벽을 벗어나기 힘들며 분자량이 커서 세포내 침투가 어렵고 기대만큼 실제 환자의 치료 효과가 높지 않은 문제점이 있기 때문에, 최근에는 항체 치료제를 대체하기 위한 인공항체의 개발이 활발하게 진행되고 있다. 이러한 인공항체 골격 단백질은 항체 치료제와 달리 암 조직 내로 침투되는 효율에 크게 향상되어 결과적으로 치료 효과를 향상 시킬 수 있다는

장점이 많은 연구를 통해 밝혀지고 있다.

[5] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 기존의 항체를 대체할 수 있는 비 항체 단백질 골격(non-antibody protein scaffold)인 리피바디(repebody)를 성공적으로 개발하였다. 상기 리피바디는 LRR(Leucine-rich repeat) 구조를 갖는 인터날린의 N-말단과 상기 VLR(Variable Lymphocyte Receptor)의 구조의 유사성을 바탕으로 융합하여 컨세서스 디자인으로 최적화시킨 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 리피바디는 크기가 항체의 1/5 수준이고, 대장균에서 대량생산 되며, 동물 실험결과 면역원성이 거의 없다. 또한, 열 및 pH 안정성이 매우 우수하고 타겟에 대한 결합력을 pico-mole 수준까지 매우 용이하게 증대시킬 수 있으며, 타겟에 대한 특이성이 매우 탁월함을 하다.

[6] 한편, 보체 단백질 C5a는 천식, 류마티스 관절염, 루프스와 같은 면역 질환에 관련된 질환유발인자로 알려져 있다. 특히, 혈액 중에 다양한 세균이 침범하여 번식하면서 생산된 독성물질에 의해 중독 증세를 나타내거나 전신에 감염증을 일으키는 질병인 패혈증 치료에 주요 표적으로 각광받고 있다. 패혈증은 전 세계적으로 중환자실 이환율 및 사망률의 주요한 원인으로 알려져 있고 미국의 경우 해마다 750,000명의 패혈증 환자가 발생하며 국내에서도 정확한 통계는 없지만 매우 높은 발병률을 나타내고 있다. 치사율 또한 40% 정도로 매우 높은 편이나, 2001년 FDA 승인을 받은 치료제가 2011년 시장에서 퇴출되면서 아직까지 효과적인 치료법이나 치료 물질은 매우 부족한 실정이다. 따라서 패혈증의 치료제로써 보체 단백질 C5a를 표적으로 하는 치료제 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[7] 본 발명자들은 상기 리피바디 골격을 이용하여 다양한 질환 관련 표적 단백질들에 대한 특이적인 결합 단백질(Specific protein binder)을 성공적으로 제조하고, 세포 기반의 방법으로 생물학적인 저해효과가 있음을 검증하였으나, 이에 대한 응용연구는 아직 시작 단계에 불과하여, 추가적인 연구를 활발히 진행하고 있다.

[8] 이에, 본 발명자들은 상기 리피바디 골격을 이용하여 다양한 면역 질환과 관련이 깊은 것으로 알려진 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 단백질을 개발하고자 예의 노력한 결과, 리피바디의 구조적 특징인 모듈성과 전체구조분석을 통해 구축한 무작위한 돌연변이 라이브러리를 바탕으로 보체 단백질 C5a에 대해 특이적인 결합력을 갖는 신규한 폴리펩타이드를 선별하고, 상기 폴리펩타이드와 보체 단백질 C5a의 결합력이 자연계에 존재하는 보체 단백질 C5a 수용체 보다 높은 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[9]

[10] **발명의 요약**

[11] 본 발명의 목적은 보체 단백질 C5a와 특이적으로 강하게 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 폴리펩타이드를 제공하는 데 있다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기

폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물을 제공하는 데 있다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 미생물을 이용하여 상기 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 제공하는 데 있다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 면역질환 또는 패혈증 치료용 의약 조성물을 제공하는데 있다.

[15]

[16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합된, 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물을 제공한다.

[18] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드의 생산방법을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 면역질환 또는 패혈증 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 상기 선행특허(KR2012-0019927)에서 구축된 파지 라이브러리를 이용하여, 보체 단백질 C5a에 대한 파지 디스플레이의 바이오 패닝을 수행한 결과이다. BSA 대비 보체 단백질 C5a에 대한 효소면역측정법 (ELISA)에 의한 결합 신호를 평균화 (Normalization)를 하였으며, 이때 10배 이상의 신호가 증가한 클론에 대해 특이적인 결합력을 갖는 리피바디 클론으로 정의한다.

[22] 도 2는 상기 도 1에서 얻어진 클론 중 가장 높은 결합력을 보이는 클론인 G7에 대해 등온열량측정기 (Isothermal titration calorimetry; ITC)를 이용하여 해리상수를 측정한 결과로, 보체 단백질 C5a에 대해 2.8 M의 낮은 결합력을 가지고 있음을 확인한 것이다.

[23] 도 3은 상기 도 2에서 선별된 클론인 G7에서 리피바디와 보체 단백질 C5a의 결합을 방해할 것으로 판단되는 C-말단 루프를 제거한 서열을 나타낸 것이다.

[24] 도 4는 결합력을 증대시키기 위해 일차적으로 선별된 클론인 G7을 바탕으로 두 번째 라이브러리가 구축된 LRRV5 모듈과 LRRVe 모듈에 존재하는 아미노산 잔기를 나타낸 것이다.

[25] 도 5는 두 번째 라이브러리를 이용하여 파지 디스플레이의 바이오 패닝을 수행한 결과를 나타낸 것이다. BSA 대비 보체 단백질 C5a에 대한

효소면역측정법 (ELISA)에 의한 결합 신호를 평균화 (Normalization)를 하였으며, 이때 5배 이상의 신호가 증가한 클론에 대해 결합력이 증대된 리피바디 클론으로 정의한다.

[26] 도 6은 상기 도 5에서 얻어진 클론 중 가장 높은 결합력을 보이는 클론인 F5에 대해 등온열량측정기를 이용하여 해리상수를 측정한 결과로, 보체 단백질 C5a에 대해 56 nM의 결합력을 가지고 있음을 확인한 것이다. 이는 결합력 증대 전의 G7 클론에 비해 약 53배 결합력이 증대된 것이다.

[27] 도 7은 결합력을 증대시키기 위해 이차적으로 선별된 클론인 F5를 바탕으로 세 번째 라이브러리가 구축된 LRRV3 모듈에 존재하는 아미노산 잔기를 나타낸 것이다.

[28] 도 8은 세 번째 라이브러리를 이용하여 파지 디스플레이의 바이오 패닝을 수행한 결과를 나타낸 것이다. BSA 대비 보체 단백질 C5a에 대한 효소면역측정법 (ELISA)에 의한 결합 신호를 평균화 (Normalization)를 하였으며, 이때 30배 이상의 신호가 증가한 클론에 대해 결합력이 증대된 리피바디 클론으로 정의한다.

[29] 도 9는 상기 도 8에서 얻어진 클론 중 F5보다 결합력이 증대된 클론들에 대해 등온열량측정기를 이용하여 해리상수를 측정한 결과를 나타낸 것이다. 클론 E8이 보체 단백질 C5a에 대해 약 1.9 nM로 가장 높은 결합력을 가지며, 이는 결합력 증대 전의 F5 클론에 비해 약 29배 결합력이 증대된 것이다.

[30] 도 10은 결합력을 증대시키기 위해 삼차적으로 선별된 클론인 E8을 바탕으로 최종 라이브러리가 구축된 LRR1과 LRRV1 모듈에 존재하는 아미노산 잔기를 나타낸 것이다.

[31] 도 11은 최종 라이브러리를 이용하여 파지 디스플레이의 바이오 패닝을 수행한 결과를 나타낸 것이다. BSA 대비 보체 단백질 C5a에 대한 효소면역측정법 (ELISA)에 의한 결합 신호를 평균화 (Normalization)를 하였으며, 이때 15배 이상의 신호가 증가한 클론에 대해 결합력이 증대된 리피바디 클론으로 정의한다.

[32] 도 12는 상기 도 11에서 얻어진 클론 중 E8보다 결합력이 증대된 클론인 D5에 대해 클론 F5에 C-말단 루프가 삽입된 클론을 이용하여 디스플레이스먼트 등온열량측정기 (Displacement isothermal titration calorimetry)를 이용하여 해리상수를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[33] 도 13은 상기 도 5에서 얻어진 클론 중 가장 높은 결합력을 보이는 클론인 F5에 C-말단 루프를 삽입한 후 보체 단백질 C5a와 결합력을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[34]

[35] **발명의 상세한 설명 및 바람직한** 구현예

[36] 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.

[37]

[38] 본 발명에서는 보체 단백질 C5a와 특이적으로 결합할 수 있는 신규 폴리펩타이드를 개발하는데 있어, 결합 특이성이 높고, 대량생산이 가능한 폴리펩타이드를 발굴하였다. 신규 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물을 이용하여 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR 단백질의 LRR 단백질 부분이 융합된, 폴리펩타이드의 반복모듈을 무작위적으로 포함하는 라이브러리를 구축한 후, 모듈 기반 방법을 이용한 리피바디의 보체 단백질 C5a에 대한 결합력 증대 방식 수행을 통해, 보체 단백질 C5a에 대해 높은 결합력을 가지는 신규 폴리펩타이드를 확인하였다.

[39] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합된, 보체 단백질의 C5a에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[40] 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 1 내지 8 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고, 보체 단백질 C5a와 효과적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 선별하였다.

[41] 본 발명의 용어 보체 단백질 C5a (complement component C5a)는 보체 활성화 과정에서 보체 단백질 C5가 잘리면서 형성된 약 9 kDa의 작은 단백질 조각이다. 보체 단백질 C5a는 비만세포와 호염구 과립 파괴로 히스타민을 방출시켜 혈관 투과성을 증가시키며, 백혈구를 불러들여 식작용을 촉진시키는 등의 다양한 염증 반응에 관여한다. 특히 체내에 과도하고 존재하는 C5a는 면역 반응을 과도하게 일으켜 비정상적인 염증 반응을 유발하며, 이러한 현상은 천식, 류마티스 관절염, 루푸스, 패혈증 등과 같은 다양한 질환에서 발견되고 있다.

[42] 본 발명에서는, 보체 단백질 C5a와 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 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(KR2012-0019927)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. 또한, 상기 라이브러리는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 파지미드의 형태가 될 수 있다.

[43] 본 발명의 용어 "파지미드"란, 대장균을 숙주로 하는 바이러스인 파지로 부터 유래된 원형의 폴리뉴클레오티드 분자를 의미하는데, 번식과 증식에 필요한

단백질 및 표면 단백질들의 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 수도 있다. 본 발명의 목적상 상기 파지미드는 상기 라이브러리를 구성하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드르를 발현 및 분비하기 위한 신호 서열 또는 리더 서열인 MalEss, DsbAss 또는 PelBss를 포함하고, 파지의 표면에 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위한 히스티딘-태그와 파지 표면으로의 발현을 위한 M13 파지의 표면 단백질의 일종인 gp3 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상기 선행특허(KR2012-0019927)의 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[44] 본 발명에서는, 상기 파지미드를 포함하는 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 보체 단백질 C5a에 대한 결합력이 우수한 리피바디 형태의 신규한 폴리펩타이드(서열번호 1)를 선별하였다 (도 1). 그러나, 이들 선별된 폴리펩타이드는 자연계에 존재하는 보체 단백질 C5a의 수용체(complement component 5a recpetor) 보다도 보체 단백질 C5a에 대한 결합력이 낮은 수준이어서(도 2), 상기 선별된 폴리펩타이드에 돌연변이를 가하여 보체 단백질 C5a에 대한 결합력이 향상된 변이 폴리펩타이드를 제작하고자 하였다. 이를 위하여, 우선 상기 선별된 서열번호 1 폴리펩타이드의 C-말단 부분의 루프(loop)가 리피바디와 보체 단백질 C5a의 결합을 방해할 수 있다고 판단하여 루프에 해당하는 239번 아미노산인 아르지닌부터 246번 아미노산인 알라닌까지 총 8개의 아미노산을 제거한 후 글라이신 2개를 삽입하였다(도 3). 또한 상기 선별된 서열번호 1을 대상으로 LRRV5 모듈에 위치한 아미노산 잔기 4개와 LRRVe 모듈에 위치한 아미노산 잔기 3개를 돌연변이 시킨 두 번째 라이브러리를 구축하고(도 4), 상기 두 번째 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 보체 단백질 C5a에 대한 결합력이 증대된 신규한 폴리펩타이드(서열번호 2)를 2차 선별하였다. 다음으로, 선별된 클론인 서열번호 2의 폴리펩타이드를 바탕으로 동일한 방식으로 LRRV4 모듈에 돌연변이를 수행하여 세 번째 라이브러리를 구축하고(도 7), 상기 세 번째 라이브러리로부터 파지 디스플레이 방법을 사용하여 보체 단백질 C5a에 대한 결합력이 더욱 증대된 리피바디 형태의 신규한 폴리펩타이드(서열번호 3 내지 6)를 3차 선별하였다. 선별된 각 클론에 대하여 등온열량적정기(Isothermal titration calorimetry)를 이용하여 보체 단백질 C5a에 대한 결합력을 측정하였으며(도 9), 이 중 서열번호 6의 폴리펩타이드가 보체 단백질 C5a에

대한 결합력이 1.9 nM로써 가장 높은 클론임이 확인되었다. 그러나, 선별된 보체 단백질 C5a에 결합하는 폴리펩타이드는 자연계에 존재하는 보체 단백질 C5a 수용체보다 낮은 결합력을 가지기 때문에 생물학적 효능이 낮을 것으로 예상된다. 이에, 본 발명자들은 보체 단백질 C5a와의 결합능이 더욱 개선됨과 동시에 생물학적 효능을 갖는 리피바디를 확보하기 위하여, 서열번호 6을 기반으로 하여 LRR1과 LRRV1 모듈에 존재하는 총 4 개의 아미노산 잔기를 돌연변이 시킨 네 번째 라이브러리를 구축하였다. 상기 네 번째 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 보체 단백질 C5a에 대한 결합력이 약 78 pM로 더욱 증대된 리피바디 형태의 신규한 폴리펩타이드(서열번호 7)를 최종적으로 선별하였다.

[45] 이후, C-말단 루프가 리피바디와 보체 단백질 C5a의 결합을 방해하는지 확인하기 위하여 서열번호 2의 폴리펩타이드에 C-말단 루프를 본래의 위치에 다시 삽입한 폴리펩타이드(서열번호 8)의 결합력을 측정하였다 (도 13). 그 결과, 약 76 nM의 결합력을 가지는 것을 확인하였으며 이는 C-말단 루프가 없는 리피바디보다 약 20 nM 정도 결합력이 감소하였음을 알 수 있다.

[46] 본 발명의 용어 "인터날린 B 단백질"이란, 리스테리아(Listeria) 균주에서 발현되는 LRR 패밀리 단백질의 일종을 의미하는데, 다른 소수성 코어가 전 분자에 걸쳐서 일정하게 분포되어 있는 다른 LRR 패밀리 단백질들과는 다른 유형의 N-말단 구조 때문에 미생물에서도 안정적으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 이러한 인터날린 단백질의 N-말단은 반복 모듈의 접힘 (Folding)에 가장 중요한 N-말단 부위가 미생물 유래일 뿐 아니라 그 형태가 알파 나선을 포함하는 더욱 안정적인 구조를 포함하므로, 미생물에서 LRR 패밀리 단백질들의 안정적인 발현을 위하여 효과적으로 사용될 수 있다.

[47] 본 발명의 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-말단은 제한 없이 포함되나, 그 예로 알파 나선형 캡핑 모티프인 "ETITVSTPIKQIFPDDAFAETIKANLKKKSVTDAVTQNE" 및 반복 모듈을 포함할 수 있다. 바람직하게 반복 모듈 패턴은 "LxxLxxLxLxxN"을 포함할 수 있다. 상기 반복 모듈 패턴 중 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판; N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌, x는 친수성 아미노산을 의미한다. 인터날린 단백질의 N-말단은 융합될 수 있는 LRR 패밀리 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.

[48] 본 발명의 용어 "가변 림프구 수용체(VLR)"란, 먹장어와 칠성 장어에서 발현되는 LRR 패밀리 단백질의 일종을 의미하는데, 먹장어와 칠성 장어에서

면역 기능을 수행하는 단백질로서 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 신규한 단백질 치료제의 제조에 사용될 수 있다.

[49] 본 발명의 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 쓰레오닌을, x는 임의의 의미하며, (iv) LRR 패밀리 단백질은 말발굽과 같은 삼차원 구조를 갖는 구조를 갖고 있는 단백질을 의미한다. 본 발명의 LRR 패밀리 단백질은 이미 그 서열이 알려져 있거나, 생체에서 새로 유도된 mRNA나 cDNA를 이용하여 찾아낸 것 뿐 아니라, 컨센서스 디자인 (Consensus design) 등의 설계를 통하여 자연계에 알려지지 않은 서열을 가지면서 반복모듈의 골격 구조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

[50] 본 발명의 용어 "리피바디"란, LRR 구조를 갖는 상기 인터날린의 N-말단과 상기 VLR의 구조의 유사성을 바탕으로 융합하여 컨센서스 디자인으로 최적화시킨 폴리 폴리펩타이드이다. 리피바디 단백질은 구조상 오목한 지역(Concave) 와 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 모든 융합 LRR 패밀리 단백질을 모두 포함할 수 있다.

[51] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물 제공에 관한 것이다.

[52] 본 발명에서 제공하는 상기 폴리뉴클레오티드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 서열번호 1 내지 8중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있고, 상기 폴리뉴클레오티드와 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[53] 본 발명의 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을

암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 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.

[54] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 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.

[55] 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, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 숙주세포는 특별히 제한되는 것이 아니나, 바람직하게는 대장균을 숙주세포로 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 대장균 BL21(DE3), OrigamiB(DE3)를 숙주세포로 사용할 수 있다.

[56] 본 발명에서 용어 "재조합"이란, 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 재조합된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에 발현될 수 있기만 한다면, 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, 리보좀 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

[57] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드의 생산방법에 관한 것이다.

[58] 본 발명에 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, 염기성 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 시간동안 배양함이 바람직하다. 상기 배양에 의하여 생산된 상기 폴리펩타이드는 배지중으로 분비되거나 세포내에 잔류할 수 있다.

[59] 본 발명에서, 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 인산이수소칼륨, 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.

[60] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 폴리펩타이드를 회수하는 방법은 배양방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 폴리펩타이드를 수집할 수 있다.

[61] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 면역질환 또는 패혈증 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

[62] 본 발명에 있어서, 상기 면역질환은 천식, 류마티스, 관절염 및 루프스를

포함한다.

[63] 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 치료용 의약 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 포함하는 치료용 의약 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[64] 상기 폴리펩타이드를 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[65]

[66] 제제화할 경우에는 보통 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 폴리펩타이드에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calciumcarbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우리지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 또한, 착색제로서는 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이, 교미교취제로서는 예를 들면 코코아 분말, 박하뇌, 방향산, 박하유, 용뇌, 계피 분말 등이 사용된다. 이들의 정제에는 과립제의 경우 당, 젤라틴, 기타 필요에 따라 적절하게 코팅하는 것을 배제하는 것은 아니다.

[67] 또한, 본 발명의 조성물을 주사제로 조제하는 경우에는 필요에 따라, pH 조정제, 완충제, 안정화제, 보존제 등을 첨가하고, 통상적인 방법에 의해 피하, 근육내, 정맥 주사제로 한다.

[68] 본 발명의 폴리펩타이드 함유 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 5~500mg/kg의 양, 바람직하게는

100~250mg/kg의 양을 1일 1~3회로 나누어 투여할 수 있고, 그 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다

[69]

[70] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[71]

[72] 실시예 1: 무작위적인 파지 라이브러리를 통한 보체 단백질 C5a와 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 선별

[73] 실시예 1-1: 단백질 구조 기반의 리피바디 라이브러리 구축

[74] 리피바디는 자연계에 존재하는 LRR 단백질들과 마찬가지로 보존된 류신 서열을 갖는 반복 단위체(Repeat unit)가 연속적으로 연결되어 전체 단백질 구조를 유지하는 모듈성과 전체 구조의 모양의 곡률로 인한 오목한 지역(Concave region)과 볼록한 지역(Convex region)으로 구별되는 구조적 특징을 갖는다. 또한, 리피바디는 생체 분자를 인식하는 Concave와 구조 유지에 중요한 Convex지역으로 구분된다. 오목한 지역에는 항체의 상보성결정지역(complementarity determining region, CDR)처럼 초가변영역(Hypervariable region)이 위치하여, 단백질-단백질 상호작용을 매개한다. 또한, 볼록한 지역은 잘 보존되어 있는 서열을 바탕으로 LRR의 전체구조의 유지하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 리피바디의 단백질 구조를 분석하여 하기의 같은 방식으로 무작위적인 라이브러리를 설계하였다.

[75] 구체적으로, 설계되지 않은 카르복시말단의 고리구조(C-term loop)에 의한 입체 장해(Steric hinderance)에서 벗어나기 위해 아민기말단 방향에 위치한 연속적인 두개의 변이 모듈(LRRV module 2 와 3)의 오목한 지역에 위치하는 여섯 아미노산 잔기 91, 93, 94, 115, 117, 그리고 118번을 선택하였다. 그런 다음, 상기 선택한 아미노산을 NNK 동의코돈(Degenerate codon)으로 치환하고, 나머지 볼록한 지역의 염기서열을 잠재성 돌연변이(Silent mutation)를 포함하도록 구성하여, 라이브러리를 구축하기 위한 돌연변이 유발프라이머(Mutagenic primer)를 합성하였다.

[76] 이어, 상기 프라이머들을 이용하여 두 모듈에 대한 겹침 중합효소 연쇄반응(Overlap PCR)을 수행하며 라이브러리 DNA를 수득하고, 상기 파지미드 pBEL118M에 삽입하여 최종적인 라이브러리 파지미드를 확보하였다.

[77] 상기 확보된 라이브러리를 전기천공법(electroporation)으로 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 미생물을 수득함으로써, $1.8x10^8$ 수준의 합성적 다양성을 갖는 라이브러리를 구축하였다.

[78]

[79] 실시예 1-2: 리피바디 라이브러리의 패닝 과정을 통한 보체 단백질 C5a와 결합하는 폴리펩타이드 선별

[80] 실시예 1-1에서 구축한 라이브러리를 사용하여 보체 단백질 C5a에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 선별하여 정제하였다. 보체 단백질 C5a와 결합할 수 있는 후보를 선별하기 위하여, 보체 단백질 C5a를 면역튜브 (Immuno-tube)에 100 /의 농도로 가하고, 4 에서 12시간동안 코팅하였다. 상기 코팅된 면역튜브를 PBS로 3회 세척하고, 1% BSA와 0.05 % Tween 20을 포함하는 PBS 용액 (TPBSA)으로 4 에서 2시간동안 블로킹(Blocking) 하였다. 그런 다음, 상기 정제된 파지를 10^{12} cfu/ml의 농도로 상기 코팅된 면역튜브에 가하고, 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 용액 (TPBS)으로 총 2분간 5번씩 및 PBS로 2번 세척하였다. 마지막으로, 1 ml 0.2 M Glycine-HCl (pH 2.2)를 상기 면역튜브에 가하고, 상온에서 13분간 반응시킴으로써, 보체 단백질 C5a와 결합할 수 있는 리피바디 후보를 표면에 발현시킨 파지를 용출시켰다. 상기 용출액에 60 의 1.0 M Tris-HCl (pH 9.0)를 가하여 중화시키고, 숙주세포인 10 ml 대장균 XL1-Blue 용액(OD600 = 0.5)에 가한 다음, 2xYT 플레이트에 도말하는 바이오패닝(Bio-panning) 과정을 동일하게 4회 반복하여 수행하였다. 그 결과, 각 패닝 과정을 통해 보체 단백질 C5a와 특이적으로 결합하는 파지가 농축됨을 확인하였다. 상기 결과는 보체 단백질 C5a와 결합하는 라이브러리 파지가 특이적으로 증가함을 의미하는 것으로 분석되었다.

[81]

[82] 실시예 1-3: 선별된 리피바디의 보체 단백질 C5a에 대한 특이적인 결합여부 확인 및 서열 분석

[83] 실시예 1-2의 방법을 통하여 선별된 파지를 보체 단백질 C5a와 BSA가 코팅된 96-웰 플레이트를 이용하여 ELISA를 수행함으로써, BSA 대비 보체 단백질 C5a의 흡광도(OD450)가 10배 이상 높은 9개의 리피바디 후보들을 선별하고 (도 1), 이들 각각의 아미노산 서열을 확인한 후, 동일한 아미노산 서열을 갖는 클론을 제외 하였다. 그 결과, 상기 선별된 파지에서 총 3 종류의 리피바디 서열을 확인하였으며, 세 종류의 리피바디에 대하여 등온열량측정기를 이용하여 보체 단백질 C5a에 대한 해리상수를 측정한 결과, 클론 G7만이 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다(도 2). G7은 91번 아미노산인 이소류신이 페닐알라닌으로 치환되고, 93번 아미노산인 트레오닌이 아스파라긴산으로 치환되며, 94번 아미노산인 글리신이 페닐알리닌으로 치환되고, 115번 아미노산인 발린이 타이로신으로 치환되고, 117번 아미노산인 발린이 세린으로 치환되며, 118번 아미노산인 글루탐산이 프롤린으로 치환되었음을 확인하였다(서열번호 1).

[84] 상기 결과는 보체 단백질 C5a와 결합하는데 중요한 역할을 수행하는 잔기가 존재함을 의미하는 것으로 분석되었다.

[85]

[86] 실시예 2: 모듈 기반 방법을 이용한 리피바디의 보체 단백질 C5a에 대한 결합력 증대 수행

[87] 본 발명에서 기술된 모듈 기반 친화력 증대 방식은 선행특허(KR2012-0019927)에 따라 수행하였다. 해당 방법은 반복 모듈을 갖는 단백질에 대해 보편적으로 사용할 수 있는 기술로써, 본 특허에서 성공적으로 재현되어 높은 수준의 친화력을 갖는 단백질 설계를 가능하게 하였다.

[88]

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

[90] 실시예 1-3의 결과에서 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 것이 확인된 클론인 G7의 보체 단백질 C5a에 대한 해리상수는 2.8 M이지만(도 2), 자연적으로 존재하는 보체 단백질 C5a 수용체의 보체 단백질 C5a에 대한 해리상수는 1.0 nM 수준이다. 따라서, 본 발명의 리피바디 후보로는 보체 단백질 C5a의 활성을 충분히 억제할 수 없을 것으로 예상되었다.

[91] 이러한 문제점을 해결하고자, 상기 선행특허(KR2012-0019927)에서 사용한 모듈을 이용한 추가적인 라이브러리 구축방법을 이용하여 결합력이 향상된 돌연변이체를 개발하고자 하였다.

[92] 구체적으로, 첫 번째 모듈 기반 친화력 증대를 위한 라이브러리는 LRRV5와 LRRVe 모듈의 총 7개 아미노산 잔기를 돌연변이 시켜(도 4), 총 4번의 패닝과정을 거쳐서 결합력이 증대된 F5(서열번호 2)를 확보하였으며, 등온열량측정기를 이용하여 해리 상수를 측정한 결과, 보체 단백질 C5a에 대해 56 nM의 결합력을 가지는 것을 확인하였다(도 6).

[93] 한편, 더욱 향상된 결합력을 나타내는 돌연변이체를 개발하기 위해서 F5를 기본 폴리펩타이드로 하여 LRRV4 모듈의 네 개의 잔기를 돌연변이 시킨 후(도 7), 동일한 패닝과정을 거쳐, E8(서열번호 6)을 선별하였으며, 등온열량측정기를 이용하여 해리 상수를 측정한 결과, 보체 단백질 C5a에 대해 1.9 nM의 결합력을 가지는 것을 확인하였다(도 9). 이는 기본 폴리펩타이드로 사용한 F5와 비교했을 때 약 29배 향상된 결과이다.

[94] 세 번째 친화력 증대 과정에서는 E8을 기반으로 LRR1과 LRRV1 모듈의 총 네 개의 잔기에 라이브러리르 구축한 결과(도 10), D5라는 클론을 선별하였다(서열번호 7). 보체 단백질 C5a에 대한 결합력을 등온열량측정기로 확인한 결과(도 12), 최종 클론인 D5의 보체 단백질 C5a에 대한 해리상수가 73 pM로 매우 강하게 결합할 수 있음을 확인하고 최종적인 클론으로 확보하였다.

[95]

[96] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은, 자연적으로 존재하는 보체 단백질 C5a의 수용체보다 높은 결합력을 갖는 리피바디를 성공적으로 확보하였으며, 이는 보체 단백질 C5a에 특이적인 결합력을 갖는 폴리펩타이드임을 확인하였다.

[97]

[98] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의

통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 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.

[99]

산업상 이용가능성

[100] 본 발명의 폴리펩타이드는 자연계에 존재하는 보체 단백질 C5a 수용체보다도 높은 친화력으로 보체 단백질 C5a에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로, 보체 단백질 C5a 관련 질환의 예방 또는 치료용 제제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[101]

서열목록 Free Text

[102] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1] 인터날린 B 단백질의 N-말단, VLR (Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합된, 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 8 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩타이드.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 보체 단백질 C5a에 결합하여 그의 활성을 저해하는 것인 폴리펩타이드.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 VLR 단백질의 변형된 반복모듈은 하기의 반복 모듈 패턴을 포함하는 폴리펩타이드:

(a) LxxLxxLxLxxN 패턴에서, L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이고;

(b) LxxLxxLxLxxN 패턴에서, N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며; 및

(c) LxxLxxLxLxxN 패턴에서, x는 모든 종류의 20개의 아미노산.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 비 항체 단백질 골격인 리피바디로 구성되는 폴리펩타이드.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 리피바디는 LRR 구조를 갖는 인터날린의 N-말단과 상기 VLR 구조의 유사성을 바탕으로 융합하여 컨세서스 디자인으로 최적화시킨 폴리펩타이드.

[청구항 7] 제1항의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 8] 제7항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

[청구항 9] 제7항의 폴리뉴클레오티드 또는 제8항의 재조합 벡터가 도입된 재조합 미생물.

[청구항 10] 다음 단계를 포함하는 보체 단백질 C5a에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드의 생산방법.

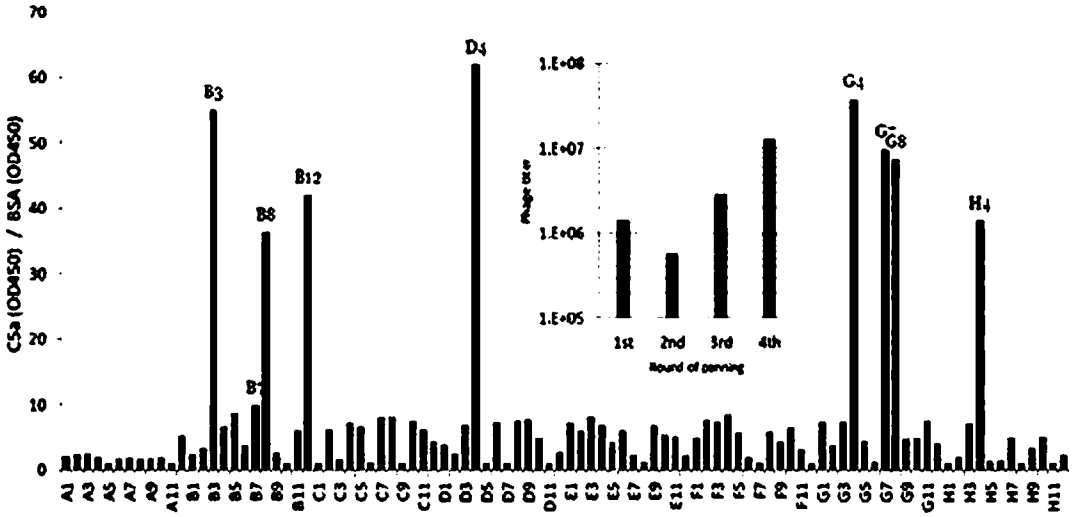
(a) 제9항의 재조합 미생물을 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및

(b) 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 제1항의 폴리펩타이드를 회수하는 단계.

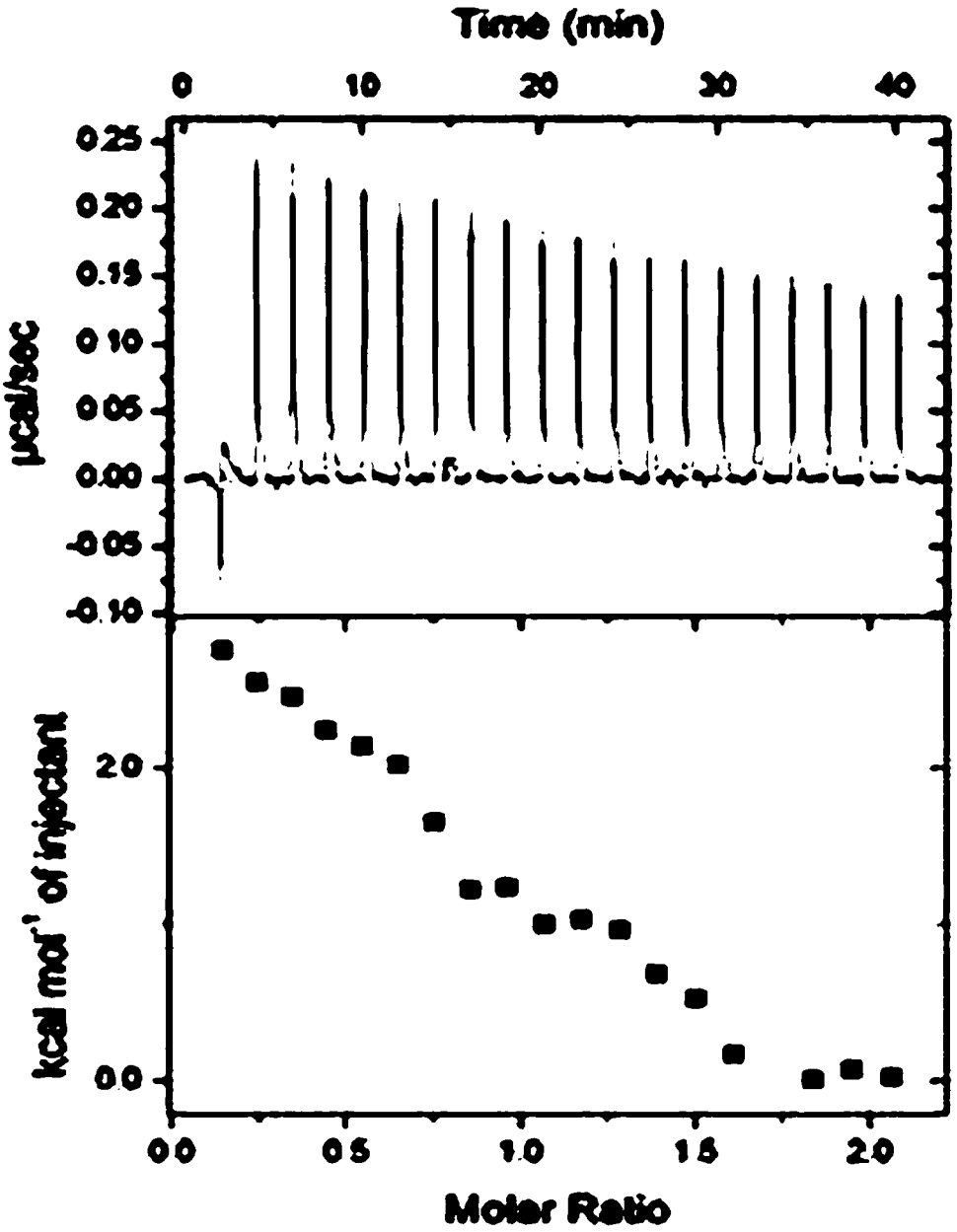
[청구항 11] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 면역질환 또는 패혈증 치료용 의약 조성물.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 면역질환은 천식, 류마티스, 관절염 및 루프스로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

[도1]

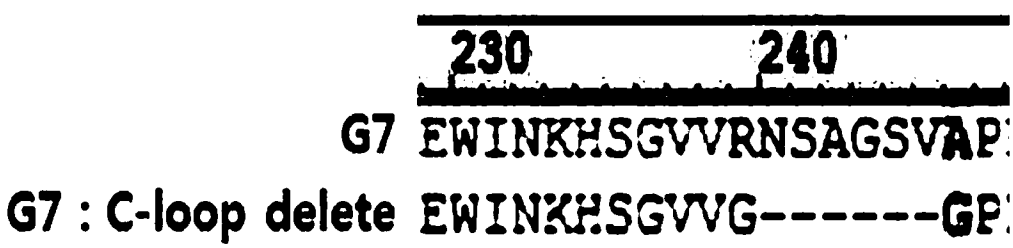

C5a (OD450) / BSA (OD450)
70
60
50
40
30
20
10
0
B3
B8
B12
D4
G4
G8
H4
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1st
2nd
3rd
4th
A1 A2 A5 A7 A9 A11 B1 B3 B5 B7 B9 B11 C1 C3 C5 C7 C9 C11 D1 D3 D5 D7 D9 D11 E1 E3 E5 E7 E9 E11 F1 F3 F5 F7 F9 F11 G1 G3 G5 G7 G9 G11 H1 H3 H5 H7 H9 H11

[도2]

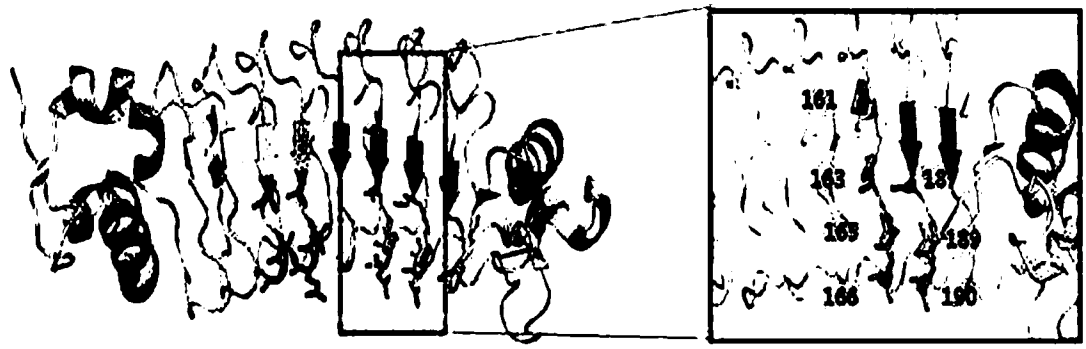

Time (min)
0
10
20
30
40
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-0.10
μcal/sec
2.0
0.0
kcal mol⁻¹ of injectant
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Molar Ratio

G7

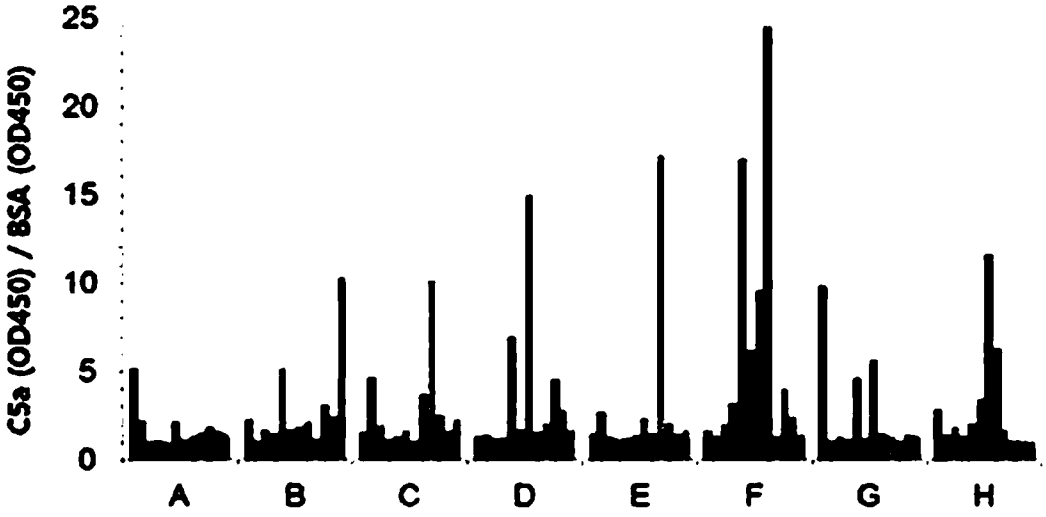
[도3]


230
240
G7 EWINKHSGVVRNSAGSVAP
G7 : C-loop delete EWINKHSGVVG------GP

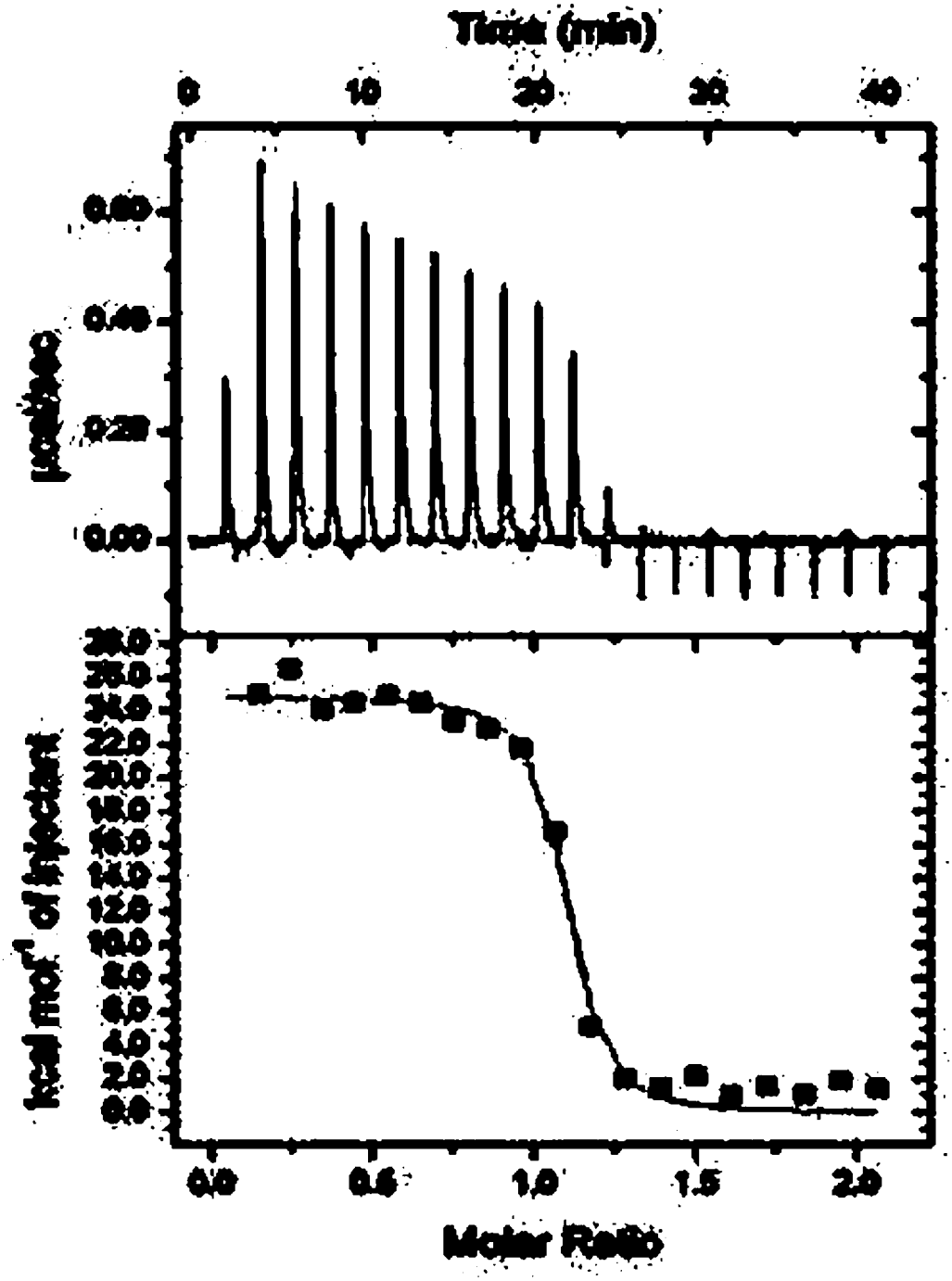
[도4]


161
163
165
166
188
189
190

[도5]

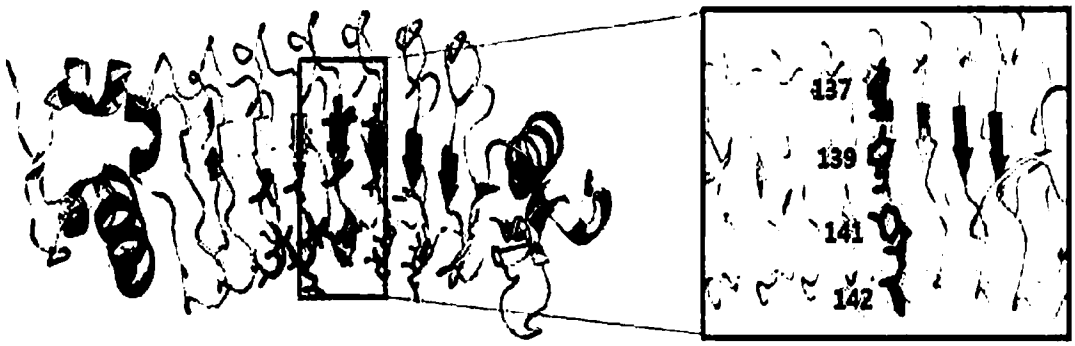

C5a (OD450) / BSA (OD450)
25
20
15
10
5
0
A
B
C
D
E
F
G
H

[도6]

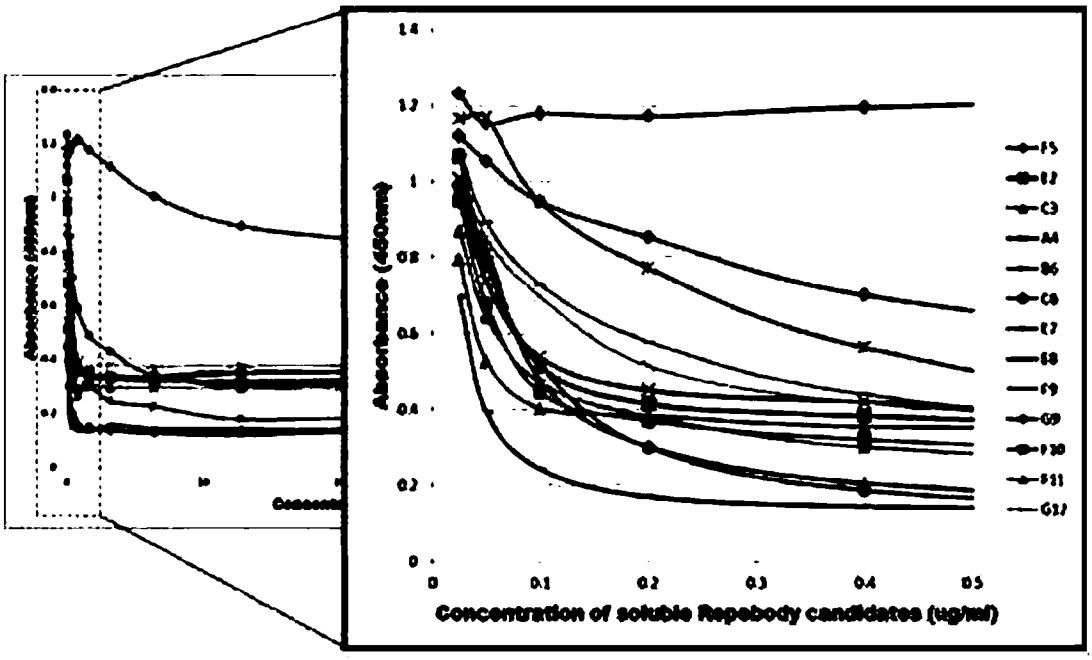

Time (min)
0
10
20
30
40
0.80
0.40
0.20
0.00
kcal mol⁻¹ of injectant
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Molar Ratio

F5

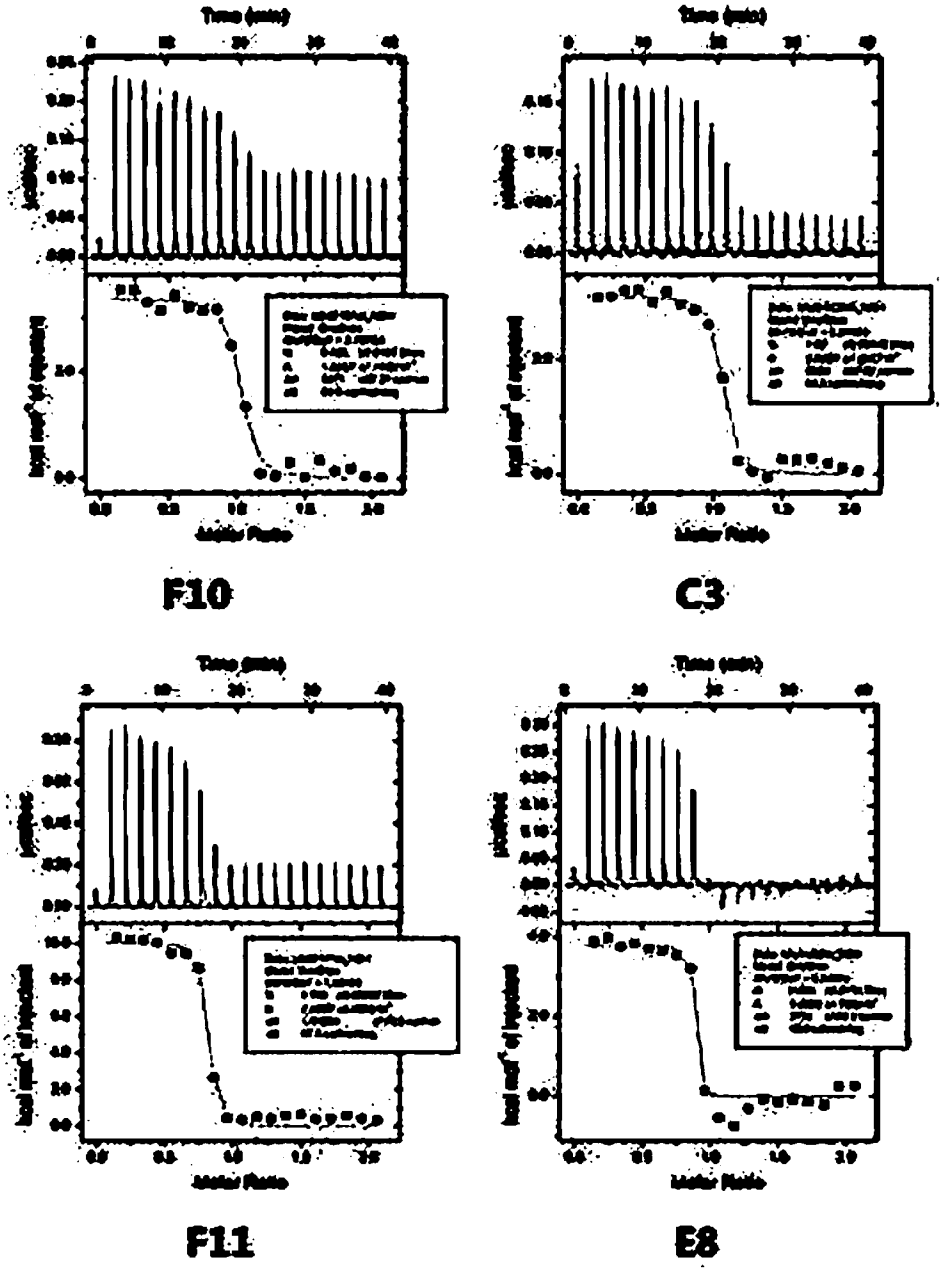
[도7]


137
139
141
142

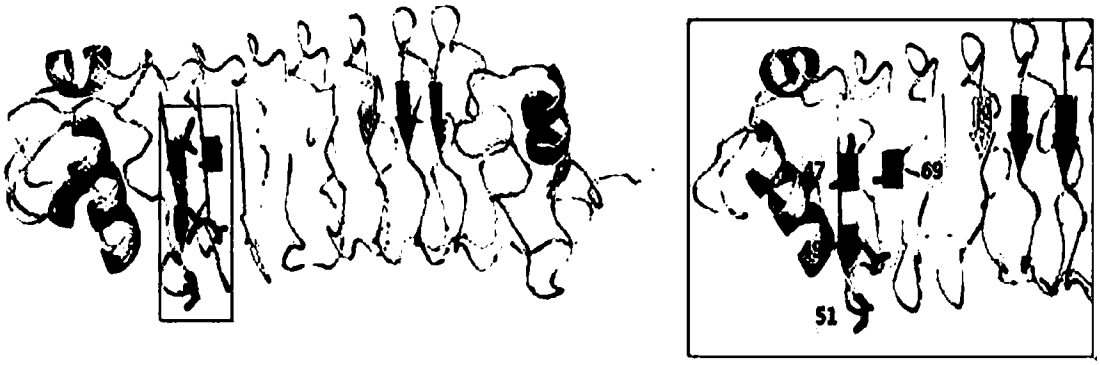
[도8]


Absorbance (450nm)
Concentration of soluble Repebody candidates (ug/ml)

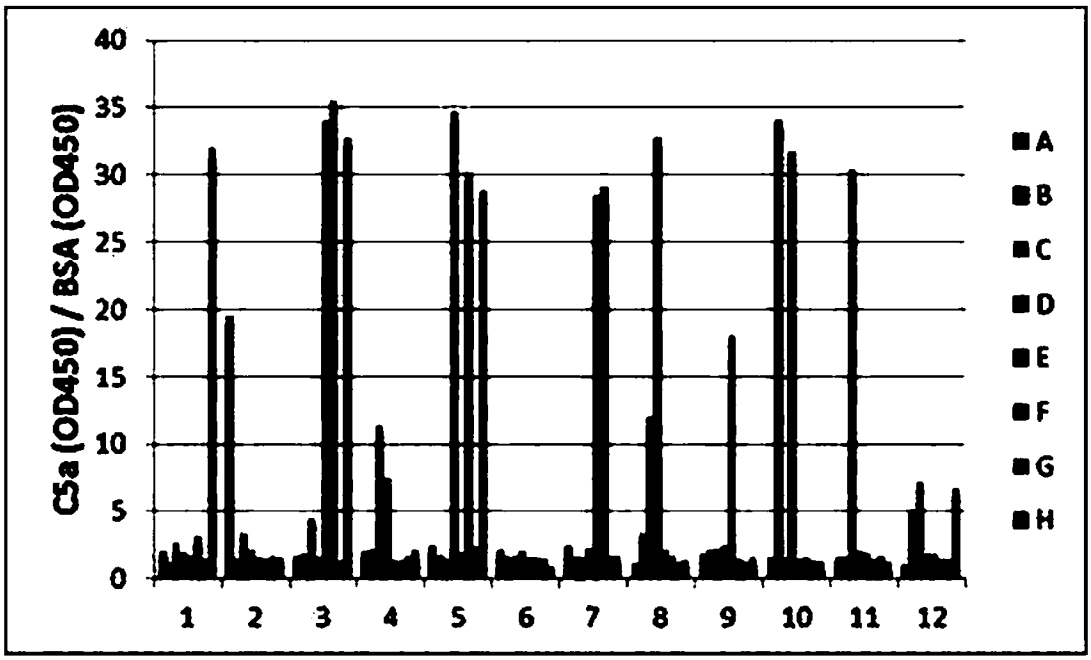
[도9]



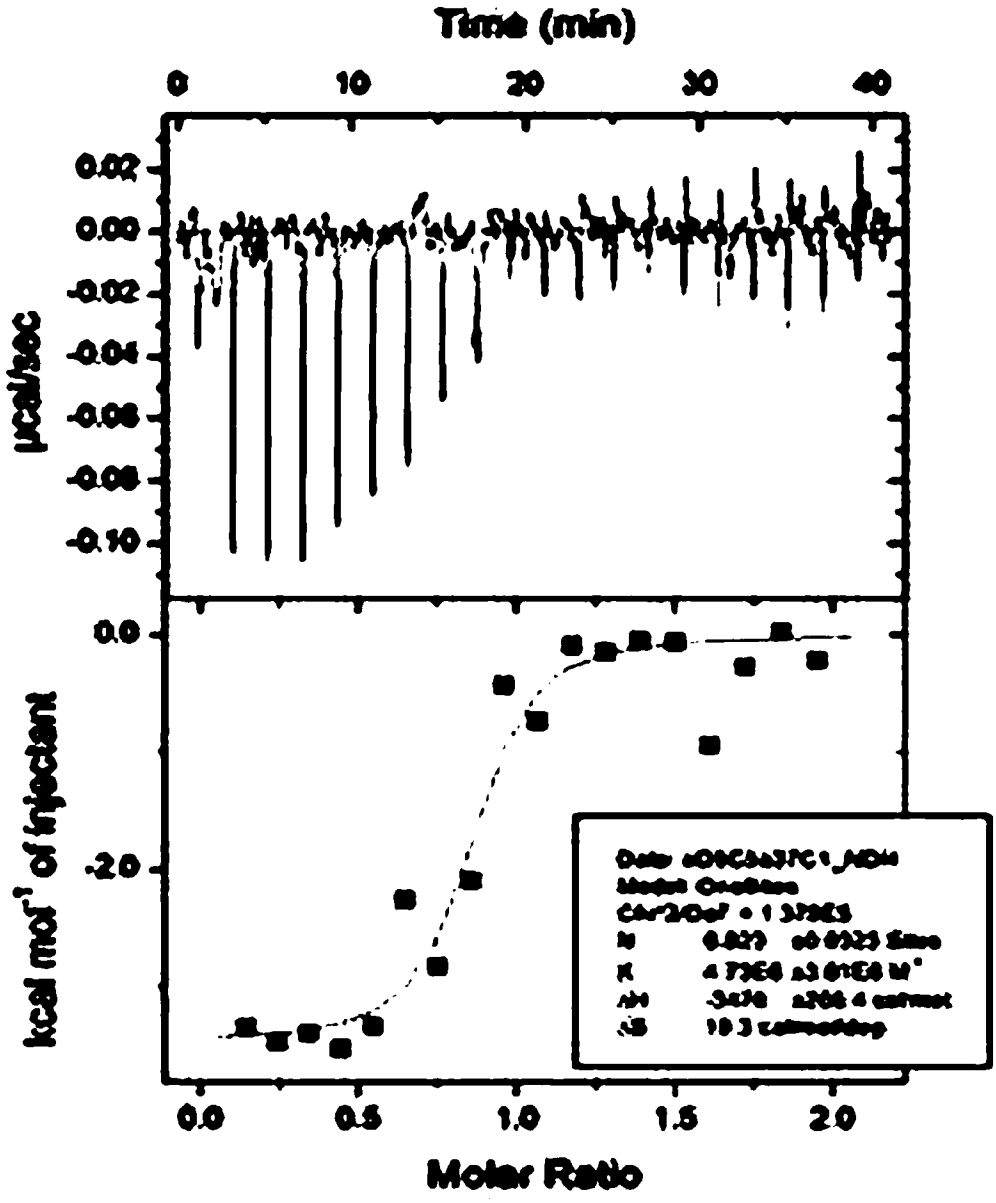
[도10]



[도11]

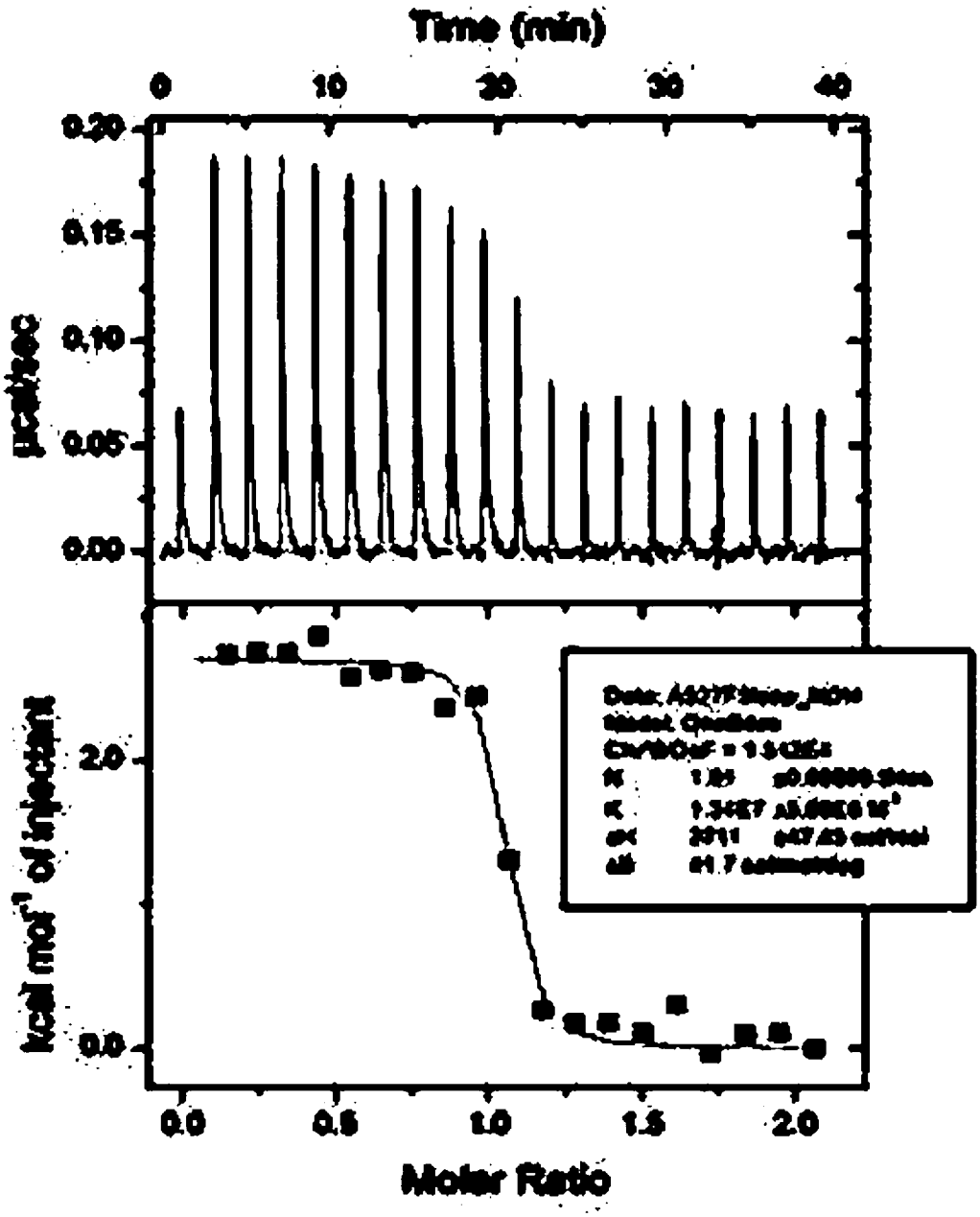

C5a (OD450) / BSA (OD450)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
A
B
C
D
E
F
G
H

[도12]


Time (min)
0
10
20
30
40
0.02
0.00
-0.02
-0.04
-0.06
-0.08
-0.10
µcal/sec
0.0
-2.0
kcal mol⁻¹ of injectant
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Molar Ratio

D5

[도13]



F5 C-loop insertion

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/008094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61P 37/00(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 19/00; A61K 39/395; C12N 15/09; C07K 14/195; C12N 15/62; A61K 38/17; A61P 37/00

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), NCBI database & Keywords: VLR, complement, C5a, internalin, complement, affinity

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 abstract, page 3299 right line, figure 1.	1,4-10
A		2-3,11-12
Y	EP 2647706 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 09 October 2013 See paragraphs [0017], [0038].	1,4-10
A		2-3,11-12
A	KR 10-1356075 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 12 February 2014 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2012-0022453 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 12 March 2012 See the entire document.	1-12

☐ 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
13 NOVEMBER 2015 (13.11.2015)	**13 NOVEMBER 2015 (13.11.2015)**

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/KR2015/008094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
EP 2647706 A1	09/10/2013	AU 2011-233390 B2	20/08/2015
		AU 2011-337704 A1	04/07/2013
		AU 2013-223087 A1	29/08/2013
		AU 2013-268418 A1	05/12/2013
		CA 2794860 A1	06/10/2011
		CA 2819356 A1	07/06/2012
		CA 2827923 A1	30/08/2012
		CA 2831770 A1	04/10/2012
		CA 2850035 A1	04/04/2013
		CA 2850194 A1	04/04/2013
		CA 2857159 A1	06/06/2013
		CA 2865158 A1	29/08/2013
		CA 2874721 A1	05/12/2013
		CN102918057 A	06/02/2013
		CN103328632 A	25/09/2013
		CN103492565 A	01/01/2014
		CN103703129 A	02/04/2014
		CN103958547 A	30/07/2014
		CN103974721 A	06/08/2014
		CN104080909 A	01/10/2014
		CN104244980 A	24/12/2014
		CN104487457 A	01/04/2015
		EP 2552955 A2	06/02/2013
		EP 2647706 A4	22/04/2015
		EP 2679681 A1	01/01/2014
		EP 2698431 A1	19/02/2014
		EP 2760890 A2	06/08/2014
		EP 2762166 A1	06/08/2014
		EP 2787081 A1	08/10/2014
		EP 2818183 A1	31/12/2014
		EP 2857419 A1	08/04/2015
		EP 2857420 A1	08/04/2015
		JP 05-415624B2	12/02/2014
		JP 2013-528354A	11/07/2013
		JP 2014-065708A	17/04/2014
		JP 2014-528906A	30/10/2014
		KR 10-2013-0010002 A	24/01/2013
		KR 10-2013-0121900 A	06/11/2013
		KR 10-2014-0014167 A	05/02/2014
		KR 10-2014-0015501 A	06/02/2014
		KR 10-2014-0069332 A	09/06/2014
		KR 10-2014-0076593 A	20/06/2014
		KR 10-2014-0100532 A	14/08/2014
		KR 10-2014-0130707 A	11/11/2014
		KR 10-2015-0016579 A	12/02/2015
		MX 2013006109 A	31/01/2014
		RU 2013129815 A	10/01/2015
		SG 190727 A1	31/07/2013
		TW 201202419 A	16/01/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/008094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		TW 201249871 A	16/12/2012
		TW 201321412 A	01/06/2013
		TW 201326209 A	01/07/2013
		TW 201343673 A	01/11/2013
		TW 201400503 A	01/01/2014
		US 2013-0131319 A1	23/05/2013
		US 2014-0093496 A1	03/04/2014
		US 2014-0105889 A1	17/04/2014
		US 2014-0234340 A1	21/08/2014
		US 2014-0335089 A1	13/11/2014
		US 2014-0363428 A1	11/12/2014
		US 2015-0056182 A1	26/02/2015
		US 2015-0166654 A1	18/06/2015
		WO 2011-122011 A2	06/10/2011
		WO 2011-122011 A3	05/01/2012
		WO 2012-073992 A1	07/06/2012
		WO 2012-115241 A1	30/08/2012
		WO 2012-132067 A1	04/10/2012
		WO 2012-133782 A1	04/10/2012
		WO 2013-046704 A2	04/04/2013
		WO 2013-046704 A3	23/05/2013
		WO 2013-047752 A1	04/04/2013
		WO 2013-081143 A1	06/06/2013
		WO 2013-125667 A1	29/08/2013
		WO 2013-180200 A1	05/12/2013
		WO 2013-180201 A1	05/12/2013
KR 10-1356075 B1	12/02/2014	KR 10-1517196 B1	04/05/2015
		US 2015-0094450 A1	02/04/2015
		WO 2013-129852 A1	06/09/2013
KR 10-2012-0022453 A	12/03/2012	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/008094

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07K 19/00; A61K 39/395; C12N 15/09; C07K 14/195; C12N 15/62; A61K 38/17; A61P 37/00

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),NCBI database & 키워드: VLR, complement, C5a, internalin, 보체, affinity

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):pp. 3299-3304 (2012. 2.28.) 요약, 페이지3299 우열, 그림 1 참조.	1,4-10
A		2-3,11-12
Y	EP 2647706 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2013.10.09 식별번호 17, 38 참조.	1,4-10
A		2-3,11-12
A	KR 10-1356075 B1 (한국과학기술원) 2014.02.12 전체문헌 참조.	1-12
A	KR 10-2012-0022453 A (한국과학기술원 등) 2012.03.12 전체문헌 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2015년 11월 13일 (13.11.2015)	2015년 11월 13일 (13.11.2015)

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

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/008094

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:

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/008094

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
EP 2647706 A1	2013/10/09	AU 2011-233390 B2	2015/08/20
		AU 2011-337704 A1	2013/07/04
		AU 2013-223087 A1	2013/08/29
		AU 2013-268418 A1	2013/12/05
		CA 2794860 A1	2011/10/06
		CA 2819356 A1	2012/06/07
		CA 2827923 A1	2012/08/30
		CA 2831770 A1	2012/10/04
		CA 2850035 A1	2013/04/04
		CA 2850194 A1	2013/04/04
		CA 2857159 A1	2013/06/06
		CA 2865158 A1	2013/08/29
		CA 2874721 A1	2013/12/05
		CN102918057 A	2013/02/06
		CN103328632 A	2013/09/25
		CN103492565 A	2014/01/01
		CN103703129 A	2014/04/02
		CN103958547 A	2014/07/30
		CN103974721 A	2014/08/06
		CN104080909 A	2014/10/01
		CN104244980 A	2014/12/24
		CN104487457 A	2015/04/01
		EP 2552955 A2	2013/02/06
		EP 2647706 A4	2015/04/22
		EP 2679681 A1	2014/01/01
		EP 2698431 A1	2014/02/19
		EP 2760890 A2	2014/08/06
		EP 2762166 A1	2014/08/06
		EP 2787081 A1	2014/10/08
		EP 2818183 A1	2014/12/31
		EP 2857419 A1	2015/04/08
		EP 2857420 A1	2015/04/08
		JP 05-415624B2	2014/02/12
		JP 2013-528354A	2013/07/11
		JP 2014-065708A	2014/04/17
		JP 2014-528906A	2014/10/30
		KR 10-2013-0010002 A	2013/01/24
		KR 10-2013-0121900 A	2013/11/06
		KR 10-2014-0014167 A	2014/02/05
		KR 10-2014-0015501 A	2014/02/06
		KR 10-2014-0069332 A	2014/06/09
		KR 10-2014-0076593 A	2014/06/20
		KR 10-2014-0100532 A	2014/08/14
		KR 10-2014-0130707 A	2014/11/11
		KR 10-2015-0016579 A	2015/02/12
		MX 2013006109 A	2014/01/31
		RU 2013129815 A	2015/01/10
		SG 190727 A1	2013/07/31
		TW 201202419 A	2012/01/16

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/008094

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		TW 201249871 A	2012/12/16
		TW 201321412 A	2013/06/01
		TW 201326209 A	2013/07/01
		TW 201343673 A	2013/11/01
		TW 201400503 A	2014/01/01
		US 2013-0131319 A1	2013/05/23
		US 2014-0093496 A1	2014/04/03
		US 2014-0105889 A1	2014/04/17
		US 2014-0234340 A1	2014/08/21
		US 2014-0335089 A1	2014/11/13
		US 2014-0363428 A1	2014/12/11
		US 2015-0056182 A1	2015/02/26
		US 2015-0166654 A1	2015/06/18
		WO 2011-122011 A2	2011/10/06
		WO 2011-122011 A3	2012/01/05
		WO 2012-073992 A1	2012/06/07
		WO 2012-115241 A1	2012/08/30
		WO 2012-132067 A1	2012/10/04
		WO 2012-133782 A1	2012/10/04
		WO 2013-046704 A2	2013/04/04
		WO 2013-046704 A3	2013/05/23
		WO 2013-047752 A1	2013/04/04
		WO 2013-081143 A1	2013/06/06
		WO 2013-125667 A1	2013/08/29
		WO 2013-180200 A1	2013/12/05
		WO 2013-180201 A1	2013/12/05
KR 10-1356075 B1	2014/02/12	KR 10-1517196 B1	2015/05/04
		US 2015-0094450 A1	2015/04/02
		WO 2013-129852 A1	2013/09/06
KR 10-2012-0022453 A	2012/03/12	없음	