(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 12 월 22 일 (22.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/204341 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 14/485* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/009710

(22) 국제출원일: 2015 년 9 월 16 일 (16.09.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0087476 2015 년 6 월 19 일 (19.06.2015) 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, Daejeon (KR). **유정현 (RYOU, Jeong Hyun)**; 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, 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.

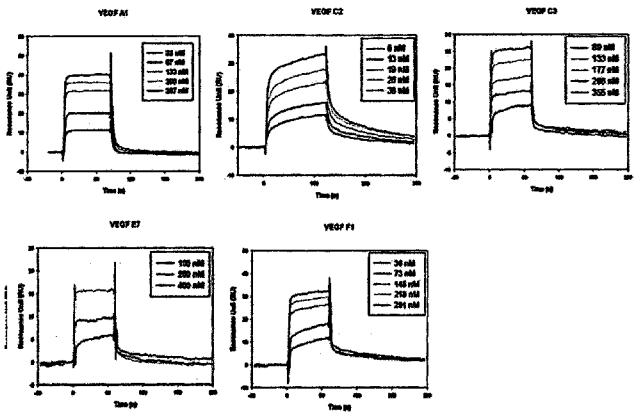
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 CAPABLE OF BINDING TO VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 신규한 혈관내피세포 성장인자와 결합할 수 있는 폴리펩타이드 및 이의 용도

[도3]



Repebody	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
A1	7.88 x 10^5	0.205	260 x 10^{-9}
C2	9.02 x 10^5	9.55 x 10^{-3}	10.6 x 10^{-9}
C3	7.9 x 10^5	0.282	357 x 10^{-9}
E4	N.D.	N.D.	N.D.
E7	1.04 x 10^6	0.281	269 x 10^{-9}
F1	1.31 x 10^6	0.106	80.4 x 10^{-9}

* N.D. = not determined

(57) **Abstract**: The present invention relates to: a novel polypeptide capable of specifically binding to a vascular endothelial growth factor; a polynucleotide coding for the polypeptide; a vector containing the polynucleotide; a recombinant microorganism into which the expression vector is introduced; a method for producing the polypeptide by using the recombinant microorganism; a composition for preventing or treating cancer, containing the polypeptide; and a method for preventing or treating cancer, comprising administering the composition for preventing or treating cancer, containing the polypeptide. The polypeptide of the present invention can bind to the vascular endothelial growth factor so as to inhibit the activity thereof, thereby being widely used as a preparation for preventing or treating various diseases associated with the vascular endothelial growth factor.

(57) **요약서**: 본 발명은 혈관내피세포 성장인자와 특이적으로 결합 가능한 신규한 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 발현벡터가 도입된 재조합 미생물, 상기 재조합 미생물 이용한 상기 폴리펩타이드의 제조방법, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드는 혈관내피세포 성장인자에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로, 혈관내피세포 성장인자와 연관된 다양한 질환의 예방 또는 치료용 제제로 널리 활용될 수 있다.

WO 2016/204341 A1

명세서

발명의 명칭: 신규한 혈관내피세포 성장인자와 결합할 수 있는 폴리펩타이드 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 혈관내피세포 성장인자와 결합할 수 있는 신규한 폴리펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 혈관내피세포 성장인자와 결합하여 그의 활성을 저해할 수 있는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포, 숙주세포 내에서 벡터를 발현시켜서 상기 폴리펩타이드를 생산하는 방법 및 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 또는 노인성 황반변성의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 항체 치료제는 화학제제에 비해 적은 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.

[4] 그러나 항체 치료제는 생산 비용이 비싸고 기존 특허 장벽을 벗어나기 힘들뿐만 아니라 분자량이 커서 세포내 침투가 어렵고 기대만큼 실제 환자의 치료 효과가 높지 않은 문제점이 있기 때문에, 최근 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. 리피바디는 크기가 항체의 1/5 수준이고 대장균에서 대량생산 되며 동물 실험결과 면역원성이 거의 없음을 확인하였다(대한민국 등록특허 제1,517,960호). 또한 열 및 pH 안정성이 매우 우수하고 표적 물질에 대한 결합력을 pico-mole 수준까지 매우 용이하게 증대시킬 수 있으며 표적 물질에 대한 특이성이 매우 탁월함을 입증한 바가 있다(대한민국 등록특허 제1,356,076호, 대한민국 공개특허 제10-2013-0007380호).

[6] 혈관내피세포 성장인자 (Vascular endothelial growth factor; VEGF)는 전이성 결장직장암을 포함한 다양한 암 세포에서 과발현 되어 신생혈관의 생성을 유도함으로써 종양의 성장과 전이를 촉진시키는 질환유발인자이다. VEGF의 과발현은 종양 뿐 아니라 노인성 황반변성 (age-related macular degeneration)과 같은 혈관 관련 질환의 유발인자로 보고되었다. 이렇듯, VEGF의 과발현이

다양한 질환과 관련되어 있어, VEGF를 표적으로 하는 치료제 개발 연구가 활발하게 진행되고 있는 실정이다.

[7] 현재 VEGF를 표적으로 하는 약물로는 항암제인 단클론항체인 베바시주맙 (Bevacizumab)이 있으나, 다른 단클론 항체 신약에 비해 결합력 및 치료효능이 낮은 것으로 보고되고 있다. 이를 극복하고자 화학요법 (Chemotherapy)과 병용하여 사용하는 등 새로운 치료법의 개발 및 신약 개발이 시도되고 있다. 또 다른 VEGF를 표적하는 약물로는 베바시주맙의 개량체인 라니비주맙 (Ranibizumab)이 있으며, 이는 노인성 황반변성의 치료제로 사용되고 있으나, 치료 효능의 한계가 있는 것으로 보고되었다. 따라서, 기존 약물이 가진 한계를 극복한 새로운 개념의 VEGF 표적 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[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 생물학적인 저해효과가 있음을 검증하였으나(대한민국 등록특허 제10-1,517,960호), 이에 대한 응용연구는 아직 시작 단계에 불과하여, 추가적인 연구를 활발히 진행하고 있다.

[9] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 상기 리피바디 골격을 이용하여 다양한 암과 노인성 황반변성의 중요한 표적 단백질인 VEGF에 특이적으로 결합하는 단백질을 성공적으로 확보하기 위해 에의 노력한 결과, 리피바디의 구조적 특징인 모듈성과 전체구조분석을 통해 구축한 무작위한 돌연변이 라이브러리를 바탕으로 VEGF에 대해 특이적인 결합력을 갖는 신규한 폴리펩타이드를 선별하였다. 또한, 단백질복합체 구조를 기본으로 예측한 유익한 돌연변이(beneficial mutation)를 통해 VEGF에 선택적으로 결합하는 신규한 리피바디인 폴리펩타이드를 제조 및 선별하였으며, 상기 리피바디가 VEGF에 선택적으로 결합 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[10]

[11] **발명의 요약**

[12] 본 발명의 목적은 VEGF와 특이적인 결합을 통해 그의 생물학적 활성을 억제할 수 있는 신규한 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물을 이용하여 상기 폴리펩타이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩타이드를 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 폴리펩타이드를 함유하는 암 또는 노인성 황반변성의 치료용 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 노인성 황반변성을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[14]

[15] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 알파 나선형 캡핑 모티프 (capping mofit)를 가지는 LRR (Leucine rich repeat) 패밀리 단백질의 N-말단과

VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합되어 있는 혈관내피세포 정장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열에서 44번, 47번, 49번, 50번, 69번, 71번 및 72번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변이된 것을 특징으로 하는, VEGF에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[16] 본 발명은 또한, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합벡터를 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 재조합벡터가 포함되어 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[18] 본 발명은 또한, 상기 재조합 미생물을 배양하여 상기 폴리펩타이드를 발현시키는 단계 및 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 암 치료용 조성물을 제공한다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 VEGF와 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 선별하기 위하여 무작위적인 라이브러리를 구축한 아미노산 잔기들을 표시한 리피바디(repebody)의 전체 구조를 나타내는 개략도이다.

[22] 도 2는 본 발명에서 구축한 파지 라이브러리를 이용하여, VEGF에 대한 파지 디스플레이의 바이오 패닝을 수행한 결과이다. BSA 대비 VEGF에 대한 효소면역측정법 (ELISA)에 의한 결합 신호를 평균화 (Normalization)를 하였으며, 이때 10배 이상의 신호가 증가한 클론을 VEGF에 대해 특이적인 결합력을 갖는 리피바디 클론으로 정의하였다.

[23] 도 3은 상기 도 2에서 얻어진 특이적인 결합을 하는 클론들의 VEGF에 대한 결합력을 표면 플라스몬 공명 (Surface plasmon resonance; SPR)으로 확인한 실험 결과를 나타내는 도면 및 도표이다.

[24] 도 4는 ELISA를 통해 VEGF에 대한 특이적인 결합여부를 확인한 결과이다. 모든 클론이 BSA에는 결합하지 않지만 VEGF에 대해서는 특이적으로 결합함을 확인할 수 있다. 이때, 경쟁자로 넣어준 항 VEGF 단클론항체인 베바시주맙 (Bevacizumab)로 인해 VEGF의 ELISA 신호가 감소한 것으로 보아 모든 클론이 베바시주맙과 유사한 항원결정부위 (epitope)를 갖는다고 추정할 수 있다.

[25] 도 5는 결합력을 증대시키기 위해 위치 지정 돌연변이를 수행하여 결합력이 증대된 클론들의 VEGF에 대한 결합력을 표면 플라스몬 공명으로 확인한 실험 결과를 나타내는 도면 및 도표이다.

[26] 도 6은 황반변성 마우스모델에 VEGF에 결합하는 폴리펩타이드 C2 (서열번호 4)와 대조군 (PBS)를 안구 내 주사로 처리한 후, 신생혈관 형성의 차이를 비교함으로써 C2의 치료효능을 검증한 실험 결과이다.

[27]

[28] **발명의 상세한 설명 및 바람직한** 구현예

[29] 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.

[30]

[31] 본 발명의 용어 "혈관내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor)"는 신호 전달 단백질로, 내피 세포의 성장, 증식 및 이동에 관여함으로써 혈관 신생 및 혈관투과성 증가에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세포 내에서 VEGF의 과발현은 과도한 혈관 신생 및 혈관투과성 증가를 유발하며, 이러한 현상은 결장직장암, 유방암, 폐암 그리고 노인성 황반변성 등 다양한 암과 혈관 질환에서 발견되고 있다.

[32] 본 발명자들은 혈관내피세포 성장인자(VEGF)와 선택적으로 결합하여 그를 효과적으로 고정화 또는 정제할 수 있는 신규한 폴리펩타이드(리피바디)를 개발하기 위하여, 알파 나선형 캡핑 모티프 (capping mofit)를 가지는 LRR (Leucine rich repeat) 패밀리 단백질의 N-말단과 가변림프구 수용체 (VLR; Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합된, 폴리펩타이드의 반복 모듈을 무작위적으로 포함하는 라이브러리를 구축하였다(도 1). 상기 라이브러리에 포함된 폴리펩타이드는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 코딩되거나 또는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열과 75%, 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 코딩될 수 있다.

[33] 또한, 상기 라이브러리는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 파지미드의 형태가 될 수 있다. 본 발명의 용어 "파지미드"란, 대장균을 숙주로 하는 바이러스인 파지로 부터 유래된 원형의 폴리뉴클레오타이드 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, 숙주 세포를

선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수도 있다. 본 발명의 목적상 상기 파지미드는 상기 라이브러리를 구성하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드르를 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 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명자의 선행 특허 (대한민국 등록특허 제1,346,075호)에 기술된 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[34] 본 발명자들은 상기 파지미드를 포함하는 라이브러리를 이용한 파지 디스플레이 방법을 사용하여, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열에서 47번, 49번, 50번, 69번, 71번 및 72번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변이되어, VEGF에 대한 결합력이 우수한 리피바디 형태의 신규한 폴리펩타이드(서열번호 3 내지 8)를 선별하고(도 2), 선별된 폴리펩타이드의 결합력을 측정하였으며(도 3), 상기 폴리펩타이드들이 혈관내피세포 성장인자에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다(도 4).

[35] 이후, 결합력을 증대시키기 위하여 상기 폴리펩타이드의 44번 아미노산에 위치지정 돌연변이(site directed mutagenesis)를 수행한 결과, 혈관내피세포 성장인자에 대한 결합력이 획기적으로 증가한 신규한 폴리펩타이드(서열번호 9 내지 10)를 선별하였다(도 5).

[36] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 알파 나선형 캡핑 모티프 (capping mofit)를 가지는 LRR (Leucine rich repeat) 패밀리 단백질의 N-말단과 VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합되어 있는 혈관내피세포 정장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열에서 44번, 47번, 49번, 50번, 69번, 71번 및 72번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변이된 것을 특징으로 하는, VEGF에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[37] 본 발명에 있어서, 상기 알파 나선형 캡핑 모티프 (capping mofit)를 가지는 LRR 패밀리 단백질의 N-말단은 인터날린 단백질의 N-말단인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 인터날린 단백질은 바람직하게는 인터날린 A, 인터날린 B, 인터날린 C, 인터날린 H 및 인터날린 J로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인터날린 B 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.

[38] 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.

[39] 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.

[40] 본 발명의 용어 "가변 림프구 수용체 (Variable Lymphocyte Receptor, 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.

[41] 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 모든 종류의 20가지의 아미노산을 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 것뿐 아니라, 컨센서스 디자인 (Consensus design) 등의 설계를 통하여 자연계에 알려지지 않은 서열을 가지면서 반복모듈의 골격 구조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

[42] 본 발명의 용어 "리피바디 (Repebody)"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. 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.

[43] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[44] 본 발명에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 혈중내피세포 성장인자(VEGF)에 결합하여 그의 활성을 저해하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[45]

[46] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

[47] 본 발명에서 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 서열번호 3 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 될 수 있고, 상기 폴리뉴클레오타이드와 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가지는 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[48]

[49] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[50] 본 발명의 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 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.

[51] 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, λMBL3, λMBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, 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.

[52]

[53] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물에 관한 것이다.

[54] 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 숙주 세포로 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 대장균 BL21(DE3), OrigamiB(DE3)를 숙주 세포로 사용할 수 있다.

[55] 본 발명에서 용어 "형질전환"이란, 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오타이드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질 전환된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내에 발현될 수 있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하든지 상관없이 이들 모두를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오타이드는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (Expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오타이드에 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 폴리뉴클레오타이드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

[56]

[57] 본 발명은 다른 관점에서, (i) 상기 재조합 미생물을 배양하여 상기 폴리펩타이드를 발현시키는 단계; 및 (ii) 상기 배양된 재조합 미생물 또는

배양물로부터 상기 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 폴리펩타이드의 제조방법에 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 40℃를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간동안 배양함이 바람직하다. 상기 배양에 의하여 생산된 상기 폴리펩타이드는 배지중으로 분비되거나 세포내에 잔류할 수 있다.

[59] 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 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]

[62] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[63] 본 발명은 또다른 관점에서, 상기 폴리펩타이드를 포함하는 노인성 황반변성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[64] 본 발명에 있어서, 상기 암 예방 또는 치료는 상기 폴리펩타이드가 혈관내피 성장인자와 결합하여 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[65] 본 발명에 있어서, 상기 노인성 황반변성 예방 또는 치료는 상기 폴리펩타이드가 혈관내피 성장인자와 결합하여 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[66] 본 발명에서 용어 "암" 또는 "종양"은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미하는 것이다. 혈관내피세포 성장인자(VEGF)는 종양의 증식을 유도하는 성장 인자인바, 본 발명에서의 암 또는 종양은, 혈관내피세포 정장인자가 과량 분비되는 결장직장암, 대장암, 비소세포폐암, 난소암, 다발성 골수종, 캐슬만씨 병, 간암등을 모두 포함하는 것을 의미한다.

[67] 본 발명에서 용어 "노인성 황반변성"은 눈의 안쪽 망막의 중심부에 위치한 신경조직을 황반이라고 하는데, 시세포의 대부분이 모여 있고, 물체의 상이 맺히며, 망막 중심부에 위치한 신경조직인 황반부에 변성이 일어나 시력장애를 일으키는 질환을 의미한다. 혈관내피세포 성장인자(VEGF)는 망막에서 신생혈관의 생성을 유도하는 성장 인자인바, 본 발명에서의 노인성 황반변성은, 혈관내피세포 정장인자가 과량 분비되어 발생한 모든 종류의 황반변성을 포함하는 것을 의미한다.

[68] 본 발명에서 용어 "치료"란 조성물의 투여로 암이나 황반변성으로부터 야기된 하나 또는 그 이상의 증상을 억제하거나 완화하는 것뿐만 아니라 질환의 증상을 반전시키는 치료 또는 진행을 방지하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어 "예방"이란 조성물의 투여로 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 암 또는 황반변성의 치료는 본 발명에서 확보한 폴리펩타이드가 혈관내피세포 성장인자와 결합하여 이루어지는 것으로, 혈관내피세포 성장인자에 결합하여 그의 활성을 유의하게 억제하여 암 또는 황반변성을 치료하는 것이다.

[69] 본 발명의 선행 특허(대한민국 등록특허, 제1,517,960호)에서는 인터루킨-6와 결합할 수 있는 신규한 리피바디가 비소세포폐암에 대하여 유의미한 항암 작용을 한다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 혈관내피세포 성장인자와 특이적으로 결합하는 리피바디 역시, 혈관내피세포 성장인자의 과발현에 의해 발생하는 암의 예방 또는 치료에도 사용될 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[70] 그러나 아직까지, 리피바디가 황반변성 치료제로서의 효과가 있는지는 전혀 알려진 바가 없다. 이에, 본 발명자들은 발명에 따른 리피바디의 치료 효능을 평가하기 위하여 레이저 광응고화 (laser photocoagulation) 방법으로 황반변성 마우스모델을 구축하였다. 서열번호 4의 폴리펩타이드 C2를 마우스 안구 내로 주사하여 처리하였을 때, 맥락막 신생혈관 생성이 현저하게 감소하는 것을 통해 리피바디의 황반변성 치료제 효능을 검증하였다 (도6).

[71] 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 포함하는 암 또는 황반변성 치료용 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다.

[72] 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, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 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.

[73] 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.

[74] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀젼, 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.

[75] 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.

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

[77] 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.

[78] 본 발명의 치료방법은 본 발명의 암 또는 황반변성의 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 암 또는 황반변성의 예방 또는 치료용 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

[79] 또한, 본 발명의 치료 방법은 혈관내피세포 성장인자의 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.

[80]

[81] 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.

[82]

[83] 실시예 1: 단백질 구조 기반의 리피바디 라이브러리 구축

[84] 리피바디는 자연계에 존재하는 LRR 단백질들과 마찬가지로 보존된 루이신 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. 상기 오목한 지역에는 항체의 상보결정지역 (complementarity determining region; CDR)처럼 초가변영역 (hypervariable region)이 위치하여, 단백질-단백질 상호작용을 매개한다. 또한, 볼록한 지역은 잘 보존되어 있는 서열을 바탕으로 LRR의 전체 구조를 유지하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 리피바디의 단백질 구조를 분석하여 하기의 같은 방식으로 무작위적인 라이브러리를 설계하였다.

[85] 구체적으로, 아민기말단 방향에 위치한 연속적인 두 개의 모듈 (LRR1, LRRV1 module)의 오목한 지역에 위치하는 여섯 아미노산 잔기 47, 49, 50, 69, 71, 그리고

72번을 선택하여 무작위적인 돌연변이 라이브러리를 구축하였으며, 이는 서열번호 2의 아미노산 서열을 바탕으로 한다(도 1).

[86] 그런 다음, 상기 선택한 아미노산을 NNK 동의코돈 (degenerate codon)으로 치환하도록, 라이브러리 구축을 위한 돌연변이 유발 프라이머 (mutagenic primer)를 합성하였다.

[87] 이어, 상기 프라이머들을 이용하여 두 모듈에 대한 겹침 중합효소 연쇄 반응 (overlap PCR)을 수행하며 라이브러리 DNA를 수득하고, 본 발명자의 선행 특허 (대한민국 등록특허 제1,356,075호)에 기술된 서열번호 2의 파지미드 pBEL118M에 삽입하여 최종적인 라이브러리 파지미드를 확보하였다.

[88] 상기 확보된 라이브러리를 전기천공법 (electroporation)으로 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환체를 수득함으로써, $1.0x10^8$ 수준의 다양성을 갖는 라이브러리를 구축하였다.

[89]

[90] 실시예 2: 무작위적인 파지 라이브러리를 통한 VEGF와 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 선별

[91] 실시예 2-1: 리피바디 라이브러리의 패닝 과정을 통한 VEGF와 결합하는 폴리펩타이드 선별

[92] 상기 실시예 1에서 구축한 라이브러리를 사용하여 VEGF에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 선별하여 정제하였다. VEGF와 결합할 수 있는 후보를 선별하기 위하여, VEGF를 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, 1ml의 0.2M Glycine-HCl (pH 2.2)를 상기 면역튜브에 가하고, 상온에서 13분간 반응시킴으로써, VEGF와 결합할 수 있는 리피바디 후보를 표면에 발현시킨 파지를 용출시켰다. 상기 용출액에 60㎕의 1.0M Tris-HCl (pH 9.0)를 가하여 중화시키고, 숙주세포인 10ml 대장균 XL1-Blue 용액 (OD_{600} = 0.5)에 가한 다음, 2xYT 플레이트에 도말하는 바이오패닝 (Bio-panning) 과정을 동일하게 4회 반복하여 수행하였다. 그 결과, 각 패닝 과정을 통해 VEGF와 특이적으로 결합하는 파지가 농축됨을 확인하였다. 상기 결과는 VEGF와 결합하는 라이브러리 파지가 특이적으로 증가함을 의미하는 것으로 분석되었다.

[93]

[94] 실시예 2-2: 선별된 리피바디의 VEGF에 대한 특이적인 결합여부 확인 및 서열 분석

[95] 상기 실시예 2-1의 방법을 통하여 선별된 파지를 VEGF와 BSA가 코팅된 96-웰

플레이트를 이용하여 ELISA를 수행함으로써, BSA 대비 VEGF의 흡광도(OD_{450})가 10배 이상 높은 8개의 리피바디 후보들을 선별하고(도 2), 이들 각각의 아미노산 서열을 확인한 후, 동일한 아미노산 서열을 갖는 클론을 제외 하였다. 그 결과, 상기 선별된 파지에서 총 6 종류의 리피바디 서열을 확인하였으며, 6 종류의 리피바디에 대하여 표면 플라스몬 공명을 이용하여 VEGF에 대한 해리상수를 측정한 결과, 모든 클론이 VEGF에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다(도 3). 즉, 47번 아미노산인 이소루이신이 발린, 루이신, 메티오닌으로 치환되고, 49번 아스파라진이 타이로신, 메티오닌으로 치환되며, 50번 아스파라진이 아르지닌, 글루타민으로 치환되고, 69번 알라닌이 발린, 이소루이신 또는 페닐알라닌으로 치환되며, 71번 글리신이 루이신, 이소루이신 또는 페닐알라닌으로 치환되고, 72번 글리신은 글루타민, 발린 또는 아르지닌으로 치환되었음을 확인하였다.

[96] 상기 결과는 VEGF와 결합하는데 중요한 역할을 수행하는 잔기가 존재함을 의미하는 것으로 분석되었다.

[97]

[98] 실시예 2-3: 선별된 리피바디의 항원결정부위 확인

[99] 상기 실시예 2-1에서 확보한 VEGF에 결합하는 리피바디 중에서 VEGF가 VEGF 수용체 (VEGF receptor)와 상호작용하는 부위에 결합하는 리피바디를 선별하는 것은 매우 중요하다. 현재 항 VEGF 단클론항체는 상기 부위에 결합을 하여 VEGF가 VEGF 수용체와 상호작용하지 못하게 함으로써 VEGF의 활성을 효과적으로 억제하여 높은 치료 효능을 나타내고 있다.

[100] 이러한 배경하에, 상기 실시예 2-1를 통해 얻어진 총 6 종류의 리피바디를 이용하여 ELISA를 수행하였다. 그 결과, 6 종류의 리피바디 모두 BSA에는 결합하지 않으나, VEGF에는 결합하는 특이적인 결합능을 확인하였다(도 4). 또한 VEGF를 코팅한 플레이트에서 수용성 VEGF(soluble VEGF)를 첨가한 결과, ELISA의 신호가 감소됨을 통해서 다시 한 번 수용액 상에서도 선발된 리피바디가 VEGF에 효과적으로 결합함을 확인하였다. 마지막으로, VEGF가 VEGF 수용체와 상호작용하는 부위에 결합하는 것으로 알려진 항 VEGF 단클론항체인 베바시주맙 (Bevacizumab)과의 경쟁적 ELISA를 수행한 결과, 모든 리피바디가 베바시주맙에 의해 결합신호가 감소하는 것으로 확인됨에 따라 6 종류의 리피바디의 항원결정부위가 VEGF가 VEGF 수용체와 상호작용하는 부위임을 확인할 수 있었다(도 4).

[101]

[102] 실시예 3: 위치 지정 돌연변이 수행을 통한 리피바디의 VEGF에 대한 결합력 증대 수행

[103] 상기 실시예 2-1에서 확보한 6 종류의 리피바디 중 클론 C2가 VEGF에 대한 결합력이 10.6nM로 가장 높음을 확인하였다. 현재 치료 목적으로 사용 중인 항 VEGF 단클론항체인 베바시주맙의 VEGF에 대한 결합력은 수 nM 수준으로

알려져 있다. 따라서, 베바시주맙과 동등한 치료 효능을 갖기 위해서 결합력이 향상된 리피바디의 돌연변이체를 개발하고자 하였다.

[104] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 무작위적인 라이브러리를 구축한 6개의 잔기 주변의 잔기들에 위치 지정 돌연변이를 시켰다. 그 결과, 리피바디 A1과 C2의 44번 아미노산인 아스파라긴산이 글리신으로 바뀐 돌연변이체 A1-D44G와 C2-D44G의 결합력이 각각 4.94nM과 7.62nM로 향상되었음을 확인하였다(도 5).

[105]

[106] 실시예 4: 황반변성 마우스모델에 대한 폴리펩타이드의 영향 분석

[107] 황반변성의 맥락막 혈관신생 (choroidal neovascularization; CNV)에 대한 폴리펩타이드의 효과를 확인하기 위하여 레이저 광응고화 (laser photocoagulation)로 마우스의 눈에서 맥락막 혈관신생을 유발하여 황반변성 마우스모델을 구축하였다. 이후 폴리펩타이드 C2 (서열번호 4)를 각각 25 μg과 50 μg을 안구 내 주사하였다. 대조군으로는 PBS를 사용하였다. 안구 내 주사 후 7일 뒤, confocal scanning laser ophthalmoscope를 이용하여 얻은 fluorescein angiography (FA)와 indocyanine green angiography (ICGA) 이미지를 분석하였다. 이때, FA는 망막과 맥락막의 혈관 및 비정상적 신생혈관 생성으로 인한 출혈을 나타내며, ICGA는 맥락막 신생혈관을 나타낸다. FA로 측정된 값 (Leaky area)을 ICGA로 측정된 값 (CNV area)으로 나눠줌으로써 황반변성의 정도를 측정할 수 있다. 그 결과, C2를 처리한 군에서의 Leaky area/CNV area 값이 확연하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 또한 처리한 C2의 양이 증가할수록 Leaky area/CNV area 값이 더욱 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[108] CNV 부피를 구하기 위해, 황반변성 모델 마우스의 안구를 적출하여 혈관내피세포의 마커인 CD31에 결합하는 항체를 이용한 면역조직화학 (immunohistochemistry) 검사를 수행하였다. 그 결과, C2를 처리한 군에서 CNV 부피가 확연히 줄어드는 것을 확인할 수 있으며, 또한 처리한 C2의 양이 증가할수록 CNV 부피가 현저하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[109] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 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.

[110]

산업상 이용가능성

[111] 본 발명의 VEGF에 결합하는 신규한 폴리펩타이드는 VEGF에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있으므로 VEGF와 연관된 다양한 질환의 예방 또는 치료용 제제의 개발에 유용하다.

[112]

서열목록 Free Text

[113] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

[청구항 1] 알파 나선형 캡핑 모티프 (capping mofit)를 가지는 LRR (Leucine rich repeat) 패밀리 단백질의 N-말단과 VLR(Variable Lymphocyte Receptor) 단백질의 변형된 반복모듈 및 VLR 단백질의 C-말단이 융합되어 있는 혈관내피세포 정장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열에서 44번, 47번, 49번, 50번, 69번, 71번 및 72번으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 위치의 아미노산이 변이된 것을 특징으로 하는, 혈관내피세포 성장인자에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 알파 나선형 캡핑 모티프 (capping mofit)를 가지는 LRR 패밀리 단백질의 N-말단은 인터날린 단백질의 N-말단인 것을 특징으로 하는, 혈관내피세포 성장인자에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 인터날린 단백질은 인터날린 A, 인터날린 B, 인터날린 C, 인터날린 H 및 인터날린 J로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 혈관내피세포 성장인자에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 인터날린 단백질은 인터날린 B 단백질인 것을 특징으로 하는, 혈관내피세포 성장인자에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 VLR 단백질의 변형된 반복모듈은 하기의 반복 모듈 패턴을 포함하는 것을 특징으로 하는, 혈관내피세포 성장인자에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드:
LxxLxxLxLxxN
상기 패턴에서,
L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판이고;
N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌이며 및
x는 모든 종류의 20개의 아미노산이다.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 혈관내피세포 성장인자에 선택적으로 결합하는 폴리펩타이드.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 혈관내피세포 성장인자에 결합하여 그의 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

[청구항 8] 제1항의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

[청구항 9] 제8항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

[청구항 10] 제8항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제9항의 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물.

[청구항 11] 다음의 단계를 포함하는 혈관내피세포 성장인자에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드의 제조방법:
(i) 제10항의 재조합 미생물을 배양하여 제1항의 폴리펩타이드를 발현시키는 단계; 및
(ii) 상기 배양된 재조합 미생물 또는 배양물로부터 제1항의 폴리펩타이드를 회수하는 단계.

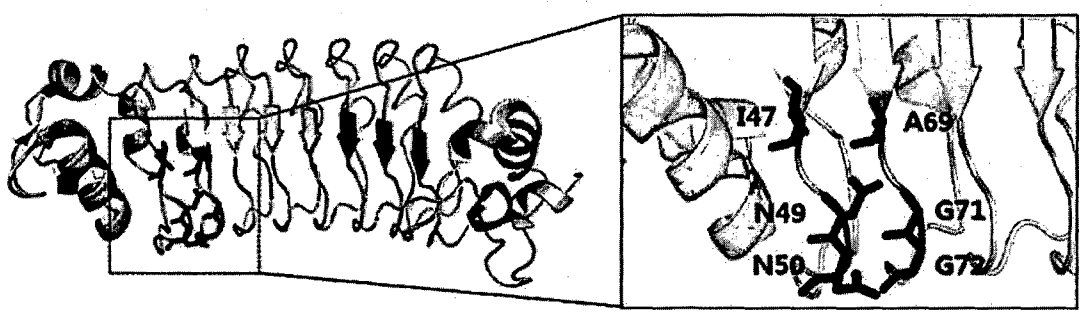
[청구항 12] 제1항 내지 제7항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 암 치료용 조성물.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 암 예방 또는 치료는 상기 폴리펩타이드가 혈관내피 성장인자와 결합하여 이루어지는 것인 암 예방 또는 치료용 조성물.

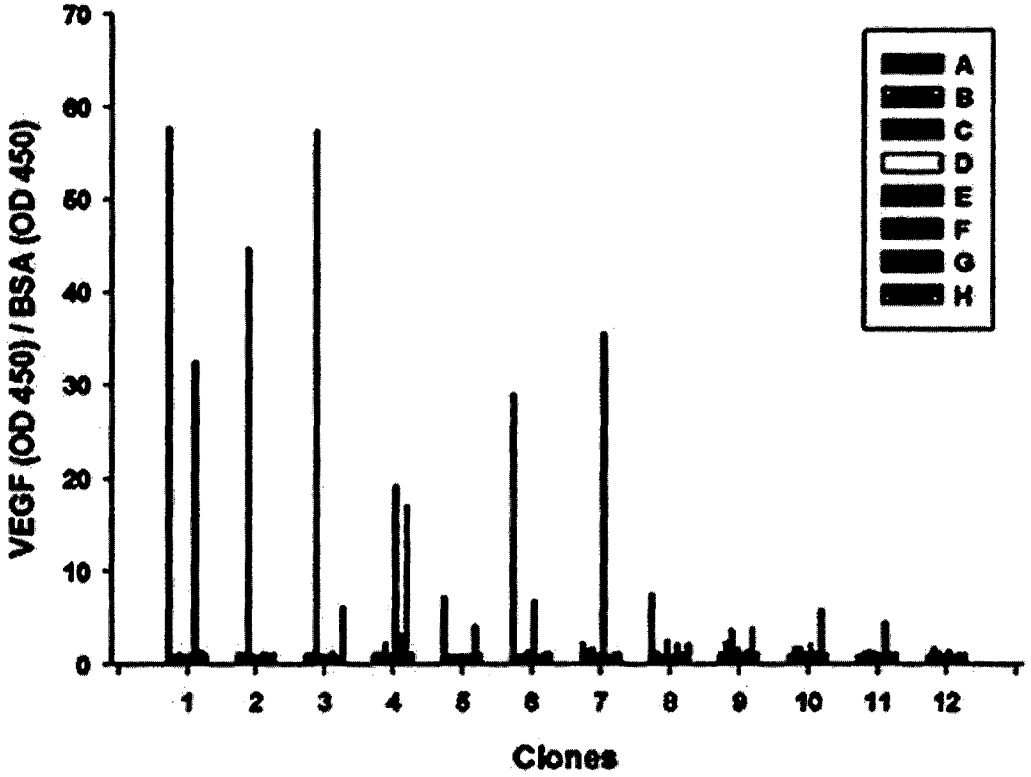
[청구항 14] 제1항 내지 제7항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 노인성 황반변성 예방 또는 노인성 황반변성 치료용 조성물.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 노인성 황반변성 예방 또는 치료는 상기 폴리펩타이드가 혈관내피 성장인자와 결합하여 이루어지는 것인 노인성 황반변성 예방 또는 치료용 조성물.

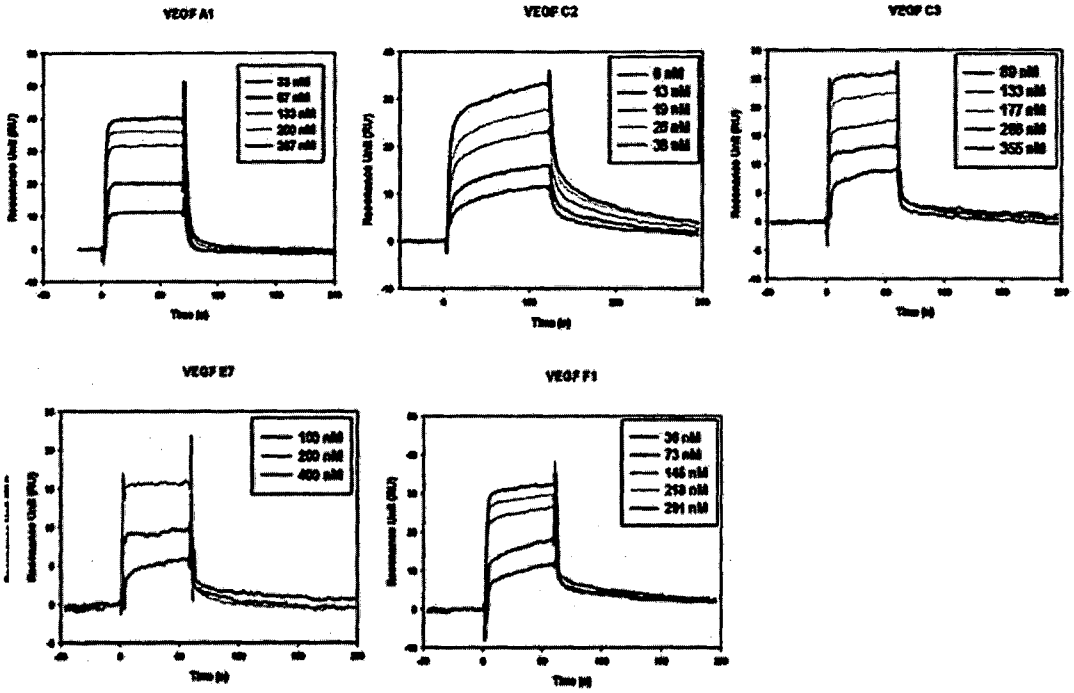
[도1]


I47
A69
N49
G71
N50
G72

[도2]


VEGF (OD 450) / BSA (OD 450)
0
10
20
30
40
50
60
70
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
Clones
A
B
C
D
E
F
G
H

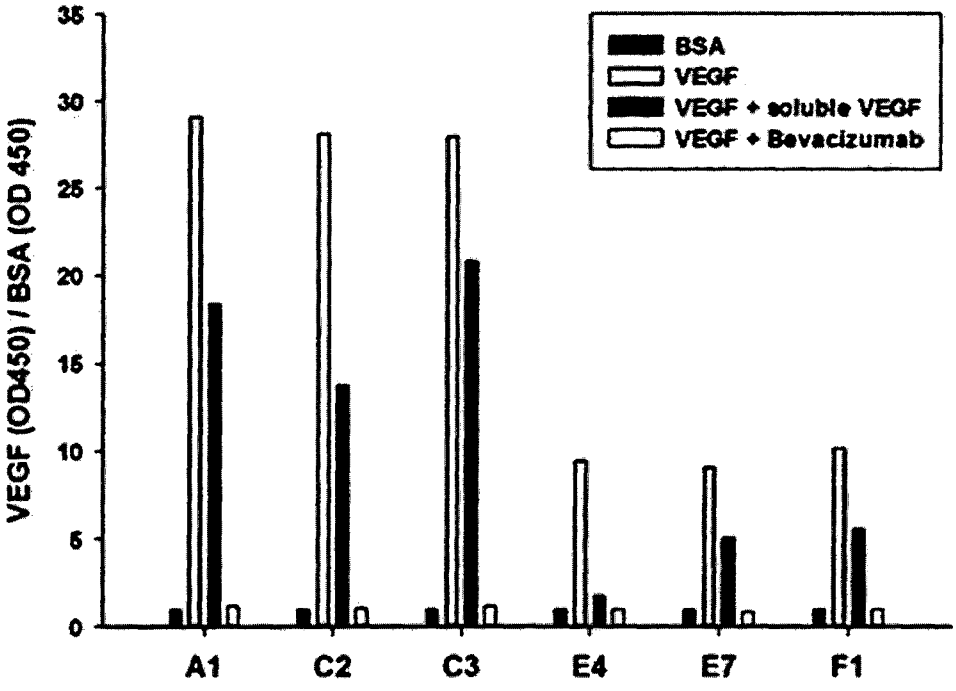
[도3]



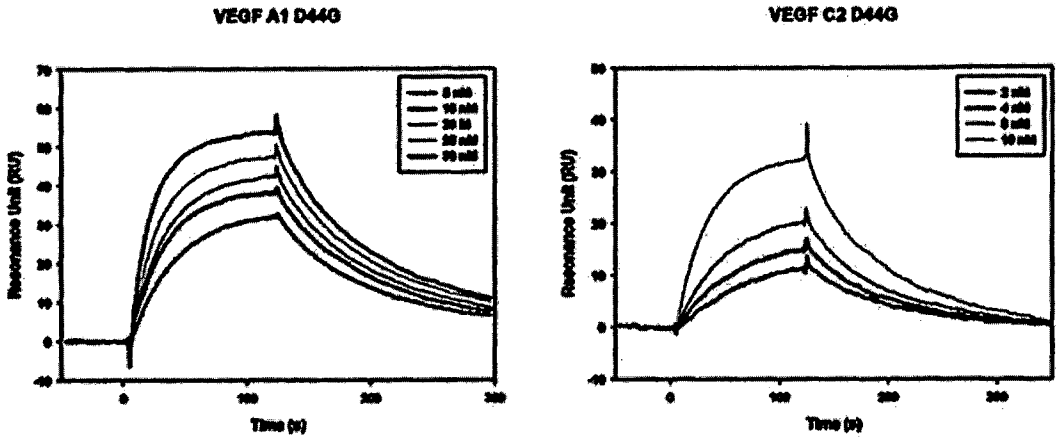
Repebody	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
A1	7.88×10^5	0.205	260×10^{-9}
C2	9.02×10^5	9.55×10^{-3}	10.6×10^{-9}
C3	7.9×10^5	0.282	357×10^{-9}
E4	N.D.	N.D.	N.D.
E7	1.04×10^6	0.281	269×10^{-9}
F1	1.31×10^6	0.106	80.4×10^{-9}

* N.D. = not determined

[도4]

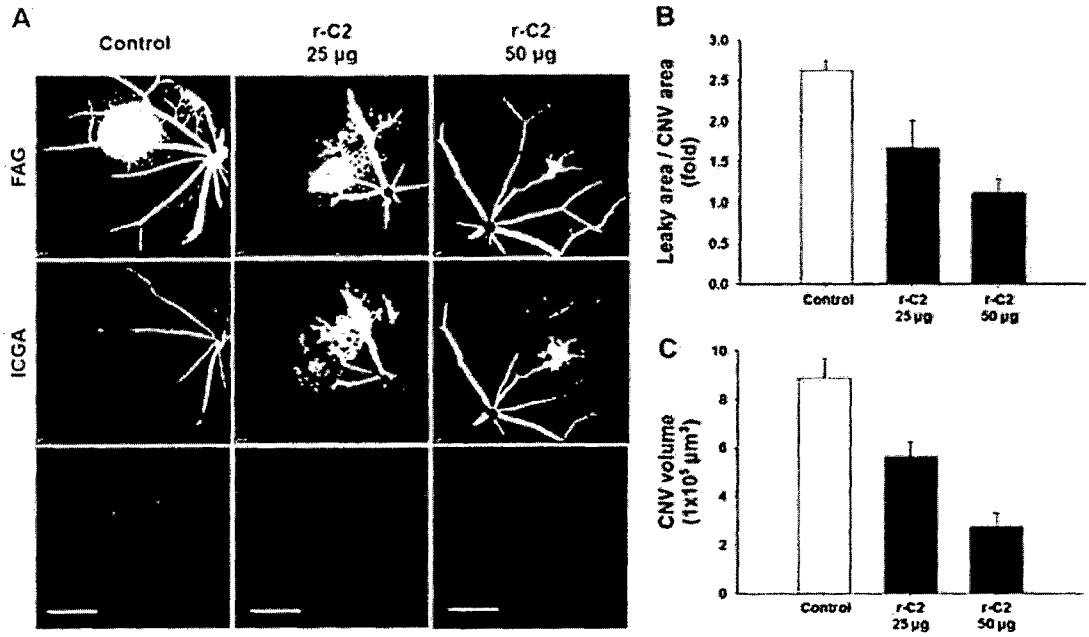


[도5]



Repebody	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
A1-D44G	1.76×10^{6}	8.68×10^{-3}	4.94×10^{-9}
C2-D44G	1.78×10^{6}	0.0135	7.62×10^{-9}

[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/009710

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, C07K 14/485(2006.01)i, C07K 14/195(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 14/47; C07K 19/00; C07K 14/195; C12N 15/62; A61K 38/17; C12N 15/00; A61K 38/16; C07K 14/485

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: repebody, vascular endothelial growth factor (VEGF), internaline, Lueucine rich repeat (LRR), VLR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0098089 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 04 September 2013 See abstract; claims 1-7; paragraphs [0016]-[0022], [0063]; and sequence nos. 11-16, 18-21.	1-5,7-10
A		6
A	KR 10-2011-0099600 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 September 2011 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2014-0094837 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 31 July 2014 See the entire document.	1-10
A	FAN et al., "Decorin derived Antiangiogenic Peptide LRR5 inhibits Endothelial Cell Migration by Interfering with VEGF-stimulated NO Release", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol. 40, pp. 2120-2128 (2008) See the entire document.	1-10
A	US 2009-0082274 A1 (STUMPP et al.) 26 March 2009 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
"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
11 DECEMBER 2015 (11.12.2015)	**14 DECEMBER 2015 (14.12.2015)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/009710

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **13, 15**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 13 and 15 refer to claims violating PCT Rule 6.4(a), and thus the subject matter for which protection is sought is not clearly defined (PCT Article 6).

3. ☒ Claims Nos.: **11, 12, 14**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/009710

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 10-2011-0099600 A	08/09/2011	KR 10-1219628 B1	02/01/2013
KR 10-2014-0094837 A	31/07/2014	KR 10-1356075 B1	12/02/2014
		US 2015-0094450 A1	02/04/2015
		WO 2013-129852 A1	06/09/2013
US 2009-0082274 A1	26/03/2009	AU 2002-18166 A1	22/03/2002
		CA 2421447 A1	14/03/2002
		CA 2421447 C	08/05/2012
		DE 60140474 D1	24/12/2009
		DK 1332209 T3	29/03/2010
		EP 1332209 A2	06/08/2003
		EP 1332209 B1	11/11/2009
		EP 2149604 A1	03/02/2010
		ES 2335861 T3	06/04/2010
		JP 2004-508033 A	18/03/2004
		JP 2013-179942 A	12/09/2013
		JP 5291279 B2	18/09/2013
		US 2004-0132028 A1	08/07/2004
		US 2012-0142611 A1	07/06/2012
		US 2015-275201 A1	01/10/2015
		US 7417130 B2	26/08/2008
		US 8110653 B2	07/02/2012
		US 9006389 B2	14/04/2015
		WO 02-20565 A2	14/03/2002
		WO 02-20565 A3	07/11/2002

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/009710

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/47(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, C07K 14/485(2006.01)i, C07K 14/195(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/47; C07K 19/00; C07K 14/195; C12N 15/62; A61K 38/17; C12N 15/00; A61K 38/16; C07K 14/485

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: 리피바디, 혈관내피세포 성장인자, 인터날린, Lueucine rich repeat(LRR), VLR

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2013-0098089 A (한국과학기술원) 2013.09.04 요약; 청구항 1-7; 문단 [0016]-[0022],[0063]; 및 서열번호 11-16, 18-21 참조.	1-5,7-10
A		6
A	KR 10-2011-0099600 A (한국과학기술원) 2011.09.08 전체 문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2014-0094837 A (한국과학기술원 등) 2014.07.31 전체 문헌 참조.	1-10
A	FAN 등, `Decorin derived antiangiogenic peptide LRR5 inhibits endothelial cell migration by interfering with VEGF-stimulated NO release`, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol.40, pp.2120-2128 (2008) 전체 문헌 참조.	1-10
A	US 2009-0082274 A1 (STUMPP 등) 2009.03.26 전체 문헌 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

"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 12월 11일 (11.12.2015)	2015년 12월 14일 (14.12.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/009710

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: 13, 15
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 13 및 15는 PCT 규칙 6.4(a)를 위반한 항을 인용하고 있어 발명이 보호받고자하는 사항이 명확하지 않습니다 (PCT 제6조).

3. ☒ 청구항: 11, 12, 14
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/009710

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 10-2011-0099600 A	2011/09/08	KR 10-1219628 B1	2013/01/02
KR 10-2014-0094837 A	2014/07/31	KR 10-1356075 B1	2014/02/12
		US 2015-0094450 A1	2015/04/02
		WO 2013-129852 A1	2013/09/06
US 2009-0082274 A1	2009/03/26	AU 2002-18166 A1	2002/03/22
		CA 2421447 A1	2002/03/14
		CA 2421447 C	2012/05/08
		DE 60140474 D1	2009/12/24
		DK 1332209 T3	2010/03/29
		EP 1332209 A2	2003/08/06
		EP 1332209 B1	2009/11/11
		EP 2149604 A1	2010/02/03
		ES 2335861 T3	2010/04/06
		JP 2004-508033 A	2004/03/18
		JP 2013-179942 A	2013/09/12
		JP 5291279 B2	2013/09/18
		US 2004-0132028 A1	2004/07/08
		US 2012-0142611 A1	2012/06/07
		US 2015-275201 A1	2015/10/01
		US 7417130 B2	2008/08/26
		US 8110653 B2	2012/02/07
		US 9006389 B2	2015/04/14
		WO 02-20565 A2	2002/03/14
		WO 02-20565 A3	2002/11/07