

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 21일 (21.09.2017)



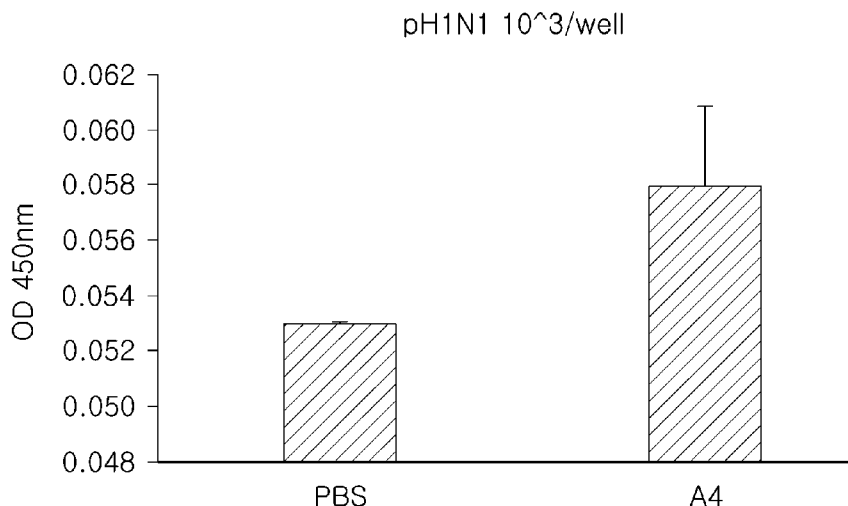
(10) 국제공개번호
WO 2017/159996 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 16/10* (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/001598
- (22) 국제출원일: 2017년 2월 14일 (14.02.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0032979 2016년 3월 18일 (18.03.2016) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 정주연 (JUNG, Juyeon); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 임은경 (LIM, Eun Kyung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김혜란 (KIM, Hye Ran); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정봉현 (CHUNG, Bong Hyun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권정선 (KWON, Jungsun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANTIBODY AGAINST DRUG-RESISTANT INFLUENZA VIRUS

(54) 발명의 명칭: 약물 저항성 인플루엔자 바이러스에 대한 항체



(57) Abstract: The present invention relates to an antibody that can be commonly used in the treatment and detection of influenza A virus which expresses neuraminidase having I223R. The antibody of the present invention specifically binds to influenza A virus expressing neuraminidase which has caused I223R mutation that causes resistance to drugs such as oseltamivir and zanamivir. Since the antibody of the present invention has a high affinity for an antigen, the antibody can be applied to an ex vivo diagnostic kit, and since the antibody is derived from a human and does not induce an immune response, the antibody can be used for purposes of in vivo targeting and treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 I223R을 갖는 뉴라미니다제를 발현하는 인플루엔자 A 바이러스의 치료 및 검출에 범용될 수 있는 항체에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 오셀타미비르, 자나미비르 등의 약물 저항성을 유발하는 I223R 돌연변이를 일으킨 뉴라미니다제를 발현하는 인플루엔자 A 바이러스에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항체는 항원에 대한 친화성이 높아 체외진단 키트에 적용할 수 있으며, 인간 유래로서 면역반응을 유도하지 않아 체내 타겟팅 및 치료 목적으로 활용될 수 있다.

WO 2017/159996 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))

명세서

발명의 명칭: 약물 저항성 인플루엔자 바이러스에 대한 항체 기술분야

- [1] 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항체에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 오셀타미비르, 자나미비르 등의 항바이러스 약물에 대한 저항성을 갖는 돌연변이 인플루엔자 A 바이러스의 치료 및 검출에 범용될 수 있는 항체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인플루엔자(influenza, 독감)는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 의해 사람 및 동물(조류, 돼지, 개, 말 등)의 호흡기를 통해 전파되는 호흡기성 질병이다. 사람 인플루엔자(Human influenza)의 경우 매년 전 세계 10-20% 인구에서 발생하며, 전염성이 높아 매년 세계적 규모로 유행하는 경향이 있다. 인플루엔자의 증상은 고열, 두통, 근육통, 인후의 염증, 통증, 기침 등의 호흡기질환을 수반하며 심한 경우 노약자, 만성질환보유자 등의 사망을 유발할 수 있다.
- [3] 인플루엔자 감염이 의심되면 신속하게 치료하여 위험한 상황이 초래되는 것을 막고 다른 사람들에게 추가적으로 전파되는 것을 방지해야 한다. 현재 인플루엔자 감염의 치료에는 오셀타미비르 포스페이트(타미플루™)가 주로 이용되고 있고, 그 외 자나미비르 등이 개발되어 있는데, 근래에 이러한 항바이러스 약물에 저항성을 나타내는 바이러스 변이주 발생이 증가하고 있다. 바이러스를 구별할 수 있는 방법에 대해서는 다수의 문헌에서 보고된 바 있는데, 예를 들어 Marin MJ *et al.*은 인간 인플루엔자 바이러스와 조류 인플루엔자 바이러스를 구별하는 방법에 대해 개시하고 있다. 그러나 인플루엔자 감염이 의심되는 환자가 항바이러스 약물 저항성 바이러스에 감염되었는지 여부를 확인할 수 있는 효과적인 방법은 현재까지 개발된 바 없다.

- [4] [선행기술문헌]

- [5] Marin MJ *et al.*, Glyconanoparticles for the plasmonic detection and discrimination between human and avian influenza, *Org Biomol Chem.* 2013 Nov 7; 11(41):7101-7

- [6] Jerome LeGoff *et al.*, I223R Mutation in Influenza A(H1N1)pdm09 Neuraminidase Confers Reduced Susceptibility to Oseltamivir and Zanamivir and Enhanced Resistance with H275Y, *PLoS ONE* 7(8): e37095. doi: 10.1371/journal.pone.0037095

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 약물 저항성 돌연변이를 갖는 인플루엔자 A 바이러스의 치료 및 검출에 범용으로 사용할 수 있는 항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [8] 이에, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 캡과
쇄 및 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을
포함하는 항체를 제공한다. 상기 항체에서 서열번호 1 및 서열번호 2에 해당하는
부분 이외의 부분은 임의의 항체의 상응하는 부분(경쇄 가변영역 및 중쇄
가변영역 이외의 부분)이 될 수 있다.
- [9] 인플루엔자 A 바이러스의 뉴라미니다제에서 I223R 돌연변이는
오셀타미비르(Oseltamivir), 자나미비르(Zanamivir) 등의 항바이러스제 약물에
대한 감수성을 감소시키는 것으로 보고되어 있다. 본 발명의 항체는 I223R
돌연변이를 갖는 뉴라미니다제에 선택적으로 결합하고 I223R 돌연변이를 갖지
않는 뉴라미니다제에는 결합력이 현저히 낮아, I223R 돌연변이를 갖는
뉴라미니다제를 발현하는 인플루엔자 A 바이러스를 검출 또는 치료하는 데
적용될 수 있다.
- [10] 본 발명의 항체는 I223R 돌연변이를 갖고, 그 외의 임의의 추가적 돌연변이를
갖는 뉴라미니다제에도 높은 결합력을 나타낸다. 추가적 돌연변이에는 제한이
없으나, 예를 들어 H275Y 돌연변이가 될 수 있다. I223R 돌연변이와 H275Y
돌연변이가 함께 발생한 경우(double mutant) 항바이러스제 약물에 대한
저항성을 크게 증가시키는 것으로 알려져 있다(Jerome LeGoff *et al.*, I223R
Mutation in Influenza A(H1N1)pdm09 Neuraminidase Confers Reduced Susceptibility
to Oseltamivir and Zanamivir and Enhanced Resistance with H275Y, *PLoS ONE* 7(8):
e37095. doi: 10.1371/journal.pone.0037095).
- [11] 한편 기존의 항체는 마우스에서 유래된 항체이거나 또는 마우스에서 유래된
부분을 포함하는 키메라 항체가 많은데, 이러한 항체는 체내에서 항체 자체에
대한 면역을 유도하여 효과가 떨어지거나 부작용을 유발한다는 단점이 있어
적용에 한계가 있었다. 본 발명의 항체는 인간 유래로서, 면역을 유도하지 않아
안전하게 사용할 수 있다.
- [12] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 단리된 핵산
분자를 제공한다. 상기 핵산 분자는 RNA 또는 상기 RNA에 대한 cDNA일 수
있다. 일 구현예로서 상기 핵산 분자는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열일 수
있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [13] 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산
분자가 삽입된 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는
pET28a-Histag-MBP-Histag 벡터에 상기 핵산 분자가 삽입된 것일 수 있다.
그러나 벡터의 종류는 이에 제한되지 않는다.
- [14] 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 단리된 핵산
분자를 제공한다. 상기 핵산 분자는 RNA 또는 상기 RNA에 대한 cDNA일 수
있다. 일 구현예로서 상기 핵산 분자는 서열번호 4로 기재되는 염기서열일 수
있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [15] 본 발명은 상기 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산

- 분자가 삽입된 재조합 벡터를 제공한다.
- [16] 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자가 삽입된 재조합 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 상기 세포는 HEK293T 세포, E.Coli 세포 등이 될 수 있다. 그러나 세포의 종류는 이에 제한되지 않는다.
- [17] 본 발명은 상기 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자가 삽입된 재조합 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.
- [18] 본 발명은 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자 및 상기 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자가 삽입된 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 일 구현예로서 상기 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열일 수 있고, 상기 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자는 서열번호 4로 기재되는 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [19] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 캡과 쇄 및 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체를 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [20] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 0.8 ml 당 5 내지 200 mg의 상기 항체를 포함할 수 있으며, 이를 적절한 용제로 희석하여 투여할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 또한 만니톨, 폴리소르베이트80 등이 조성물 내에 더 포함될 수 있으며, 조성물의 pH를 조절하기 위한 각종 완충액, 예를 들어 아세트산 완충액, 시트르산 완충액, 인산염 완충액 등이 더 포함될 수 있다. 그러나 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 물질은 이에 제한되지 않는다.
- [21] 본 발명의 조성물 및 방법에 있어서, 유효성분의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 1주일에 5 내지 200 mg, 바람직하게는 40 내지 100 mg 투여될 수 있으나, 투여량은 이에 제한되지 않는다. 상기 투여 빈도는 적절히 조정될 수 있으며, 예를 들어 하루에 한 번 또는 여러 번 투여할 수도 있고, 격일 또는 수 일 간격, 매주, 격주, 수 주 간격, 매월, 격월, 또는 수개월 간격으로 투여할 수도 있다.
- [22] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있다. 조성물의 투여 경로는 피하, 피내, 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 경피, 비측내, 흉골내, 흡입, 국소 등이 될 수 있다. 그러나 투여 경로는 이에 제한되지 않는다.
- [23] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호

2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체를 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.

- [24] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 항체를 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 검출용 키트를 제공한다. 상기 키트는 I223R 돌연변이를 포함하는 뉴라미니다제 또는 I223R 돌연변이를 포함하는 뉴라미니다제를 발현하는 인플루엔자 A 바이러스를 검출하는 데 사용할 수 있다. 또한 상기 키트는 사용 지침(instruction) 및 기타 검출에 필요한 도구 또는 장비를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [25] 본 발명은 I223R을 갖는 뉴라미니다제를 발현하는 인플루엔자 A 바이러스의 치료 및 검출에 범용될 수 있는 항체에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 오셀타미비르, 자나미비르 등의 약물 저항성을 유발하는 I223R 돌연변이를 일으킨 뉴라미니다제를 발현하는 인플루엔자 A 바이러스에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항체는 항원에 대한 친화성이 높아 체외진단 키트에 적용할 수 있으며, 인간 유래로서 면역반응을 유도하지 않아 체내 타겟팅 및 치료 목적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1의 상단은 인플루엔자 A H1N1 바이러스의 모식도이며, 도 1의 하단은 야생형 뉴라미니다제와 I223R 및 H275Y 돌연변이가 일어난 뉴라미니다제의 아미노산 서열을 비교한 것이다.
- [27] 도 2는 본 발명의 배클로바이러스 발현 시스템의 모식도이다.
- [28] 도 3은 야생형 뉴라미니다제와 I223R 돌연변이 뉴라미니다제의 웨스턴 블롯 분석 결과이다.
- [29] 도 4는 야생형 뉴라미니다제와 I223R 돌연변이 뉴라미니다제의 NA 활성 시험 결과이다.
- [30] 도 5는 패닝 결과 선별된 NA-A4 항체의 야생형 및 돌연변이 뉴라미니다제, BSA 및 PBS에 대한 ELISA 결과이다.
- [31] 도 6은 NA-A4 항체의 서열번호 1 및 서열번호 2를 나타낸 도이다.
- [32] 도 7은 정제된 NA-A4 항체로 전기영동을 수행한 결과를 나타낸 도이다.
- [33] 도 8은 NA-A4 전항체(whole antibody)의 야생형 및 돌연변이 뉴라미니다제, BSA 및 PBS에 대한 ELISA 결과이다.
- [34] 도 9는 NA-A4 전항체의 NA-A4 전항체(whole antibody)의 야생형 및 돌연변이 뉴라미니다제에 대한 결합능을 ELISA로 확인한 결과이다.
- [35] 도 10은 NA-A4 전항체의 야생형 뉴라미니다제에 대한 K_D 를 SPR로 확인한 결과이다.
- [36] 도 11은 NA-A4 전항체의 돌연변이 뉴라미니다제에 대한 K_D 를 SPR로 확인한

결과이다.

- [37] 도 12는 NA-A4 전항체의 야생형 Influenza A/CA/07/2009 (H1N1) 바이러스에 대한 결합 시험 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [38] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [39] 실시예 1. 약물 저항성 돌연변이를 갖는 인플루엔자 A 바이러스 뉴라미니다제 생산
- [40] 1-1. 야생형 및 돌연변이 뉴라미니다제 생산
- [41] 배큘로바이러스 시스템(Baculovirus System)을 이용하여 약물 저항성 돌연변이(I223R)를 갖는 인플루엔자 A 바이러스 뉴라미니다제를 생산하였다. 배큘로바이러스 시스템은 곤충세포에서 단백질을 발현하는 바이러스 시스템으로서, 배큘로바이러스가 곤충세포에 감염되어 증폭되는 원리를 이용한다.
- [42] 야생형 뉴라미니다제 단백질을 생산을 위한 벡터를 제조하기 위하여, 배큘로바이러스(baculovirus) transfer vector인 pAcGP67a(BD Biosciences)의 GP67A 분비 서열(gp67 signal sequence)과 multicloning site(MCS) 사이에 분리/정제를 위한 태그(hexa histidine), 사합체화 도메인(tetramerization domain), 트롬빈 절단 부위(thrombin cleavage site)(LVPRS residues), 뉴라미니다제 헤드 도메인(neuraminidase head domain)[75-469 a.a, H1N1(A/california/04/2009)] 순으로 construct를 설계하였고 이의 염기서열을 삽입하였다. 특히 자연 상태에서 사합체로 존재하는 뉴라미니다제의 활성을 유지하기 위해, VASP의 사합체화 도메인 서열 (SSSDYSDLQRVKQELLEEVKKELQKVKEEIIIEAFVQELRKRG residues, 서열번호 5)을 이용하였다. 한편 약물 저항성 돌연변이(I223R)를 포함하는 뉴라미니다제 생산을 위한 벡터는 상기 야생형 단백질을 생산을 위한 벡터와 동일한 구조를 갖되 해당 잔기에 돌연변이를 포함하는 방식으로 설계하였다.
- [43] 도 1의 상단은 인플루엔자 A 바이러스의 모식도이며, 도 1의 하단은 야생형 뉴라미니다제 서열 및 I223R 돌연변이, H275Y 돌연변이가 일어난 뉴라미니다제 서열을 비교한 것이다. 본 발명에서는 I223R 돌연변이 바이러스에 대한 항체를 제조하였는데, I223R과 H275Y 돌연변이가 동시에 발생하는 경우도 있으며(double mutant), I223R&H275Y double mutant의 경우 항바이러스제 저항성이 I223R 또는 H275Y 돌연변이 중 어느 하나가 일어난 경우보다 더욱 높아지는 것으로 보고되어 있다.
- [44] 도 2는 본 발명의 배큘로바이러스 발현 시스템의 모식도이다.
- [45] 무혈정 배지 sf900II SFM (Gibco)에서 배양되어 log phase 성장을 갖는 곤충세포

(*Spodoptera frugiperda*, Sf9)를 50% confluent (semi-confluent) monolayer 상태로 준비하였다. Profectin (ABvector) 형질감염 시약을 이용하여 선형화된(linearized) 배컬로바이러스 DNA (Proeasy, ABvector)와 상기 제작한 형질감염 벡터 혼합 DNA (1:1~0.2)를 Sf9에 형질감염 시켰다. Sf9 세포를 28 °C에서 배양하며 배컬로바이러스 증식을 유도하였다. 72시간 배양 후, 세포배양액을 수거하여 야생형 뉴라미니다제와 돌연변이 뉴라미니다제를 발현하는 재조합 배컬로바이러스를 각각 확보하였다. 재조합 바이러스 함량 (titer)을 높이기 위해, log phase 성장의 Sf9 배양액에 상기 재조합 배컬로바이러스 함유 배양액을 일정 비율로 첨가(10~20:1, v:v), 배양하며 바이러스 증식을 유도하였다. 72시간 배양 후, 일정 세포배양액을 취하여 목적단백질인 뉴라미니다제의 발현을 확인하였다.

- [46] 도 3은 His 태그 항체(His tag antibody)를 이용한 웨스턴 블롯 분석 결과인데, 야생형 뉴라미니다제가 약 50 kDa 크기인 반면, 돌연변이 뉴라미니다제는 당화 단백질이므로 약 53 kDa의 분자량을 갖는 것으로 관찰되었다.
- [47] 또한 Sf9 보다 세포 성장이 빠른 곤충세포인 high hive (insect) cell을 무혈청 배지 Express High SFM (Gibco co.)에서 log phase 성장 상태로 준비하였다. 이 세포에 상기에서 확보한 재조합 배컬로바이러스 배양액을 일정비율 (10~20:1, v:v) 첨가하고 세포를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 72시간 배양 후, 4000rpm에서 원심 분리하여 배양액을 수거하여 0.45um pore size membrane을 이용하여 배양액을 여과(filtering)하였다. 재조합 단백질을 정제하기 위해, Ni-NTA agarose로 충전된 컬럼에 여과한 배양액을 로딩하였다. 버퍼 (35mM imidazole, 50mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 5% glycerol pH 7.5)을 컬럼에 로드하여 충분한 워싱을 진행한 후, 0.5M imidazole 함유 버퍼 (50mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 5% glycerol pH 7.5)를 컬럼에 로드하여 Ni-NTA agarose로부터 His 태그를 갖는 재조합 단백질을 용출하였다. 용출 분획을 모은 후 Hi Trap desalting column(GE healthcare)을 이용하여 탈염 및 PBS(phosphate-buffered saline, 5% glycerol 함유)로 버퍼교환을 진행하였다.
- [48] 1-2. 야생형 및 돌연변이 뉴라미니다제의 NA 활성 시험
- [49] NA-Fluor Influenza Neuraminidase assay kit(life technologies cat.4457091)를 이용하여 1-1에서 생산된 야생형 뉴라미니다제(NA WT) 및 돌연변이 뉴라미니다제(NA mutant) 항원의 NA 활성 시험을 진행하였다. 한편 비교를 위하여 H1N1 바이러스의 뉴라미니다제 항원(Sino, cat.11085-V01H)에 대해서도 NA 활성 시험을 진행하였다. 그 결과, 야생형 뉴라미니다제는 높은 NA 활성을 나타내었으나, I223R 돌연변이 뉴라미니다제는 NA 활성이 거의 없는 것으로 나타났다(도 4).
- [50] 실시예 2. 약물 저항성 돌연변이를 갖는 인플루엔자 A 바이러스 뉴라미니다제에 선택적으로 결합하는 항체 선별
- [51] 2-1. 파지 디스플레이 항체 라이브러리(phage-displayed human antibody library)

제조

[52] 하기 방법으로 본 실험실에서 보유하고 있는 인간 항체 라이브러리를 증폭하였다.

[53] 상기 인간 항체 라이브러리를 포함하고 있는 *E.coli* 세포를 OD600=0.6-0.7까지 배양한 후, 헬퍼 파지(helper phage)를 첨가하여 30분간 방치하고(standing) 30분간 진탕(shaking)한 후, 카나마이신(kanamycin)을 첨가하고 밤새 배양하였다. 그 후 증폭된 라이브러리 파지를 배양액으로부터 회수하였다.

[54] 2-2. 바이오패닝(biopanning)

[55] 상기 실시예 1에서 준비한 돌연변이 뉴라미니다제(I223R) 100 µg을 튜브 내에 코팅하고(immunotube), 상기 튜브에 상기 2-1에서 준비한 라이브러리 파지를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 둔 후 0.5% PBST로 10회 세척하였다. 세척 후 남아있는 파지를 0.1 M 글리신-HCl(pH 2.5)로 희석한 후, *E.coli* TG1 변이주에 감염시켜 증폭하였다. 이때 패닝 방법은 동일하게 하고, 패닝 횟수가 증가할 때마다 0.5% PBST로 세척하는 횟수를 10회씩 증가시켰다.

[56] 1차 패닝에서 4차 패닝까지의 유입(input) 및 유출(output) 역가는 하기 표 1과 같다.

[57] [표 1]

패닝 회차		역가
1' 패닝	유입	9.5×10^{12}
	유출	4.18×10^6
2' 패닝	유입	6.9×10^{12}
	유출	1.87×10^6
3' 패닝	유입	8×10^{12}
	유출	5.83×10^7
4' 패닝	유입	8.1×10^{12}
	유출	4×10^7

[59] 2-3. 돌연변이 뉴라미니다제에 특이적인 항체 클론 선별

[60] 3차 및 4차 패닝에서 증폭된 96종의 클론들을 무작위로 선택하여 *E.coli* TG1 변이주에 감염시킨 세포를 약 1000개의 단일 콜로니(single colony)가 되도록 플레이팅(plating)하여 각각의 단일 콜로니를 OD600=0.6-0.7까지 배양한 후 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)로 28°C 유도한 상층액(sup)을 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)가 100ng/well로 코팅되어있는 96 웰 플레이트에 넣고 37°C에서 1시간 둔 뒤, 0.05% PBST로 3번 세척하였다.

[61] 그 다음 ELISA를 수행하였다. 구체적으로, 상기 증폭된 클론을 뉴라미니다제(I223R)가 코팅된 튜브에 첨가하고, 상기 튜브에 1차 항체(Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG (Fab')₂ (HRP), abcam으로부터 구입(cat.ab98535))를 0.05% PBST에 1:3000으로 희석한 후 37°C에서 1시간 동안 결합시키고, 세척한 다음 TMB가 결합된 2차 항체와 반응시킨 후 세척하고, TMB 기질 용액을 첨가하여 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 결합한 클론을 검출하였다. 음성 대조군으로는

BSA를 사용하였다.

- [62] 음성 대조군(negative control)에는 결합하지 않고 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에만 선택적으로 결합하는 1개의 클론을 수득하였다. ELISA 결과 상기 클론이 야생형 뉴라미니다제(WT) 및 음성 대조군(BSA 및 PBS)에는 결합하지 않고 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 선택적으로 결합함을 확인하였다(도 5).
- [63] 상기 클론을 시퀀싱하여 그 중에서 1개의 항체 클론을 선별하였다. 시퀀싱 결과, 1개의 상기 클론의 경쇄 캡과(Kappa) 쇠 서열은 서열번호 1이었고, 중쇄 가변영역 서열은 서열번호 2였다(도 6). 도 6에서 회색 글씨로 표시한 부분은 각각 CDR1, CDR2, 및 CDR3에 해당하는 부분이다.
- [64] 상기와 같이 제조된, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 캡과 쇠 및 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스의 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 인플루엔자 NA-A4 항체(Influenza NA-A4 antibody, 이하 NA-A4 항체)로 명명하였다.
- [65] 실시예 3. 선별된 항체 클론의 전항체화 및 돌연변이 뉴라미니다제에 대한 결합능 및 K_D 값(K_D value) 측정
- [66] 3-1. 항체 클론의 전항체화
- [67] 상기 선별된 클론들을 보다 정밀하게 분석하기 위해 하기 방법에 따라 전항체(whole Ig) 형태로 전환하였다.
- [68] 먼저 Fab 형태의 NA-A4 항체의 경쇄 캡과 쇠를 암호화하는 염기서열(서열번호 3) 및 중쇄 가변영역을 암호화하는 염기서열(서열번호 4)을 중합효소연쇄반응으로 증폭시켰다.
- [69] 증폭된 서열을 1.5% 아가로스 겔 (Cambrex)을 통하여 분리한 다음 정제하였다.
- [70] 이와는 별도로, pdCMV-dhfrC(대한민국 특허 등록번호 제10-0476363호)로부터 중쇄와 경쇄의 리더 시퀀스를 PCR에 의하여 합성하고 분리하고 1.5% 아가로스 겔 (Cambrex)을 통하여 분리한 다음 정제하였다. PCR시 사용한 프라이머의 서열은 하기와 같다.

[71] [표 2]

클론	프라이머	
	정방향	역방향
경쇄 리더 시퀀스	5'-TGCAAAGCTTCGGCAGAGCA-3' (서열번호 6)	5'-TCCTTCAACACCAGACAAC-3' (서열번호 7)
중쇄 리더 시퀀스	5'-GACGAATTCACCTAACCATGGAA-3' (서열번호 8)	5'-GGAGTGGACACCTGTAG-3' (서열번호 9)

- [73] 그 다음 증폭된 pdCMV-dhfrC의 중쇄 리더 시퀀스와 서열번호 2를 암호화하는 핵산 서열을, 경쇄 리더 시퀀스와 서열번호 1을 암호화하는 핵산 서열을 각각 재조합(recombination) PCR을 이용하여 연결시켰다. 중쇄 가변영역과 중쇄의 리더 시퀀스를 연결시키는데 사용한 프라이머는 서열번호 8과 서열번호 9이었고, 경쇄 가변영역과 경쇄의 리더 시퀀스를 연결시키는데 사용한

프라이머는 서열번호 6와 서열번호 7이었다.

[74] 연결된 서열은 1.5% 아가로스 겔 (Cambrex)을 통하여 분리한 다음 정제하고, 중쇄는 제한효소 EcoRI(Roche, 스위스)과 ApaI(Roche, 스위스)으로, 경쇄는 HindIII(Roche, 스위스)와 BsiWI(Roche, 스위스)로 절단하였다. pdCMV-dhfrC 벡터 역시 동일한 제한효소로 절단하고 정제하고, 상기 벡터의 중쇄와 경쇄 불변영역 위쪽에 상기 절단된 중쇄 및 경쇄 서열을 각각 클로닝하였다. 이렇게 하여 제조한 벡터를 동일한 제한효소로 절단하고 정제한 pdCMV-dhfrC 벡터의 중쇄와 경쇄 불변영역 위쪽에 각각 클로닝하고 pdCMV-dhfrC-NA-A4 벡터라 명명하였다.

[75] PEG를 사용하여 상기 pdCMV-dhfrC-NA-A4 벡터로 HEK293T 세포를 형질전환 시켰다. 형질전환 된 세포를 4-6시간 동안 37°C 5% CO₂ 항온 배양기에서 배양한 후 혈청을 함유하고 있지 않은 배지 CD293(Gibco, 미국)로 바꾸어 3일간 동일한 항온 배양기에서 배양하여 NA-A4 항체를 생산하는 상청액을 수집하였다. 수집된 상청액으로부터 protein A 아가로스 컬럼(Upstate, 미국)을 통하여 NA-A4 항체를 정제하고, 전기영동을 수행하여 확인하였다(도 7). 도 7에서 NA-A4 전향체(중앙 레인) 및 중쇄와 경쇄(우측 레인)의 밴드가 나타나고, 다른 밴드가 나타나지 않음을 확인할 수 있다. 항체를 환원시켰을 때에 항체의 중쇄 및 경쇄의 분자량으로 알려진 50KDa, 25KDa의 분자량을 갖는 단백질 밴드를 관찰하였다. 따라서 전향체화가 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다.

[76] 또한 상기 실시예 1에서 준비한 돌연변이 뉴라미니다제(I223R) 100 ng을 96-웰 플레이트의 웰 내에 코팅하고, 상기 NA-A4 전향체를 12.5 nM에서 시작하여 1/2로 계단희석하여 웰에 첨가하고, 세척한 후, 2차 항체(항-인간 IgG(Fc specific)-HRP)를 1/3000으로 희석하여 첨가하였다. 그 후 다시 웰을 세척하고 기질을 첨가한 후 흡광도를 측정하였다. 처리한 전향체의 농도에 따른 흡광도를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 NA-A4 전향체가 야생형 뉴라미니다제(NA WT)보다 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 대한 결합능이 현저히 높으며, 대조군(BSA, PBS)에는 거의 결합하지 않음을 알 수 있다.

[77] 3-2. 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 대한 K_d 값(K_d value) 및 결합능 측정

[78] 전향체화된 NA-A4 항체로 ELISA, BLITZ, 및 SPR을 이용하여 3번의 반복실험을 진행하여 K_d 값을 측정하였다. 야생형 뉴라미니다제 및 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 대한 ELISA 후 흡광도 측정은 도 9에, 야생형 뉴라미니다제에 대한 SPR 분석 결과는 도 10에, 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 대한 SPR 분석 결과는 도 11에 나타내었다. ELISA, BLITZ, 및 SPR 분석 결과를 요약하면 하기 표 3과 같다.

[79] [표 3]

[80]

분석방법	야생형	돌연변이 (I223R)
ELISA	3.25e-7	6.16e-8
BLITZ	7.00e-7	1.06e-9
SPR	4.56e-5	3.67e-8

[81] 상기 표 3에서, 3가지 분석방법 모두에서 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에서 야생형 뉴라미니다제보다 K_D 값이 현저히 작게 나타나는데, 이로부터 NA-A4 항체가 야생형 뉴라미니다제보다 돌연변이 뉴라미니다제(I223R)에 대한 결합력이 매우 높음을 알 수 있다.

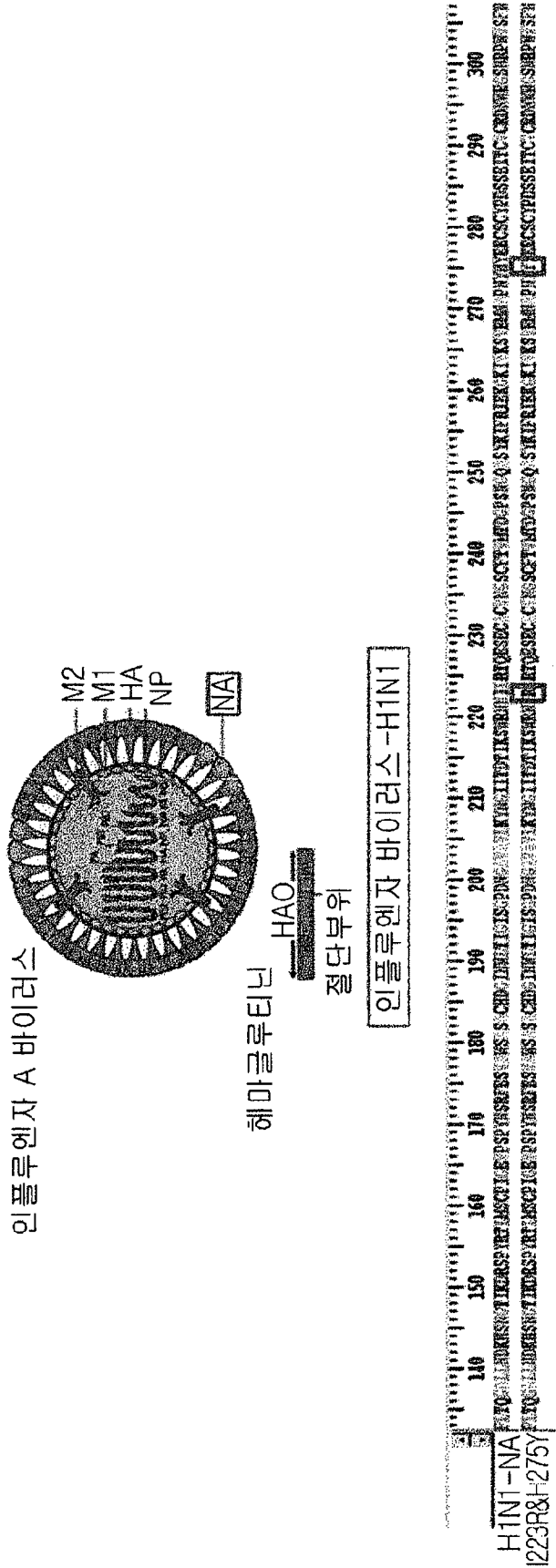
[82] 실시예 4. 야생형 인플루엔자 바이러스에 대한 결합 여부 확인

[83] 상기 NA-A4 전항체(whole antibody)가 돌연변이가 일어나지 않은 야생형 Influenza A/california/07/2009(H1N1)에 결합하는지 여부를 흡광도를 측정하여 확인한 바, 야생형 바이러스에는 결합하지 않음을 확인하였다(도 12).

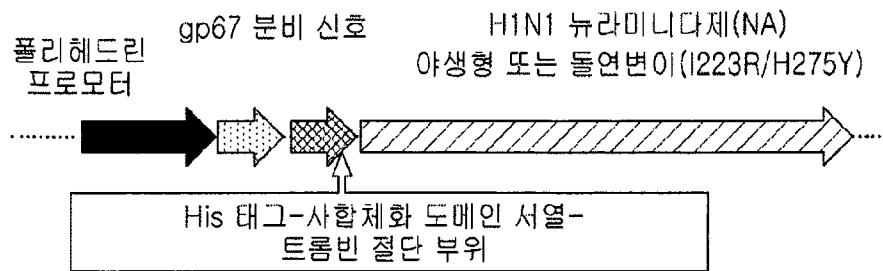
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 캡과 쇠 및 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는, 항체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 인간 항체는 I223R 돌연변이를 포함하는 인플루엔자 A 바이러스의 뉴라미니다제(neuraminidase)에 결합하는 항체.
- [청구항 3] 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열 및 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 4] 서열번호 3으로 기재되는 염기서열 또는 서열번호 4로 기재되는 염기서열을 갖는 핵산 분자.
- [청구항 5] 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 캡과 쇠 및 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 인간 항체를 포함하는, I223R 돌연변이를 포함하는 뉴라미니다제 또는 I223R 돌연변이를 포함하는 뉴라미니다제를 발현하는 인플루엔자 A 바이러스 검출용 키트.

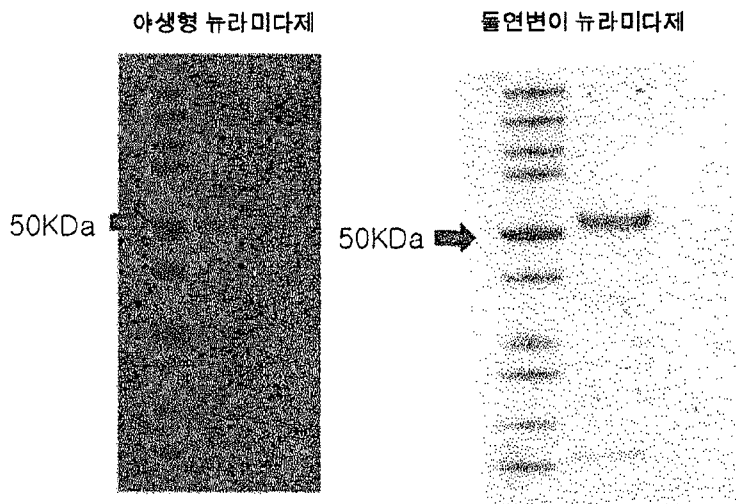
[도1]



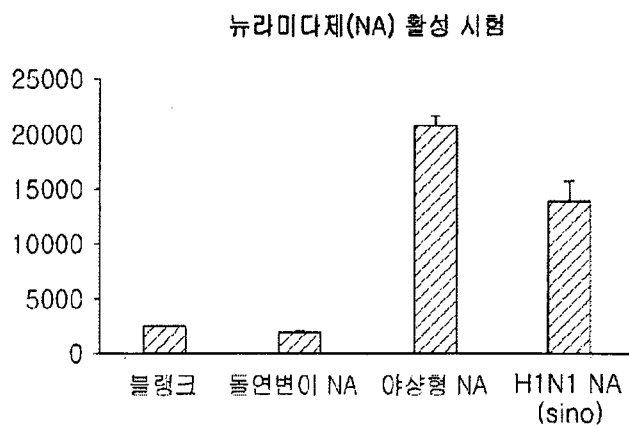
[도2]



[도3]

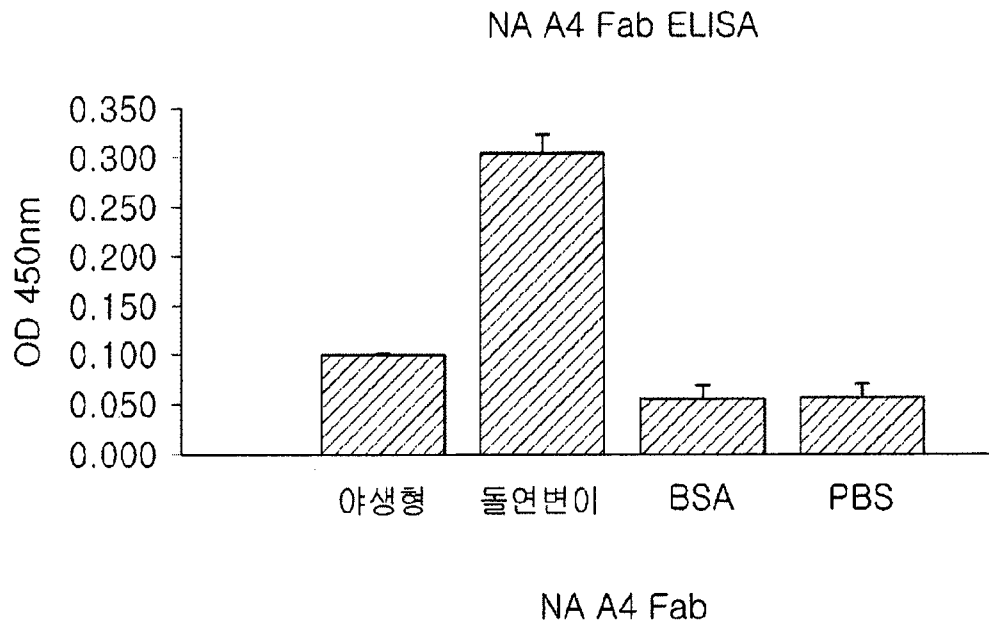


[도4]



- NA 활성 시험
- 샘플 1ug/웰
- 여기(Excitation) 355nm
- 방출(Emission) 460nm

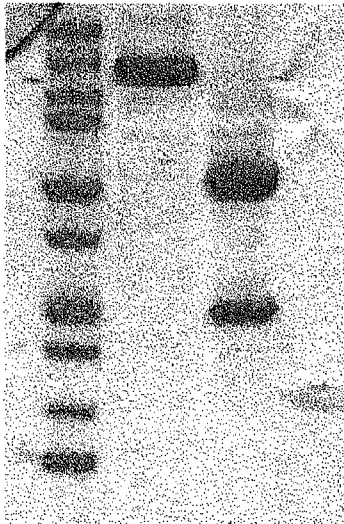
[도5]



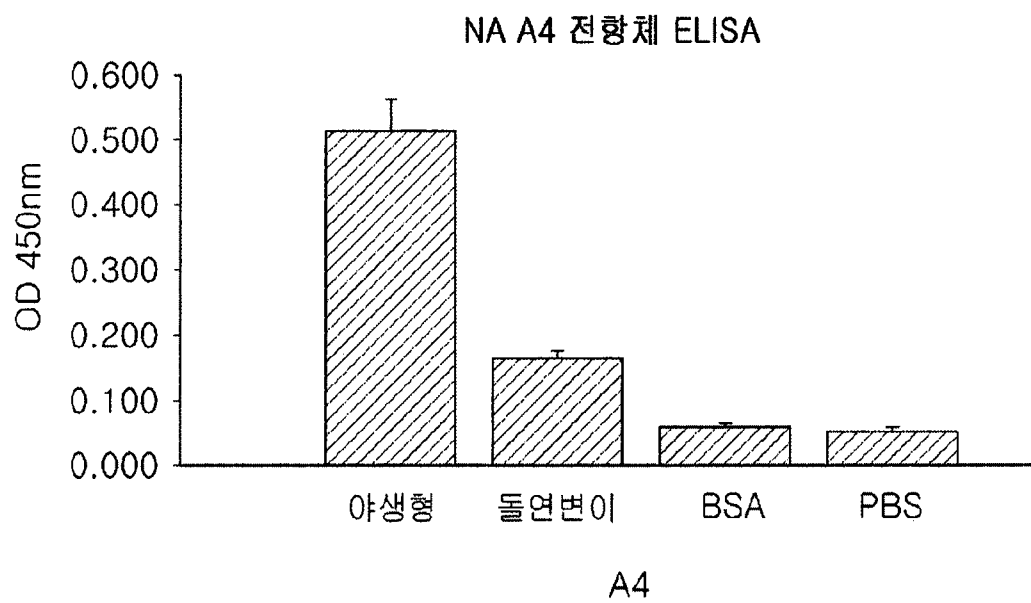
[도6]

	NA-A4 계열
시열번호	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTHTCRASGVNTHLAPYQOKPKAPKLLLYSLESQVPSRFSGSGSGTDEFTLTHTSSIQPEDFA TYICQDQVWVWPPYTFGGGTKVELK
시열번호	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYIMMSWVRQAPGKGLHWSMITPQSSGNTLYVADSEYKGRFTISRDN SKNTLYLOMN 2 SLRAEDTAVTYICARVEDWDIGLYCGMDYWGQGLVTVSSAS

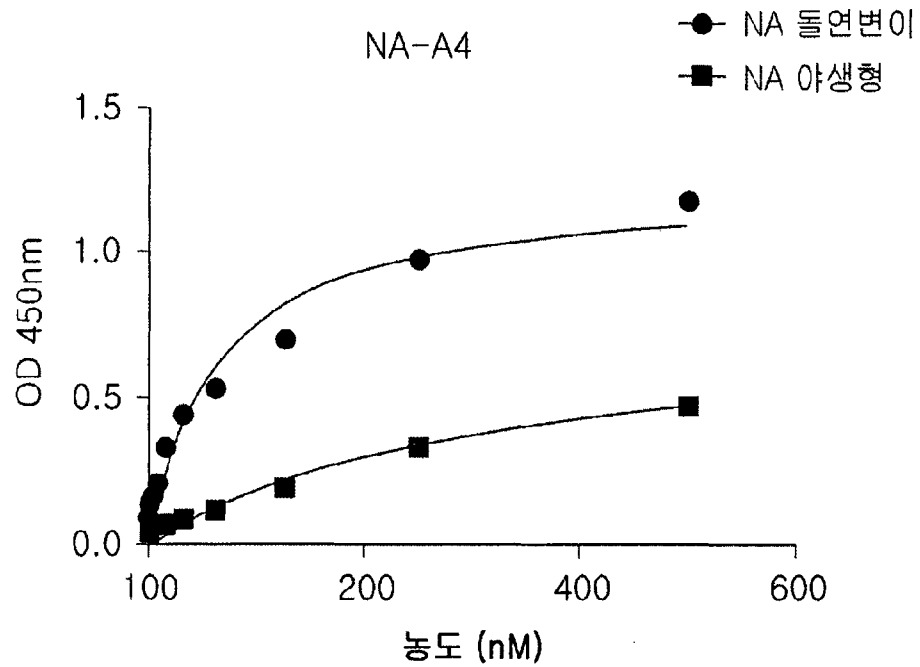
[도7]



[도8]



[도9]



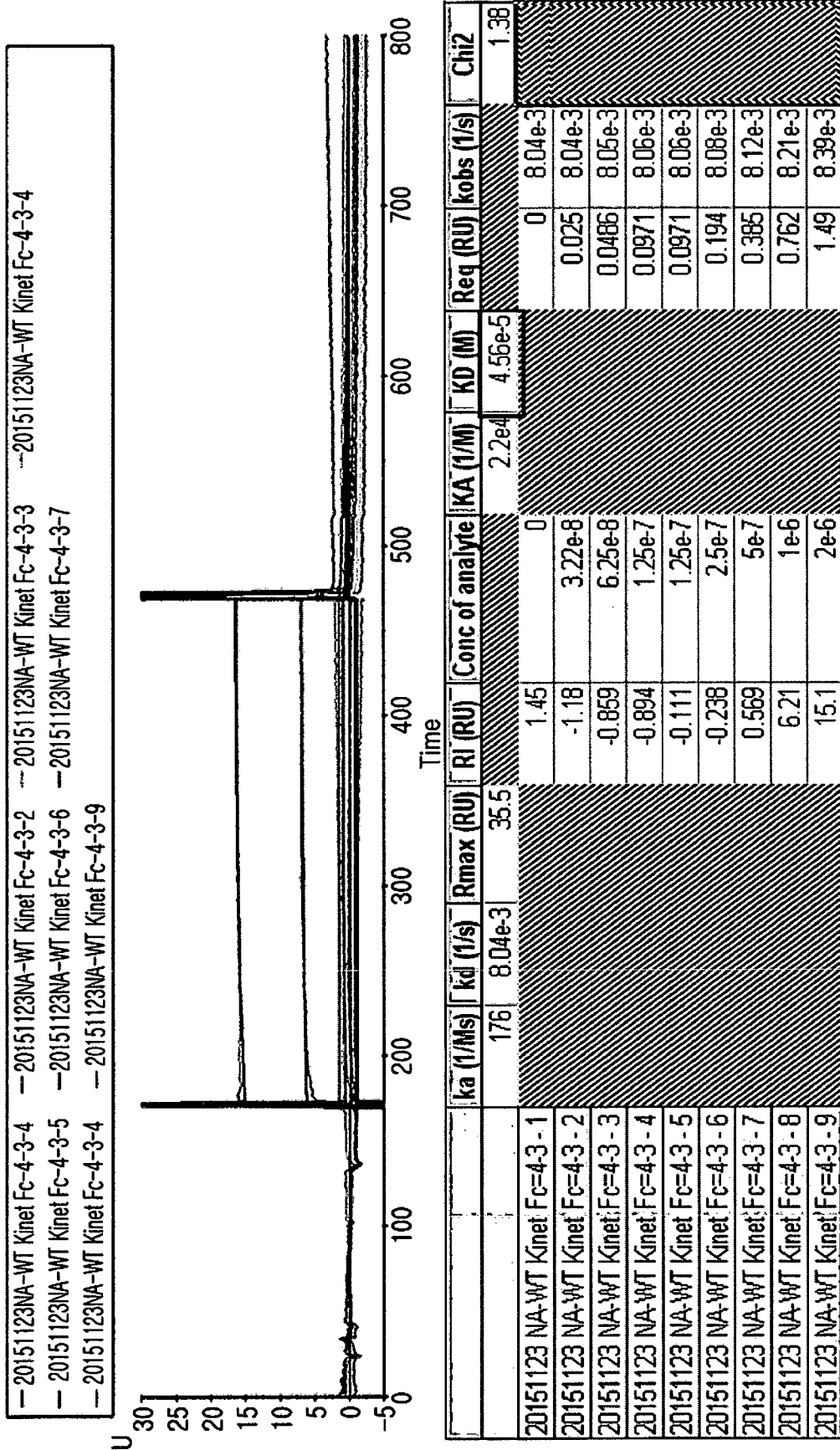
Ag 코팅 : 100ng/웰

1차 항체 : 전항체-500nM ~ 1/2 계단희석

2차 항체 : 항-인간 Fc HRP(1/3000)

[도 10]

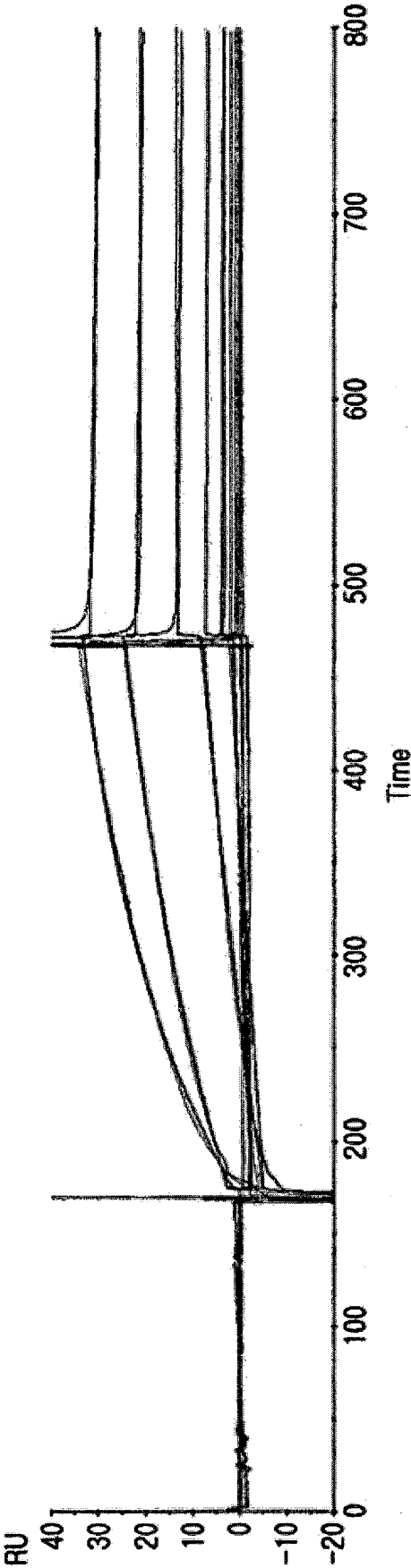
- NA-A4 전향체 고정화 (표적 500RU)
- NA 야생형 단백질 운동 분석 (OnM ~ 500nM)



[도 11]

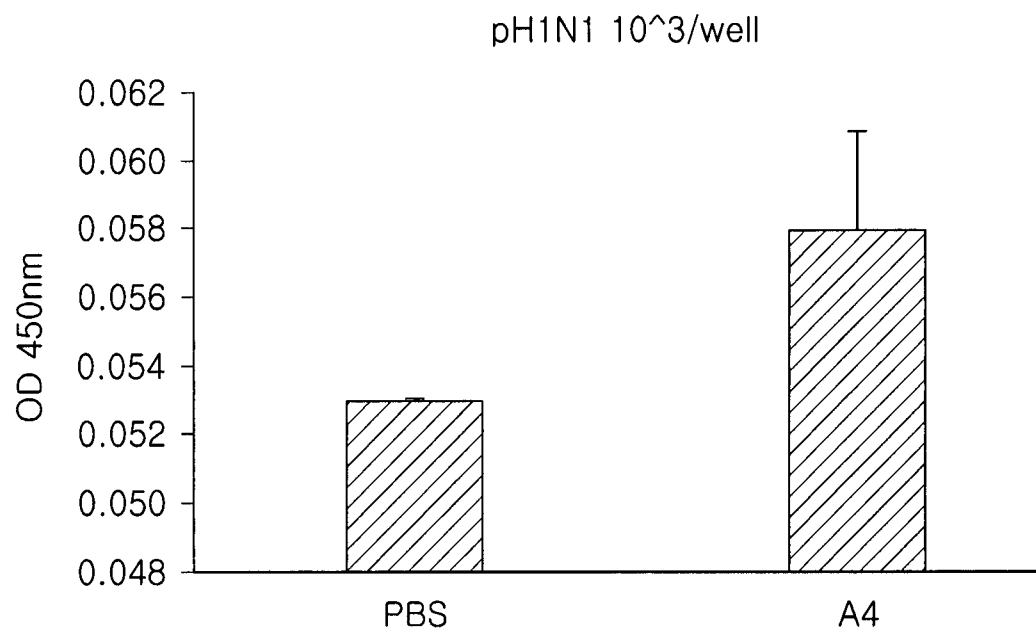
- NA-A4 전향체 고정화 (표적 500RU)
→ NA 들연변이 단백질 운동 분석 (0 nM ~ 5000 nM)

— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-1	— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-2	— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-3	— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-4
— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-5	— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-6	— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-7	
— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-8	— 20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-9		



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-1	2.98e3	1.09e-4	37.9	0.647	0	2.72e7	3.67e-8	0	1.09e-4	0.393
20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-2				-2.42	3.12e-8			17.4	2.03e-4	
20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-3				-2.07	6.25e-8			23.9	2.96e-4	
20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-5				-2.44	1.25e-7			29.3	4.82e-4	
20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-6				-5.12	2.5e-7			33.1	8.55e-4	
20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-7				-5.04	5e-7			35.3	1.6e-3	
20151124 NA_A4 Mutan Fc=2-1-8				2.56	1e-6			36.6	3.09e-3	

[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/001598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

H04L 27/26(2006.01)i, H04L 5/00(2006.01)i, H04W 72/12(2009.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/10; G01N 33/573; G01N 33/569; A61K 31/255; C12N 15/63

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: influenza A virus, neuraminidase, I223R, mutation, chemical resistance

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011-096302 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) 11 August 2011 See abstract; paragraph [0008]; claims 1-3.	1-5
Y	VRIES, Van Der et al., "H1N1 2009 Pandemic Influenza Virus: Resistance of the I223R Neuraminidase Mutant Explained by Kinetic and Structural Analysis", PLoS Pathogens, vol. 8, issue 9, e1002914 (internal pages 1-8) (2012) See abstract.	1-5
Y	US 2014-0194392 A1 (NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY) 10 July 2014 See paragraphs [0035], [0116].	1-5
Y	PIZZORNO et al., "Impact of Mutations at Residue I223 of the Neuraminidase Protein on the Resistance Profile, Replication Level, and Virulence of the 2009 Pandemic Influenza Virus", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 56, no. 3, pages 1208-1214 (2012) See abstract.	1-5
A	WO 2015-045053 A1 (KABUSIKIGAISSYA TOMIYAMAKENKYUJYO) 02 April 2015 See the entire document.	1-5



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

02 JUNE 2017 (02.06.2017)

Date of mailing of the international search report

02 JUNE 2017 (02.06.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

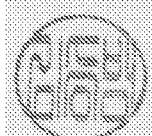
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/001598

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-096302 A1	11/08/2011	NONE	
US 2014-0194392 A1	10/07/2014	TW 201428147 A	16/07/2014
WO 2015-045053 A1	02/04/2015	JP 5469783 B1	16/04/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/10(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/10; G01N 33/573; G01N 33/569; A61K 31/255; C12N 15/63 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: 인플루엔자 A 바이러스, 뉴라미니다제, I223R, 돌연변이, 약물 저항성																				
C. 관련 문헌 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">카테고리*</th> <th style="width: 70%;">인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th style="width: 20%;">관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>WO 2011-096302 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) 2011.08.11 요약; 단락 [0008]; 청구항 1-3 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>VAN DER VRIES 등, 'H1N1 2009 pandemic influenza virus: resistance of the I223R neuraminidase mutant explained by kinetic and structural analysis' PLoS Pathogens, Vol.8, Issue 9, e1002914 (internal pages 1-8) (2012) 요약 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>US 2014-0194392 A1 (NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY) 2014.07.10 단락 [0035], [0116] 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>PIZZORNO 등, 'Impact of mutations at residue I223 of the neuraminidase protein on the resistance profile, replication level, and virulence of the 2009 pandemic influenza virus' Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.56, No.3, pages 1208-1214 (2012) 요약 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-5</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO 2015-045053 A1 (KABUSIKIGAISSYA TOMIYAMAKENKYUUJYO) 2015.04.02 전체 문헌 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-5</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	WO 2011-096302 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) 2011.08.11 요약; 단락 [0008]; 청구항 1-3 참조.	1-5	Y	VAN DER VRIES 등, 'H1N1 2009 pandemic influenza virus: resistance of the I223R neuraminidase mutant explained by kinetic and structural analysis' PLoS Pathogens, Vol.8, Issue 9, e1002914 (internal pages 1-8) (2012) 요약 참조.	1-5	Y	US 2014-0194392 A1 (NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY) 2014.07.10 단락 [0035], [0116] 참조.	1-5	Y	PIZZORNO 등, 'Impact of mutations at residue I223 of the neuraminidase protein on the resistance profile, replication level, and virulence of the 2009 pandemic influenza virus' Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.56, No.3, pages 1208-1214 (2012) 요약 참조.	1-5	A	WO 2015-045053 A1 (KABUSIKIGAISSYA TOMIYAMAKENKYUUJYO) 2015.04.02 전체 문헌 참조.	1-5
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
Y	WO 2011-096302 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) 2011.08.11 요약; 단락 [0008]; 청구항 1-3 참조.	1-5																		
Y	VAN DER VRIES 등, 'H1N1 2009 pandemic influenza virus: resistance of the I223R neuraminidase mutant explained by kinetic and structural analysis' PLoS Pathogens, Vol.8, Issue 9, e1002914 (internal pages 1-8) (2012) 요약 참조.	1-5																		
Y	US 2014-0194392 A1 (NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY) 2014.07.10 단락 [0035], [0116] 참조.	1-5																		
Y	PIZZORNO 등, 'Impact of mutations at residue I223 of the neuraminidase protein on the resistance profile, replication level, and virulence of the 2009 pandemic influenza virus' Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.56, No.3, pages 1208-1214 (2012) 요약 참조.	1-5																		
A	WO 2015-045053 A1 (KABUSIKIGAISSYA TOMIYAMAKENKYUUJYO) 2015.04.02 전체 문헌 참조.	1-5																		
☐ 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 신구성 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 2017년 06월 02일 (02.06.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 06월 02일 (02.06.2017)																			
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 																			

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/001598

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-096302 A1	2011/08/11	없음	
US 2014-0194392 A1	2014/07/10	TW 201428147 A	2014/07/16
WO 2015-045053 A1	2015/04/02	JP 5469783 B1	2014/04/16