

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국(43) 국제공개일
2012년 12월 13일 (13.12.2012)(10) 국제공개번호
WO 2012/169735 A9

(51) 국제특허분류:

A61K 38/00 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2012/004075

(22) 국제출원일:

2012년 5월 23일 (23.05.2012)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2011-0054805 2011년 6월 7일 (07.06.2011) KR
10-2012-0054613 2012년 5월 23일 (23.05.2012) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주)
네오팜 (NEOPHARM CO., LTD.) [KR/KR]; 305-510
대전광역시 유성구 탑림동 928 번지 305-510, Daejeon
(KR).

(72) 발명자; 겸

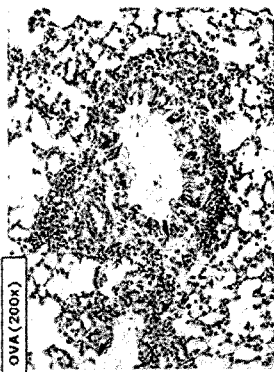
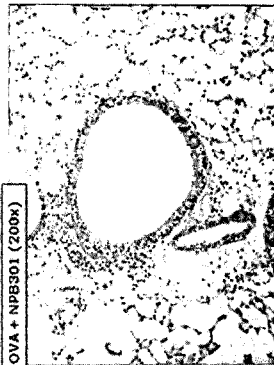
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 박병덕 (PARK,
Byeong- Deog) [KR/KR]; 305-500 대전광역시 유성구
용산동 722 대덕테크노밸리 2 차 푸르지오 1 단지 아파
트 107- 201, Daejeon (KR). 윤선주 (YOON, Seon Joo)
[KR/KR]; 302-280 대전광역시 서구 월평동 266 번지
백함아파트 102- 303, Daejeon (KR). 김옥동 (KIM,
Wook- Dong) [KR/KR]; 305-340 대전광역시 유성구 도
룡동 타운하우스 6 동 104 호, Daejeon (KR). 배중환
(BAE, Jong Hwan) [KR/KR]; 305-751 대전광역시 유성
구 송강동 송강그린아파트 316- 101, Daejeon (KR). 김
민희 (KIM, Min Hee) [KR/KR]; 420-804 경기도 부천시
원미구 도당동 140 번지 성산빌라 가동 302 호,
Gyeonggi-do (KR). 강현정 (KANG, Hyun Jung)
[KR/KR]; 573-440 전라북도 군산시 개정동 507 번지,
Jeollabuk-do (KR). 박은혜 (PARK, Eun Hye) [KR/KR];
719-853 경상북도 성주군 월항면 장산 1 리 926,
Gyeongsangbuk-do (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPLEX COMPRISING WATER-SOLUBLE FRAGMENTS OF FCεRI AND COMPOSITION COMPRISING SAME FOR TREATING ALLERGIC DISEASES MEDIATED BY IGE

(54) 발명의 명칭: FCεRI의 수용성 단편을 포함하는 복합체 및 이를 포함하는 IGE 매개 알레르기성 질환 치료용 조성물

[Fig. 6]



(57) Abstract: The present invention relates to a complex in which water-soluble fragments of FcεRI, which is a receptor having a high affinity to the Fc region of immunoglobulin E (IgE), are bound with a material having biocompatibility. The complex in which the water-soluble fragments of FcεRI are bound with the material having biocompatibility according to the present invention inhibits the coupling of IgE and the FcεRI, which is a receptor of the IgE, so as to suppress the secretion of allergic cytokine. Thus, the complex has the effect of treating and preventing allergic diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 면역글로불린 E(IgE)의 Fc 부위에 고친화성을 갖는 수용체인 FcεRI의 수용성(soluble) 단편과 생체 적합성(biocompatibility)을 가지는 물질이 접합된 복합체에 대한 발명으로, 본 발명에 따른 FcεRI의 수용성 단편과 생체 적합성을 가지는 물질이 접합된 복합체는 IgE와 IgE 수용체인 FcεRI의 결합을 저해하여 알레르기성 사이토카인의 분비를 억제시킴으로써 알레르기 질환을 치료 및 예방하는 효과가 있다.



(74) **대리인:** 권오식 (KWON, Oh-Sig) 등; 302-120 대전광역시 서구 둔산중로 138 번지 주은오피스텔 401 호, Daejeon (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) **국제조사보고서 공개일:** 2013 년 3 월 7 일

(48) **본 정정판 공개일:** 2013 년 5 월 2 일

(15) **정정사항에 관한 정보:**
2013 년 5 월 2 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: FcεRI의 수용성 단편을 포함하는 복합체 및 이를 포함하는 IGE 매개 알레르기성 질환 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 면역글로불린 E(IgE)의 Fc 부위에 고친화성을 갖는 수용체인 FcεRI의 수용성(soluble) 단편과 생체 적합성(biocompatibility)을 가지는 물질이 접합된 복합체에 대한 발명으로, 본 발명에 따른 FcεRI의 수용성 단편과 생체 적합성을 가지는 물질이 접합된 복합체는 IgE와 IgE 수용체인 FcεRI의 결합을 저해하여 알레르기성 사이토카인의 분비를 억제시킴으로써 알레르기 질환을 치료 및 예방하는 효과가 있다.
- [2] 특히 본 발명에 따른 바람직한 복합체의 형태는 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc가 융합된 융합 단백질로, 본 발명에서 제공되는 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc가 융합된 융합 단백질인 NPB301은 IgE와 IgE 수용체인 FcεRI의 결합을 억제하여, IgE와 FcεRI에 의해 유도되는 신호전달을 저해하며, 이에 따라 알레르기성 사이토카인의 분비를 억제시킴으로써 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 천식, 두드러기 및 접촉성 피부염 등의 알레르기성 질환의 치료에 탁월한 치료효능을 나타낸다.

배경기술

- [3] 특정한 음식이나 약에 과민반응하는 알레르기 반응으로서 체내 고민감성 즉각적 반응 형태를 나타내는 천식, 알레르기성 비염 등의 질환이 있다. 알레르기 반응에서의 즉각적인 반응은 이뮤노글로불린 E(IgE)에 의해 매개되어진다. 대부분의 알레르기 반응은 IgE가 알레르기 수용체의 표면에 결합함으로써 유발되어지는데, IgE의 Fc 부분(Fcε)에 대한 수용체중 대표적인 것이 FcεRI이다. IgE는 비만 세포(mast cell) 또는 호염기(basophilia)성 세포 표면에서 발현되어지는 IgE 수용체인 FcεRI와 결합을 하여 알레르기를 일으키는 신호전달을 하게 된다.
- [4] 인간 FcεRI은 알파쇄, 베타쇄(시그널 증폭인자), 감마쇄(시그널 전달인자)의 3개의 서로 다른 서브유닛을 가지고 있다. 각각 한 개의 알파쇄 및 베타쇄 및 두 개의 감마쇄로 구성된 테트라머 FcεRI는 주로 조직세포 및 호염기구의 세포막상에서 발현되고, 세포의 활성화를 위한 I형 알레르기 반응에서 중요한 역할을 한다. FcεRI 중 알파쇄만이 IgE와 직접 결합하며 IgE에 대한 결합 부위는 알파쇄의 세포외 영역 전체에 걸쳐 있다(Nature. 2000, 406, 259-266). 이 중 IgE가 결합하는 FcεRI은 α-서브유닛을 가지고 있는데(FcεRIα), FcεRIα는 60 kDa 정도의 크기를 가지며, 세포막 안에 존재하는 소수성 도메인과 세포막 외부에 존재하는 친수성 도메인으로 구성된다.
- [5] 혈중 IgE는 B 림포사이트에 의해 생산되어지는데, 병원체(pathogens)에 대한

일차적 방어기작에 포함되어 진다. IgE는 특정 알레르겐에 결합 및 비만세포 FcεRI의 결합에 의하여 하위 신호전달물질인 Syk 단백질을 인산화시키고, 하위 세포신호전달 기작이 유도되어 비만세포가 활성화된다. 그 결과로 인해 비만 세포 밖으로 TNF가 분비되고, 세포질의 과립에 저장되어 있던 히스타민, 콘드로이틴 설페이트(chondroitin sulfate), 헤파린 및 단백질 분해효소인 트립테이즈(tryptase)와 카이메이즈(chymase)등이 빠른 시간 내에 탈과립되어 세포 밖으로 분비된다. 비만세포와 호염기성 세포에서 분비되는 이러한 물질들은 각각 가려움증, 담마진(두드러기), 소양증, 피부이상, 복통, 설사, 기관지 수축, 천명, 호흡곤란, 기관지 천식증상, 콧물, 재채기 등의 다양한 생리학적 알레르기 질환을 일으킨다.

- [6] 알레르기성 질환의 원인은 아직 명확하게 규명되고 있지는 않지만, 인체 면역 기전의 불균형 등이 원인으로 제시되고 있다. 또한 혈중 내 IgE의 증가 또한 주요한 알레르기성 질환의 원인으로 제시되고 있다. 특히 천식 환자의 혈중 내 IgE의 농도 (100~500 IU/ml)가 정상인(20~40 IU/ml)에 비하여 매우 증가되어 있는 것으로 보고되어 있으며, 아토피 환자의 경우 그 농도가 (1000 IU/ml) 훨씬 높아 알레르기성 질환에 있어 IgE의 역할이 강조되고 있다. 이외에도 알레르기성 비염, 천식 및 아토피 피부염에서 환자의 혈액 중 FcεRI의 발현은 증가되어져 있기 때문에, 알레르기 질환에서 IgE와 FcεRI 수용체 사이의 결합은 질환의 발병에 있어 매우 중요하다 할 수 있다(J. Allergy Clin. Immunol. 1980, 66, 305-313).
- [7] 현재 알레르기 질환의 치료를 위해서 알레르겐 회피요법, 항 알레르기 약물사용, 특정 알레르겐에 대한 면역 치료 요법 등이 사용되고 있다(Clin. Immunol. 1997, 100(2), 171-176, Allergy 1998, 53, 821-832, Allergy Clin. Immunol. 1998, 102, 631-636, Clin. Exp. Allergy. 1999, 29 (11), 1563-1571, Allergy Clin. immunol. 2002, 110, 154-159). 가장 널리 사용되는 알레르기 질환 치료제로는 항히스타민 약품과 코르티코스테로이드(corticosteroid) 계통의 약품이 있다. 이외에도 베타-2-아드레네직(beta-2 adrenergic) 수용체의 촉매제나 포스포다이에스테라제-3(phosphodiesterase-3) 저해제 등이 알레르기성 질환의 치료제로 사용되고 있다. 지난 수년간 다수의 알레르기 치료용 약품이 개발 되었으나 증상을 완화하는 데 그칠 뿐, 실제로 알레르기의 근본 원인을 치료할 수 있는 치료제는 없는 실정이다. 또한 약제의 효능이 불충분하거나 부작용으로 인한 많은 단점을 가지고 있다. 따라서 새로운 개념의 알레르기 치료제에 대한 수요가 증가하고 있는 현실이다.
- [8] 전통적인 면역 요법은 알레르겐을 장기간에 걸쳐 그 양을 증가시키면서 알레르기 환자에 투입하는 방법이다. 이 방법은 알레르기성 비염의 치료에 효과를 보였고 알레르기성 천식에도 일정 부분 효과를 보였다. 이러한 면역요법은 T 세포 반응을 Th2 유형에서 Th1으로 변경함으로써 알레르기 환자의 증상을 완화시키게 하고 알레르겐 특이적 IgG 반응을 유도한다. 하지만

이러한 면역 요법 역시 환자의 증상을 완화시키는 작용을 할 뿐, 근본적인 치료는 되지 못한다는 단점을 갖고 있다.

- [9] 또한 현재 IgE를 타겟으로 하는 항체 제품으로는 오말리주맵(Omalizumab, 상품명 : 졸레어(Xolair))이 천식환자 치료제로 사용되고 있다. 오말리주맵은 IgE에 결합함으로써 천식과 알레르기의 주된 원인인 화학물질 방출을 억제하는 역할을 한다. 하지만 오말리주맵은 혈관부종, 아나필락시스 반응 및 다른 알레르기성 상태, 알레르기성 기관지 경련 등의 부작용이 있으며, 시판 후 결과를 통해 심각한 이상인 알레르기성 육아종 혈관염, 특발성 중증 혈소판감소증이 보고되고 있다.

- [10] 따라서, 부작용 없이 알레르기 질환을 효율적이고 근본적으로 치료할 수 있는 치료제 개발에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 상기와 같은 문제를 해결하고자 본 발명은 부작용 없이 알레르기 질환을 효율적이고 근본적으로 치료할 수 있는 치료제를 제공하기 위하여, IgE의 Fc 부위에 고친화성을 갖는 수용체인 FcεRI의 수용성 단편과 생체 적합성을 가지는 물질이 접합된 복합체 및 그러한 복합체의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 특히 본 발명에서 제공되는 바람직한 복합체의 형태는 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc가 융합된 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 융합 단백질인 NPB301이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 복합체를 함유하는 알레르기성 비염, 천식, 아토피 피부 질환, 두드러기 및 접촉성 피부염을 치료하기 위한 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 복합체를 이용한 알레르기 질환, 특히 알레르기성 비염, 천식, 아토피 피부 질환, 두드러기 및 접촉성 피부염 등을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 FcεRI 수용체의 수용성 단편을 생체 적합성 물질과 결합시킨 복합체를 제조하였다.
- [15] 본 발명에서의 'FcεRI의 수용성 단편(soluble fragment)'은 FcεRI 중에서 세포내 도메인(intracellular domain)이 결여되어 있어, IgE가 결합되더라도 세포 내로 신호전달(signal transduction)이 일어나지 않는 단편을 의미하며, IgE와 결합할 수 있는 능력을 가지는 세포외 도메인(extracellular domain)의 일부 또는 전부로 구성됨이 바람직하며, 추가적으로 세포막 도메인(transmembrane domain)이 포함될 수 있다. 특히 본 발명에 따른 바람직한 FcεRI의 수용성 단편은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하다.
- [16] 본 발명에 따른 생체 적합성 물질은 FcεRI의 수용성 단편의 체내

안정성(stability)을 증가시키는 기능을 하며 체내에서 면역반응 등을 유발하지 않는 특성을 가진 것이라면 어떤 것이라도 사용가능하며, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 디아실글리세롤(DAG), 인간 항체의 Fc(fragment crystallizable) 영역 등이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

- [17] 항체의 Fc 영역은 항체를 파파인(papain) 효소로 처리해서, 절단되는 불변영역(constant region) 부분의 단편을 의미하며, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 항체에서 유래된 것이라면 어떤 것이라도 제한 없이 본 발명에 따른 복합체 제조에 이용가능하며, 특히 그 중에서 IgG 항체의 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 항체 유래의 Fc 영역이 특히 바람직하다.
- [18] 본 발명에 따른 바람직한 복합체는 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc 영역이 접합된 형태의 융합 단백질(fusion protein)이다. FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc 영역은 직접 접합하는 것도 가능하며, 링커(linker)를 사용하여 연결하는 것도 가능하다. 링커는 FcεRI의 수용성 단편과 IgE의 결합에 영향을 미치지 않으면서, 3차원적으로 FcεRI의 수용성 단편의 움직임을 자유롭게 하는 것이라면 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용될 수 있는 어떤 것이라도 제한 없이 사용가능하며, 바람직한 링커는 펩타이드 링커(peptide linker)이지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [19] 본 발명에서 제공되는 바람직한 융합 단백질은 서열번호 1에 따른 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc 영역이 펩타이드 링커에 의해 서로 융합된 형태이며, 특히 서열번호 2와 같은 아미노산 서열을 가지는 융합단백질인 NPB301이 바람직하다.
- [20] 또한 본 발명의 융합 단백질의 특성이 유지되는 한, FcεRI 수용성 단편, 인간 항체의 Fc 영역 또는 링커 구조에서의 변이가 일어난 융합 단백질도 본 발명의 권리범위에 포함된다. 그러한 예로서 FcεRI의 수용성 단편 내에서의 아미노산의 보존적 치환(conservative substitution)이 일어난 경우를 들 수 있다. 보존적 치환은 원래의 아미노산 서열과 유사한 특성을 가지는 다른 아미노산 잔기로의 치환을 의미하는데, 예를 들어 라이신, 아르기닌, 히스티딘은 염기 결사슬을 가지고 있어 유사한 특성을 가지고, 아스파라틱산과 글루탐산은 산 결사슬을 가진다는 점에서 유사한 특성을 가진다. 또한, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판은 비전하 극성 결사슬을 가진다는 점에서 특성이 유사하며, 알라닌, 발린, 루신, 트레오닌, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌은 비극성 결사슬을 가지고 있다는 점에서, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘은 방향족 결사슬을 가지고 있다는 점에서 유사한 특성을 가진다. 따라서, 상기와 같이 유사한 특성을 가지는 그룹 내에서의 아미노산 치환이 일어나더라도 별다른 특성 변화를 보이지 않을 것이라는 점은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.
- [21] 본 발명에서는 상기와 같이 FcεRI의 수용성 단편을 포함하는 복합체를 유효성분으로 하는 약제학적 조성물을 제공한다. 상기 약제학적 조성물에는

약학적으로 허용가능한 통상적인 담체 및 부형제 등이 추가적으로 포함될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 IgE에 의해 매개되는 모든 알레르기 질환에 적용될 수 있는데, 대표적인 질환으로는 알레르기성 비염, 천식, 아토피 피부 질환, 두드러기 및 접촉성 피부염 등이 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명은 상기 단편 단백질을 치료대상에게 투여하는 것을 특징으로 하는 알레르기 질환의 예방 및 치료방법을 제공한다.

- [22] 또한 본 발명에서는 FcεRI의 수용성 단편 또는 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc 영역이 접합된 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다. 특히 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 가지는 융합 단백질인 NPB301을 인코딩하는 서열번호 3에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열이 바람직하다.
- [23] 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터 및 이를 포함하는 숙주세포, 그리고 상기 재조합 벡터 또는 숙주세포를 이용하여 본 발명에 따른 FcεRI의 수용성 단편을 포함하는 접합체를 제조하는 방법을 제공한다. FcεRI의 수용성 단편이 PEG 등의 단백질이 아닌 물질과 접합된 복합체의 경우에는 FcεRI의 수용성 단편만을 생산한 후, PEG 등과 접합시키는 단계를 추가적으로 수행하여 복합체를 제조할 수 있다. 또한 FcεRI의 수용성 단편과 인간 Fc 영역의 융합 단백질 형태의 복합체의 경우에는 유전자 재조합 방법을 통해 FcεRI의 수용성 단편과 인간 Fc 영역을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 연결시켜, 상기 단백질이 서로 아미노 결합으로 연결되어 하나의 단백질의 형태로 발현되도록 하여 제조하는 것이 바람직하다.
- [24] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명에서 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 수행할 수 있다.
- [25] 본 발명에서 사용될 수 있는 적합한 발현 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 번역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 원핵 세포에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터가 있으나 이로 제한되지는 않는다. 진핵세포에는 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양

바이러스(MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들면 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스 사코마 바이러스(RSV)프로모터 뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터가 있으나 이것으로 제한되지는 않는다. 상기 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제 (selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터는 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점 (replication origin)을 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다.

- [26] 본 발명에 따른 Fc ϵ RI의 수용성 단편, 또는 Fc ϵ RI의 수용성 단편과 인간 Fc 영역의 융합 단백질을 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열 등이 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC 벡터, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 대장균(*Escherichia coli*)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10과 λ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2°C 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.

- [27] 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 삽입되어 형질전환체를 형성하는데, 적합한 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라

- 크라사(*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다.
- [28] 또한 상기 숙주세포는 바람직하게는 식물, 포유동물로부터 유래할 수 있는데, 원숭이 신장 세포(COS7 : monkey kidney cells) 세포, NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO : chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK : baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등이 이용가능하며, 이에 한정되지 않는다. 특히 바람직하게는 CHO 세포이다.
- [29] 본 발명에서 숙주세포로의 형질 전환"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [30] 재조합 벡터가 발현되는 형질전환체를 영양배지에서 배양함으로써 본 발명에 따른 FcεRI 수용체의 수용성 단편과 인간 Fc 영역의 융합 단백질을 대량으로 생산할 수 있으며, 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적당히 선택 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다. 상기와 같이 재조합적으로 생산된 항체 또는 항체 단편은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리, 정제가 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)). 이에 는 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등), 등전점 포커싱 및 이의 다양한 변화 및 복합 방법 등이 이용가능하지만 이에 한정되지 않으며, 특히 프로테인 A(Protein A)를 이용하여 분리, 정제하는 것이 바람직하다.
- [31] 특히 본 발명에서의 바람직한 FcεRI의 수용성 단편과 인간 Fc 영역의 융합 단백질인 NPB301은 서열번호 3에 따른 폴리뉴클레오티드 서열을 이용하여 동물세포를 숙주세포로 이용, 배양함으로써 생산하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [32] 본 발명에 따른 FcεRI의 수용성 단편을 포함하는 복합체는 IgE와 FcεRI 간의 결합을 낮은 농도로도 효율적으로 억제하여, IgE에 의해 매개되는 다양한 알레르기성 질환에 우수한 치료효과를 나타내며, FcεRI에만 특이적으로 결합, 작용하므로 부작용이 거의 없으며, 체내 투여시 면역반응을 유발하지 않는다.

- [33] 본 발명에 따른 FcεRI 수용체 단편을 포함하는 복합체는 IgE와 FcεRI 간의 결합을 억제하여 IgE 매개된 알레르기 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 특히 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 천식, 두드러기 및 접촉성 피부염 환자의 치료용으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [34] 도 1은 본 발명에 따른 융합단백질인 NPB301을 인코딩하는 DNA 서열을 나타낸 도면.
- [35] 도 2는 본 발명에 따른 융합단백질인 NPB301의 아미노산 서열을 나타낸 도면.
- [36] 도 3은 본 발명에 따른 융합단백질인 NPB301이 베타-헥소스아미니데이즈 분비에 미치는 영향을 나타내는 도면.
- [37] 도 4는 본 발명에 따른 융합단백질인 NPB301의 히스타민 분비 억제효과를 나타내는 도면.
- [38] 도 5는 본 발명에 따른 융합단백질인 NPB301의 PCA 저해효과를 나타내는 도면.
- [39] (A) 형질전환 마우스를 이용한 귀에서의 과민 반응 육안 관찰 결과
- [40] (B) 형질전환 마우스를 이용한 귀 색 변화의 흡광도 측정 결과
- [41] 도 6은 OVA 유도된 FcεRIα 트랜스제닉 마우스(Tg mice) 천식 모델에서의 NPB301에 의한 폐 조직의 변화를 조직 생검으로 분석한 결과를 나타내는 도면.
- [42] 도 7은 OVA 유도된 FcεRIα 트랜스제닉 마우스 천식 모델에서의 NPB301에 의한 전체 세포수, 대식구, 호산구 및 림프구 수 변화를 나타내는 도면.
- [43] 도 8은 OVA 유도된 FcεRIα 트랜스제닉 마우스 천식 모델에서의 NPB301에 의한 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13)의 양 변화를 나타내는 도면.
- [44] 도 9는 접촉성피부염 동물모델에서의 NPB301에 의한 귀의 두께 변화를 나타내는 도면.
- [45] 도 10은 TPA 유도된 피부염증 동물 모델에서의 NPB301에 의한 귀의 두께 변화를 나타내는 도면.
- [46] 도 11은 땅콩 알레르기 유발 동물모델에서의 NPB301에 의한 면역글로불린 E의 변화를 나타내는 도면.
- [47] 도 12는 비염 동물모델에서의 NPB301에 의한 비염 개선효과를 나타내는 도면.
- [48] (A) 코 문지르기 횟수를 측정한 결과
- [49] (B) 재채기 횟수를 측정한 결과
- [50] 도 13은 아토피 동물모델에서 NPB301 정맥주사 후 경피 수분손실도, 피부 내 수화도, 및 피부두께의 변화를 나타내는 도면.
- [51] 도 14는 아토피 동물모델에서 NPB301 복강주사 후 경피 수분손실도, 피부 내 수화도, 및 피부두께의 변화를 나타내는 도면.
- [52] 도 15는 OVA 아토피 동물모델에서 다양한 농도의 NPB301 복강주사 후, NPB301 농도에 따른 피부두께의 변화를 나타내는 도면.

[53] 도 16은 OVA 아토피 동물모델에서의 NPB301에 의한 아토피 개선효과를 나타내는 도면.

[54] (A) 5 MPK 복강주사 후 피부두께의 변화를 측정한 결과

[55] (B) 5 MPK 복강주사 후 면역글로불린 E의 변화를 측정한 결과

[56] 도 17은 OVA 아토피 동물모델에서 제형화 된 NPB301을 환부에 바른 후 피부의 두께 변화를 나타내는 도면.

[57] 도 18은 OVA 천식 동물모델에서의 NPB301에 의한 전체 세포수 변화를 나타내는 도면.

[58] 도 19는 TMA 피부염증 동물모델에서의 NPB301에 의한 면역글로불린 E의 변화를 나타내는 도면.

발명의 실시를 위한 형태

[59] 이하 본 발명을 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[60] [실시예 1] FcεRI 수용체 단편을 포함하는 융합 단백질의 제조

[61] FcεRI 수용체 단편을 포함하는 융합 단백질을 제조하기 위하여, 오리진 테크놀로지스(Origene Technologies, 미국)에서 인간 FcεRI 수용체의 수용성 단편을 코딩하는 cDNA(카탈로그 No. sc122614)를 구입하였다. 이를 인간 IgG의 Fc를 발현하는 TT5 벡터에 재조합시키고, 293-6E 세포로 일시적인 형질전환을 한 후 FreeStyle 293 배지(GIBCO, 12338)에서 배양하여 서열번호 2에 따른 융합 단백질 NPB301을 제조하였다.

[62] [실시예 2] 선별된 항체의 탈과립 억제 효과

[63] 베타 헥소스아미니다이즈 분비량 측정을 위해 96-웰 플레이트에 RBL-SX38 세포를 3% FBS(Fetal Bovine Serum)와 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 현탁시킨 후 96-플레이트에 2×10^4 cells/100 μ l로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 각 세포들을 PBS+a 버퍼(buffer) (PBS, 0.4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM 포도당, 0.1% BSA)로 1회 세척한 다음 니트로페닐-IgE(nitrophenyl-IgE; NP-IgE) (0.1 μ g/ml)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 반응 후, NPB301을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 150분 동안 반응시켰다. 이후 NP-BSA(0.1 μ g/ml) 을 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 반응시키고 세포 밖으로 분비되는 베타 헥소스아미니다이즈를 포함하는 상층액 30 μ l과, 0.1% 트리톤 X-100 60 μ l으로 용해(lysis)시켜 세포 내의 베타 헥소스아미니다이즈가 수득되어 포함된 용액 30 μ l를 96-웰 플레이트에 옮기고 기질버퍼 (4-p-니트로페닐-N-아세틸-β-D-글루코사미니드(4-p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide) 1 mM, 소듐 시트레이트, 0.1 M, pH 4.5) 30 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 후 반응정지 용액(50 mM 글리신, pH 10.7)을 가하여 반응을

종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [64] 그 결과, NPB301을 처리한 경우 베타 헥소스아미니다이즈 분비량이 감소됨을 확인할 수 있었으며, NPB301의 농도가 증가됨에 따라 분비량 감소가 더욱 강력하게 일어나, 탈과립 현상을 억제함을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[65] [실시예 3] 히스타민(histamine) 분비 억제 효능

- [66] 히스타민의 분비량 측정을 위해 먼저 24-웰 플레이트에 RBL-SX38 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 현탁시킨 후, 24-웰 플레이트에 2×10^5 cells/500 μ l로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 각 세포들을 티로드 버퍼(Tyrode's buffer, 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM 포도당, 0.1% BSA, 10 mM 허피스(Hepes), pH7.2)로 2회 세척한 다음 NP-IgE 0.5 μ g/ml를 분주한 뒤 배양배지로 37°C, 5% CO₂배양기에서 24시간 반응하였다. 이 때 NPB301을 함께 처리하였다. 24시간 후, 티로드 버퍼로 3회 세척한 다음, NP-BSA 0.1 μ g/ml를 가하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 30분 동안 반응시켰다. 이후, 상층액 500 μ l를 원심분리하여 다시 상층액 100 μ l를 96- 웰 플레이트에 옮기고 히스타민을 아세틸화 시킨 후, 히스타민 함량을 HTRF Kit(CISBIO International, 프랑스)를 이용하여 측정하였다.

- [67] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이 NPB301은 히스타민의 분비를 낮은 농도에서도 효율적으로 억제하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[68] [실시예 4] PCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis) 동물실험을 통한 NPB301의 IgE와 FcεRI의 결합 억제 효능 확인

- [69] 인간 FcεRI을 발현하도록 형질전환된 마우스 6주령 암컷을 사용하여, 왼쪽 귀에는 NP-IgE(0.1 μ g/20 μ l)를 피하 주사하고, 동시에 오른쪽 귀에는 NP-IgE(0.1 μ g/20 μ l) 와 NPB301(0.08 μ g/10 μ l)를 피하 주사하였다. 24시간 경과 후, 1% 에반스 블루(EVANS Blue) 파랑 염색약이 용해된 NP-BSA 1 mg를 꼬리에 정맥주사하였다. 90분 경과 후 귀를 절단하고, 포름알데히드를 첨가한 후, 55°C에서 24시간 반응시키고, 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [70] 그 결과 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 NPB301은 PCA를 유의성 있게 저해함을 확인할 수 있었다. 구체적으로 육안으로 확인한 결과, 왼쪽 귀에서는 정상적으로 과민증 반응이 유도되어 파란색으로 변화하였지만, 과민증 반응이 억제된 오른쪽 귀는 색깔이 변하지 않고 그대로 유지되었으며(도 5A 참조), 귀를 분리한 후 염색약을 분리한 후 흡광도를 측정결과에서도 유의성 있는 결과를 얻게 되었다(도 5B 참조). 이러한 결과로부터 본 발명에 따른 NPB301이 IgE와 FcεRI의 결합을 억제함을 확인할 수 있었다.

[71] [실시예 5] 천식동물 모델을 이용한 NPB301의 과민반응 세포 수의 변화에 미치는 영향 확인

- [72] OVA(ovalbumin) 100 μ g과 알룸(Alum) 2 mg을 200 μ l 용액에 포함되도록 하였다. 혼합된 OVA-알룸을 37°C에서 1시간 정도 계속 혼합하였다. 혼합이 끝난 OVA-알룸은 1.5 ml 튜브에 200 μ l 씩 분주하고 1 ml 주사기에 하나씩 넣어주었다.

이후, 인간 FcεRI을 발현하도록 형질전환된 마우스 6주령 암컷에 0, 14 일, 2차에 걸쳐 200 μl씩 복강주사하였다. 28, 29, 30일에 코 점막을 통하여 1% OVA 30 μg을 흡입하도록 하였다.

- [73] 선별된 항체 NPB301은 10 mg/kg로 26, 27, 28, 29일에 주사하였다. 24시간 후 폐조직을 떼어내어 생검하고, 기관지 폐포 세척액에서 세포 수를 계수하였다. 졸레틸(Zoletil)을 이용해 마취한 마우스의 기관지를 절개한 후 관을 삽입하여 22게이지 주사바늘을 기관에 삽입한 뒤, 기관지 폐포 세척을 시행하였는데 1회당 0.9 mL의 PBS를 2회 주입하여 수거하였다. 수거된 기관지 폐포 세척액은 4°C, 5000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층액은 다음 실험시까지 -70°C에 보관하였다. 원심분리로 얻어 낸 세포를 혈구 계산반을 이용하여 총 세포수를 세었으며, 사이토스핀(cytospin) 3(Thermo 사, 미국)를 이용하여 유리 슬라이드에 세포를 도말하고, 디프-퀵(Diff-Quik) 염색을 실시하였다. 총 200개의 세포를 세어 폐포 대식세포, 호산구, 림프구, 호중구를 감별 계산하였다. 또한 염증반응과 관련 있는 IL-4, IL-5 및 IL-13 등의 사이토카인의 농도를 측정하였다.
- [74] 먼저, 폐조직 생검 결과, OVA를 처리 한 천식 동물 모델의 폐 조직은 기관지벽이 두꺼워져 있지만, NPB301을 정맥 주사한 마우스 모델의 기관지 조직은 정상으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 6 참조).
- [75] 또한, OVA에 의해 유도된 FcεRIα를 발현하도록 형질전환된 천식 모델의 기관지 폐포 세척액에서 전체 세포수, 대식구, 호산구 및 림프구의 수가 PBS 그룹에 비해 증가하지만, NPB301을 처리할 경우, 기관지 폐포 세척액에서 전체 세포수, 대식구, 호산구 및 림프구의 수가 현저하게 감소함을 확인할 수 있었으며(도 7 참조),
- [76] NPB301를 처리한 결과, 기관지 폐포에서 염증반응에 관계된 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 양이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(도 8 참조).
- [77] [실시예 6] 표면 플라즈몬 공명(Biacore)을 이용한 NPB301과 human IgE의 친화도 측정
- [78] GE의 Biacore3000을 이용하여 CM5 sensor chip에 NPB301을 10 mM sodium acetate(pH 5.0) 조건에서 1030 RU로 고정(immobilization)화 하고, EDC/NHS를 이용하여 표면을 활성화 시킨 후, 1 M 에탄올아민(ethanolamine)방법으로 고정시켰다. 대조 셀에는 NPB301을 넣지 않고 동일 조건으로 고정시켰다. 인간 IgE 또는 마우스 IgE를 HBS-EP buffer에 25 내지 0 nM 로 1/2 희석하여 CM5 chip에 작은 농도에서 높은 농도 순으로 흘려주어 kinetics를 측정하고 10 mM Glycine(pH 2.0) buffer를 이용하여 재생하였다. Biacore(SPR기법)로 NPB301과 인간 IgE 또는 마우스 IgE의 친화도를 측정하였다. 그 결과 하기 표 1에서도 확인할 수 있듯이, $KD = 1.43 \times 10^{10}(M)$ 로 측정되어 NPB301과 인간 IgE의 친화도(affinity)가 좋은 것으로 측정되었다.

[79]

[표 1]

	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KA(1/M)	KD(M)
인간 IgE	4.17×10^5	5.97×10^{-5}	6.89×10^9	1.43×10^{-10}
마우스 IgE	1.61×10^5	1.36×10^{-5}	1.18×10^{10}	8.46×10^{-11}

[80] [실시에 7] 접촉성피부염 동물모델을 이용한 **NPB301**의 효능평가

[81] TG 마우스 4주령 암컷을 사용하였다. 배의 털을 밀고 5% Oxazoline(OXA) 100 μ l를 도포하여 감작시킨 후, Day 5, Day 7, Day 9, Day 11에 0.1% Oxazoline(OXA) 10 μ l를 양쪽 귀에 도포하고, Day 9에는 5MPK의 NPB301을 정맥주사 하였다. 이 후, Day 13에 귀의 두께를 측정하였다.

[82] 그 결과, OXA 대조군에 비해서 5MPK의 NPB301을 정맥주사한 그룹의 평균값이 30% 가량 낮아져 NPB301에 의해 접촉성피부염의 피부 두께가 상당히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 9 참조).

[83] [실시에 8] TPA 유도 피부염증 동물모델을 이용한 **NPB301**의 효능평가

[84] TG 마우스 6주령 암컷을 사용하였다. Day 1, Day 2에 0.05 g(20 μ l)의 TPA를 귀에 도포하였다. Day 3, Day 4에 0.5 g(20 μ l)의 TPA를 귀에 도포하였다. Day 2, Day 4에 NPB301을 5 MPK, 10 MPK, 20 MPK로 정맥주사하여, Day 5에 귀의 두께를 측정하였다.

[85] 귀의 두께 측정 결과, TPA에 의해 유도된 부종이 NPB301을 정맥주사 하였을 때 NPB301의 농도에 따라 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 10 참조).

[86] [실시에 9] 땅콩 알레르기 유발 동물모델을 이용한 **NPB301**의 효능평가

[87] TG 마우스 6주령 암컷을 사용한다. 땅콩과 콜레라 독신을 3일 동안 1일 1회 공복에 경구투여하고 2주 후 땅콩과 콜레라 독신을 3일 동안 1일 1회 공복에 경구투여 반복하였다. 2주 후, 30분 간격으로 땅콩을 먹인 뒤, 하루에 한 번, 또는 이틀에 한 번씩 일주일간 10 MPK의 NPB301을 복강투여하고, 혈액 내 전체 면역글로블린 E를 정량 Kit을 이용하여 측정하였다.

[88] 그 결과, T/G 마우스에 10 MPK NPB301을 처리한 결과 매일 주사하였을 때 뿐 아니라 이틀간격으로 주사하였을 때에도 정상 수준의 면역글로블린 E의 결과를 확인하였고, 상기 결과로부터 NPB301이 땅콩 알레르기 질환을 완화시켜주는 결과를 확인할 수 있었다(도 11 참조).

[89] [실시에 10] 비염 동물모델을 이용한 **NPB301**의 효능평가

[90] Balb/c 마우스 6주령 암컷을 사용하였다. Day 0과 Day 7에 OVA와 Alum을 섞어 복강주사로 감작시킨 후에 Day 14에서 Day 20까지 매일 OVA 150 ug/10 μ l를 코로 흡입시키는데 OVA를 코로 흡입하기 30분 전에 NPB301을 5 MPK, 10 MPK, 20 MPK의 농도로 흡입시켜 주었다. Day 21에 OVA를 흡입시키고 직후에 10분간

- 코 문지르기 횟수(도 12A 참조)와 재채기 횟수(도 12B 참조)를 측정하였다.
- [91] 도 12에서도 확인할 수 있듯이, 비염 동물모델에 NPB301을 처리한 결과 코 문지르는 횟수와 재채기 하는 횟수가 감소하는 결과를 확인하였고, 상기 결과로부터 NPB301이 비염 질환을 완화시켜주는 결과를 확인할 수 있었다.
- [92] **[실시예 11] 아토피 동물모델을 이용한 NPB301의 효능평가**
- [93] 무모 마우스 7 주령 암컷을 사용하였다. 5% Oxazoline(OXA) 100 μ l을 도포하여 감작시킨 7일 경과 후 0.1% OXA 100 μ l를 마우스의 등에 이틀에 한번 20일간 고루 도포하였다. 아토피 피부염 유발이 종료된 후 TEWL(경피 수분손실도), 피부 내수화도를 측정하기 위해 TEWameter TM 300(Courage & Khazaka, Cologne, Germany)을 사용하고 피부두께를 측정한 후 일정한 그룹을 나눈다. 5, 10, 20 MPK NPB301을 하루에 한번 정맥주사(도 13 참조)복강주사(도 14 참조)후 측정하였다.
- [94] 그 결과 경피 수분손실도, 피부 내 수화도, 피부두께 모두 완화되는 결과를 확인할 수 있었다.
- [95] **[실시예 12] OVA 아토피 동물모델을 이용한 NPB301의 효능평가**
- [96] (1) NPB301 처리 농도에 따른 피부두께 변화
- [97] C57BL/6 mouse의 털을 밀고, 3M tape으로 5번 자극을 주어 1 × 1 cm 길이의 멸균 거즈에 100 ug의 OVA를 도포하여 Tegaderm으로 일주일 동안 감싸주었다. 3주 간격으로 3회(Day 1~7, Day 22~28, Day 43~49) OVA에 노출시키고 NPB-301을 0.3, 1, 5 MPK로 이틀에 한번 복강주사하여 피부두께의 변화를 측정하였다.
- [98] 그 결과 NPB301을 0.3, 1.2, 5 MPK 주사한 그룹 모두에서 피부두께가 감소하는 경향을 확인하였고, 상기의 결과로부터 아토피 피부가 호전되는 것을 확인할 수 있었다(도 15 참조).
- [99] (2) NPB301 처리에 따른 혈액 내 전체 면역글로블린 E 변화
- [100] TG mice의 털을 밀고, 3M tape으로 5번 자극을 주어 1 × 1 cm 길이의 멸균 거즈에 100 ug의 OVA를 도포하여 Tegaderm으로 일주일 동안 감싸주었다. 3주 간격으로 3회(Day 1~7, Day 22~28, Day 43~49) OVA에 노출시키고 NPB-301을 5 MPK로 이틀에 한번 복강주사하여 피부 두께의 변화를 측정하였다(도 16A 참조). 및 혈액 내 전체 면역글로블린 E를 정량 Kit을 이용하여 측정하였다(도 16B 참조). TG 마우스에 5 MPK NPB301을 처리한 결과 이틀간격으로 측정하였을 때 점차 피부두께가 감소하는 경향을 보았으며, 전체 혈액 내 IgE도 감소하는 결과를 보였다. 상기의 결과로부터 아토피 피부염증이 완화되는 것을 확인할 수 있었다(도 16 참조).
- [101] (3) NPB301의 제형에 따른 피부두께 변화
- [102] C57BL/6 mouse의 털을 밀고, 3M tape으로 5번 자극을 주어 1 × 1 cm 길이의 멸균 거즈에 100 ug의 OVA를 도포하여 Tegaderm으로 일주일 동안 감싸주었다. 3주 간격으로 3회(Day 1~7, Day 22~28, Day 43~49) OVA에 노출시키고 2%

- NPB301 제형을 만들어 이틀간 환부에 발라주고 피부두께의 변화를 측정하였다.
- [103] 그 결과, C57BL/6 mouse의 아토피 환부에 2% NPB301을 이틀간 도포하였을 때 피부두께가 감소하는 경향을 확인하였고, 상기의 결과로부터 아토피 피부염증이 완화되는 것을 확인할 수 있었다(도 17 참조).
- [104] [실시예 13] OVA 천식 동물모델을 이용한 NPB301의 효능평가
- [105] OVA(ovalbumin) 25 ug과 알럼(Alum) 1 mg을 200 μ l 용액에 포함되도록 하였다. 혼합된 OVA-알럼을 호모게나이저를 이용하여 10분정도 계속 혼합하였다. 혼합이 끝난 OVA-알럼은 1.5 ml 튜브에 200 μ l씩 분주하고 1 ml 주사기에 하나씩 넣어주었다. 이후, balb/c 마우스 6주령 암컷에 0, 6, 13, 20일, 4차에 걸쳐 200 μ l씩 복강 주사하였다. 26, 30일에 코 점막을 통하여 1% OVA 50 μ g을 흡입하도록 하였다. NPB301은 5 mg/kg로 1% OVA 50 μ g 흡입 4일 전, 3일 전, 2일 전, 1일 전에 주사하였다. 24시간 후 폐조직을 떼어내어 생검하고, 기관지 폐포 세척액에서 세포 수를 계수하였다. 졸레틸(Zoletil)을 이용해 마취한 마우스의 기관지를 절개한 후, 관을 삽입하고 22 게이지 주사바늘을 기관에 삽입한 뒤, 기관지 폐포 세척을 시행하였는데 1회당 0.9 mL의 PBS를 2회 주입하여 수거하였다. 수거된 기관지 폐포 세척액은 4°C, 5000 rpm 에서 5분간 원심분리하고, 상층액은 다음 실험시까지 -70°C에 보관하였다. 원심분리로 얻어낸 세포를 혈구 계선반을 이용하여 총 세포수를 관찰하였다.
- [106] 그 결과 control 에 비교하여 4, 3, 2, 1일 전 투입한 NPB301 그룹에서 기관지 폐포 세포수가 감소하였고, 그 중 OVA 흡입 하루 전에서 기관지 폐포 세포수가 제일 많이 감소되는 경향이 나타남을 확인하였고, 상기의 결과로부터 천식질환이 완화되는 것을 확인할 수 있었다(도 18 참조).
- [107] [실시예 14] TMA 피부염증 동물모델을 이용한 NPB301의 효능평가
- [108] TG mice에 TMA를 도포하여 피부염증을 유발시켰다. TG mice에 등에 있는 털을 밀고 5% TMA 50 μ l(in acetone and isoprophylmyristate, 4:1)을 도포하였다. 5일 경과 후 5% TMA 10 μ l를 양쪽 귀에 도포하였다. 6일부터 15일까지 매일 1회 2% TMA 10 μ l를 양쪽 귀에 계속 도포하였다. 9일째와 13일째 되는 날 5MPK, 10MPK의 NPB301을 정맥투여 하고(주2회), 17일에 혈액 내 전체 면역글로블린 E를 정량 Kit을 이용하여 측정하였다.
- [109] TG 마우스에 NPB301을 처리한 결과, 면역글로블린 E의 수치가 정상치에 가깝게 낮아지는 것을 확인하였고, 상기의 결과로부터 NPB301이 염증 질환을 완화시켜주는 것을 확인할 수 있었다(도 19 참조).

서열목록 Free Text

- [110] 서열목록 1은 Fc ϵ RI의 수용성 단편의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- [111] 서열목록 2는 Fc ϵ RI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc 영역이 펩타이드 링크로 연결된 복합체(NPB301)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- [112] 서열목록 3은 Fc ϵ RI의 수용성 단편과 인간 항체의 Fc 영역이 펩타이드 링크로

연결된 복합체(NPB301)를 인코딩하는 염기서열을 나타낸 것이다.

청구범위

- [청구항 1] FcεRI의 수용성(soluble) 단편과 생체 적합성(biocompatibility)을 가지는 물질이 접합된 복합체(NPB301).
- [청구항 2] 청구항 제1항에 있어서, FcεRI의 수용성 단편은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 복합체(NPB301).
- [청구항 3] 청구항 제1항에 있어서, 생체 적합성을 가지는 물질은 인간 항체 Fc 영역, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 또는 디아실글리세롤(DAG) 임을 특징으로 하는 복합체(NPB301).
- [청구항 4] 청구항 제1항에 있어서, FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체 Fc 영역이 접합된 복합체(NPB301).
- [청구항 5] 청구항 제4항에 있어서, FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체 Fc 영역이 펩타이드 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 복합체(NPB301).
- [청구항 6] 청구항 제5항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 복합체(NPB301).
- [청구항 7] 청구항 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 복합체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 알레르기성 질환 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 8] 청구항 제7항에 있어서, 상기 알레르기성 질환은 아토피성 피부염, 알레르기성 비염, 천식, 두드러기 및 접촉성 피부염에서 선택됨을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 9] 청구항 제4항 내지 제6항에 따른 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체 Fc 영역의 복합체(NPB301)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 10] 청구항 제9항에 있어서, 서열번호 3에 기재된 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 청구항 제9항 또는 제10항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터.
- [청구항 12] 제11항의 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [청구항 13] 청구항 제12항에 있어서, 상기 숙주세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균, 곤충세포에서 선택된 것임을 특징으로 하는 숙주세포.
- [청구항 14] 청구항 제13항에 있어서, 상기 형질전환된 숙주 세포는 원숭이 신장 세포7(COS7 : monkey kidney cells) 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO : chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK : baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포, 대장균, 바실러스

- 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.), 아스페르길러스 속(*Aspergillus* sp.), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 속(*Schizosaccharomyces* sp.) 및 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)에서 선택됨을 특징으로 하는 숙주세포.
- [청구항 15] 청구항 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 벡터 또는 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 FcεRI의 수용성 단편과 인간 항체 Fc 영역의 복합체를 생산하는 방법.
- [청구항 16] (a) FcεRI의 수용성 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환된 숙주세포를 배양하여 FcεRI의 수용성 단편을 생산하는 단계; 및
(b) (a) 단계에서 생산된 FcεRI의 수용성 단편에 생체적합성 물질을 접합하는 단계;
를 포함하는 FcεRI의 수용성 단편을 포함하는 복합체를 생산하는 방법.
- [청구항 17] 청구항 제16항에 있어서, 상기 생체적합성 물질은 폴리에틸렌글리콜(PEG) 또는 디아실글리세롤(DAG) 중에서 선택된 어느 하나 이상임을 특징으로 하는 FcεRI의 수용성 단편을 포함하는 복합체를 생산하는 방법.

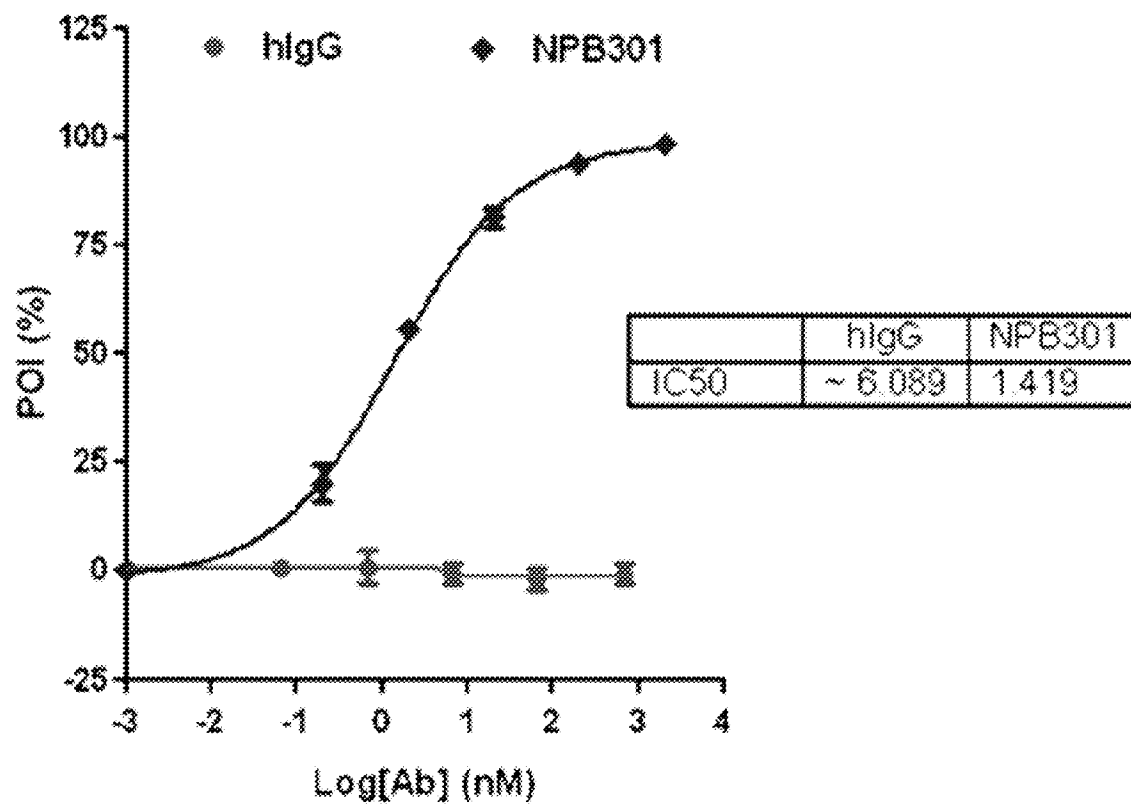
[Fig. 1]

GTCCCTCAGA AACCTAAGGT CTCCTTGAAC CCTCCATGGA ATAGAATATT TAAAGGAGAG AATGTGACTC
TTACATGTAA TGGGAACAAT TTCTTTGAAG TCAGTTCCAC CAAATGGTTC CACAATGGCA GCCTTTCAGA
AGAGACAAAT TCAAGTTTGA ATATTGTGAA TGCCAAATTT GAAGACAGTG GAGAATACAA ATGTCAGCAC
CAACAAGTTA ATGAGAGTGA ACCTGTGTAC CTGGAAGTCT TCAGTGACTG GCTGCTCCTT CAGGCCTCTG
CTGAGGTGGT GATGGAGGGC CAGCCCCTCT TCCTCAGGTG CCATGGTTGG AGGAACTGGG ATGTGTACAA
GGTGATCTAT TATAAGGATG GTGAAGCTCT CAAGTACTGG TATGAGAACC ACAACATCTC CATTACAAAT
GCCACAGTTG AAGACAGTGG AACCTACTAC TGTACGGGCA AAGTGTGGCA GCTGGACTAT GAGTCTGAGC
CCCTCAACAT TACTGTAATA AAAGCTCCGC GTGAGAAGGG TGGAGGCGGT TCAGGCGGTG GAGGTTGAGG
AGGTGGCGGA TCCGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA
GTCTTCCTCT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA
TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG
AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA
GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGCTGGAC TCCGACGGCT
CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC
CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG TAAA

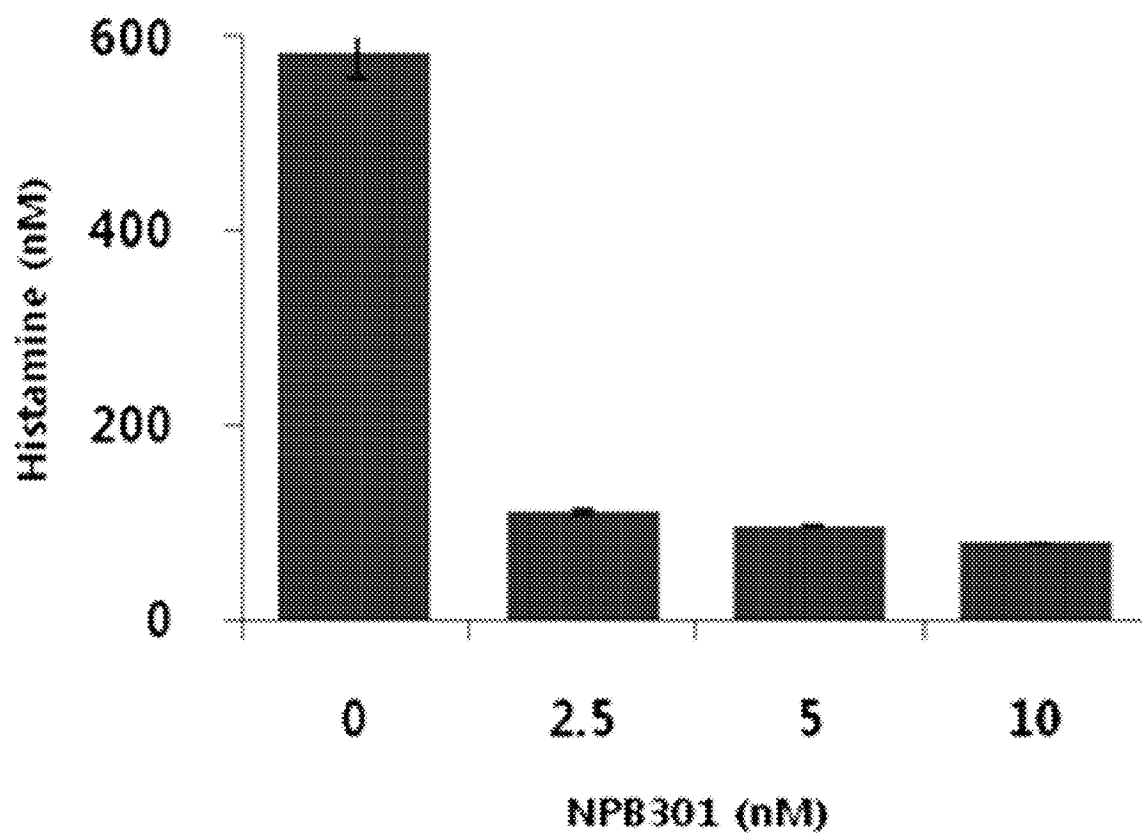
[Fig. 2]

VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN SSLNIVNAKF EDSGEYKCQH
QQVNESEPVY LEVFSDWILL QASAEVVMG QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY YKDGEALKYW YENHNISITN
ATVEDSGTYY CTGKVWQLDY ESEPLNITVI KAPREKGGGG SGGGSGGGG SDKTHTCPPC PAPELLGGPS
VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

[Fig. 3]

Inhibition of beta-hexosaminidase activity

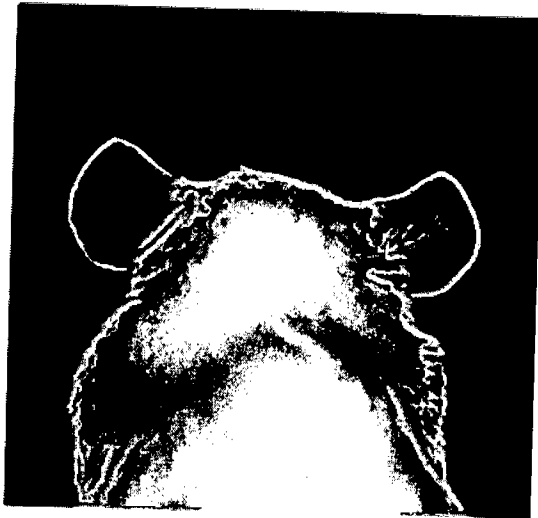
[Fig. 4]



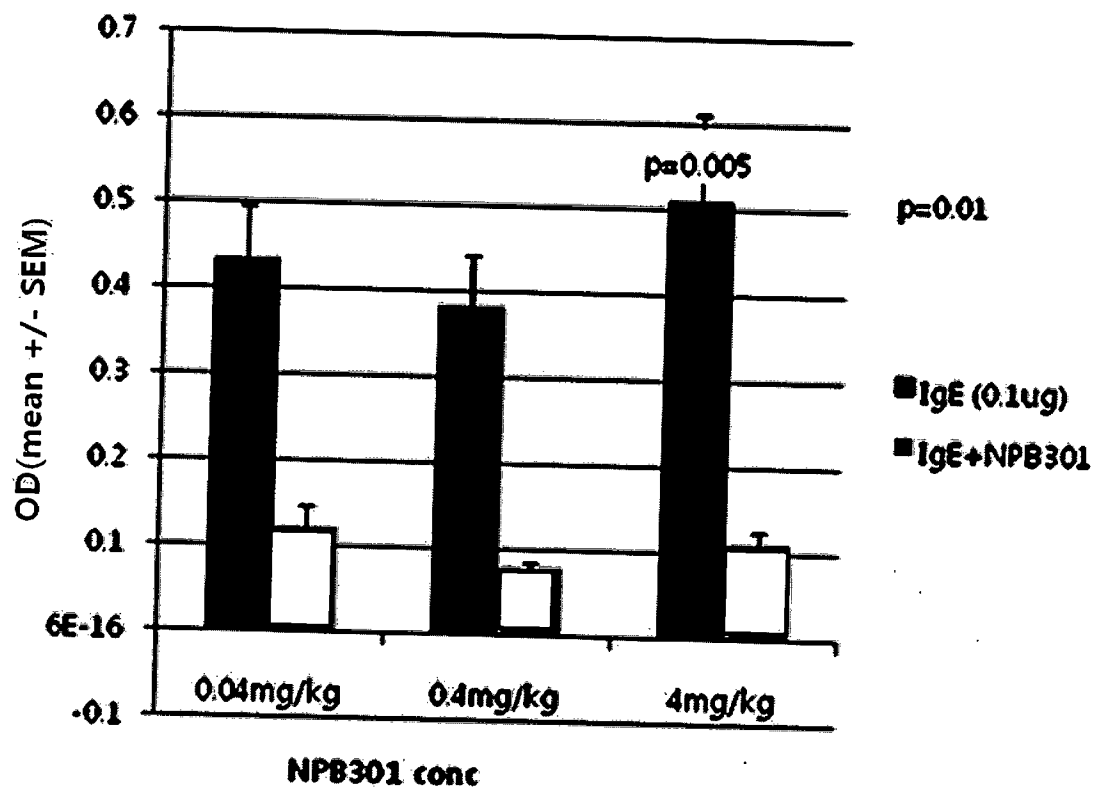
3/16

【Fig. 5】

A

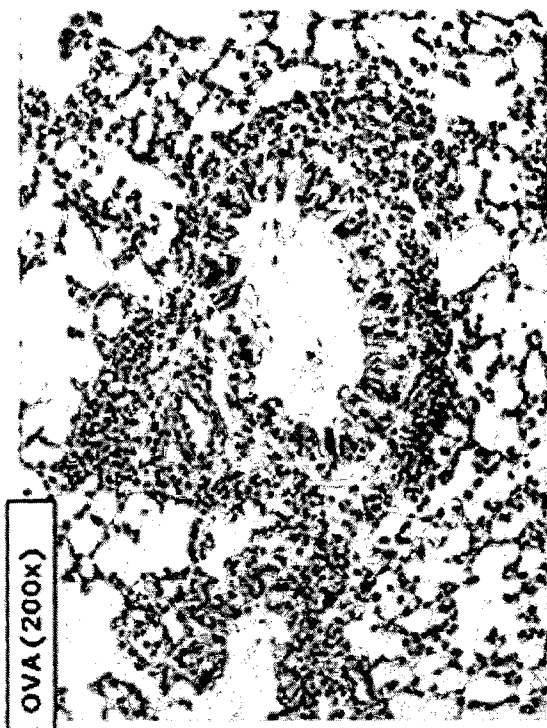


B

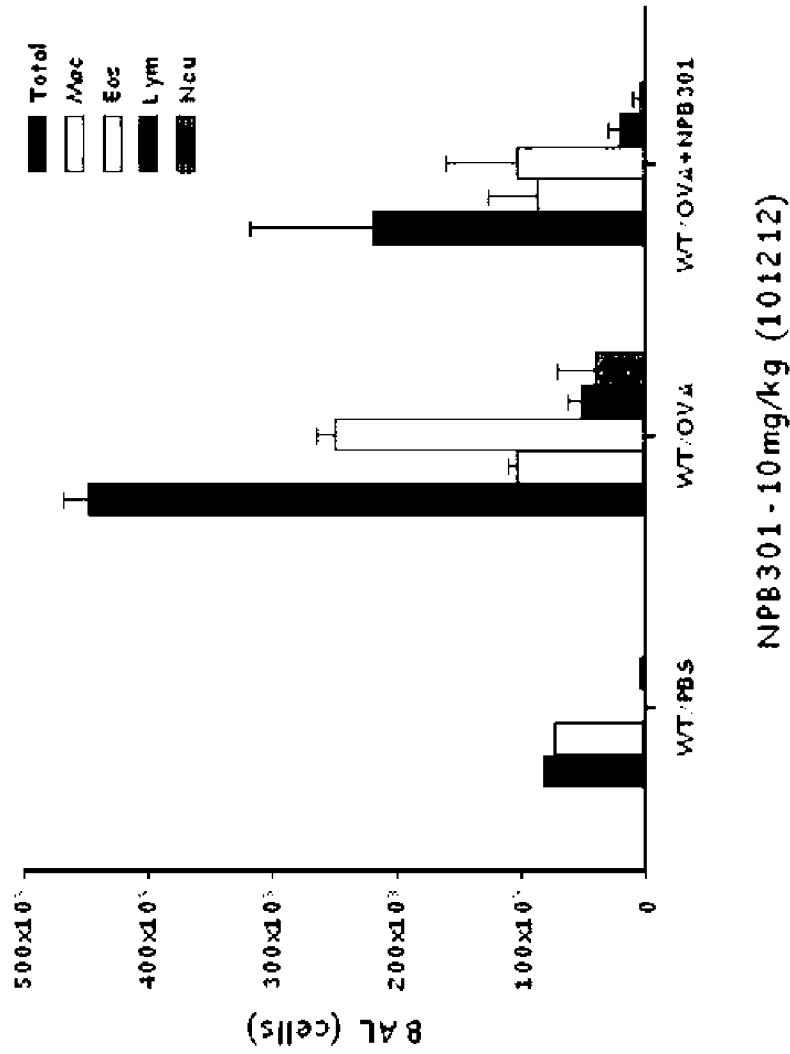


4/16

【Fig. 6】

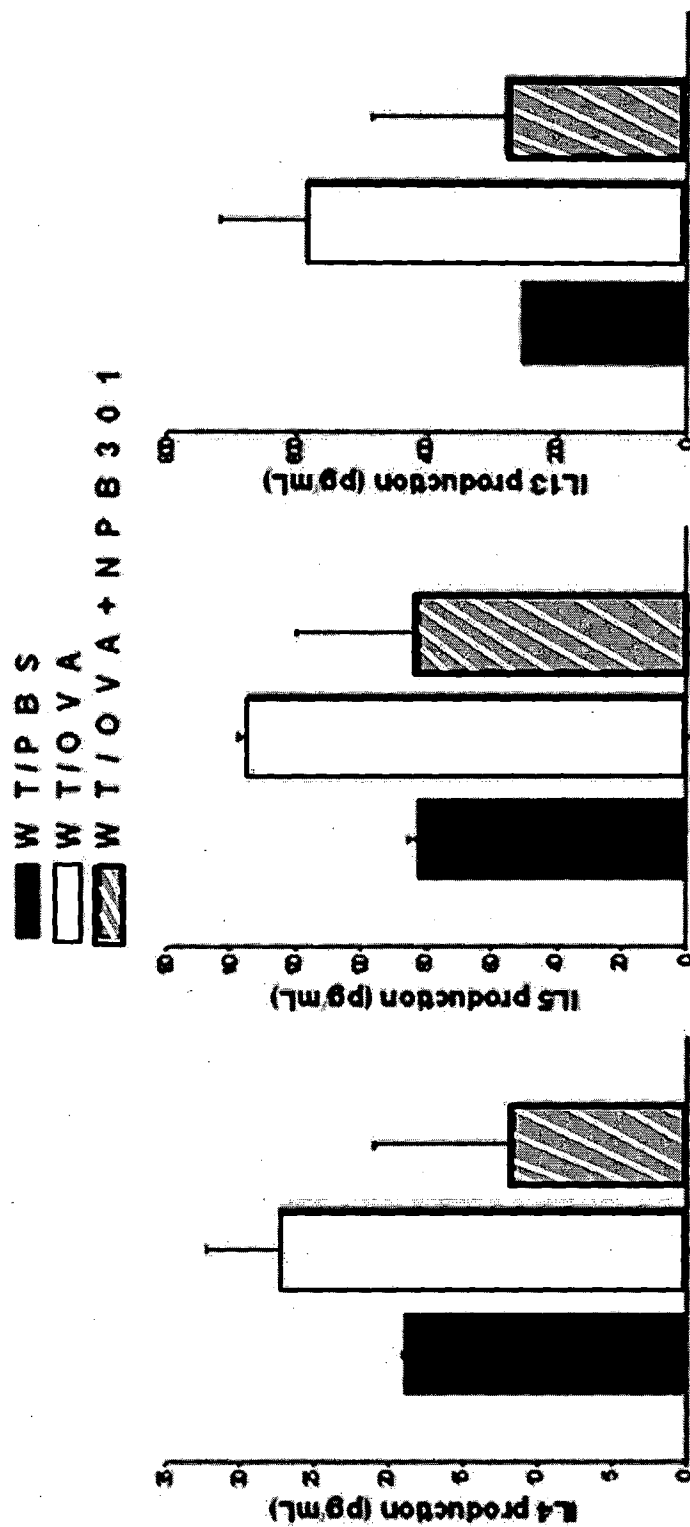


[Fig. 7]

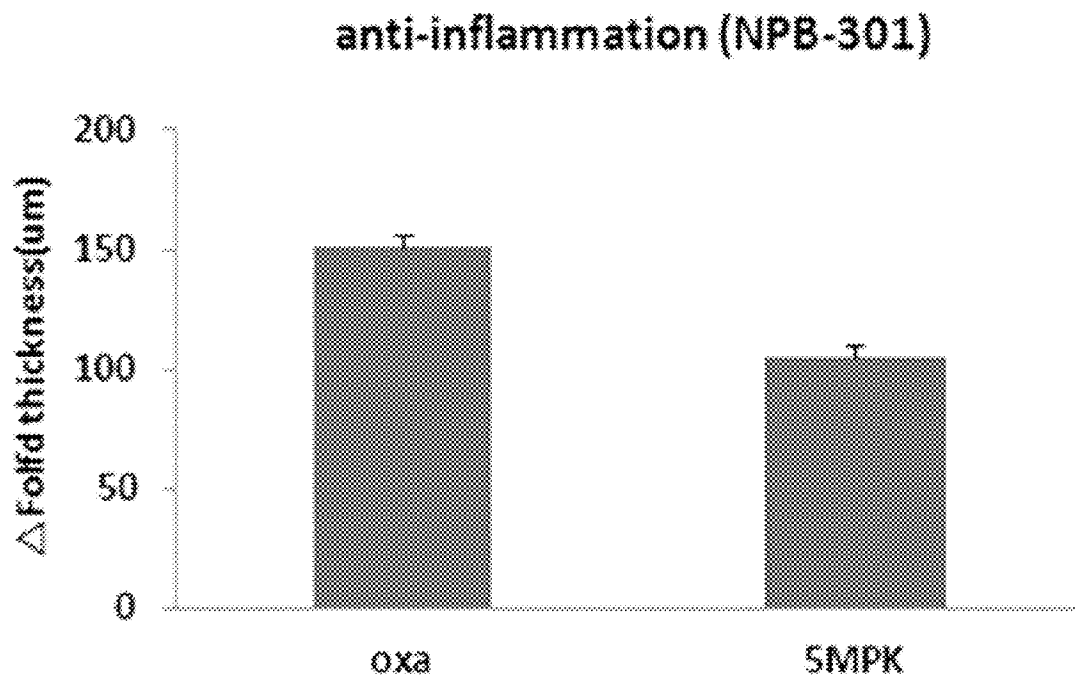


6/16

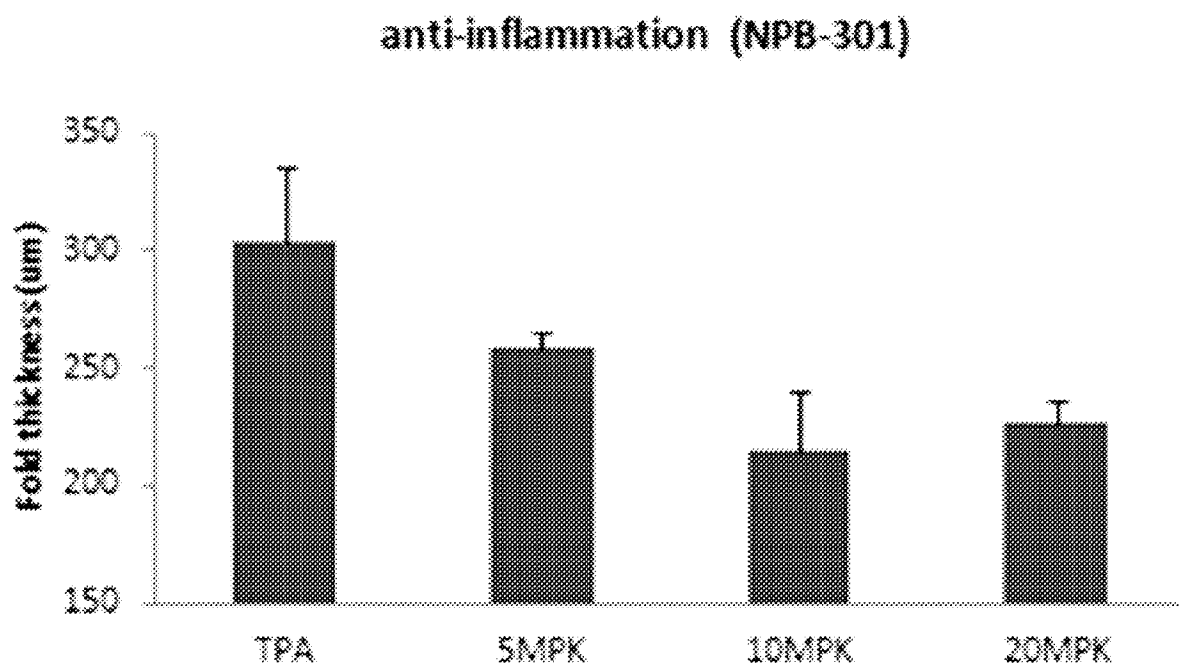
[Fig. 8]



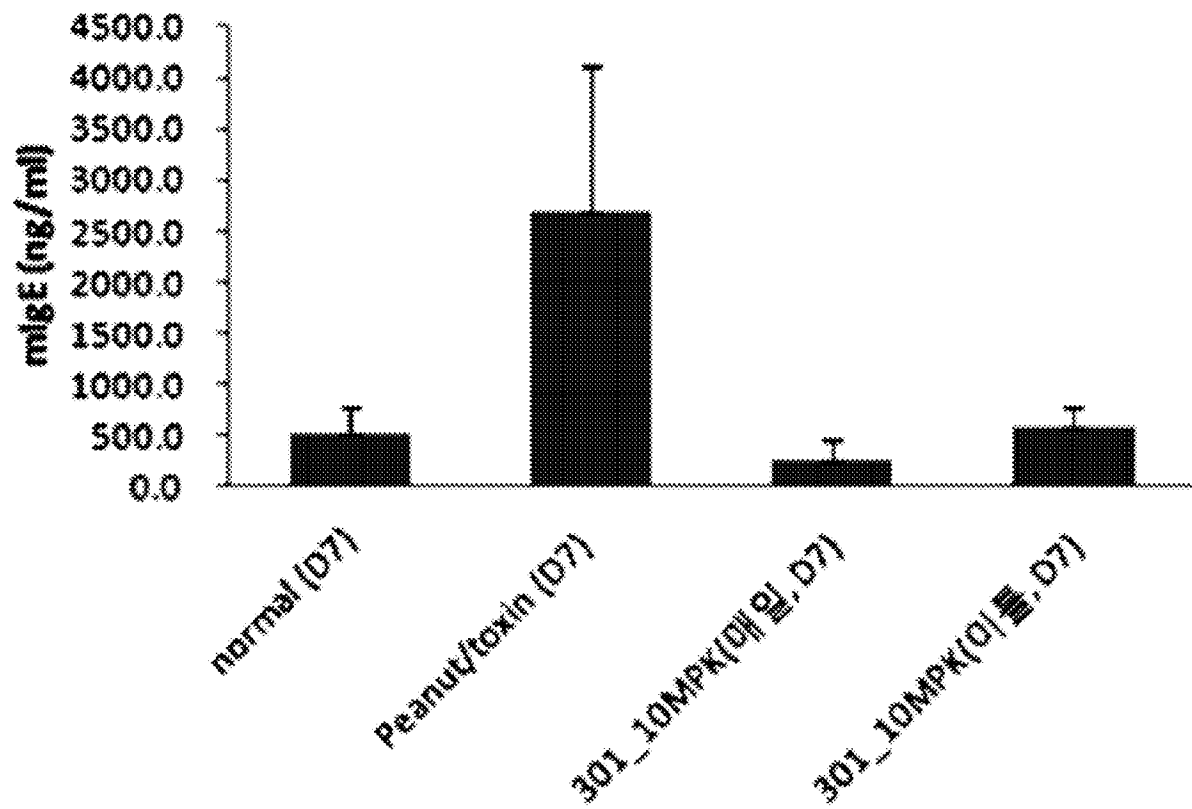
[Fig. 9]



[Fig. 10]

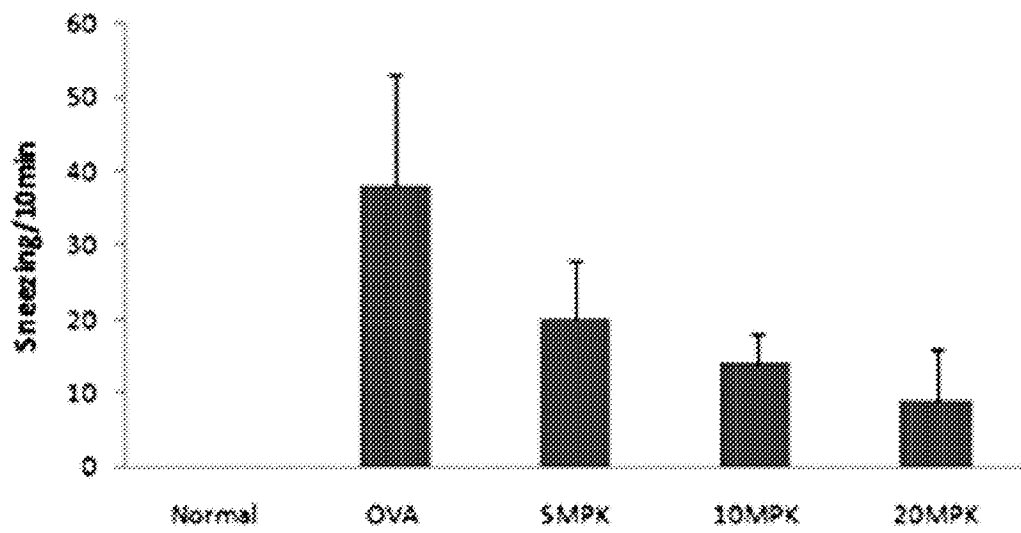


[Fig. 11]

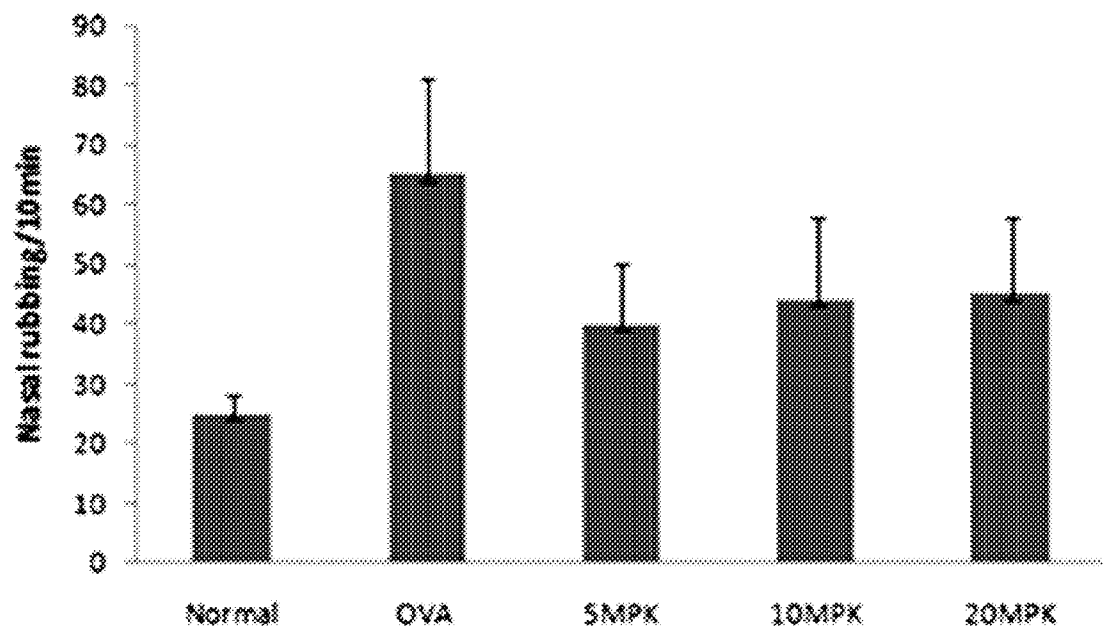


[Fig. 12]

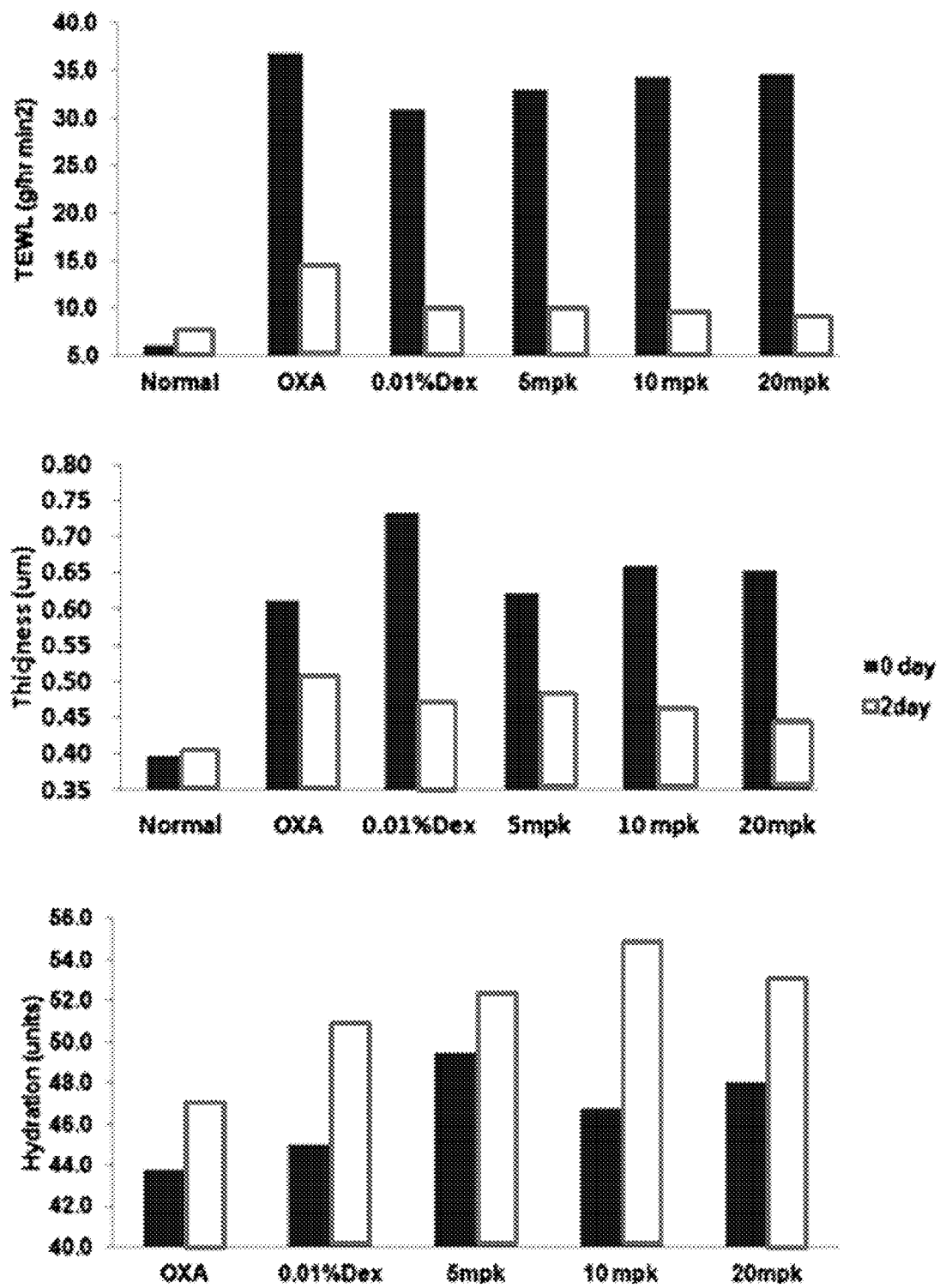
A



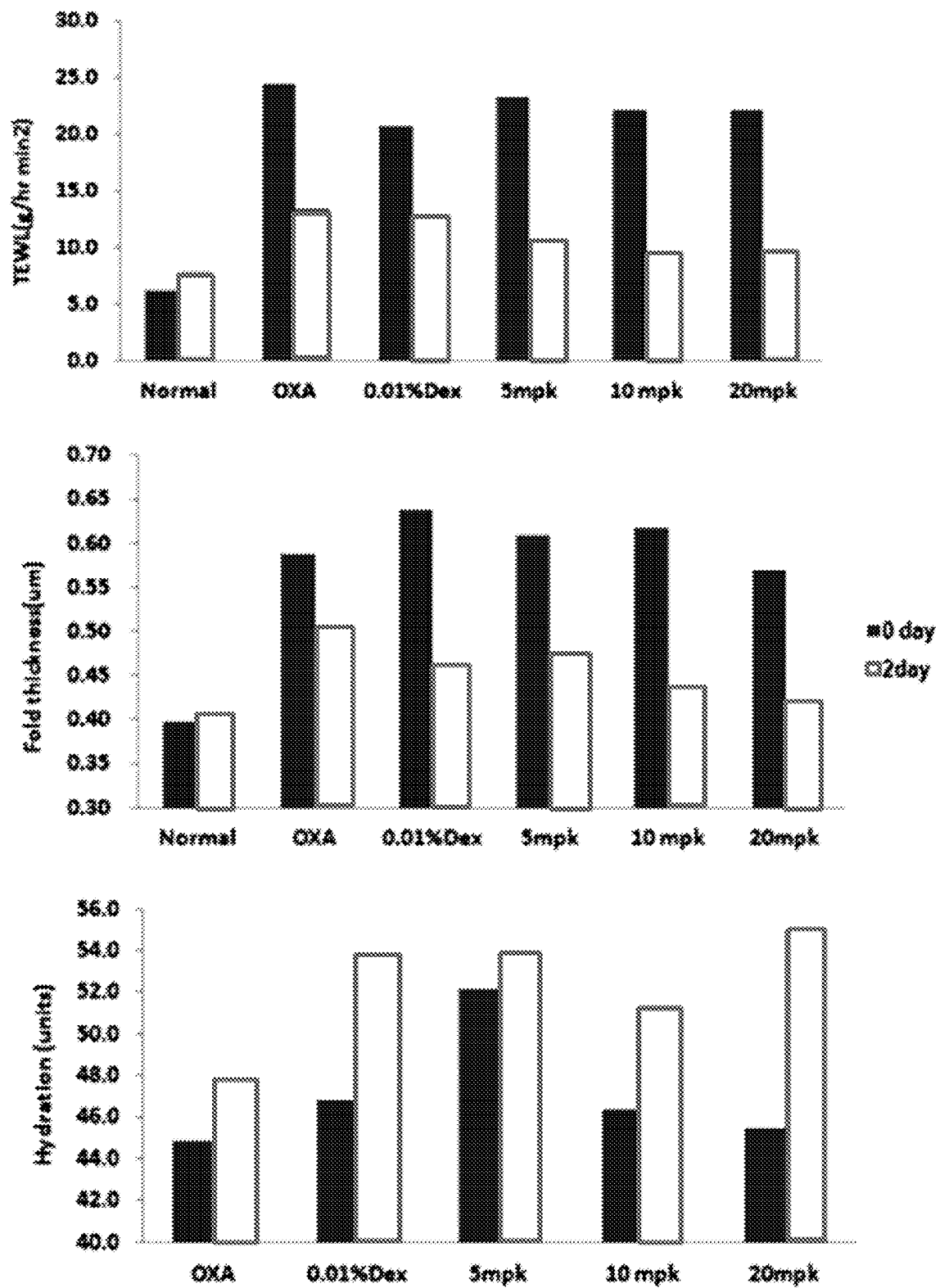
B



[Fig. 13]

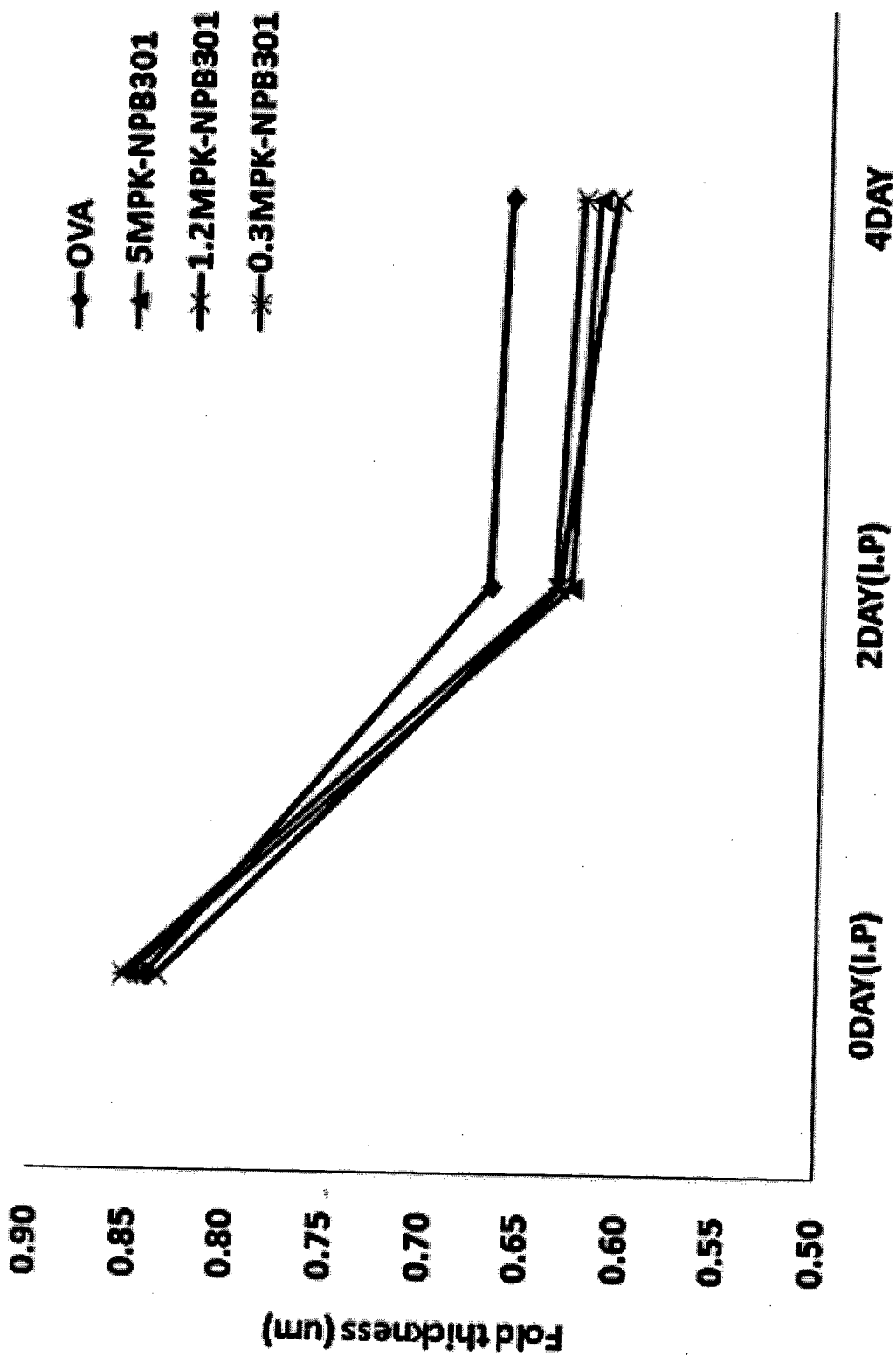


[Fig. 14]

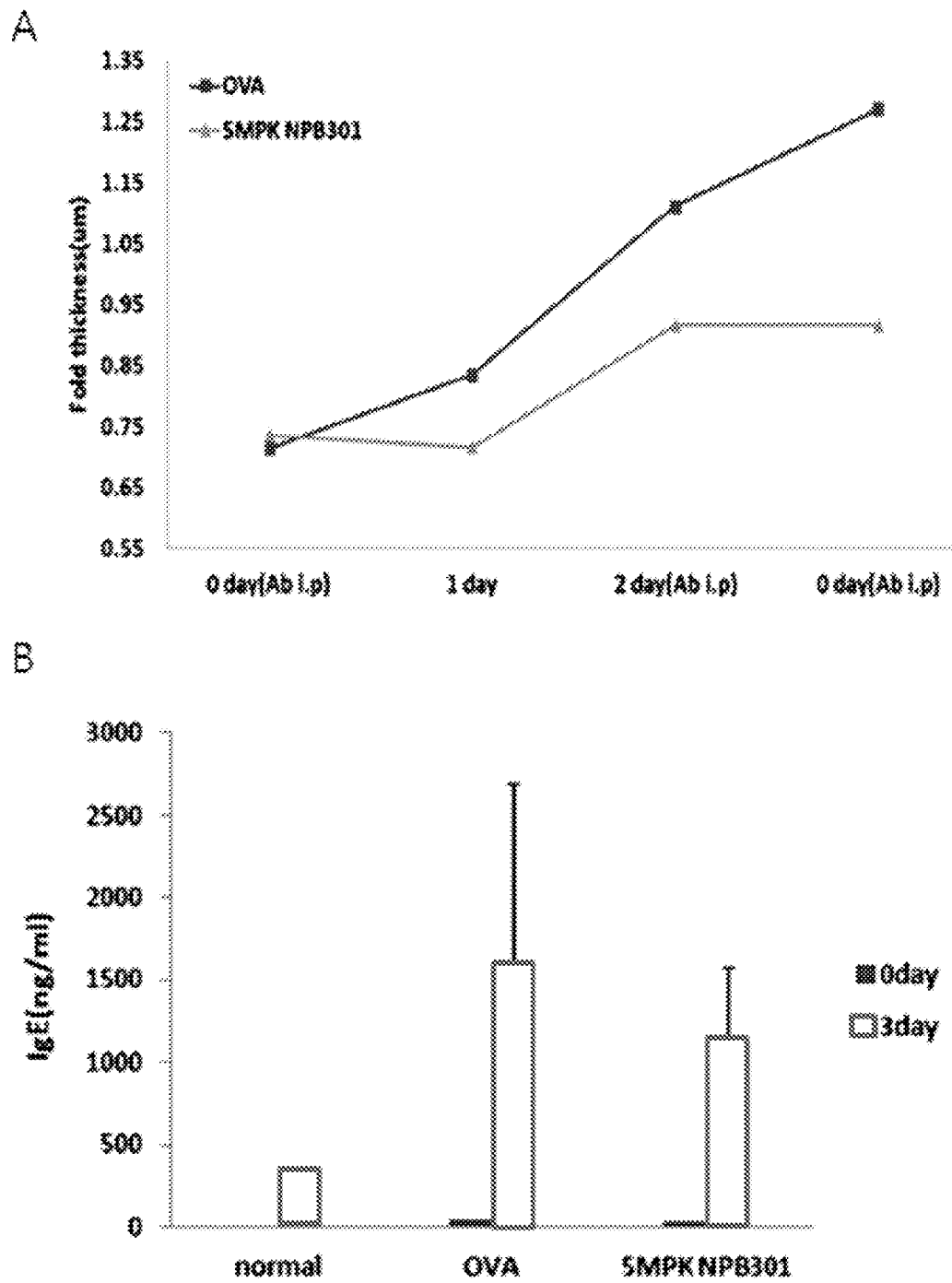


12/16

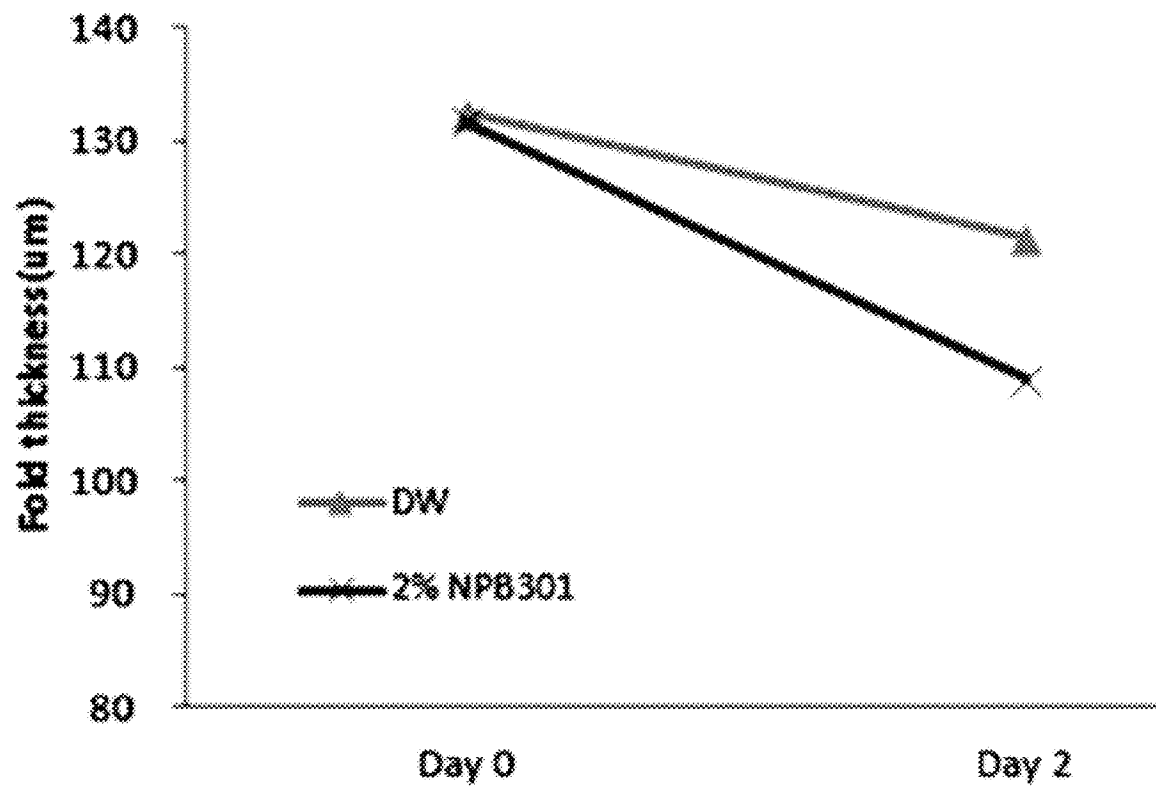
【Fig. 15】



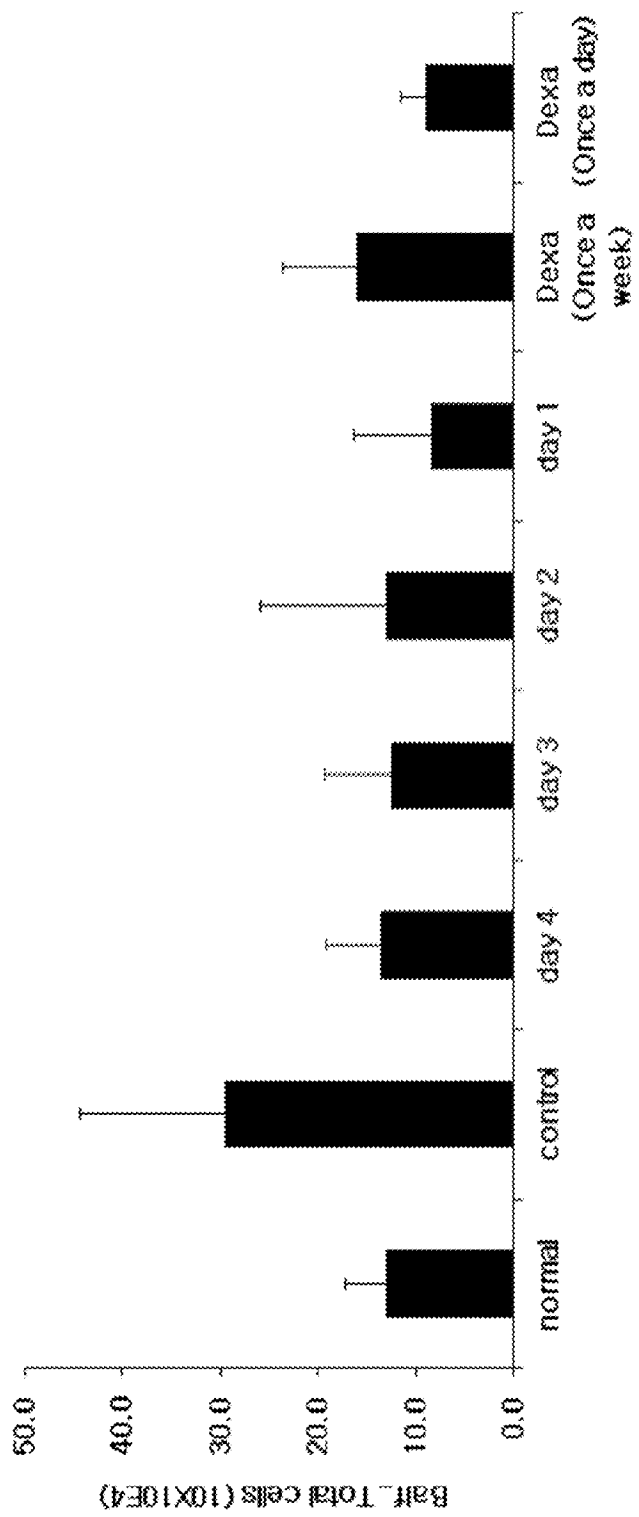
[Fig. 16]



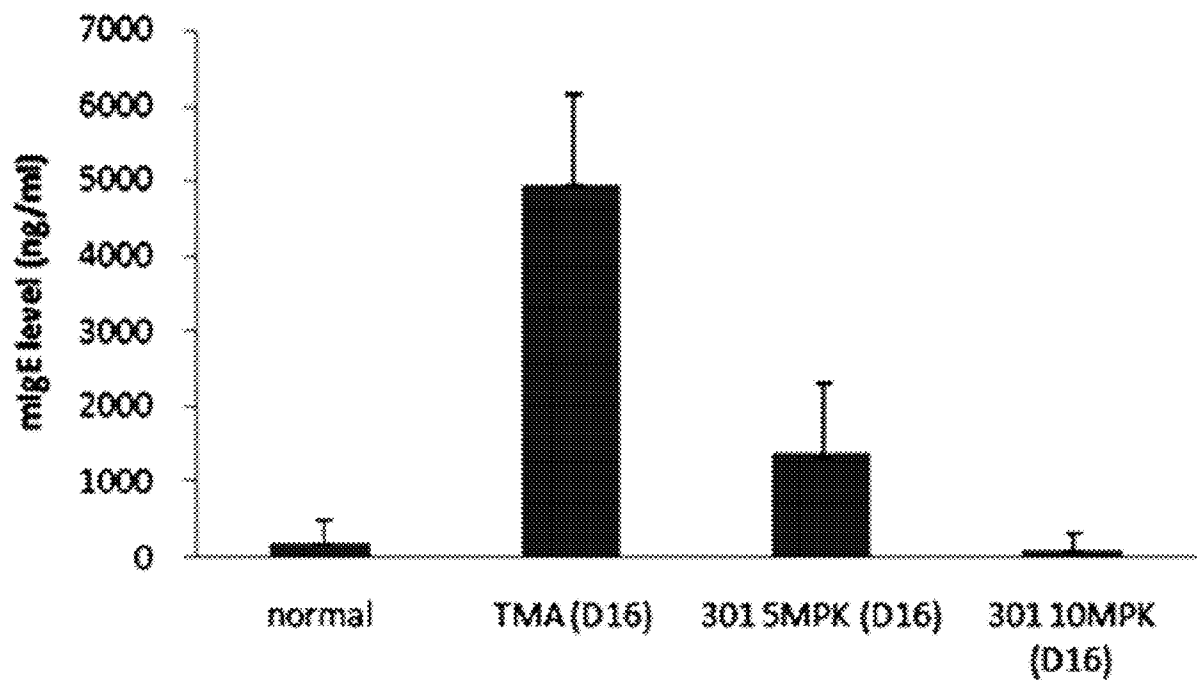
[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/004075**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 38/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 38/16(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)

A61K 38/00; C07H 21/04; C12N 15/64; C12N 15/12; C07K 16/42; A61K 47/48

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), PubMed, Google

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0502879 B1 (NOVARTIS AG) 25 July 2005 See abstract; the claims.	1-8,16,17
A	STEPHEN J. DEMAREST, et al. "An Intermediate pH Unfolding Transition Abrogates the Ability of IgE to Interact with Its High Affinity Receptor Fcεc1ronRIalpha" JBC, Vol. 281(41), pp. 30755-30767 (2006) See abstract.	1-8,16,17
A	US 2005-0170451 A1 (KAZUHISA SUGIMURA et al.) 04 August 2005 See abstract; the claims.	1-8,16,17
A	KR 10-0464699 B1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD.) 28 July 2005 See abstract; the claims.	1-8,16,17



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

21 DECEMBER 2012 (21.12.2012)

Date of mailing of the international search report

26 DECEMBER 2012 (26.12.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/004075

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.: **10-15**
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 10 to 15 refer to claim 9 which doesn't refer to other claims in the alternative way, thus claim 9 is not clearly defined.
Claims 12 to 14 refers to claim 11 which is not drafted in compliance with the manner of claiming multiple dependent claims, thus claims 12 to 14 are not clearly defined.

3. ☒ Claims Nos.: **9,11,15**
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/KR2012/004075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0502879 B1	25.07.2005	AU 1997-42025 B2	20.07.2000
		CA 2261562 A1	05.02.1998
		CA 2261562 C	05.04.2011
		CN 1146664 C0	21.04.2004
		CN 1229439 A0	22.09.1999
		EP 0917581 A1	23.03.2005
		EP 0917581 B1	09.01.2008
		JP 03-681402 B2	10.08.2005
		JP 2000-516089 A	05.12.2000
		TW 565571 A	11.12.2003
		TW 565571 B	11.12.2003
		WO 98-04718 A1	05.02.1998
US 2005-0170451 A1	04.08.2005	AU 2002-320790 B2	23.08.2007
		CA 2454307 A1	30.01.2003
		EP 1408113 A1	14.04.2004
		EP 1408113 A4	12.01.2005
		KR 10-0932465 B1	17.12.2009
		US 7384633 B2	10.06.2008
		WO 03-008584 A1	30.01.2003
KR 10-0464699 B1	28.07.2005	AU 1997-10707 B2	06.04.2000
		CN 1207686 A0	10.02.1999
		EP 0868198 A1	07.10.1998
		EP 0868198 A1	09.07.2003
		EP 0868198 B1	10.03.2004
		JP 2000-516570 A	12.12.2000
		JP 2009-106286 A	21.05.2009
		US 2003-0158390 A1	21.08.2003
		US 2009-0082549 A1	26.03.2009
		US 6919079 B1	19.07.2005
		US 7704506 B2	27.04.2010
		US 7740853 B2	22.06.2010
		WO 97-22364 A1	26.06.1997

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>A61K 38/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/00; C07H 21/04; C12N 15/64; C12N 15/12; C07K 16/42; A61K 47/48 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), PubMed, Google		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-0502879 B1 (노파르티스 아게) 2005.07.25 See abstract; claims.	1-8, 16, 17
A	STEPHEN J. DEMAREST, et al. `An Intermediate pH Unfolding Transition Abrogates the Ability of IgE to Interact with Its High Affinity Receptor Fcεγ1R1α` JBC, Vol 281(41), pp. 30755-30767 (2006) See abstract.	1-8, 16, 17
A	US 2005-0170451 A1 (KAZUHISA SUGIMURA 외 2명) 2005.08.04 See abstract; claims.	1-8, 16, 17
A	KR 10-0464699 B1 (이섬 리서치 디벨러프먼트 컴파니 오브 더 히브루) 2005.07.28 See abstract; claims.	1-8, 16, 17
☐ 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 2012년 12월 21일 (21.12.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 12월 26일 (26.12.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 박정웅 전화번호 82-42-481-8131

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: 10-15
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제10항 내지 제15항은 택일적 기재 미비인 청구항 제9항을 인용하는 항으로 명확하지 않습니다.

청구항 제12항 내지 제14항은 다중종속항 기재 미비인 청구항 제11항을 인용하는 항으로 명확하지 않습니다.
3. ☒ 청구항: 9,11,15
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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0502879 B1	2005.07.25	AU 1997-42025 B2 CA 2261562 A1 CA 2261562 C CN 1146664 C0 CN 1229439 A0 EP 0917581 A1 EP 0917581 B1 JP 03-681402 B2 JP 2000-516089 A TW 565571 A TW 565571 B WO 98-04718 A1	2000.07.20 1998.02.05 2011.04.05 2004.04.21 1999.09.22 2005.03.23 2008.01.09 2005.08.10 2000.12.05 2003.12.11 2003.12.11 1998.02.05
US 2005-0170451 A1	2005.08.04	AU 2002-320790 B2 CA 2454307 A1 EP 1408113 A1 EP 1408113 A4 KR 10-0932465 B1 US 7384633 B2 WO 03-008584 A1	2007.08.23 2003.01.30 2004.04.14 2005.01.12 2009.12.17 2008.06.10 2003.01.30
KR 10-0464699 B1	2005.07.28	AU 1997-10707 B2 CN 1207686 A0 EP 0868198 A1 EP 0868198 A1 EP 0868198 B1 JP 2000-516570 A JP 2009-106286 A US 2003-0158390 A1 US 2009-0082549 A1 US 6919079 B1 US 7704506 B2 US 7740853 B2 WO 97-22364 A1	2000.04.06 1999.02.10 1998.10.07 2003.07.09 2004.03.10 2000.12.12 2009.05.21 2003.08.21 2009.03.26 2005.07.19 2010.04.27 2010.06.22 1997.06.26