

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2020년 12월 3일 (03.12.2020) WIPO | PCT

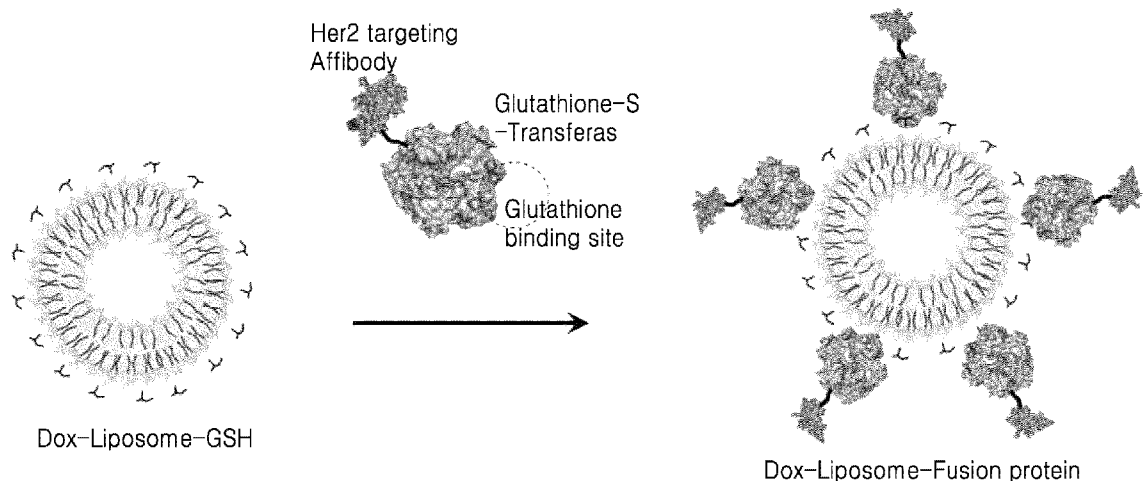


(10) 국제공개번호  
WO 2020/242217 A1

- (51) 국제특허분류:  
A61K 47/69 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 47/64 (2017.01) C12N 9/10 (2006.01)  
A61K 31/704 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/006905
- (22) 국제출원일: 2020년 5월 28일 (28.05.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2019-0062594 2019년 5월 28일 (28.05.2019) KR
- (71) 출원인: 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) [KR/KR]; 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 주식회사 퓨전바이오텍 (FUSION BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34051 대전시 유성구 문지로 193, 연구동 3층, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김채규 (KIM, Chae Kyu); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR). 유자형 (RYU, Ja Hyoung); 44919 울산시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).
- (74) 대리인: 리엔목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13, 대림아크로텔 12층, 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, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: LIPOSOME COMPRISING GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE AND PROTEIN HAVING CAPACITY TO BIND TO TARGET CELL OR TARGET PROTEIN, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 글루타치온- S- 전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 리포솜 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a liposome comprising glutathione-S-transferase and a protein having the capacity to bind to a target cell or a target protein, and use thereof as a drug carrier and a pharmaceutical composition. A drug carrier comprising the liposome according to an aspect can not only maintain residence time in vivo, but can also be effectively delivered to target cells due to an enhanced ability to target the target cells, and thus can be effectively used as a targeted therapeutic agent.

(57) 요약서: 글루타치온- S- 전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 리포솜으로, 이의 약물 전달체 및 약학적 조성물로서의 용도에 관한 것이다. 일 양상에 따른 리포솜으로 구성된 약물 전달체에 의하면, 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/242217 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 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 글루타치온-S-전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 리포솜 및 이의 용도 기술분야

- [1] 글루타치온-S-전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 리포솜 및 이의 약물 전달체 및 약학적 조성물로서의 용도에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 최근 나노기술의 발전과 더불어 새로운 물리적, 화학적, 광학적 특성을 가지는 나노크기의 소재들을 암 진단 및 치료분야에 응용하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 나노기술은 기존기술로는 가능하지 않던 신개념의 진단 및 치료가 가능해 나노기술의 무한한 가능성을 보여주고 있다. 그 중에서도 나노기술기반 약물전달시스템(DDS, Drug Delivery System)이 질병 진단 및 치료 분야에 다양하게 적용되고 있다. 이러한 나노입자 기반 약물전달시스템은 약물의 부작용을 최소화하며, 보다 효과적으로 약물을 전달하여 치료 효능을 높일 수 있는 것으로 동물실험 등을 통해 검증되어 왔다. 나노입자 기반 약물전달시스템은 첫째, 나노입자의 크기 및 물성을 조절하여 약물의 생체 내 동역학과 분포를 최적화함으로써 치료효과 극대화 할 수 있다는 점과 둘째, 기존 항암제의 비선택적인 생체 분포에 기인한 광범위한 독성 및 부작용, 약제 내성을 줄이고, 병용투여요법을 용이하게 한다는 장점이 있다.

- [3] 현재까지 미국 FDA 허가를 받은 나노약물전달시스템 기반 제품은 Doxyl®(독소루비신 함유 나노리포솜)과 Abraxane®(패클리탁셀 함유 알부민 나노입자)과 같이 공히 생체적합성이 탁월한 나노입자에 기반한 것으로, 특정 암을 선택적으로 표적하여 항암제를 전달하는 기능을 가지고 있지는 않아 단순히 EPR 효과에 의한 수동적인 전달이라 효능이 제한적이라는 평가를 받고 있다. EPR 효과에 의존한 수동적 표적지향은 동물 암 모델에서는 우수한 효능을 보일 수 있으나 실제 인간 암에서는 상대적으로 EPR 효과를 보이는 경우가 드물어 치료 효능이 제한적이다. 특히 전립선암이나 췌장암 조직과 같이 신생혈관이 적을 경우에는 EPR 효과에 따른 효과적인 약물전달을 기대하기 어렵다는 단점이 있다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [4] 일 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 약물을 담지하는 리포솜이 결합된 것을 함유하는

약물 전달체를 제공하는 것이다.

- [5] 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 항암제를 담지하는 리포솜이 결합된 것을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 약물을 담지하는 리포솜을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 약물을 전달하는 방법을 제공하는 것이다.
- [7] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 항암제를 담지하는 리포솜을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [8] 일 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 약물을 담지하는 리포솜이 결합된 것을 함유하는 약물 전달체를 제공하는 것이다.
- [9] 본 명세서에서 용어 "표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질", "표적세포 인식능을 갖는 단백질", 또는 "표적 세포 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질"은 세포의 수용체 또는 표적 단백질을 특이적으로 인식하는 또는 세포의 수용체 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질을 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 세포의 수용체 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질은 항체, 항원 결합 단편, 애피바디(affibody), 다이아바디(diabody) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [10] 본 명세서에서 용어 "애피바디 분자(affibody molecule)"는 특정 타겟 단백질(수용체)에 결합할 수 있는, 항체 모사체를 의미할 수 있다. 일반적으로 애피바디 분자는 20 내지 150의 아미노산 잔기로 구성되며, 2 내지 10개의 알파 헬릭스로 구성된 것일 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 애피바디 분자는 항-ErbB 애피바디 분자(ab31889), HER2-특이적 애피바디 분자(ZHER2:342), 항-EGFR

애피바디 분자(ZEGFR:2377) 등을 포함할 수 있다. 또한, 이에 한정되지 않고, 세포의 특정 수용체 또는 표적 단백질을 인식할 수 있는 애피바디 분자를 모두 포함한다. 상기 애피바디 분자가 인식할 수 있는 표적 수용체 또는 표적 단백질의 예는, 아밀로이드 베타 펩티드, 시누클레인(예를 들면, 알파-시누클레인), 아포리포프로테인(예를 들면, 아포리포프로테인 A1), 보체 인자(Complement factor)(예를 들면, C5), 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase)(예를 들면, CAIX), 인터루킨-2 수용체 알파 사슬(IL2RA; CD25), 세포 표면의 CD 항원(예를 들면, CD28), 또는 c-Jun, Factor VIII, 프비르노젠, GP120, H-Ras, Her2, Her3, HPV16 E7, IAPP(Human islet amyloid polypeptide), 이뮤노글로불린 A(IgA), IgE, IgM, 인터루킨(예를 들면, IL-1, IL-6, IL-8, IL-17), 인슐린, 스타필로코커스 단백질 A 도메인(Staphylococcal protein A domain), Raf-1, LOV 도메인(Light-oxygen-voltage-sensing domain), 또는 RSV G 단백질일 수 있다. 상기 애피바디에 대한 정보는 Stefan Stahl et al., Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications, Trends in Biotechnology, August 2017, Vol 35, No 8에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에서 포함된다.

- [11] 상기 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질은 수용체 타이로신 카이네이즈(Receptor tyrosine kinases: RTKs)에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 수용체 타이로신 카이네이즈는 표피 성장인자 수용체, 인슐린 수용체, 혈소판 유래 성장인자 수용체, 혈관내피 성장인자 수용체, 섬유아세포 성장인자 수용체, 콜레시스토킨(Cholecystokinin: CCK) 수용체, 신경영양인자(Neurotrophic factor: NGF) 수용체, 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor: HGF) 수용체, 에프린(Ephrin: Eph) 수용체, 안지오프이에틴 수용체, 및 RYK(related to receptor tyrosine kinase) 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [12] 상기 GST 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질은 링커를 통해 연결되어 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 링커는, 1 내지 400개, 1 내지 200개, 또는 2 내지 200개의 임의의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드일 수 있다. 상기 펩티드 링커는 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 포함할 수 있으며, Thr 및 Ala과 같은 중성 아미노산들도 포함될 수 있다. 펩티드 링커에 적합한 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다. 또한 기능적 일부분 사이의 적절한 분리를 달성하기 위하여 또는 필수적인 내부-일부분(inter-moiety)의 상호작용을 유지하기 위한 링커의 최적화를 고려하여 카피 수 "n"을 조절할 수 있다. 해당 기술분야에서 다른 가요성 링커들이 알려져 있는데, 예를 들어 수용성을 향상시키기 위하여 극성 아미노산 잔기를 추가하는 것뿐만 아니라 유연성을 유지하기 위하여 T 및 A와 같은 아미노산 잔기를 추가한 G 및 S 링커가 있을 수 있다. 따라서 일 구체예에 있어서, 상기 링커는 G, S, 및/또는 T 잔기를 포함하는 유연성 링커일 수 있다. 상기 링커는  $(G_pS_s)_n$  및  $(S_pG_s)_n$ 으로부터 선택되는 일반식을 가질 수 있고, 이

경우, 독립적으로,  $p$ 는 1 내지 10의 정수이고,  $s=0$  내지 10의 0 또는 정수이고,  $p + s$ 는 20 이하의 정수이고, 및  $n$ 은 1 내지 20의 정수이다. 더욱 구체적으로 링커의 예는  $(GGGGS)_n$  (서열번호 2),  $(SGGGG)_n$  (서열번호 3),  $(SRSSG)_n$  (서열번호 4),  $(SGSSC)_n$  (서열번호 5),  $(GKSSGSGSESKS)_n$  (서열번호 6),  $(RPPPPC)_n$  (서열번호 7),  $(SSPPPPC)_n$  (서열번호 8),  $(GSTSGSGKSSEGGK)_n$  (서열번호 9),  $(GSTSGSGKSSEGGSGSTKG)_n$  (서열번호 10),  $(GSTSGSGKPGSGEGSTKG)_n$  (서열번호 11), 또는  $(EGKSSGSGSESKF)_n$  (서열번호 12)이고, 상기  $n$ 은 1 내지 20, 또는 1 내지 10의 정수이다.

[13] 또 다른 양상은 상기 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[14] 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 의미한다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 자연의 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 당 또는 염기 부위가 변형된 그의 유사체(analogue)도 포함한다. 일 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 단쇄 폴리뉴클레오티드이다.

[15] 또 다른 양상은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[16] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 지칭한다. 일 실시예에 따른 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 및/또는 인핸서와 같은 발현 조절 요소를 포함할 수 있으며, 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 상기 벡터는, 숙주 세포 내에서 안정적으로 상기 융합 단백질을 발현시킬 수 있는, 발현용 벡터일 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터는 벡터를 함유 하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우, 복제 기원을 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 도입될 수 있으며, 상기 벡터는 플라스미드, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 및 배시니아 바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[17] 상기 벡터는 동물세포, 예를 들어, 포유동물 세포에서 작동가능한 프로모터를 포함한다. 일 실시예에 따라 적합한 프로모터는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV (Cytomegalovirus) 프로모터, U6 프로모터 및 H1 프로모터, MLV(Murine Leukemia Virus) LTR(Long terminal repeat) 프로모터, 아데노바이러스 초기 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터,

EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 인간 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 마우스 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터 및 셀바이빈 (Survivin) 프로모터를 포함할 수 있다.

- [18] 또한, 상기 벡터에서, 전술한 융합 단백질은 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, "작동 가능하게 연결된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[19]

- [20] 또 다른 양상은 상기 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 벡터를 포함하는, 숙주 세포를 제공한다.

- [21] 상기 세포, 예를 들면, 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 원생동물 (protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는, 배양된 세포 (인 비트로), 이식된 세포 (graft cell) 및 일차 세포 배양 (인 비트로 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보 (in vivo) 세포, 및 또한 인간을 포함하는 포유동물의 세포 (mammalian cell)일 수 있다. 또한, 상기 유기체는 효모, 곰팡이, 원생동물, 식물, 고등 식물 및 곤충, 양서류, 또는 포유 동물일 수 있다. 또한, 상기 세포는 동물 세포 또는 식물세포일 수 있다.

- [22] 일 구체예에 있어서, 상기 리포솜은 나노 리포솜인 것일 수 있다.

- [23] 일 구체예에 있어서, 상기 리포솜은 입자 크기가 10nm 내지 250nm인 것일 수 있다.

- [24] 일 구체예에 있어서, 상기 리포솜은 인지질, 스테로이드 및 PEG 함유한 인지질로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질을 포함하는 것일 수 있다.

- [25] 본 명세서에서 용어 "리포솜"은 적어도 하나의 지질 이중층에 의해 에워싸인 수성 구획을 포함한다. 친수성 헤드기를 포함한 지질이 물에 분산될 때, 이들은 층판(lamellae)이라고 불리는 이중층 막을 자발적으로 형성할 수 있다. 층판은 서로 대면하는 그들의 비-극성 (소수성) 표면 및 수성 매질과 대면하는 그들의 극성 (친수성) 표면을 가진 지질 분자의 2개 단층 시트로 구성된다. 용어 리포솜은 단일 지질 이중층으로 이루어진 단일층상 소포를 포함하고 일반적으로 약 10 내지 약 400 nm, 약 50 내지 약 300 nm, 또는 약 100 내지 200 nm 범위의 직경을 갖는다. 리포솜은 또한 다중층상일 수 있고, 일반적으로 1 내지 10  $\mu$ m 범위의 직경을 갖고 어느 곳에서라도 2개 내지 수 백개의 동심 지질 이중층이 수성 상의 층과 교대한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 다중층상 소포 (MLV), 큰 단일층상 소포 (LUV) 및 작은 단일층상 소포 (SUV)를 포함할 수 있다.

리포솜의 지질은 양이온성, 양쪽성, 중성 또는 음이온성, 또는 이들의 어느 혼합물일 수 있다.

- [26] 본 명세서에서 리포솜 또는 나노 리포솜은 상기 기재된 바와 같이 양이온성 지질, 양쪽성 지질, 중성 지질 또는 음이온성 지질을 포함하여 어떠한 적절한 지질을 함유할 수 있다. 적절한 지질은 지방, 왁스, 스테로이드, 콜레스테롤, 지용성 비타민, 모노글리세리드, 디글리세리드, 인지질, 스펅고지질, 당지질, 양이온성 또는 음이온성 지질, 유도체화 지질 등을 포함할 수 있다.

- [27] 적절한 인지질은, 이에 한정되지 않지만, 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티드산 (PA), 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파티딜글리세롤 (PG), 포스파티딜세린 (PS), 및 포스파티딜이노시톨 (PI), 디미리스토일 포스파티딜 콜린 (DMPC), 디스테아로일 포스파티딜 콜린 (DSPC), 디올레오일 포스파티딜 콜린 (DOPC), 디팔미토일 포스파티딜 콜린 (DPPC), 디미리스토일 포스파티딜 글리세롤 (DMPG), 디스테아로일 포스파티딜 글리세롤 (DSPG), 디올레오일 포스파티딜 글리세롤 (DOPG), 디팔미토일 포스파티딜 글리세롤 (DPPG), 디미리스토일 포스파티딜 세린 (DMPS), 디스테아로일 포스파티딜 세린 (DSPS), 디올레오일 포스파티딜 세린 (DOPS), 디팔미토일 포스파티딜 세린 (DPPS), 디올레오일 포스파티딜 에탄올아민 (DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린 (POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민 (POPE) 및 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민 (DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민 (DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민 (DSPE), 16-O-모노메틸 PE, 16-O-디메틸 PE, 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민 (SOPE), 1,2-디엘라이도일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (트랜스DOPE), 및 카르디올리핀을 포함한다. 지질 추출물, 예컨대 계란 PC, 심장 추출물, 뇌 추출물, 간 추출물 및 콩 PC가 본 발명에서 또한 유용하다. 일부 실시양태에서, 콩 PC는 하이드로 소이(Hydro Soy) PC (HSPC)를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 지질은 유도체화 지질, 예컨대 PEG화(PEGylated) 지질을 포함할 수 있다. 유도체화 지질은 예를 들어 DSPE-PEG2000, 콜레스테롤-PEG2000, DSPE-폴리글리세롤, 또는 당 기술분야에 일반적으로 공지된 기타 유도체를 포함할 수 있다.

- [28] 본 명세서에서 리포솜 또는 나노 리포솜은 융합된 테트라시클릭 고난 고리계의 존재를 특징으로 하는 스테로이드를 함유할 수도 있다. 스테로이드의 예는 이에 한정되지 않지만 콜레스테롤, 콜산, 프로그스테론, 코르티손, 알도스테론, 에스트라디올, 테스토스테론, 데히드로에피안드로스테론을 포함한다. 합성 스테로이드 및 그의 유도체가 또한 본 발명에서 사용하기 위해 고려된다.

- [29] 양이온성 지질은 생리학적 조건 하에서 양으로 하전된 작용기를 함유한다. 양이온성 지질은, 이에 한정되지 않지만, N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄

클로라이드 (DODAC), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드 (DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTAP), N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA), N-[1-(2,3-디테트라데실옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-히드록시에틸암모늄 브로마이드 (DMRIE), N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-히드록시에틸암모늄 브로마이드 (DORIE),  $3\beta$ -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카르바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 디메틸디옥타데실암모늄 (DDAB) 및 N,N-디메틸-2,3-디올레일옥시)프로필아민 (DODMA)를 포함한다.

- [30] 일부 실시양태에서, 인지질은 HSPC 및 DSPE-PEG(2000)이고, 스테로이드는 콜레스테롤을 이용할 수 있다.
- [31] 본 명세서에서 리포솜 또는 나노 리포솜을 제공하기 위하여 지질의 어떠한 적절한 조합이라도 사용될 수 있다. 지질 조성물은 누출 속도, 안정성, 입자 크기, 제타 포텐셜, 단백질 결합, 생체내 순환, 및/또는 조직 또는 기관 내 축적과 같은 특징에 영향을 주도록 맞춰질 수 있다. 일부 실시양태에서, 존재하는 특정한 유형의 지질의 몰 백분율 (mol%)은 전형적으로 리포솜 또는 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 약 0% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 90%, 약 90% 내지 100%를 구성한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 또는 나노 리포솜은 56 mol% HSPC, 39 mol% 콜레스테롤, 및 5 mol% DSPE-PEG(2000)을 포함한다.
- [32] 일 구체예에 있어서, 상기 글루타치온-S-전이효소와 리포솜의 결합은 GSH(Glutathione)에 의한 것일 수 있다. 즉, 상기 리포솜은 GSH(Glutathione)가 결합된 리포솜일 수 있다. 상기 GSH는 글루타치온-S-전이효소의 결합 부위로 작용하여 리포솜과 글루타치온-S-전이효소를 연결할 수 있다.
- [33] 일 구체예에 있어서, 상기 하나의 리포솜에 상기 글루타치온-S-전이효소, 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질 및 링커가 포함된 단백질이 두개 이상 결합된 것일 수 있다. 즉, 하나의 리포솜에 두개 이상의 융합 단백질이 결합하여 표적 세포 또는 표적 단백질에 더 용이하게 결합하는 것일 수 있다.
- [34] 약물 전달체를 사용하여 개체 내로 전달할 수 있는 약학적 활성 성분의 종류는 항암제, 조영제(염료), 호르몬제, 항호르몬제, 비타민제, 칼슘제, 무기질 제제, 당류제, 유기산 제제, 단백질 아미노산 제제, 해독제, 효소 제제, 대사성 제제, 당뇨 병용제, 조직 부활 용약, 클로로필 제제, 색소제제, 종양 용약, 종양 치료제, 방사성 의약품, 조직 세포 진단제, 조직 세포 치료제, 항생 물질 제제, 항바이러스제, 복합항생물질제제, 화학요법제, 백신, 독소, 독소이드, 항독소, 렙토스피라혈청, 혈액 제제, 생물학적 제제, 진통제, 면역원성 분자, 항히스타민제, 알레르기 용약, 비특이성 면역원 제제, 마취제, 각성제, 정신 신경 용제, 저분자 화합물, 핵산, 앵타머, 안티센스 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, siRNA 및 마이크로 RNA 등을 포함할 수 있다.

- [35] 일 구체예에 있어서, 상기 약물은 항암제인 것일 수 있다.
- [36] 상기 항암제는 캄토테신(camptothecin), 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cisplatin), 베라파밀(Verapamil), 플루오로우라실(flourouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 파클리탁셀(paclitaxel), 카보플라틴(carboplatin), 겐시타빈(Gemcitabine), 메소트렉세이트(Methotrexalte), 도세탁셀(Docetaxel), 아시바이신, 아클라루비신, 아코다졸, 아크로나이신, 아도젤레신, 알라노신, 알데스루킨, 알로푸리놀 소듐, 알트레타민, 아미노글루테티미드, 아모나파이드, 암플리젠, 암사크린, 안드로겐스, 안구이딘, 아피디콜린 글리시네이트, 아사레이, 아스파라기나아제, 5-아자시티딘, 아자티오프린, 바실러스 칼메테-구에린(BCG), 베이커스 안티폴, 베타-2-디옥시티오구아노신, 비스안트렌 HCl, 블레오마이신 설페이트, 불서판, 부티오닌 설펡시민, BWA 773U82, BW 502U83/HCl, BW 7U85 메실레이트, 세라세미드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 클로로퀴녹살린-설포나미드, 클로로조토신, 크로모마이신 A3, 시스플라틴, 클라드리빈, 코르티코스테로이드, 코리너박테리움 파르븀, CPT-11, 크리스나톨, 사이클로사이티딘, 사이클로포스파미드, 사이타라빈, 사이템베나, 다비스 말리에이트, 데카르바진, 닥티노마이신, 다우노루바이신 HCl, 디아자유리딘, 텍스라죽산, 디언하이드로갈락티톨, 디아지쿠온, 디브로모둘시톨, 디데민 B, 디에틸디티오카르바메이트, 디클라이코알데하이드, 다이하이드로-5-아자사이틴, 에치노마이신, 데다트렉세이트, 에텔포신, 에플롤니틴, 엘리웃스 용액, 엘사미트루신, 에피루비신, 에소루비신, 에스트라머스틴 포스페이트, 에스트로젠, 에타니다졸, 에티오포스, 에토포사이드, 파드라졸, 파자라빈, 펜레티나이드, 필그라스티م, 피나스테라이드, 플라본 아세트산, 플록스유리딘, 플루다라빈 포스페이트, 5-플루오로우라실, Fluosol제, 플루타미드, 갈륨 나이트레이트, 겐사이타빈, 고세레린 아세테이트, 헤프셀팜, 헥사메틸렌 비스아세트아미드, 호모하링토닌, 하이드라진 설페이트, 4-하이드록시안드로스테네디온, 하이드로지우레아, 이다루비신 HCl, 이포스파미드, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터루킨-1 알파 및 베타, 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 4-이포메아놀, 이프로플라틴, 이소트레티노인, 류코보린 칼슘, 류프로라이드 아세테이트, 레바미솔, 리포좀 다우노루비신, 리포좀 포집 독소루비신, 로머스틴, 로니다민, 마이탄신, 메클로레타민 하이드로클로라이드, 멜팔란, 메노가릴, 메르바론, 6-머캅토프린, 메스나, 바실러스 칼레테-구에린의 메탄올 추출물, 메토포트렉세이트, N-메틸포름아미드, 미페프리스톤, 미토구아존, 마이토마이신-C, 미토탄, 미톡산트론 하이드로클로라이드, 모노사이트/마크로파아지 콜로니-자극 인자, 나빌론, 나폭시딘, 네오키르지노스타틴, 옥트레오타이드 아세테이트, 오르마플라틴, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 팔라, 펜토스타틴, 피페라진디온,

피포브로만, 피라루비신, 피리트렉심, 피록산트론 하이드로클로라이드, PIXY-321, 플리카마이신, 포르피머 소듐, 프레드니무스틴, 프로카르바진, 프로게스틴스, 파이라조푸린, 라족산, 사르그라모스틴, 세무스틴, 스피로게르마늄, 스피로무스틴, 스트렙토나이그린, 스트렙토조신, 솔로페너르, 수라민 소듐, 타목시펜, 탁소테레, 테가푸르, 테니포사이드, 테레프탈아미딘, 테록시론, 티오구아닌, 티오테파, 티미딘 인젝션, 티아조푸린, 토포테칸, 토레미펜, 트레티노인, 트리플루오페라진 하이드로클로라이드, 트리플루리딘, 트리메트렉세이트, TNF(tumor necrosis factor), 우라실 머스타드, 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트, 빈데신, 비노렐빈, 빈줄리딘, Yoshi 864, 조루비신, 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이들의 혼합물 등을 포함할 수 있다.

[37]

[38] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 항암제를 담지하는 리포솜이 결합된 것을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[39] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 항암제를 담지하는 리포솜을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[40] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 항암제를 담지하는 리포솜을 함유하는 조성물을 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 용도를 제공한다.

[41] 상기 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST), 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질, 상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 리포솜에 대해서는 상기한 바와 같다.

[42] 용어 "치료제" 또는 "약학적 조성물"는, 대상체로의 투여 시에 몇몇 유리한 효과를 부여하는 분자 또는 화합물을 지칭한다. 유리한 효과는 진단적 결정을 가능하게 하는 것; 질병, 증상, 장애 또는 병태의 개선; 질병, 증상, 장애 또는 질환의 발병의 감소 또는 예방; 및 일반적으로 질병, 증상, 장애 또는 병태의 대응을 포함한다.

[43] 상기 암은 폐암(예를 들면, 비소세포성 폐암), 췌장암, 위암, 간암, 대장암, 뇌암,

유방암, 갑상선암, 방광암, 식도암, 또는 자궁암일 수 있다. 또한, 상기 암은 항암제에 대한 내성(예를 들면, 다제 내성)을 갖는 위암, 유방암, 폐암, 간암, 식도암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

- [44] 상기 약학적 조성물은 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(Nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [45] 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [46] 또한, 상기 약학적 조성물은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(Carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(Ascorbic acid) 또는 글루타치온(Glutathione)과 같은 항산화제(Antioxidants), 킬레이트화제(Chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(Stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [47] 상기 약학적 조성물의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.
- [48] 일 구체예에 있어서, 상기 항암제는 아바렐릭스 [abarelix (Plenaxis depot®)]; 알데스류킨 [aldesleukin (Prokine®)]; 알데스류킨 [Aldesleukin (Proleukin®)]; 알렘투주맙 [Alemtuzumabb (Campath®)]; 알리트레티노인 [alitretinoin (Panretin®)]; 알로퓨리놀 [allopurinol (Zyloprim®)]; 알트레타민 [altretamine (Hexalen®)]; 아미포스틴 [amifostine (Ethyol®)]; 아나스트로졸 [anastrozole (Arimidex®)]; 아르세닉 트리옥사이드 [arsenic trioxide (Trisenox®)]; 아스파라기나아제 [asparaginase (Elspar®)]; 아자시티딘 [azacitidine (Vidaza®)]; 베바쿠지맙 [bevacuzimab (Avastin®)]; 벅사로텐 캡슐 [bexarotene capsules (Targretin®)]; 벅사로텐 겔 [bexarotene gel (Targretin®)]; 블레오마이신 [bleomycin (Blenoxane®)]; 보르테조밐 [bortezomib (Velcade®)]; 정맥용 부술피판 [busulfan intravenous (Busulfex®)]; 경구용 부술피판 [busulfan oral (Myleran®)]; 칼루스테론 [calusterone (Methosarb®)]; 카페시타빈 [capecitabine (Xeloda®)]; 카르보플라틴 [carboplatin (Paraplatin®)]; 카르무스틴 [carmustine (BCNU®, BiCNU®)]; 카르무스틴 [carmustine

(Gliadel®); 카르무스틴과 폴리페프로산 20 임플란트 (Polifeprosan 20 Implant) (Gliadel Wafer®); 셀레코싯 [celecoxib (Celebrex®)]; 세툽시맙 [cetuximab (Erbix®)]; 클로람부실 [chloambucil (Leukeran®)]; 시스플라틴 [cisplatin (Platinol®)]; 클라드리빈 [cladribine (Leustatin®) 2-CdA®]; 클로파라빈 [clofarabine (Clolar®)]; 사이클로포스파미드 [cyclophosphamide (Cytosan®, Neosar®)]; 사이클로포스파미드 [cyclophosphamide (Cytosan Injection®)]; 사이클로포스파미드 [cyclophosphamide (Cytosan Tablet®)]; 사이타라빈 [cytarabine (Cytosar-U®)]; 사이타라빈 리포조말 [cytarabine liposomal (DepoCyt®)]; 다카르바진 [dacarbazine (DTIC-Dome®)]; 닥티노마이신 (dactinomycin), 액티노마이신 D [actinomycinD (Cosmegen®)]; 다르베포에틴 알파 [Darbepoetin alfa (Aranesp®)]; 다우노루비신 리포조말 [daunorubicin liposomal (Danuoxome®)]; 다우노루비신 (daunorubicin), 다우노마이신 [daunomycin (Daunorubicin®)]; 다우노루비신 (daunorubicin), 다우노마이신 [daunomycin (Cerubidine®)]; 데니류킨 디프티톡스 [Denileukin diftitox (Ontak®)]; 텍스라조산 [dexrazoxane (Zinecard®)]; 도세탁셀 [docetaxel (Taxotere®)]; 독소루비신 [doxorubicin (Adriamycin PFS®)]; 독소루비신 [doxorubicin (Adriamycin®, Rubex®)]; 독소루비신 [doxorubicin (Adriamycin PFS Injection®)]; 독소루비신 리포조말 [doxorubicin liposomal (Doxil®)]; 드로모스타놀론 프로피오네이트 [dromostanolone propionate (dromostanolone®)]; 드로모스타놀론 프로피오네이트 [dromostanolone propionate (masterone injection®)]; 엘리엇 B 용액 [Elliott's B Solution (Elliott's B Solution®)]; 에피루비신 [epirubicin (Ellence®)]; 이포에틴 알파 [Epoetin alfa (epogen®)]; 에를로티닙 [erlotinib (Tarceva®)]; 에스트라무스틴 [estramustine (Emcyt®)]; 에토포사이드 포스페이트 [etoposide phosphate (Etopophos®)]; 에토포사이드 (etoposide), VP-16 (Vepesid®); 엑세메스탄 [exemestane (Aromasin®)]; 필그라스티움 [Filgrastim (Neupogen®)]; 플록수리딘 [floxuridine (intraarterial) (FUDR®)]; 플루다라빈 [fludarabine (Fludara®)]; 플루오로우라실 [Fluorouracil, 5-FU (Acrucil®)]; 플루베스트란트 [flvestrant (Faslodex®)]; 게피티닙 [gefitinib (Iressa®)]; 겐시타빈 [gemcitabine (Gemzar®)]; 겐투주맙 오조가미신 [gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)]; 고세렐린 아세테이트 [goserelin acetate (Zoladex Implant®)]; 고세렐린 아세테이트 [goserelin acetate (Zoladex®)]; 히스트렐린 아세테이트 [histrelin acetate (Histrelin implant®)]; 하이드록시우레아 [hydroxyurea (Hydrea®)]; 이브리투모맙 티옥세탄 [Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®)]; 이다루비신 [idarubicin (Idamycin®)]; 이포스파미드 [ifosfamide (IFEX®)]; 이마티닙 메실레이트 [imatinib mesylate (Gleevec®)]; 인터페론 알파-2a [interferon alfa-2a (Roferon A®)]; 인터페론 알파-2b [Interferon alfa-2b (Intron A®)]; 이리노테칸 [irinotecan (Camptosar®)]; 레날리도마이드 [lenalidomide (Revlimid®)]; 레트로졸 [letrozole (Femara®)]; 류코보린 [leucovorin (Wellcovorin®, Leucovorin®)]; 류프롤리드 아세테이트 [Leuprolide Acetate (Eligard®)]; 레바미솔 [levamisole (Ergamisol®)];

로무스틴-CCNU [lomustine-CCNU (CeeBU®)]; 메클로레타민 (meclorethamine), 니트로젠 머스타드 [nitrogen mustard (Mustargen®)]; 메게스트롤 아세테이트 [megestrol acetate (Megace®)]; 멜파란 (melphalan), L-PAM (Alkeran®); 머캅토프린 [mercaptapurine, 6-MP (purinethol®)]; 메스나 [mesna (Mesnex®)]; 메스나 [mesna (Mesnex tabs®)]; 메토틱렉세이트 [methotrexate (methotrexate®)]; 메톡스살렌 [methoxsalen (Uvadex®)]; 미토마이신 C [mitomycin C (Mutamycin®)]; 미토탄 [mitotane (Lysodren®)]; 미토잔트론 [mitoxantrone (Novantrone®)]; 난드롤론 펜프로피오네이트 [nandrolone phenpropionate (Durabolin-50®)]; 넬라라빈 [nelarabine (Arranon®)]; 노페투모맵 [Nofetumomab (Verluma®)]; 오프렐벤킨 [Oprelvekin (Neumega®)]; 옥살리플라틴 [oxaliplatin (Eloxatin®)]; 파클리탁셀 [paclitaxel (Paxene®)]; 파클리탁셀 [paclitaxel (Taxol®)]; 파클리탁셀 단백질 결합 입자 [paclitaxel protein-bound particles (Abraxane®)]; 팔리페르민 [palifermin (Kepivance®)]; 파미드로네이트 [pamidronate (Aredia®)]; peg아데마스 [pegademase (Adagen (Pegademase Bovine)®)]; peg아스파르가아제 [pegaspargase (Oncaspar®)]; peg필그라스티మ్ [Pegfilgrastim (Neulasta®)]; 페멕트렉제트 디소듐 [pemetrexed disodium (Alimta®)]; 펜토스타틴 [pentostatin (Nipent®)]; 피포브로만 [pipobroman (Vercyte®)]; 플리카마이신 [plicamycin], 미트라마이신 [mithramycin (Mithracin®)]; 포르피머 소듐 [porfimer sodium (Photofrin®)]; 프로카르바진 [procarbazine (Matulane®)]; 퀴나크린 [quinacrine (Atabrine®)]; 라스부리카아제 [Rasburicase (Elitek®)]; 리툽시맵 [Rituximab (Rituxan®)]; 사르그라모스틴 [sargramostim (Leukine®)]; 사르그라모스틴 [Sargramostim (Prokine®)]; 소라페닙 [sorafenib (Nexavar®)]; 스트렙타조신 [streptozocin (Zanosar®)]; 수니티닙 말리에이트 [sunitinib maleate (Sutent®)]; 탈크 [talc (Sclerosol®)]; 타목시펜 [tamoxifen (Nolvadex®)]; 테모졸로마이드 [temozolomide (Temodar®)]; 테니포사이드 [teniposide, VM-26 (Vumon®)]; 테스톨락톤 [testolactone (Teslac®)]; 티오구아닌 [thioguanine, 6-TG (thioguanine®)]; 티오테파 [thiotepa (thioplex®)]; 토포테칸 [topotecan (Hycamtin®)]; 토레미펜 [toremifene (Fareston®)]; 토시투모맵 [Tositumomab (Bexxar®)]; 토시투모맵/I-131 토시투모맵 (Bexxar®); 트라스투주맵 [Trastuzumab (Herceptin®)]; 트레티노인 [tretinoin, ATRA (Vesanoid®)]; 우라실 머스타드 [Uracil Mustard (Uracil Mustard Capsules®)]; 발루비신 [valrubicin (Valstar®)]; 빈블라스틴 [vinblastine (Velban®)]; 빈크리스틴 [vincristine (Oncovin®)]; 비노렐빈 [vinorelbine (Navelbine®)]; 및 졸레드로네이트 [zoledronate (Zometa®)]로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[49] 또한, 본 발명은 하기 i) 내지 iii) 단계를 포함하는, 단백질 코로나 외층을 가지는 리포솜 약물 전달체의 제조 방법을 제공한다:

[50] i) 리포솜 표면에 링커(예를 들면, GSH)를 결합시키는 단계; ii) 상기 단계 i)에서 링커와 결합된 리포솜의 내부 또는 표면에 약물을 담지시키는 단계; 및 iii) 상기 단계 ii)에서 약물을 담지한 리포솜 표면에 GST 융합 단백질을 코팅하여 단백질

코로나 외층(PCS)을 형성시키는 단계.

- [51] 상기 단백질 코로나 외층(protein corona shield)을 가지는 리포솜은 융합 단백질로 표면이 전-코팅된 단백질 코로나 외층을 먼저 생성하였기 때문에 체내 환경에서 혈청 단백질에 의해 둘러싸이는 코로나층이 형성되지 않아, 대식 세포에 의한 면역 반응을 회피할 수 있어 스텔스 효과(stealth effect)를 유의적으로 가질 수 있다. 따라서, 상기 단백질 코로나 외층을 가지는 리포솜은 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

### 발명의 효과

- [52] 일 양상에 따른 리포솜으로 구성된 약물 전달체에 의하면, 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [53] 도 1은 본 발명에서 리포솜의 단백질 코로나 외층을 이루는 융합단백질의 구조를 도식화한 것이다.
- [54] 도 2는 GST-Afb 융합 단백질의 세포 독성 및 세포 표적능을 확인한 결과이다:
- [55] 도 2a는 GST-Afb 융합 단백질이 Afb 표적 세포에 대하여 세포 생존율을 저하시키지 않음을 확인한 결과이고; 및 도 2b는 GST-Afb 융합 단백질이 Afb 표적 세포에 대하여 나타내는 세포 표적능을 확인한 결과이다.
- [56] 도 3은 약물을 담지하는 리포솜의 구성요소 중 하나인 GSH-PEG-DSPE의 합성을 도식화한 것이다.
- [57] 도 4는 약물을 담지하는 리포솜의 구성요소를 도식화한 것이다.
- [58] 도 5는 Dox-리포솜-GSH의 모양을 투과전자현미경으로 관찰한 이미지이다.
- [59] 도 6은 Dox-리포솜-GSH의 크기를 동적 광산란으로 관찰한 그래프이다.
- [60] 도 7은 약물을 담지하는 리포솜에 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST)와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질, 즉 표적지향 융합단백질이 결합한 것 (Dox-리포솜-융합단백질)을 도식화한 것이다.
- [61] 도 8은 Dox-리포솜-융합단백질의 크기를 동적 광산란으로 관찰한 그래프이다.
- [62] 도 9는 Dox-리포솜-융합단백질의 모양을 투과전자현미경으로 관찰한 이미지이다.
- [63] 도 10은 Dox-리포솜-GSH의 제타 전위를 나타낸 그래프이다.
- [64] 도 11은 Dox-리포솜-융합단백질의 제타 전위를 나타낸 그래프이다.
- [65] 도 12는 Dox-리포솜-융합단백질의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.
- [66] 도 13은 Dox-리포솜-융합단백질의 항 종양 효과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

## 발명의 실시를 위한 형태

- [67] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [68]
- [69] 실시예 1. 단백질 코로나 외층을 가지는 리포솜에 사용하기 위한 외층 융합 단백질의 발현
- [70] **<1-1> 애피바디(affibody) 및 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST) 융합 단백질의 제조**
- [71] 본 발명에서는 약물 전달체로 사용하기 위한 리포솜의 표면에 단백질 코로나의 외층을 형성시켜, 생체 내 환경에서도 안정성 및 표적능이 향상된 약물 전달체를 제조하고자 하였다. 이를 위해, 먼저 단백질 코로나 외층을 구성할 수 있는 융합 단백질(fusion protein)을 제조하였다. 융합 단백질은 암세포 표면의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 애피바디(affibody, Afb)와 GST가 결합된 형태가 되도록 발현하였다.
- [72] 구체적으로, 본 발명에서는 Afb로서 HER2에 특이적으로 결합하는 HER2 Afb 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 EGFR Afb를 사용하였다. 각각의 HER2 Afb 또는 EGFR Afb를 암호화하는 유전자의 말단에 추가 링커 도메인(서열번호 1: GGGLVPRGSGGGCGGGGTGGGSGGG)을 암호화하는 유전자를 결합시킨 다음, pETduet 플라스미드에 삽입하였다. 또한, GST 과발현을 위해서 GST의 N-말단에 6XHis 태그가 연결되도록 디자인한 GST 암호화 유전자를 상기 pETduet 플라스미드에 삽입하여, Afb와 GST가 링커로 연결된 융합 단백질(GST-Afb)의 과발현을 위한 플라스미드를 구축하였다. 구축된 플라스미드에서 PCR 및 DNA 서열분석을 통해 GST-Afb 암호화 서열이 정상적으로 삽입되었는지 확인하였다. 그런 다음, 구축된 플라스미드를 E. coli BL21(DE3) 균주에 삽입하여 배양한 다음, IPTG를 처리하고 30 °C에서 16 시간 동안 배양하여 GST-Afb의 과발현을 유도하였다. 과발현 유도된 E. coli 세포는 5000Xg로 4 °C에서 10 분간 원심분리하여 침전된 세포를 수득하고, 인산염 완충용액(50 mM 인산 나트륨 및 100 mM 염화 나트륨, pH 6.5)에 세포를 현탁하였다. 세포 현탁액에 리소자임(lysozyme)을 처리하고 20 분간 실온에서 배양한 다음, 30 초 파쇄 및 1 분 간격으로 총 10 분가 초음파 파쇄하였다. 파쇄 후, 12000Xg로 4 °C에서 1 시간 동안 원심분리하여 상층액을 GST-Afb 포함 분획으로서 수득하였다. 상층액은 FPLC를 이용한 금속이온 친화 크로마토그래피(immobilized metal affinity chromatography; 1mL HisTrap FF 컬럼, GE HealthCare)로 정제하여 GST-Afb을 분리 하였다. 분리한 GST-Afb(GST-HER2 Afb 및 GST-EGFR Afb는 PBS(pH 7.4)에서 밤새도록 투석하여 농축하였다.

[73] 도 1은 본 발명에서 리포솜의 단백질 코로나 외층을 이루는 융합단백질의 구조를 도식화한 것이다.

[74]

[75] **<1-2> GST-Afb 융합 단백질의 세포 독성 및 세포 표적능 확인**

[76] 본 발명에서 발현한 GST-Afb 융합 단백질을 약물 전달체에서 단백질 코로나 외층(protein corona shield, PCS)으로 적용할 수 있는지 확인하기 위해 세포 독성 및 세포내 흡수능을 확인하고자 하였다.

[77] 구체적으로, 먼저 GST-HER2 Afb를 대상으로 세포 독성 여부를 확인하기 위해 인간 유방암 세포주인 SK-BR-3 세포를 준비하였다. 준비한 SK-BR-3 세포는 DMEM 배지(11995065, Invitrogen, S.Korea)에서 배양하였다. 배지에는 10% 우태아혈청(FBS), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린을 첨가하였고, 배양 기간 중에는 배지를 매일 한번씩 교체하였다. 배양 환경은 37 °C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기로 유지하였다. 세포 접종 후 세포가 85% 포화도로 증식되면, 부착 배양된 세포를 분리하여 실험에 사용하였다. SK-BR-3 세포를 분리하여, 96 웰 플레이트(Thermo Scientific Inc. Korea)에 5X10<sup>3</sup> 세포/웰의 농도로 각각의 세포를 접종하고 37 °C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 GST-HER2 Afb를 0.3  $\mu\text{M}$  내지 10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 SK-BR-3 세포에 처리하고 24 시간 동안 추가 배양하였다. 배양 종료 후, 알라마르 블루 염색약(alarmar blue dye; DAL 2015, Invitrogen, Korea)을 사용하여 세포 생존률을 확인하였다. 세포 생존률을 확인하기 위해 형광 염료에 대한 여기 파장(excitation wavelength)을 565 nm로 설정하였으며 이에 따른 방출 파장(monitored emission)을 590 nm로 설정하여 형광 플레이트 리더기(Tecan Infinite Series, Germany)로 형광 분석하였다. 또한, GST-HER2 Afb 중 GST를 형광-5-말레이미드(fluorescein-5-maleimide, F5M)로 표지하여 세포 내로 흡수(cell uptake)된 GST-HER2 Afb의 위치를 확인하였다. 음성 대조군으로서는 정상 상피 세포주인 MCF-10A 세포를 사용하여 동일한 방법을 수행하여 세포 생존률 및 세포 내 흡수 정도를 확인하였다.

[78] 이와 함께, GST-Afb에서 GSH와 표적 수용체 간의 상호작용을 실시간으로 확인하기 위해 수정진동자저울(Quartz Crystal Microbalance, QCM) 및 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 분석을 수행하였다.

[79] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 GST-HER2 Afb가 세포에 대하여는 독성을 나타내지 않으나, 암 세포 특이적으로 흡수될 수 있음을 확인하였다. GST-HER2 Afb를 SK-BR-3 세포 및 MCF-10A 세포에 처리하여 배양하였을 때 처리 농도와는 관계없이 세포 사멸 정도를 나타내지 않아 GST-Afb에 의해 세포 독성을 나타내지 않음을 확인한 반면(도 2a), GST-HER2 Afb는 유방암 세포주인 SK-BR-3 세포에만 결합하는 결합능을 나타내어 GST-Afb가 암세포 특이적인 표적능을 나타내는 것으로 확인하였다(도 2b). 이를 통해, 본 발명에서 단백질 코로나 외층으로 사용하기 위해 발현한 GST-Afb 융합 단백질은 정상 세포에

대하여 독성을 나타내지 않고 암 세포에 대한 표적능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[80]

[81] 실시예 2. 융합 단백질 외층을 갖는 리포솜 약물 전달체의 제조

[82] &lt;2-1&gt; 리포솜의 준비

[83] 약물 전달체의 기본 구조로서, 리포솜(Liposome)을 준비하였다. 리포솜은 EPR(Enhanced Permeability and Retention)효과를 얻기 위해 나노 사이즈로 제작하였다. 리포솜의 구성요소로서 HSPC (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy)), Cholesterol, 및 GSH를 결합시킨 DSPE-PEG(2000)를 사용하였다. 도 3 및 도 4에서 나타낸 바와 같이 합성하였다.[84] 구체적으로, DSPE-PEG-maleimide (32.7 mg, 0.01635 mmol)와 글루타치온 (glutathione) (7.5 mg, 0.0244 mmol)을 pH 7.4 HEPES 완충액 1M 3 mL에 넣고 22 °C에서 15시간 교반시켰다. Dark 조건에서 질소기체를 주입하며 반응시켰다. 반응 후 남은 글루타치온은 HEPES 완충액을 이용하여 세척하여 제거하고 반응한 DSPE-PEG-GSH는 원심 분리기로 분리하였다. 분리한 DSPE-PEG-GSH는 DMSO-d<sub>6</sub>를 이용하여 NMR로 반응을 확인하였다.[85] HSPC(phosphatidylcholine) (44.25 mg, 0.056 mmol), 콜레스테롤 (15.079 mg, 0.039 mmol), 독소루비신 (10mg) 및 DSPE-PEG-GSH (16.451 mg, 0.005 mmol)을 350  $\mu$ L DMSO 와 400  $\mu$ L 에탄올에 넣고 60~70 °C에서 4시간 반응시켰다. pH 7.4 PBS 완충액 7.5mL 또한 65 °C에서 따뜻하게 데운 상태에서 지질 혼합물을 천천히 한 방울씩 넣으면서 교반시켰다. 그 후 tris-HCl pH 7.5 완충액 10mM을 이용하여 투석을 2번 진행하여, 독소루비신이 담지된 리포솜 (Dox-리포솜-GSH)을 수득하였다. 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM) 및 동적 광 산란 (Dynamic Light Scattering, DLS)으로 리포솜의 모양 및 크기를 관찰하였고, 관찰된 리포솜의 크기는 약 106nm이다 (도 5 및 도 6).

[86] 도 3은 약물을 담지하는 리포솜의 구성요소 중 하나인 GSH-PEG-DSPE의 합성을 도식화한 것이다.

[87] 도 4는 약물을 담지하는 리포솜의 구성요소를 도식화한 것이다.

[88] 도 5는 Dox-리포솜-GSH의 모양을 투과전자현미경으로 관찰한 이미지이다.

[89] 도 6은 Dox-리포솜-GSH의 크기를 동적 광산란으로 관찰한 그래프이다.

[90]

[91] &lt;2-2&gt; GST-Afb 단백질 코로나 외층을 가지는 리포솜의 제조

[92] 본 발명에서 약물 전달체로 사용하고자 하는, 단백질 코로나 외층을 가지는 리포솜을 제조하기 위해, 단백질 코로나 외층으로서 GST-Afb를 적용한 리포솜을 제조하였다. 리포솜은 내부 및 표면에 화학 작용기를 통해 물질을 담지할 수 있는 전달체로서 사용되므로, 본 발명에서는 리포솜 표면에 GSH를 결합하여 제조하고, 이에 GST를 통해 결합된 단백질 코로나 외층을 형성하여

제조하였다 (도 7).

- [93] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에서 수득한 Dox-리포솜-GSH (104.4 mg) 을 10mM tris-HCl pH 7.5 완충용액 10ml에 준비한 후 20mg/ml PBS 농도의 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 융합단백질을 10 ul 첨가한 후 65 °C에서 10분간 교반시켰다. 그 후 tris-HCl pH 7.5 완충액 10mM을 이용하여 투석을 2번 진행하여 융합단백질을 외층으로 가지는 독소루비신이 담지된 리포솜 (Dox-리포솜-융합단백질)을 합성하였다.
- [94] 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM) 및 동적 광 산란 (Dynamic Light Scattering, DLS)으로 Dox-리포솜-융합단백질의 모양 및 크기를 관찰하였다. Dox-리포솜-융합단백질의 크기는 약 150nm 이며, 표면전하는 ~0 mv 로써, 이는 융합단백질이 Dox-리포솜-GSH와 복합체를 형성하였음을 나타낸다 (도 8 내지 도 11).
- [95] 도 7은 약물을 담지하는 리포솜에 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST)와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질, 즉 표적지향 융합단백질이 결합한 것 (Dox-리포솜-융합단백질)을 도식화한 것이다.
- [96] 도 8은 Dox-리포솜-융합단백질의 크기를 동적 광산란으로 관찰한 그래프이다.
- [97] 도 9는 Dox-리포솜-융합단백질의 모양을 투과전자현미경으로 관찰한 이미지이다.
- [98] 도 10은 Dox-리포솜-GSH의 제타 전위를 나타낸 그래프이다.
- [99] 도 11은 Dox-리포솜-융합단백질의 제타 전위를 나타낸 그래프이다.

[100]

[101] 실시예 3. 표적 세포에 대한 GST-Afb 단백질 코로나 외층을 가지는 리포솜의 세포 독성 확인

- [102] GST-Afb 단백질 코로나 외층을 가지는 리포솜 (Dox-리포솜-융합단백질)이 표적 세포에 대하여 세포독성을 가지는지 확인하였다.
- [103] 구체적으로, 인간 유방암 세포(human breast cancer cell)인 SKBR3 세포에 대한 Her2 지향 융합단백질(Fusion protein) + Dox-리포솜-GSH 의 세포 생존력은 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT)의 불용성 포르마잔(formazan)으로의 환원을 관찰하여 평가하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 세포를 96-웰 플레이트에 웰당 5X10<sup>3</sup> 세포의 밀도로 파종하고 밤새 배양한 후, 0 ~ 25 ug/ml농도 범위의 Dox-리포솜-융합단백질을 각각 세포에 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 대조군 실험은 융합 단백질과 Dox-리포솜-GSH로 수행하였다. 그 다음, 세포를 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT)와 배양한 뒤, 결정화된 포르마잔을 ELISA 플레이트 판독기로 595 nm에서

흡광도를 측정하여 정량화하였다. 결과는 생존력 백분율 =  $[(A550 \text{ (처리된 세포)} - \text{배경값}) / (A550 \text{ (처리되지 않은 세포)} - \text{배경값})] \times 100$ 으로 표현되었다.

- [104] 그 결과, 대조군인 Her2 지향 융합단백질(Fusion protein) 또는 Dox-리포솜-GSH 자체의 세포독성은 80ug/ml 까지 미비한 수준이나, Dox-리포솜-융합단백질의 세포독성은 IC50 수치가 1.4 ug/ml 임을 나타냈다 (도 12). 이러한 결과는, 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 글루타치온—S—전이효소 (glutathione-S-transferase, GST)에 글루타치온이 개질화된 리포솜과의 복합체를 조성하고 있다는 것과, 표적세포로 담지된 약물인 독소루비신을 전달하여 Dox-리포솜-융합단백질을 치료 목적으로 적용 가능함을 나타낸다.

- [105] 도 12는 Dox-리포솜-융합단백질의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[106]

- [107] 실시예 4. 표적 세포에 대한 GST-Afb 단백질 코로나 외충을 가지는 리포솜의 항종양 효과 확인

- [108] Dox-리포솜-융합단백질의 생체 내 항종양 효능을 분석하기 위한 실험을 수행하였다.

- [109] 구체적으로, Balb/c 누드 암컷 마우스는 한국의 Orient bio에서 구입했으며 모든 동물 실험은 울산과학기술원 (UNIST)의 기관 동물 관리 및 사용위원회가 승인한 프로토콜에 따라 수행하였다. SKBR3 세포를 1X PBS 에  $3 \times 10^6$  세포 / 100  $\mu$ L로 하여 0.1 mL를 각각의 누드 마우스의 우측 측면 영역에 피하 주사하여 종양 이종 이식편 모델을 생성하였다. 디지털 캘리퍼(caliper)를 사용하여 주기적으로 종양의 성장을 모니터링 하였다. 종양 부피는 부피 = (종양 길이)  $\times$  (종양 폭) $^2$ /2의 공식에 의해 계산되었다. 종양 크기가 200 mm<sup>3</sup>에 도달할 때, Dox-리포솜-융합단백질, Dox-리포솜-GSH, 융합단백질, 및 PBS 를 각각 주사할 3 마리씩의 마우스를 선택하였고, 그보다 크거나 작은 종양을 가진 마우스는 선택하지 않았다. 이어서, 각 마우스에 Dox-리포솜-융합단백질을 100  $\mu$ L, 50 mg/kg, Dox-리포솜-GSH 를 100  $\mu$ L, 50 mg/kg, 융합단백질을 100  $\mu$ L, 5 mg/kg, 대조군으로 1X PBS를 100  $\mu$ L로 하여 매일 3주간 정맥 내 주사하였다. 그 후, 모든 그룹의 종양 크기 및 체중을 측정하고 비교하였다.

- [110] 그 결과, Dox-리포솜-GSH, 융합단백질 처리군 및 대조군과 비교하여 Dox-리포솜-융합단백질이 처리된 누드 마우스의 경우 종양 성장이 현저히 감소하였다 (도 13). 이러한 결과는, Dox-리포솜-융합단백질이 유의한 항 종양 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

- [111] 도 13은 Dox-리포솜-융합단백질의 항 종양 효과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

## 청구범위

- [청구항 1] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);  
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;  
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을  
갖는 단백질을 연결하는 링커; 및  
상기 글루타치온-S-전이효소와 약물을 담지하는 리포솜이 결합된 것을  
함유하는 약물 전달체.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 리포솜은 나노 리포솜인 것인 약물 전달체.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 리포솜은 입자 크기가 10nm 내지 250nm인 것인  
약물 전달체.
- [청구항 4] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 리포솜은 인지질, 스테로이드 및  
PEG 함유한 인지질로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질을  
포함하는 것인 약물 전달체.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 글루타치온-S-전이효소와 리포솜의 결합은  
GSH(Glutathione)에 의한 것인 약물 전달체.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 하나의 리포솜에 상기 글루타치온-S-전이효소,  
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질 및 링커가 포함된  
단백질이 두개 이상 결합된 것인 약물 전달체.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 약물은 항암제인 것인 약물 전달체.
- [청구항 8] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);  
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;  
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을  
갖는 단백질을 연결하는 링커; 및  
상기 글루타치온-S-전이효소와 항암제를 담지하는 리포솜이 결합된 것을  
포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 리포솜은 나노 리포솜인 것인 약물 전달체.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 리포솜은 입자 크기가 10nm 내지 200nm인 것인  
약물 전달체.
- [청구항 11] 청구항 8 또는 청구항 9에 있어서, 상기 리포솜은 인지질, 스테로이드 및  
PEG 함유한 인지질로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 지질을  
포함하는 것인 약물 전달체.
- [청구항 12] 청구항 8에 있어서, 상기 글루타치온-S-전이효소와 리포솜의 결합은  
GSH(Glutathione)에 의한 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 청구항 8에 있어서, 상기 항암제는 아바렐릭스 [abarelix (Plenaxis depot®)];  
알데스류킨 [aldesleukin (Prokine®)]; 알데스류킨 [Aldesleukin (Proleukin®)];  
알렘투주맙 [Alemtuzumabb (Campath®)]; 알리트레티노인 [alitretinoin  
(Panretin®)]; 알로퓨리놀 [allopurinol (Zyloprim®)]; 알트레타민 [altretamine

(Hexalen®); 아미포스틴 [amifostine (Ethyol®)]; 아나스트로졸 [anastrozole (Arimidex®)]; 아르세닉 트리옥사이드 [arsenic trioxide (Trisenox®)]; 아스파라기나아제 [asparaginase (Elspar®)]; 아자시티딘 [azacitidine (Vidaza®)]; 베바쿠지맙 [bevacuzimab (Avastin®)]; 벅사로텐 캡슐 [bexarotene capsules (Targretin®)]; 벅사로텐 겔 [bexarotene gel (Targretin®)]; 블레오마이신 [bleomycin (Blenoxane®)]; 보르테조밐 [bortezomib (Velcade®)]; 정맥용 부숴판 [busulfan intravenous (Busulfex®)]; 경구용 부숴판 [busulfan oral (Myleran®)]; 칼루스테론 [calusterone (Methosarb®)]; 카페시타빈 [capecitabine (Xeloda®)]; 카르보플라틴 [carboplatin (Paraplatin®)]; 카르무스틴 [carmustine (BCNU®, BiCNU®)]; 카르무스틴 [carmustine (Gliadel®)]; 카르무스틴과 폴리페프로산 20 임플란트 (Polifeprosan 20 Implant) (Gliadel Wafer®); 셀레코싯 [celecoxib (Celebrex®)]; 세툽시맙 [cetuximab (Erbix®)]; 클로람부실 [chloambucil (Leukeran®)]; 시스플라틴 [cisplatin (Platinol®)]; 클라드리빈 [cladribine (Leustatin®) 2-CdA®]; 클로파라빈 [clofarabine (Clolar®)]; 사이클로포스파미드 [cyclophosphamide (Cytoxan®, Neosar®)]; 사이클로포스파미드 [cyclophosphamide (Cytoxan Injection®)]; 사이클로포스파미드 [cyclophosphamide (Cytoxan Tablet®)]; 사이타라빈 [cytarabine (Cytosar-U®)]; 사이타라빈 리포조말 [cytarabine liposomal (DepoCyt®)]; 다카르바진 [dacarbazine (DTIC-Dome®)]; 닥티노마이신 (dactinomycin), 액티노마이신 D [actinomycinD (Cosmegen®)]; 다르베포에틴 알파 [Darbepoetin alfa (Aranesp®)]; 다우노루비신 리포조말 [daunorubicin liposomal (Danuoxome®)]; 다우노루비신 (daunorubicin), 다우노마이신 [daunomycin (Daunorubicin®)]; 다우노루비신 (daunorubicin), 다우노마이신 [daunomycin (Cerubidine®)]; 데니루킨 디프티톡스 [Denileukin diftitox (Ontak®)]; 덱스라조산 [dexrazoxane (Zinecard®)]; 도세탁셀 [docetaxel (Taxotere®)]; 독소루비신 [doxorubicin (Adriamycin PFS®)]; 독소루비신 [doxorubicin (Adriamycin®, Rubex®)]; 독소루비신 [doxorubicin (Adriamycin PFS Injection®)]; 독소루비신 리포조말 [doxorubicin liposomal (Doxil®)]; 드로모스타놀론 프로피오네이트 [dromostanolone propionate (dromostanolone®)]; 드로모스타놀론 프로피오네이트 [dromostanolone propionate (masterone injection®)]; 엘리엇 B 용액 [Elliott's B Solution (Elliott's B Solution®)]; 에피루비신 [epirubicin (Ellence®)]; 이포에틴 알파 [Epoetin alfa (epogen®)]; 에를로티닙 [erlotinib (Tarceva®)]; 에스트라무스틴 [estramustine (Emcyt®)]; 에토포사이드 포스페이트 [etoposide phosphate (Etopophos®)]; 에토포사이드 (etoposide), VP-16 (Vepesid®); 엑세메스탄 [exemestane (Aromasin®)]; 필그라스티민 [Filgrastim (Neupogen®)]; 플록수리딘 [floxuridine (intraarterial) (FUDR®)]; 플루다라빈 [fludarabine (Fludara®)];

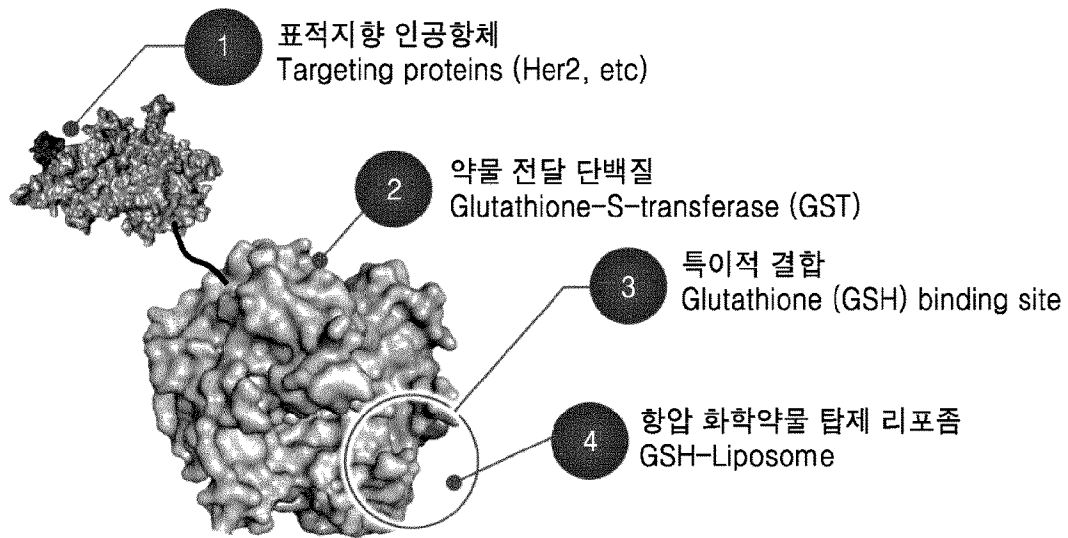
플루오로우라실 [Fluorouracil, 5-FU (Adrucil®)]; 플루베스트란트  
 [flovestrant (Faslodex®)]; 게피티닙 [gefitinib (Iressa®)]; 겐시타빈  
 [gemcitabine (Gemzar®)]; 겐투주맙 오조가미신 [gemtuzumab ozogamicin  
 (Mylotarg®)]; 고세렐린 아세테이트 [goserelin acetate (Zoladex Implant®)];  
 고세렐린 아세테이트 [goserelin acetate (Zoladex®)]; 히스트렐린  
 아세테이트 [histrelin acetate (Histrelin implant®)]; 하이드록시우레아  
 [hydroxyurea (Hydrea®)]; 이브리투모맙 티옥세탄 [Ibritumomab Tiuxetan  
 (Zevalin®)]; 이다루비신 [idarubicin (Idamycin®)]; 이포스파미드 [ifosfamide  
 (IFEX®)]; 이마티닙 메실레이트 [imatinib mesylate (Gleevec®)]; 인터페론  
 알파-2a [interferon alfa-2a (Roferon A®)]; 인터페론 알파-2b [Interferon  
 alfa-2b (Intron A®)]; 이리노테칸 [irinotecan (Camptosar®)]; 레날리도마이드  
 [lenalidomide (Revlimid®)]; 레트로졸 [letrozole (Femara®)]; 류코보린  
 [leucovorin (Wellcovorin®, Leucovorin®)]; 류프롤리드 아세테이트  
 [Leuprolide Acetate (Eligard®)]; 레바미솔 [levamisole (Ergamisol®)];  
 로무스틴-CCNU [lomustine-CCNU (CeeBU®)]; 메클로레타민  
 (meclorothamine), 니트로젠 머스타드 [nitrogen mustard (Mustargen®)];  
 메게스트롤 아세테이트 [megestrol acetate (Megace®)]; 멜파란 (melphalan),  
 L-PAM (Alkeran®); 머캅토피린 [mercaptapurine, 6-MP (purinethol®)];  
 메스나 [mesna (Mesnex®)]; 메스나 [mesna (Mesnex tabs®)]; 메토트렉세이트  
 [methotrexate (methotrexate®)]; 메톡스살렌 [methoxsalen (Uvadex®)];  
 미토마이신 C [mitomycin C (Mutamycin®)]; 미토탄 [mitotane (Lysodren®)];  
 미토잔트론 [mitoxantrone (Novantrone®)]; 난드로론 펜프로피오네이트  
 [nandrolone phenpropionate (Durabolin-50®)]; 넬라라빈 [nelarabine (Arranon  
 ®)]; 노페투모맙 [Nofetumomab (Verluma®)]; 오프렐베킨 [Oprelvekin  
 (Neumega®)]; 옥살리플라틴 [oxaliplatin (Eloxatin®)]; 파클리탁셀 [paclitaxel  
 (Paxene®)]; 파클리탁셀 [paclitaxel (Taxol®)]; 파클리탁셀 단백질 결합 입자  
 [paclitaxel protein-bound particles (Abraxane®)]; 팔리페르민 [palifermin  
 (Kepivance®)]; 파미드로네이트 [pamidronate (Aredia®)]; peg아데마스  
 [pegademase (Adagen (Pegademase Bovine®)]; peg아스파르가아제  
 [pegaspargase (Oncaspar®)]; peg필그라스티움 [Pegfilgrastim (Neulasta®)];  
 페멕트렉세트 디소듐 [pemetrexed disodium (Alimta®)]; 펜토스타틴  
 [pentostatin (Nipent®)]; 피포브로만 [pipobroman (Vercyte®)]; 플리카마이신  
 [plicamycin], 미트라마이신 [mithramycin (Mithracin®)]; 포르피머 소듐  
 [porfimer sodium (Photofrin®)]; 프로카르바진 [procarbazine (Matulane®)];  
 퀴나크린 [quinacrine (Atabrine®)]; 라스뷰리카아제 [Rasburicase (Elitek®)];  
 리툽시맙 [Rituximab (Rituxan®)]; 사르그라모스틴 [sargramostim (Leukine®  
 )]; 사르그라모스틴 [Sargramostim (Prokine®)]; 소라페닙 [sorafenib  
 (Nexavar®)]; 스트렙타조신 [streptozocin (Zanosar®)]; 수니티닙 말리에이트

[sunitinib maleate (Sutent®)]; 탈크 [talc (Sclerosol®)]; 타목시펜 [tamoxifen (Nolvadex®)]; 테모졸로마이드 [temozolomide (Temodar®)]; 테니포사이드 [teniposide, VM-26 (Vumon®)]; 테스트락톤 [testolactone (Teslac®)]; 티오구아닌 [thioguanine, 6-TG (thioguanine®)]; 티오테파 [thiotepa (thioplex®)]; 토포테칸 [topotecan (Hycamtin®)]; 토레미펜 [toremifene (Fareston®)]; 토시투모맵 [Tositumomab (Bexxar®)]; 토시투모맵/I-131 토시투모맵 (Bexxar®); 트라스투주맵 [Trastuzumab (Herceptin®)]; 트레티노인 [tretinoin, ATRA (Vesanoid®)]; 우라실 머스타드 [Uracil Mustard (Uracil Mustard Capsules®)]; 발루비신 [valrubicin (Valstar®)]; 빈블라스틴 [vinblastine (Velban®)]; 빈크리스틴 [vincristine (Oncovin®)]; 비노렐빈 [vinorelbine (Navelbine®)]; 및 졸레드로네이트 [zoledronate (Zometa®)]로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

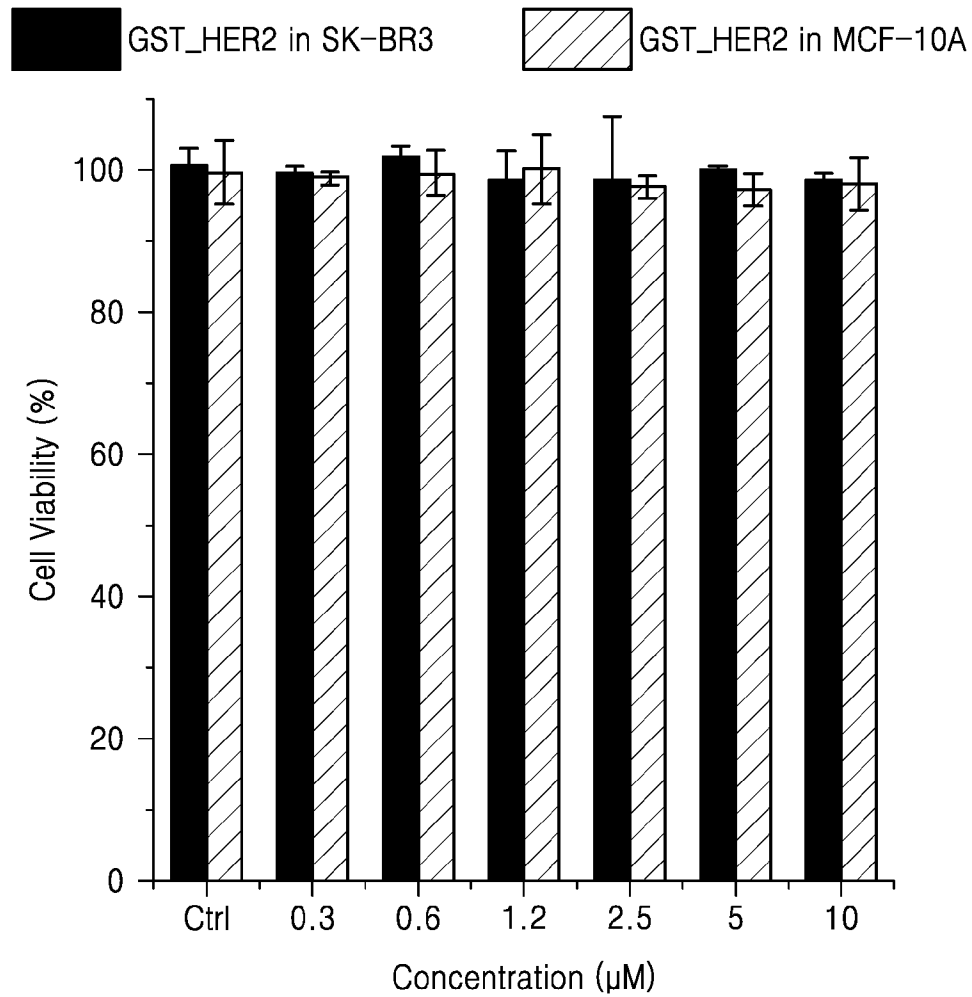
[청구항 14] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);  
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;  
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및  
상기 글루타치온-S-전이효소와 약물을 담지하는 리포솜을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 약물을 전달하는 방법.

[청구항 15] 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST);  
표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질;  
상기 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커; 및  
상기 글루타치온-S-전이효소와 항암제를 담지하는 리포솜을 함유하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방하거나 치료하는 방법.

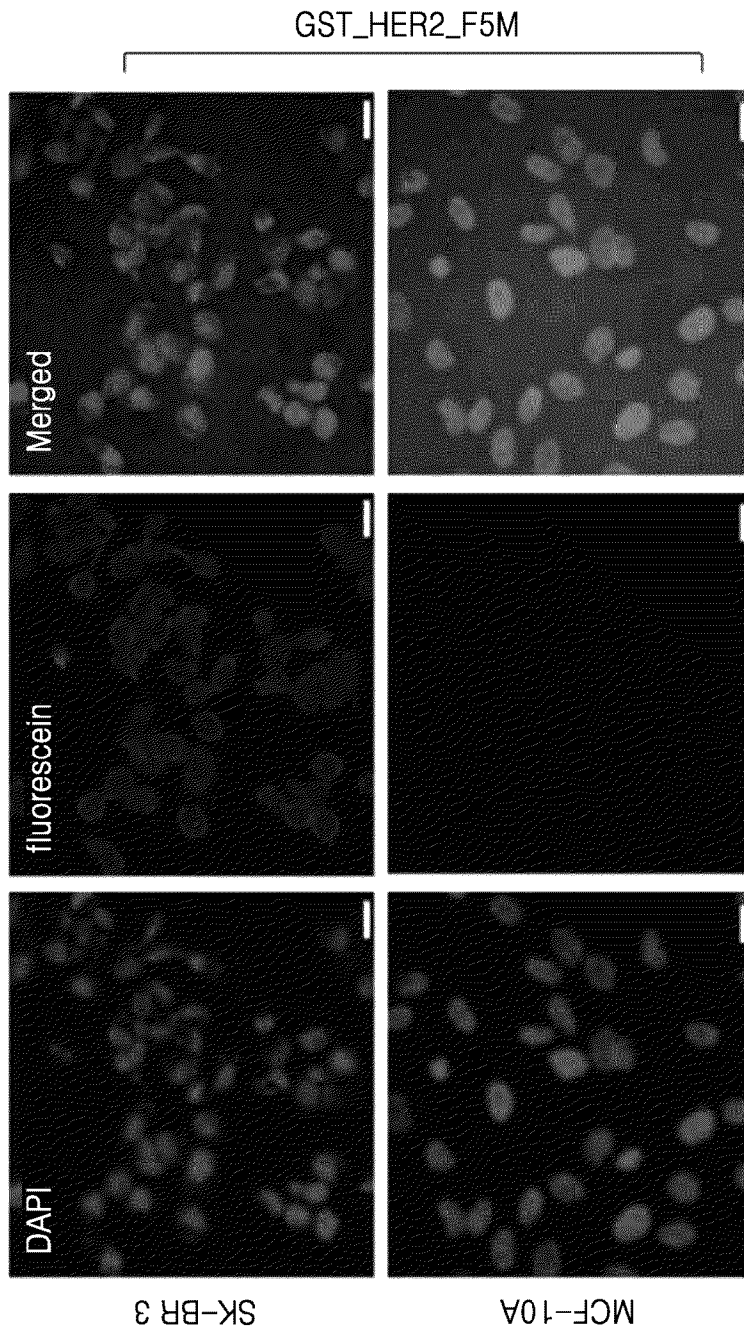
[도1]



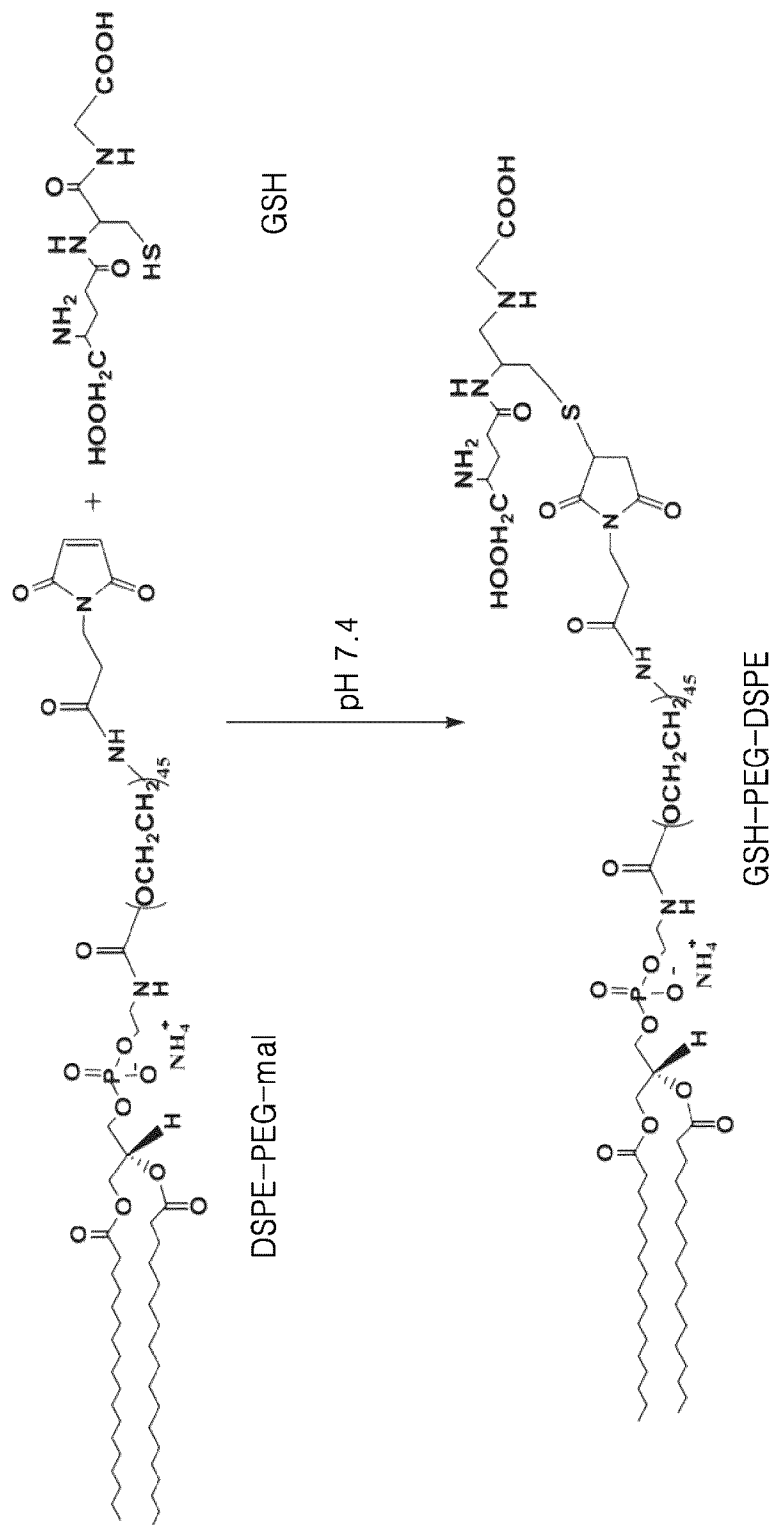
[도2a]



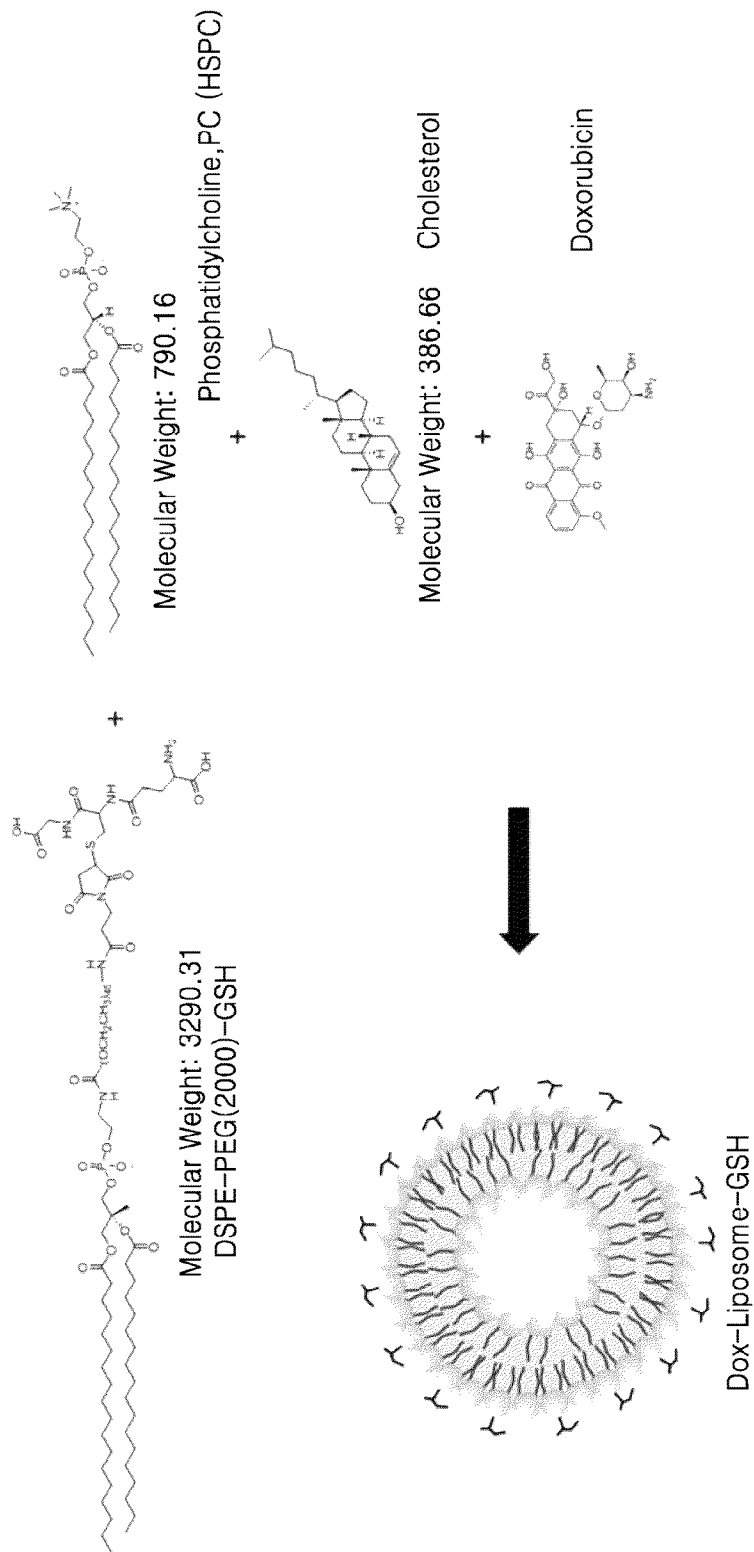
[도2b]



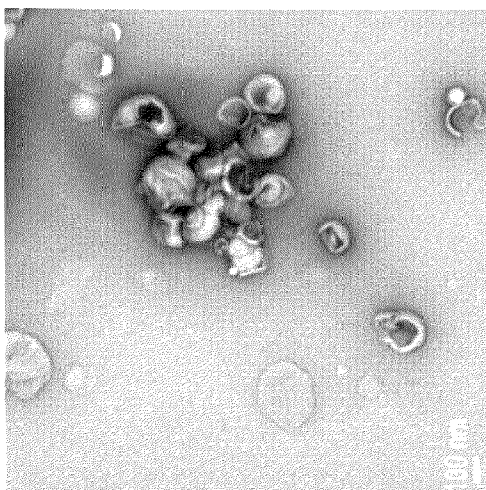
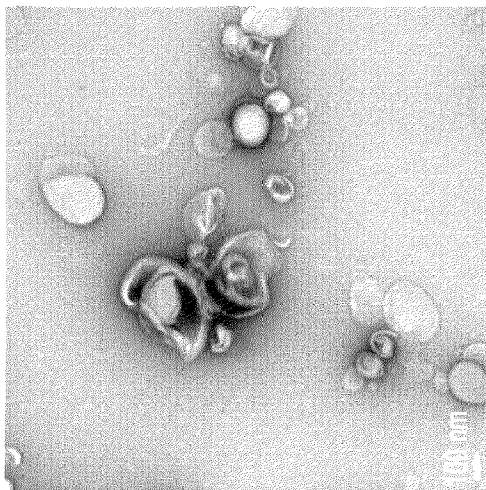
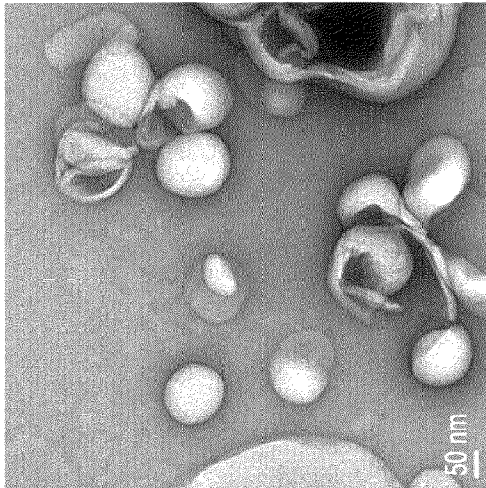
[도3]



[도4]

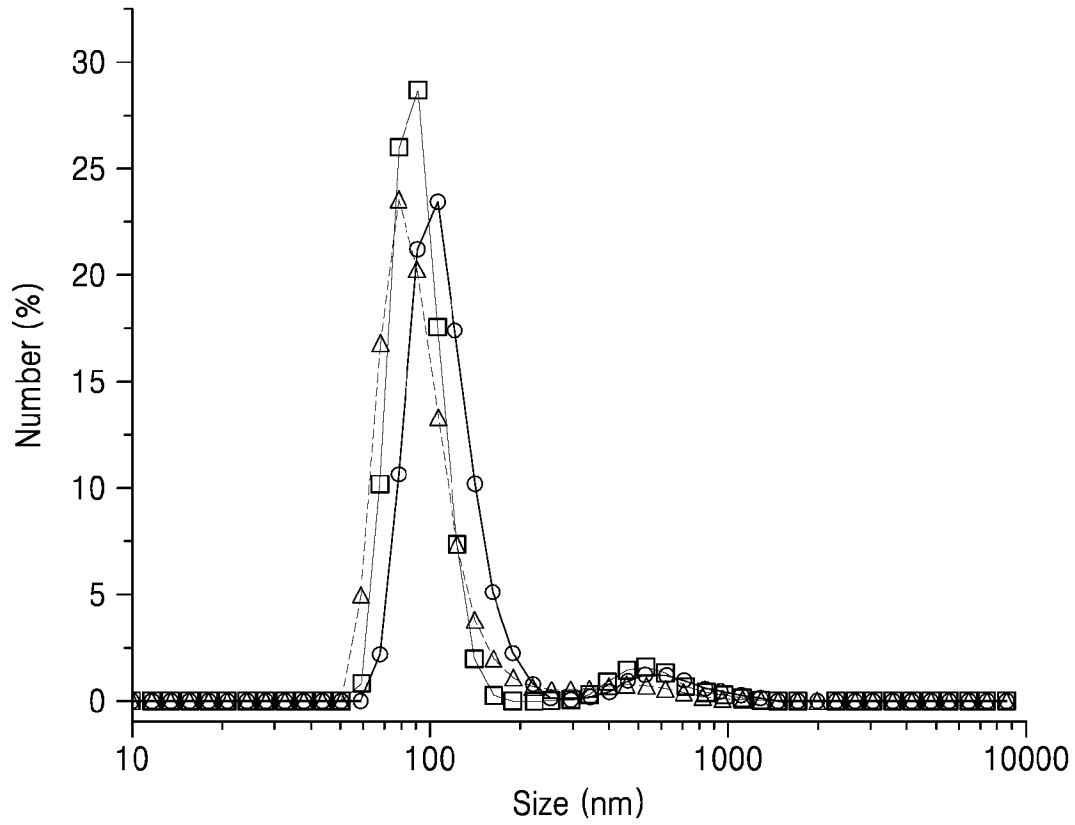


[도5]

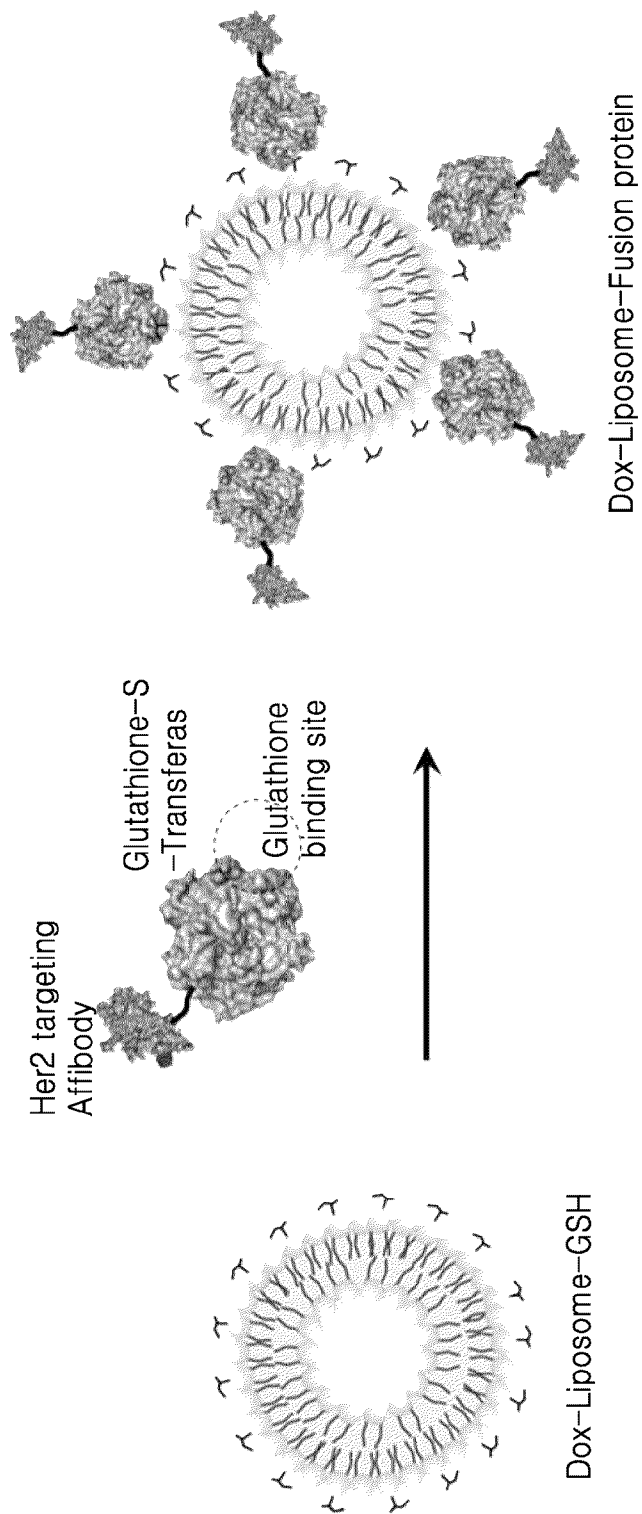


[도6]

Dox-Liposome-GSH size : 약 106 nm

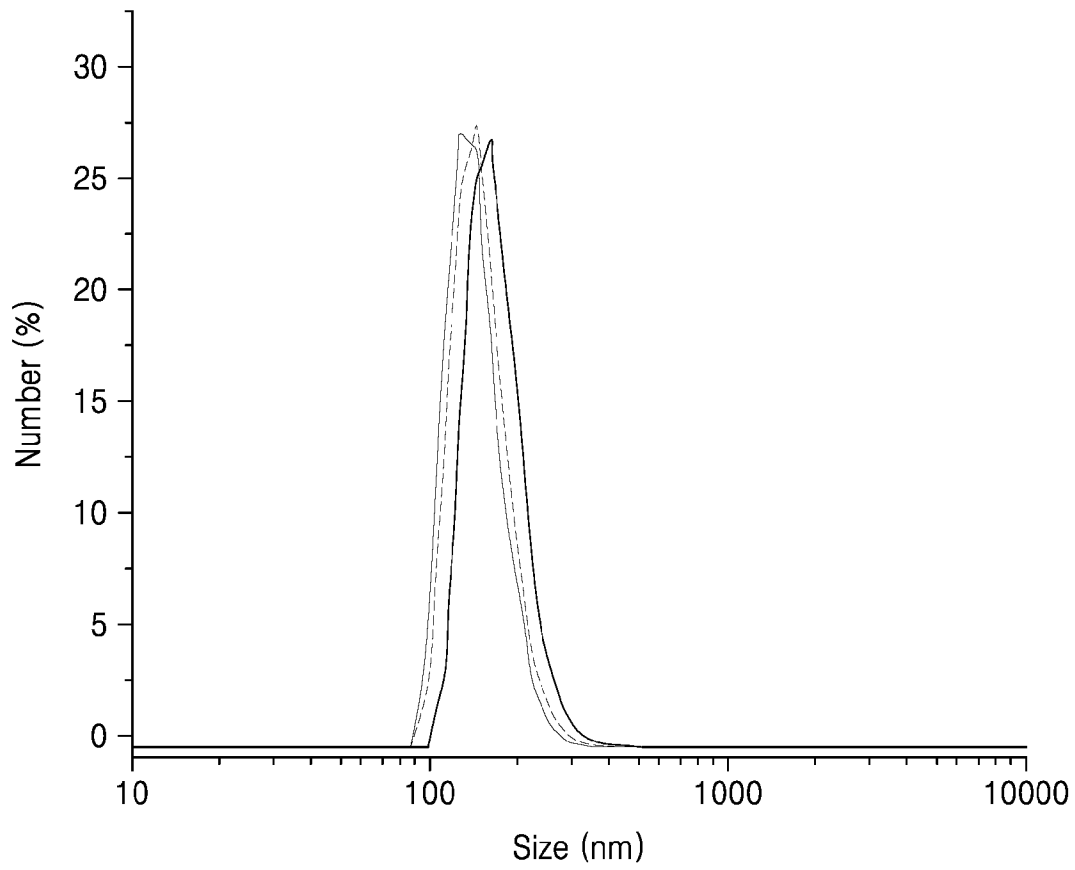


[도7]

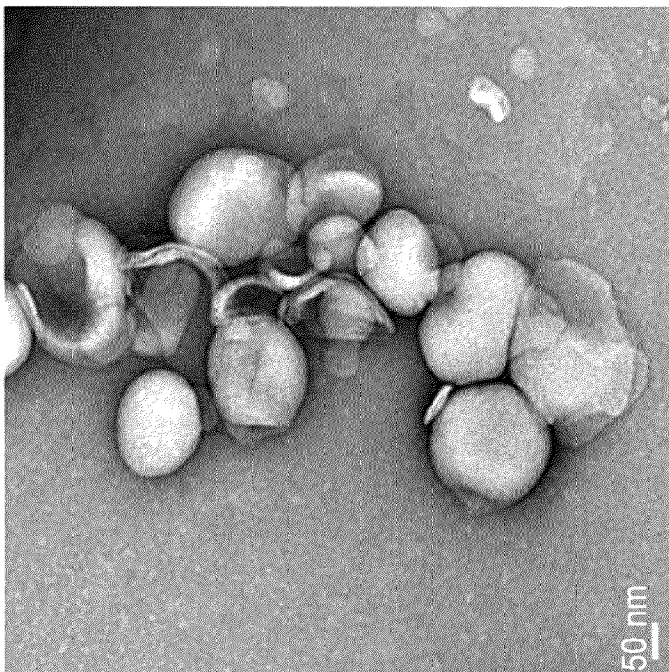
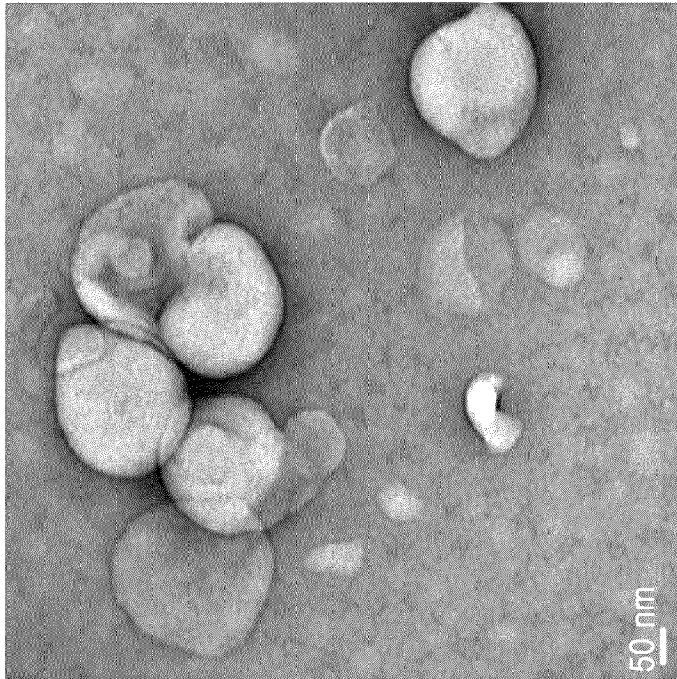


[도8]

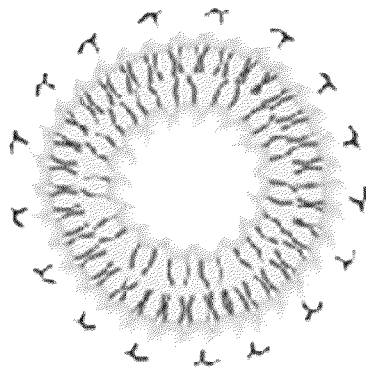
Dox-Liposome-fusion protein : 약 154 nm



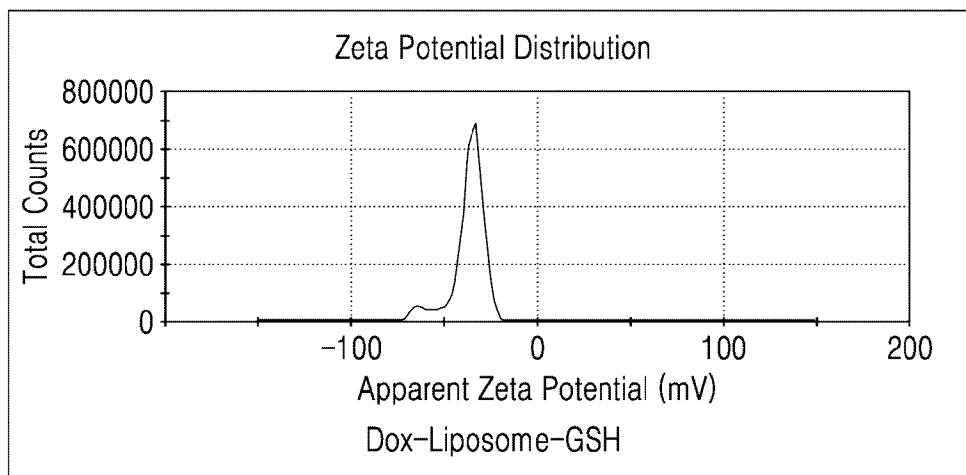
[도9]



[도10]

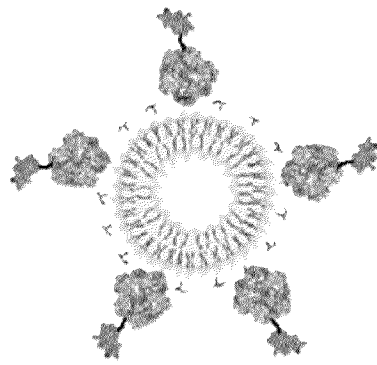


Dox-Liposome-GSH

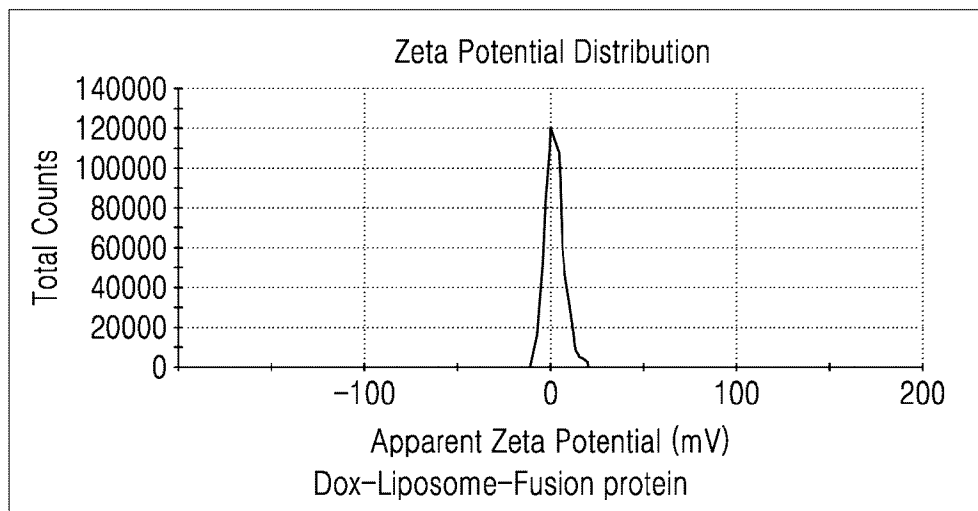


- 40 mv

[도11]

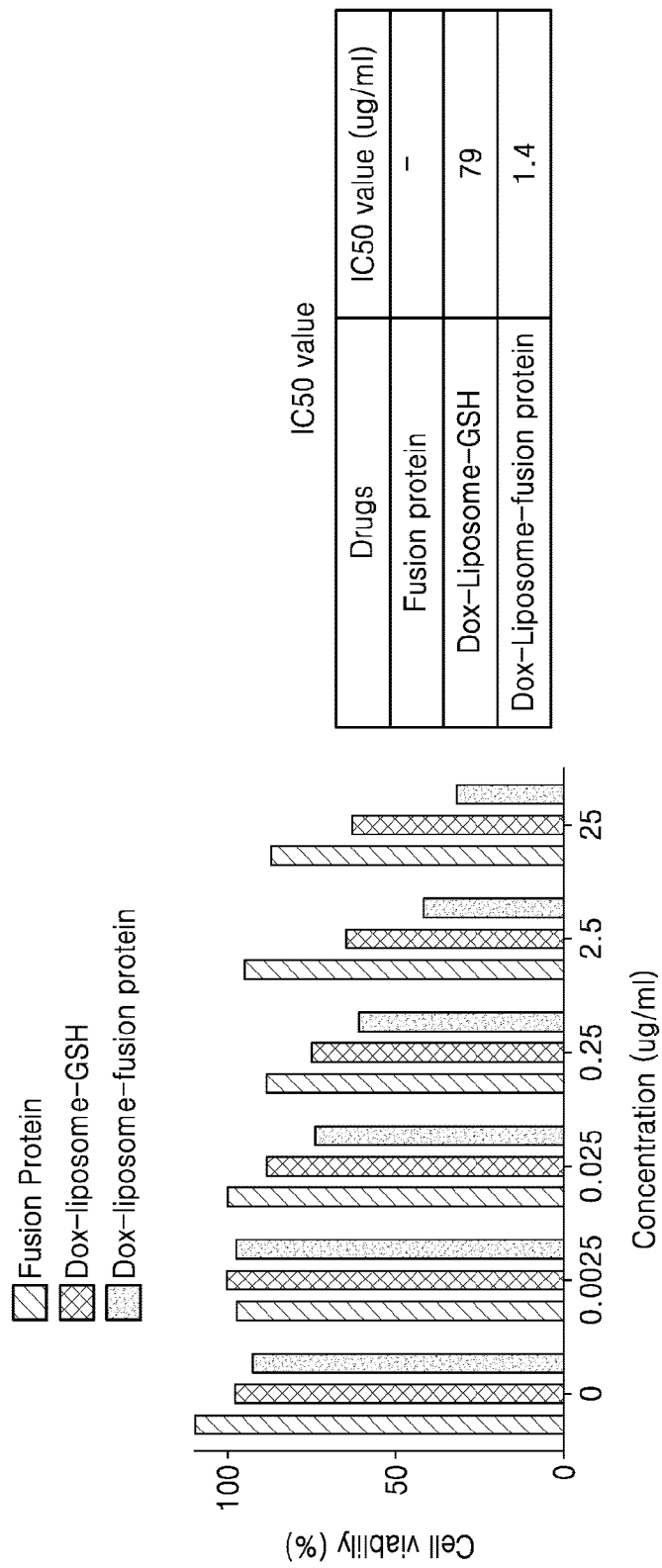


Dox-Liposome-Fusion protein

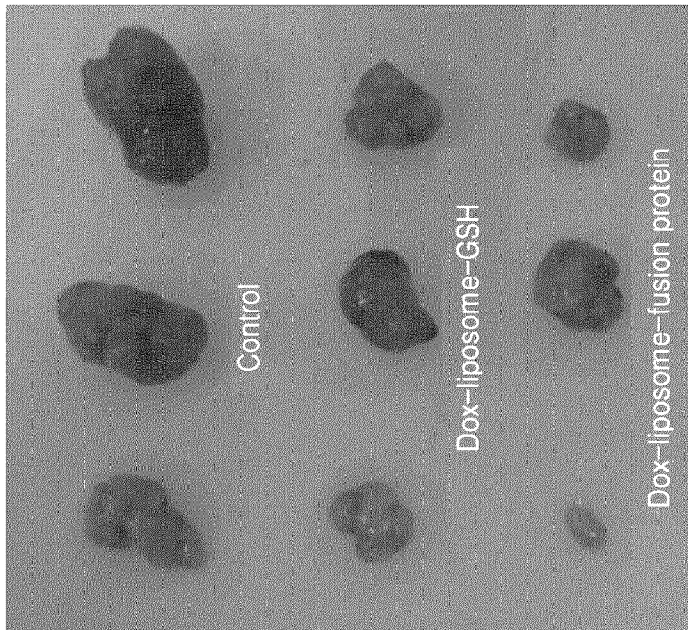
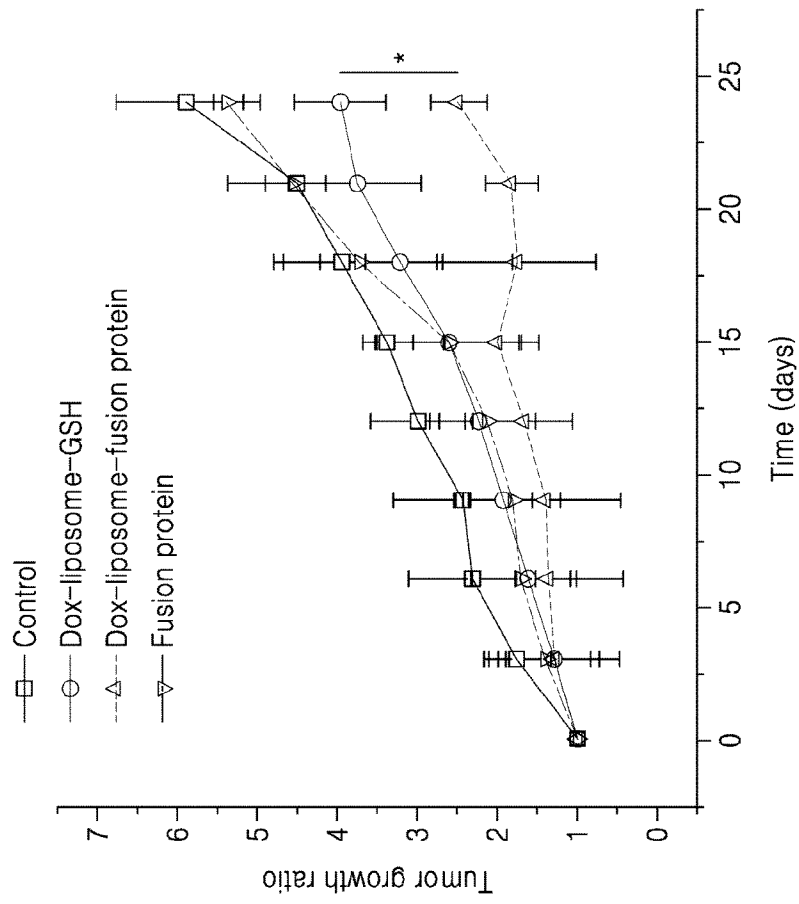


0 mv

[도12]



[도13]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/006905

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/69(2017.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/32(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 47/69; A61K 38/15; A61K 47/64; A61K 9/127; C07K 16/40; C07K 16/46; A61K 31/704; A61K 45/06; A61P 35/00; C12N 9/10; C07K 16/28; C07K 16/32

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: glutathione-S-transferase(GST), target cell, liposome, anti-cancer

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | MOON, H. et al. Plug-and-playable fluorescent cell imaging modular toolkits using the bacterial superglue, SpyTag/SpyCatcher. Chemical Communications. 2016, vol. 52, no. 97, pages 14051-14054<br>See abstract; pages 14051-14053. | 1-13                  |
| Y         | US 2007-0141133 A1 (WANG, A.-J. et al.) 21 June 2007<br>See abstract; figure 1; paragraphs [0012], [0034]; claims 1-8.                                                                                                              | 1-13                  |
| Y         | MA, W. et al. Protein conjugation to nanoparticles by designer affinity tags. Materials Today: Proceedings. 2017, vol. 4, pages 6923-6929<br>See abstract; pages 6923, 6928.                                                        | 1-13                  |
| A         | KR 10-2017-0028637 A (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) 14 March 2017<br>See abstract; claim 1.                                                                                                            | 1-13                  |
| PX        | KR 10-2019-0062320 A (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) 05 June 2019<br>See abstract; claims 1-19.                                                                                                         | 1-13                  |



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

24 AUGUST 2020 (24.08.2020)

Date of mailing of the international search report

24 AUGUST 2020 (24.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/006905

## 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.: **14-15**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 14-15 pertain to a method for treatment of the human body, including a step for direct treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:  
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:
3. ☐ Claims Nos.:  
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/KR2020/006905**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| US 2007-0141133 A1                        | 21/06/2007          | CN 101385859 A          | 18/03/2009          |
|                                           |                     | CN 101385859 B          | 07/12/2011          |
|                                           |                     | CN 1985804 A            | 27/06/2007          |
|                                           |                     | CN 1985804 B            | 14/05/2014          |
|                                           |                     | CY 1115542 T1           | 04/01/2017          |
|                                           |                     | DK 1891962 T3           | 13/10/2014          |
|                                           |                     | EP 1891962 A1           | 27/02/2008          |
|                                           |                     | EP 1891962 B1           | 13/08/2014          |
|                                           |                     | EP 2837384 A1           | 18/02/2015          |
|                                           |                     | ES 2516665 T3           | 31/10/2014          |
|                                           |                     | JP 2007-169252 A        | 05/07/2007          |
|                                           |                     | JP 2010-150264 A        | 08/07/2010          |
|                                           |                     | JP 4773200 B2           | 14/09/2011          |
|                                           |                     | JP 5394944 B2           | 22/01/2014          |
|                                           |                     | PL 1891962 T3           | 30/01/2015          |
|                                           |                     | PT 1891962 E            | 11/11/2014          |
|                                           |                     | SI 1891962 T1           | 31/12/2014          |
|                                           |                     | SI EP1891962 T1         | 31/12/2014          |
|                                           |                     | TW I365754 B            | 11/06/2012          |
|                                           |                     | US 2008-0095836 A1      | 24/04/2008          |
|                                           |                     | US 2009-0060991 A1      | 05/03/2009          |
|                                           |                     | US 2009-0123531 A1      | 14/05/2009          |
|                                           |                     | US 2010-0166849 A1      | 01/07/2010          |
|                                           |                     | US 2012-0046445 A1      | 23/02/2012          |
|                                           |                     | US 7446096 B2           | 04/11/2008          |
|                                           |                     | US 7700564 B2           | 20/04/2010          |
|                                           |                     | US 7704956 B2           | 27/04/2010          |
|                                           |                     | US 8067380 B2           | 29/11/2011          |
|                                           |                     | US 8569239 B2           | 29/10/2013          |
|                                           |                     | US 8673863 B2           | 18/03/2014          |
| KR 10-2017-0028637 A                      | 14/03/2017          | None                    |                     |
| KR 10-2019-0062320 A                      | 05/06/2019          | KR 10-2020-0047481 A    | 07/05/2020          |
|                                           |                     | KR 10-2020-0047482 A    | 07/05/2020          |
|                                           |                     | KR 10-2112269 B1        | 19/05/2020          |
|                                           |                     | KR 10-2114445 B1        | 21/05/2020          |
|                                           |                     | KR 10-2114447 B1        | 21/05/2020          |
|                                           |                     | WO 2019-107896 A1       | 06/06/2019          |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

A61K 47/69(2017.01)i, A61K 47/64(2017.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/32(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/69; A61K 38/15; A61K 47/64; A61K 9/127; C07K 16/40; C07K 16/46; A61K 31/704; A61K 45/06; A61P 35/00; C12N 9/10; C07K 16/28; C07K 16/32

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: 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST), 표적세포(target cell), 리포솜(liposome), 항암(anti-cancer)

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                  | 관련 청구항 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Y     | MOON, H. 등, `Plug-and-playable fluorescent cell imaging modular toolkits using the bacterial superglue, SpyTag/SpyCatcher`, Chemical Communications, 2016, 52권, 97호, 페이지 14051-14054<br>초록; 페이지 14051-14053 | 1-13   |
| Y     | US 2007-0141133 A1 (WANG, A.-J. 등) 2007.06.21<br>요약; 도면 1; 단락 [0012], [0034]; 청구항 1-8                                                                                                                       | 1-13   |
| Y     | MA, W. 등, `Protein conjugation to nanoparticles by designer affinity tags`, Materials Today: Proceedings, 2017, 4권, 페이지 6923-6929<br>초록; 페이지 6923, 6928                                                     | 1-13   |
| A     | KR 10-2017-0028637 A (울산과학기술원) 2017.03.14<br>요약; 청구항 1                                                                                                                                                      | 1-13   |
| PX    | KR 10-2019-0062320 A (울산과학기술원) 2019.06.05<br>요약; 청구항 1-19                                                                                                                                                   | 1-13   |

☐ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 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

2020년 08월 24일 (24.08.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 08월 24일 (24.08.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



## 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: 14-15  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 14-15는 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:  
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<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 공개일                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 2007-0141133 A1    | 2007/06/21 | CN 101385859 A<br>CN 101385859 B<br>CN 1985804 A<br>CN 1985804 B<br>CY 1115542 T1<br>DK 1891962 T3<br>EP 1891962 A1<br>EP 1891962 B1<br>EP 2837384 A1<br>ES 2516665 T3<br>JP 2007-169252 A<br>JP 2010-150264 A<br>JP 4773200 B2<br>JP 5394944 B2<br>PL 1891962 T3<br>PT 1891962 E<br>SI 1891962 T1<br>SI EP1891962 T1<br>TW I365754 B<br>US 2008-0095836 A1<br>US 2009-0060991 A1<br>US 2009-0123531 A1<br>US 2010-0166849 A1<br>US 2012-0046445 A1<br>US 7446096 B2<br>US 7700564 B2<br>US 7704956 B2<br>US 8067380 B2<br>US 8569239 B2<br>US 8673863 B2 | 2009/03/18<br>2011/12/07<br>2007/06/27<br>2014/05/14<br>2017/01/04<br>2014/10/13<br>2008/02/27<br>2014/08/13<br>2015/02/18<br>2014/10/31<br>2007/07/05<br>2010/07/08<br>2011/09/14<br>2014/01/22<br>2015/01/30<br>2014/11/11<br>2014/12/31<br>2014/12/31<br>2012/06/11<br>2008/04/24<br>2009/03/05<br>2009/05/14<br>2010/07/01<br>2012/02/23<br>2008/11/04<br>2010/04/20<br>2010/04/27<br>2011/11/29<br>2013/10/29<br>2014/03/18 |
| KR 10-2017-0028637 A  | 2017/03/14 | 없음                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| KR 10-2019-0062320 A  | 2019/06/05 | KR 10-2020-0047481 A<br>KR 10-2020-0047482 A<br>KR 10-2112269 B1<br>KR 10-2114445 B1<br>KR 10-2114447 B1<br>WO 2019-107896 A1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2020/05/07<br>2020/05/07<br>2020/05/19<br>2020/05/21<br>2020/05/21<br>2019/06/06                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |