

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 1월 13일 (13.01.2022) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2022/010254 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 14/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/008641

(22) 국제출원일: 2021년 7월 7일 (07.07.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0083909 2020년 7월 8일 (08.07.2020) KR

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

(72) 발명자: 김학성 (KIM, Hak-Sung); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 김태윤 (KIM, Tae Yoon); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 최윤주 (CHOI, Yoonjoo); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울시 강남구 언주로 430 16층, 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, IT, 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.

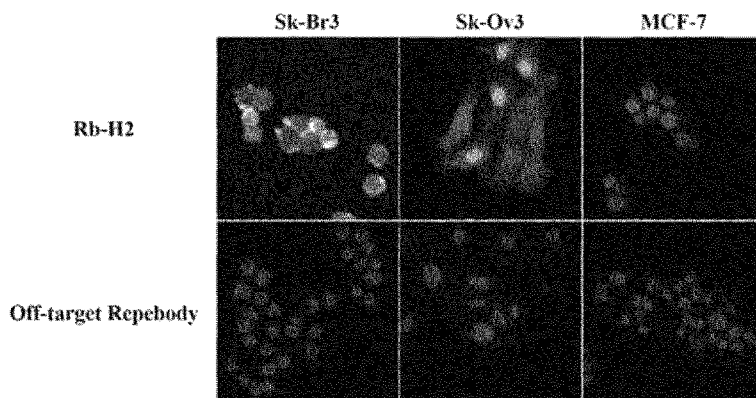
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE BINDING SPECIFICALLY TO DOMAIN 4 OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 신규 폴리펩티드 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a novel polypeptide designed using a computational biological method to bind to a specific site of domain 4 of human epidermal growth factor receptor 2, a method for preparing the polypeptide, and a use of the polypeptide. Serving as a new diagnostic and therapeutic agent for cancer, the novel polypeptide according to the present invention is expected to substitute for conventional antibodies.

(57) 요약서: 본 발명은 계산생물학 방법을 이용해 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4의 특정 위치에 결합하도록 설계된 신규 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드의 제조방법 및 상기 폴리펩티드의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 신규 폴리펩티드는 새로운 암 진단 및 치료제로써 기존의 항체를 대체할 수 있을 것으로 기대된다.



WO 2022/010254 A1

명세서

발명의 명칭: 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 신규 폴리펩티드 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형(HER2)의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 신규 폴리펩티드 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 계산생물학 방법을 이용해 특정 위치인 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 결합하도록 설계된 신규 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드의 제조방법 및 상기 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2)은 많은 암세포에서 1형(EGFR)과 함께 과발현되는 단백질로 알려져 있다. 이들 인간 상피세포 증식인자 수용체 단백질족(ErbB Protein Family)들은 특정 암세포에서 과발현되어 자기 자신(homo) 혹은 이형(hetero)과 이합체(dimer)를 형성하여 암세포의 분화와 성장을 촉진한다. 이러한 이유로 많은 제약회사에는 이러한 인산 상피세포 증식인자 수용체 단백질들에 대한 항체를 개발해 왔다. 그 중에서 인간 상피세포 증식인자 수용체 1형과 2형에 대한 연구가 가장 활발하게 진행되었다, 특별히, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형 단백질은 유방암 세포를 포함한 많은 암세포에서 특이적으로 과발현되어 이들 암세포에 대한 특이적인 항원으로써 항체를 개발하고자 하였다. 그런데, 이 2형은 1형과는 다르게 특정한 수용인자(ligand)가 존재하지 않으며 단백질 족 내의 다른 수용체와의 이질 이합체(hetero-dimer) 형성을 통하여 암세포의 성장과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이질이중체의 형성에는 도메인 2와 4가 관여하고 있다. 따라서, HER2의 세포 밖 수용체를 표적 시 이질 이중체의 형성에 관여하는 특정 위치에 결합할 경우에만 암세포 성장 억제 효과를 얻을 수 있다. 하지만, 이러한 특정위치를 표적하는 단백질을 개발하는 것은 현재 범용적으로 이용되고 있는 라이브러리에 기반한 방법으로는 많은 어려움이 따른다.
- [4] 다양한 질병의 치료제 개발을 위하여 질병에 특이적인 항원에 결합하는 항체나 단백질을 개발하려는 연구가 지속되고 있다. 그러나, 이러한 특이적 결합체들은 많은 시간과 실험이 요구되며 또한 대부분의 경우 라이브러리에 기반한 무작위 선택에 의존하고 있기에 선택된 결합 단백질이 결합하는 위치가 생물학적으로 혹은 의학적으로 효과가 없는 위치인 경우가 많이 발생한다. 이로 인하여, 원하는 특정 위치에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질의 개발이 요구되고 있다.
- [5] 계산생물학의 발전으로 인하여 특정 단백질에 결합하는 단백질의 개발 기술도 점점 고도화되고 있다. 이러한 기술을 이용하여 치료용 단백질을 설계하고

개발하는 연구가 활발히 진행 중이며 이를 실제 치료제 개발에 적용하려는 노력이 최근 들어 많아지고 있다. 하지만, 아직까지 컴퓨터의 계산능력의 한계 및 에너지 함수의 부정확성으로 인하여 많은 어려움을 갖고 있다. 특히, 구조가 매우 단단한 단백질에 대해서는 많은 성과를 이루고 있지만 아직까지 많은 loop로 이루어져 매우 유동적인 단백질에 대한 결합 단백질 설계와 개발은 많은 어려움을 가지고 있다.

- [6] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 리피바디(repebody)라는 신규 단백질 골격을 이용하여 다양한 질병 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 새로운 폴리펩티드를 개발하였다. 상기 리피바디는 LRR (Leucine-rich repeat) 모듈로 구성되어 있고 크기가 항체의 1/5 수준이며 대장균에서 대량생산이 가능할 뿐만 아니라 열 및 pH 안정성이 매우 우수한 특징을 가지고 있다. 또한 표적 물질에 대해 특이적으로 결합하는 리피바디를 파지 디스플레이(Phage display)를 이용하여 쉽게 선별할 수 있고 표적에 대한 결합력을 pico-mole 수준까지 매우 용이하게 증가시킬 수 있다.
- [7] 이에, 본 발명자들은 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하며 동시에 목표하는 특정한 위치에 결합할 수 있는 새로운 폴리펩티드를 개발하기 위해, 예의 노력한 결과, 계산생물학적 방법을 이용하여 기존에 결합하는 위치가 알려진 치료용 항체(trastuzumab)와 결합위치가 겹치는 리피바디를 디자인하고, 파지 디스플레이 방법을 이용한 모듈 기반 결합력 증대를 통해 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형(HER2)의 도메인 4에 특이적인 결합력을 갖는 신규한 폴리펩티드를 개발하고, 상기 신규 폴리펩티드가 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 대한 특이성과 결합력이 매우 높으며 기존에 개발된 도메인 4에 결합하는 항체(trastuzumab)와의 결합 위치가 겹치는 것을 확인하였고, 세포막에 발현되어 있는 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과도 특이적으로 결합하는 것을 확인하였으며, 기존의 개발된 항체와 유사한 암세포 증식 억제 효능을 보이는 것을 통해 이합체 형성을 억제할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [8]
- [9] **발명의 요약**
- [10] 본 발명의 목적은 계산생물학적인 방법과 라이브러리 기반 모듈 증대 방법을 접목하여 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 결합하는 리피바디(Repebody)를 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 상기 리피바디를 코딩하는 뉴클레오티드 및 상기 뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 제공하는데 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 뉴클레오티드 또는 제조합 벡터가 도입된 제조합 미생물을 제공하는데 있다.
- [13] 본 발명이 또 다른 목적은 상기 제조합 미생물을 이용한 리피바디의 제조방법을 제공하는데 있다.

- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 리피바디를 유효성분으로 함유하는 암 치료용 조성물을 제공하는데 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 리피바디를 유효성분으로 함유하는 암 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 선택적으로 결합하는 리피바디(repebody)를 제공한다.
- [17] 본 발명은 또한, 상기 리피바디를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [18] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터를 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 제조합 벡터가 도입되어 있는 제조합 미생물을 제공한다.
- [20] 본 발명은 또한, (i) 상기 제조합 미생물을 배양하여 리피바디를 생성시키는 단계; 및 (ii) 상기 생성된 리피바디를 회수하는 단계를 포함하는, 상기 리피바디의 제조방법을 제공한다.
- [21] 본 발명은 또한, 상기 리피바디를 유효성분으로 함유하는 암 치료용 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명은 또한, 상기 리피바디를 유효성분으로 함유하는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, 상기 리피바디를 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료방법을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, 암의 치료 또는 예방을 위한 상기 리피바디의 용도를 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, 암의 치료용 약제 제조를 위한 상기 리피바디의 사용을 제공한다.

[26]

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 본 발명에서 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 결합하도록 계산생물학적으로 설계된 리피바디 중 결합에너지차이 값($\Delta\Delta G$)이 가장 높은 순으로 선별된 후보군들을 나타내는 도면이다.
- [28] 도 2는 선별된 리피바디 후보군들과 결합위치가 알려진 기존의 항체(trastuzumab)와의 표적에 대한 경쟁 여부를 확인한 효소 결합 면역침강 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)의 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 3은 기존 항체와의 표적에 대한 경쟁이 가장 큰 후보 리피바디 Rb-H0에 대하여 계산생물학적으로 예측된 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과의 결합 구조 모델을 나타내는 도면이다.
- [30] 도 4는 선별된 리피바디 초기후보의 결합 증대를 위해 예측된 결합 구조를 기반으로 선별한 아미노산에 대하여 구축한 무작위적인 라이브러리의 전체 구조를 나타내는 개략도이다.

- [31] 도 5는 파지 디스플레이 방법으로 결합력이 증대된 리피바디의 결합력 변화를 효소 결합 면역 침강 분석법(ELISA)으로 측정한 결과를 나타내는 도면이다.
- [32] 도 6은 본 발명에서 개발된 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 특이적으로 결합하는 리피바디의 결합력을 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance, SPR)으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [33] 도 7은 선별된 리피바디 클론들이 기존 항체와 표적 단백질에 대한 경쟁을 유지하고 있는 것을 결합력 변화로 확인하기 위하여, 효소 결합 면역 침강 분석법(ELISA)으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [34] 도 8은 본 발명에 따른 리피바디와 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과의 결합이 매우 안정적인 것을 확인한 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography)결과를 나타낸 것이다.
- [35] 도 9는 본 발명에 따른 리피바디가 인간 상피세포 증식인자 수용체 단백질 죽을 이루는 수용체들 중에서 2형에만 특이적으로 결합하는 것을 면역 침강 분석법(ELISA)으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [36] 도 10은 본 발명에서 개발된 Rb-H2 리피바디를 형광물질(Fluorescein isothiocyanate, FITC)로 표지하여 암세포 표면에 발현된 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과 특이적으로 결합하며 세포 표면의 발현 정도에 따라 다른 형광세기를 나타냄을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [37] 도 11은 본 발명에 따른 Rb-H2 리피바디와 기존에 개발된 항체(trastuzumab)를 각각 암세포에 처리하여, 암세포 증식 억제 효능을 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[38]

[39] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**

[40] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[41] 본 발명에서는 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 계산생물학적 방법과 라이브러리 기반 파지 디스플레이 방법을 접목해 신규 폴리펩티드를 개발하고, 상기 신규 폴리펩티드의 결합 특성과 암세포 증식 억제 능력을 확인하였다.

[42] 본 발명에서는, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 리피바디를 개발하기 위하여, 계산생물학적 방법을 이용해 적합한 후보군들을 설계하였다. 또한 후보군들 중에서 실험을 통해 도메인 4에 결합하는 것이 알려진 항체와 표적에 대해 경쟁을 하는 후보 리피바디를 선정한 후, 이 리피바디의 결합력 증대를 위해 라이브러리에 포함된 폴리펩티드를 파지미드를 이용한 바이오패닝을 통해 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 대한 결합력을 증대시키는 작업을 수행하였다. 그 결과, 인간 상피세포 증식인자

수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 높은 결합력을 가지는 폴리펩티드를 개발하였다.

- [43] 본 발명의 실시 예에서는 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 폴리펩티드를 개발하기 위하여, 인터날린 B (Internalin B) 단백질의 N-말단, 컨센서스 디자인(consensus design)으로 최적화된 LRR (Leucine-rich repeat) 모듈이 융합된, 폴리펩티드의 구조적으로 오목(concave)한 지역을 계산생물학적 방법으로 목표로 하는 위치에 결합이 가능한 후보들을 설계하고 이들 후보 중 원하는 위치에 결합하는 폴리펩티드를 실험적 방법으로 선별한 후 결합력 증대를 위해 무작위 라이브러리를 구축하였다.
- [44] 또한, 상기 라이브러리는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 파지미드의 형태가 될 수 있다.
- [45] 본 발명의 용어 "파지미드"란, 대장균을 숙주로 하는 바이러스인 파지로부터 유래된 원형의 폴리뉴클레오티드 분자를 의미하는데, 번식과 증식에 필요한 단백질 및 표면 단백질들의 서열이 포함되어 있다. 제조합 파지미드는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 제조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 파지미드는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 분비를 위한 신호서열 또는 리더서열을 포함할 수 있고, 주로 원하는 단백질을 파지의 표면 단백질과 융합하여 파지 표면에 표지하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 파지미드의 프로모터는 주로 유도성이며, 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수도 있다.
- [46] 본 발명에서 상기 파지미드는 상기 라이브러리를 구성하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현 및 분비하기 위한 신호서열 또는 리더서열인 MalEss, DsbAss 또는 PelBss를 포함하고, 파지의 표면에 제조합 단백질의 발현을 확인하기 위한 히스티딘-태그와 파지 표면으로의 발현을 위한 M13 파지의 표면 단백질의 일종인 gp3 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명자의 선행특허 (대한민국 등록특허 제1,356,075호)에 기술된 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [47] 본 발명자들은 상기 파지미드를 포함하는 선행특허 (대한민국 등록특허 제1,356,075호)의 서열번호 1에 해당하는 리피바디를 이용한 계산생물학적 방법을 사용하여 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 결합할 수 있는 리피바디 후보군들을 설계하고 이 중 결합에너지차이 값을 기준으로 상위 10개의 신규한 폴리펩티드 후보(서열번호 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)를 선별하였다.
- [48] 이후, 기존에 도메인 4에 결합한다고 알려진 항체(trastuzumab)와의 표적에

대한 경쟁 여부를 확인하여 결합위치가 trastuzumab과 겹치는 후보 폴리펩티드(서열번호 6)를 선정하였다. 이 후보의 결합력을 증대시키기 위하여, 예측된 결합구조를 기반으로 선정된 7개의 아미노산에 대한 위치지정 돌연변이(site directed mutagenesis, 서열번호 12)를 수행한 결과 결합력이 증대된 신규 폴리펩티드(서열번호 13)를 선별하였다. 추가적으로 선정된 7개의 아미노산에 위치지정 돌연변이(site directed mutagenesis, 서열번호 14)를 수행하여 결합력이 더욱 증대된 신규한 폴리펩티드(서열번호 1)를 선별하였고, 그 결합력이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[49] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4의 특정 부위에 선택적으로 결합하는 리피바디(repebody)에 관한 것이다.

[50] 본 발명의 용어 "리피바디(Repebody)"란, LRR 구조를 갖는 인터날린의 N-말단과 컨센서스 디자인(consensus design)으로 최적화된 LRR (Leucine-rich repeat) 모듈로 구성된 폴리펩티드이다. 리피바디 단백질은 구조상 오목한 지역(concave)과 볼록한 지역(convex)으로 나누어질 수 있다 (도 4). 여기서 오목한 지역은 서열의 다양성이 높으며 단백질 상호작용에 중요한 부위로 알려져 있다. 이와 반대로 볼록한 지역은 보존성이 높은 서열을 바탕으로 단백질의 전체구조를 안정하게 유지하는 역할을 수행한다. 리피바디 단백질은 반복 모듈을 갖는 LRR 패밀리에 속하는 모든 단백질을 상기 방법으로 수용성 발현 및 단백질의 생물리화학적 성질을 향상시킨 융합 LRR 패밀리 단백질을 모두 포함할 수 있다.

[51] 본 발명에서 용어 "LRR(Leucine Rich Repeat) 단백질"이란, 루이신이 일정한 위치에 반복되는 모듈의 조합으로 이루어진 단백질을 의미하는 것으로, (i) 하나 이상의 LRR 반복 모듈을 갖고 있고, (ii) 상기 LRR 반복 모듈은 20 내지 30개의 아미노산으로 이루어져 있고, (iii) LRR 반복 모듈은 보존 패턴으로 "LxxLxxLxLxxN"을 갖고 있으며, 여기서 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 및 트립토판과 같은 소수성 아미노산을, N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌을, x는 임의의 아미노산을 의미하며, (iv) LRR 패밀리 단백질은 말발굽과 같은 삼차원 구조를 갖고 있는 단백질을 의미한다.

[52] 본 발명의 LRR 패밀리 단백질은 이미 그 서열이 알려져 있거나, 생체 내에서 새로 유도된 mRNA나 cDNA를 이용하여 찾아낸 것과 더불어 컨센서스 디자인(consensus design) 등의 설계를 통하여 자연계에 알려지지 않은 서열을 가지면서 반복모듈의 골격 구조가 있는 변이체를 모두 포함할 수 있다.

[53] 본 발명에서 용어 "인터날린 B 단백질"이란, 리스테리아(Listeria) 균주에서 발현되는 LRR 패밀리 단백질의 일종으로, 다른 소수성 코어가 전 분자에 걸쳐서 일정하게 분포되어 있는 다른 LRR 패밀리 단백질들과는 상이한 N-말단 구조를 가지고 있어 미생물에서도 안정적으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 이러한

인터날린 단백질의 N-말단은 반복 모듈의 접힘(folding)에 가장 중요한 N-말단 부위가 미생물 유래일 뿐만 아니라 그 형태가 알파 나선을 포함하는 안정적인 모양을 가졌기에 미생물에서 LRR 패밀리 단백질들의 안정적인 발현을 위하여 효과적으로 사용될 수 있다.

- [54] 본 발명에서 용어, "인터날린 단백질의 N-말단"은 단백질의 수용성 발현 및 접힘에 있어서 필요한 인터날린 단백질의 N-말단을 의미하며 알파 나선형 캡핑 모티프(capping motif) 및 인터날린 단백질의 반복 모듈을 의미한다. 인터날린 단백질의 N-말단은 단백질의 수용성 발현 및 접힘에 있어서 필요한 인터날린 단백질의 N-말단을 제한없이 포함하며, 그 예로 알파 나선형 캡핑 모티프인 "ETITVSTPIKQIFPDDAFAETIKANLKKKSVTDVAVTQNE" 및 반복 모듈을 포함할 수 있다. 또한 반복 모듈 패턴은 "LxxLxxLxLxxN"을 포함할 수 있다. 반복 모듈 패턴 중 L은 알라닌, 글리신, 페닐알라닌, 티로신, 루이신, 이소루이신, 발린 또는 트립토판; N은 아스파라진, 글루타민, 세린, 시스테인 또는 트레오닌, x는 임의의 친수성 아미노산을 의미한다. 인터날린 단백질의 N-말단은 융합될 수 있는 LRR 패밀리 단백질의 종류에 따라 높은 구조 유사도를 갖는 N-말단이 선택될 수 있으며 결합 에너지 등의 계산을 통해 가장 안정적인 아미노산을 선택하여 해당 모듈의 아미노산의 변이가 가능하다.
- [55] 본 발명의 용어, "인간 상피세포 증식인자 수용체 2형"은 암세포 표면에 과발현되는 단백질로, 리간드(ligand)가 없는 대신 자신(homo) 혹은 인간 상피세포 증식인자 수용체 단백질 속에 속한 다른 수용체들과 이종 이합체(hetero-dimer)를 형성하여 암세포의 분화와 증식을 촉진시킨다. 따라서, 이들 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형이 과발현되는 암세포의 성장을 억제하기 위해서는 이합체 형성에 관여하는 도메인을 표적으로 하여 이합체 형성을 방해하여야 한다. 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 세포막 밖 부분은 총 4개의 단백질 도메인으로 이루어져 있으며, 이중 도메인 2와 4가 이합체 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [56] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 리피바디를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 재조합 미생물에 관한 것이다.
- [57] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 될 수 있고, 상기 폴리뉴클레오티드와 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가지는 염기 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [58] 본 발명의 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열,

및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질 전환된 후, 숙주 계놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계놈 그 자체에 통합될 수 있다.

- [59] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당 업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pET-21a, pET-32a, pcDNA3.1 벡터 등을 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 pET-21a, pET-32a, pcDNA3.1 벡터를 사용할 수 있다.

- [60] 본 발명의 용어 "재조합 미생물"이란, 하나 이상의 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 갖는 벡터가 숙주세포에 도입되어 목적 단백질을 발현시키도록 형질이 감염된 세포를 의미하며, 진핵세포, 원핵세포 등의 모든 세포가 될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류 세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우 멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 숙주세포는 특별히 제한되는 것이 아니나, 바람직하게는 대장균을 숙주 세포로 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 대장균 BL21(DE3), OrigamiB(DE3)를 숙주 세포로 사용할 수 있다.

- [61] 본 발명에서 용어 "형질전환"이란, 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주 세포 내에 도입하여 숙주 세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질 전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내에 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하든지 상관없이 이들 모두를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는, 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트 (Expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결 신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함한다. 상기 발현 카세트는

자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어, 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있다.

- [62] 본 발명은 또 다른 관점에서, (i) 상기 재조합 미생물을 배양하여 리피바디를 생성시키는 단계; 및 (ii) 상기 생성된 리피바디를 회수하는 단계를 포함하는 리피바디의 생산 방법에 관한 것이다.
- [63] 상기 방법에 있어서, 상기 재조합 미생물을 배양하는 단계는 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행됨이 바람직하고, 배양조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 혐기성 화합물(예: 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 암모니아) 또는 산성 화합물(예: 인산 또는 황산)을 사용하여 적정 pH(pH 5 내지 9, 바람직하게는 pH 6 내지 8, 가장 바람직하게는 pH 6.8)를 조절할 수 있고, 산소 또는 산소-함유 가스 혼합물을 배양물에 도입시켜 호기성 조건을 유지할 수 있으며, 배양온도는 20 내지 45°C, 바람직하게는 25 내지 40°C를 유지할 수 있고, 약 10 내지 160 시간동안 배양하는 것이 바람직하다. 상기 배양에 의하여 생산된 상기 폴리펩티드는 배지로 분리되거나 세포 내에 잔류할 수 있다.
- [64] 아울러, 사용되는 배양용 배지는 탄소 공급원으로는 당 및 탄수화물(예: 글루코오스, 슈크로오스, 락토오스, 프럭토오스, 말토오스, 몰라세, 전분 및 셀룰로오스), 유지 및 지방(예: 대두유, 해바라기씨유, 땅콩유 및 코코넛유), 지방산(예: 팔미트산, 스테아르산 및 리놀레산), 알콜(예: 글리세롤 및 에탄올) 및 유기산(예: 아세트산) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 질소 공급원으로는 질소-함유 유기 화합물(예: 펩톤, 효모 추출액, 육즙, 맥아 추출액, 옥수수 침지액, 대두 박분 및 우레아), 또는 무기 화합물(예: 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄) 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있으며; 인 공급원으로서 인산 이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 이에 상응하는 나트륨 함유 염 등을 개별적으로 사용하거나 또는 혼합하여 사용할 수 있고; 기타 금속염(예: 황산마그네슘 또는 황산철), 아미노산 및 비타민과 같은 필수성장-촉진 물질을 포함할 수 있다.
- [65] 본 발명의 상기 배양 단계에서 생산된 폴리펩티드를 회수하는 방법은 배양방법, 예를 들어 회분식, 연속식 또는 유가식 배양 방법 등에 따라 당해 분야에 공지된 적합한 방법을 이용하여 배양액으로부터 목적하는 리피바디를 회수할 수 있다.
- [66] 한편, 본 발명의 리피바디를 이용할 경우, 기존의 항체를 대체하여 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형이 과발현되는 암세포의 치료에 사용할 수 있다.
- [67] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 리피바디를 유효성분으로 함유하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [68] 또한, 본 발명의 리피바디를 이용할 경우, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형이 과발현되는 암세포를 진단할 수 있다.

- [69] 본 발명의 일 양태에서는 본 발명에 따른 Rb-H2 리피바디와 양성대조군인 trastuzumab를 암세포(Sk-Br3, Sk-Ov3 및 MCF-7)에 처리하고, 암세포의 성장 억제능을 확인하였고, 그 결과, Rb-H2 리피바디가 trastuzumab과 유사한 암세포 성장 억제 능력을 가지고 있음을 확인하였으며(도 11), 이를 통해 Rb-H2 리피바디가 trastuzumab과 유사하게 이합체 형성을 방해하여 암세포 증식을 억제하는 것을 확인하였다.
- [70] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 리피바디를 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료방법에 관한 것이다.
- [71] 본 발명은 또 다른 관점에서, 암의 치료 또는 예방을 위한 상기 리피바디의 용도에 관한 것이다.
- [72] 본 발명은 또 다른 관점에서, 암의 치료용 약제 제조를 위한 상기 리피바디의 사용에 관한 것이다.
- [73] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 리피바디를 유효성분으로 함유하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [74] 본 발명에서 상기 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형이 과발현되는 암은 유방암, 대장암, 난소암, 위암 등이 있어 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [75] 상기 방법에 있어서, 상기 리피바디를 형광물질 혹은 방사성 동위원소로 표시한 후 체내에 주입하여 형광 혹은 방사성 동위원소를 측정함으로써 암세포를 진단할 수 있다.
- [76] 본 발명에서 상기 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형이 과발현되는 암은 유방암, 대장암, 난소암, 위암 등이 있어 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [77] 본 발명의 일 양태에서는 형광물질인 FITC로 표시한 Rb-H2 리피바디를 암세포(Sk-Br3, Sk-Ov3 및 MCF-7)에 처리한 후, 공초점주사현미경(confocal microscopy)을 이용해 형광을 띠는 세포의 사진을 확인한 결과, HER2가 강하게 발현되는 Sk-Br3 세포에는 매우 강한 형광이 관측되었고, 중간 정도의 HER2가 발현되는 Sk-Ov3 세포에서는 그 보다는 낮은 중간정도의 형광이 확인되었으며, HER2 발현이 낮은 MCF-7 세포에서는 매우 낮은 형광이 관찰되었다. 이를 통해 본 발명에 따른 Rb-H2 리피바디가 암세포 표면에 발현된 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였으며(도 10), 이를 통해 본 발명에 따른 리피바디가 암의 진단에 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [78]
- [79] [실시예]
- [80] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [81]
- [82] 실시예 1: 계산생물학적 방법을 이용한 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의

도메인 4에 특이적으로 결합하는 리피바디 후보 선별

- [83] 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 리피바디를 개발하기 위하여, 서열번호 2의 리피바디 구조를 이용하여 계산생물학적 방법(ClusPro webserver)으로 얻어진 후보들 중 결합에너지차이 값을 기반으로 상위 10개의 후보를 선별하였다(도 1). 10개의 후보들을 각각 발현한 후, 도메인 4에 결합한다고 알려진 항체인 trastuzumab (Roach, 서울, 한국)과 표적에 대한 경쟁 여부를 HRP가 결합된 c-Myc 항체(Santa Cruz Biotechnology, TX, 미국)를 이용하여 확인하였고 최종 후보(Rb-H0)를 선별하였다(도 2).

[84]

- [85] 실시예 2: 리피바디의 결합력 증가를 위한 모듈 기반 라이브러리 제작

- [86] 결합력이 증대된 리피바디를 확보하기 위해 선행특허 (대한민국 등록특허 제1,356,075호)에서 구축한 모듈 기반 친화력 증대 기술을 사용하였다. 우선, 실시예 1에서 선별한 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 결합하는 Rb-H0 리피바디의 결합구조를 계산생물학적 방법으로 예측하였다. 예측된 구조를 기반으로, 표적과 가장 인접한 모듈들(LRRV3,4)에 위치한 7개의 아미노산을 선택하여 돌연변이를 주었다. 상기 선택한 아미노산을 NNK 동의코돈(degenerate codon)으로 치환하도록, 라이브러리 구축을 위한 돌연변이 유발 프라이머 (mutagenic primer)를 합성하였다.

- [87] 이어, 상기 프라이머들을 이용하여 두 모듈에 대한 겹침 중합효소 연쇄 반응(overlap PCR)을 수행하며 라이브러리 DNA를 수득하고, 본 발명자의 선행특허 (대한민국 등록특허 제1,356,075호)에 기술된 서열번호 3의 파지미드 pBEL118N에 삽입하여 최종적인 라이브러리 파지미드를 확보하였다.

- [88] 상기 확보된 라이브러리를 전기천공법(electroporation)으로 대장균 TG-1에 도입하여 형질 전환체를 수득함으로써, 1.2×10^9 수준의 다양성을 갖는 라이브러리를 구축하였다. 총 다섯 번의 패닝 과정을 거쳐 결합력이 증대된 리피바디(Rb-H1, 서열번호 13)를 확보하였다.

- [89] 추가로 결합력을 증가시키기 위해 Rb-H1의 결합구조를 계산생물학적 방법으로 예측하였고, 이를 기반으로 모듈들(LRR1, LRRV1, LRRV2)에 위치한 7개의 아미노산을 선택하여 위와 같은 방식으로 돌연변이를 주었다. 총 다섯 번의 패닝 과정을 거쳐 결합력이 증대된 리피바디(Rb-H2, 서열번호 14)를 확보하였다.

[90]

- [91] 실시예 3: 리피바디 라이브러리의 패닝 과정을 통한 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 대한 결합력 증대

- [92] 실시예 2에서 구축한 라이브러리를 사용하여 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 선별하여 정제하였다. 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 대한 결합력을 증가시키기 위하여, biotinylation된 인간

상피세포 증식인자 수용체 2형의 세포막 외부 도메인을 streptavidin으로 표지된 Dynabead 10 μ L에 4 μ g/mL의 농도로 가하고, 4 °C에서 2시간 동안 코팅하였다. 상기 코팅된 Dynabead를 PBS로 3회 세척하고, 1% BSA와 0.05 % Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBSA)으로 4 °C에서 2시간동안 블로킹(Blocking)하였다. 그와 동시에, 상기 정제된 파지를 10¹² cfu/ml의 농도로 그리고 정제된 Rb-H0 혹은 Rb-H1 리피바디를 1 μ M의 농도로 1% BSA와 0.05 % Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBSA)에 희석한 후 Dynabead 40 μ L에 가하여 4 °C에서 2시간 동안 negative selection을 진행시켰다. 이후 자석을 이용해 파지와 Dynabead를 분리시킨 후 파지용액을 상기 코팅된 Dynabead와 섞은 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBS)으로 1분간 총 5번 세척하고 PBS 용액으로 1분간 한번 세척을 하였다. 마지막으로, 1 mL 0.2 M Glycine-HCl(pH 2.2)를 가하고, 상온에서 10분간 반응시킴으로써, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과의 결합력 증가된 리피바디 후보를 표면에 발현시킨 파지를 용출시켰다. 상기 용출액에 100 μ L의 1.0 M Tris-HCl (pH 9.0)를 가하여 중화시키고, 숙주세포인 대장균 TG-1의 배양액 15 mL(OD₆₀₀ = 0.5)에 가한 다음, 2xYT 플레이트에 도말하는 바이오패닝(Bio-panning) 과정을 동일하게 5회 반복하여 수행하였다.

- [93] 그 결과, 각 패닝 과정을 통해 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과의 결합력이 증가한 파지가 농축된 것을 확인하였다. 상기 결과는 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과 결합하는 라이브러리 파지가 특이적으로 증가하는 것을 통해 확인하였다.
- [94]
- [95] 실시예 4: 선별된 파지가 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 대한 결합 여부 확인 및 서열 분석
- [96] 실시예 3의 방법을 통하여 선별한 파지를 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과 Bovine serum albumin(BSA)가 코팅된 96-웰 플레이트를 이용하여 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 수행하였다. 각 파지 100 μ L를 1% BSA와 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBSA) 100 μ L 섞은 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 또한 각 웰을 1% BSA와 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 용액(TPBSA)로 블로킹(blocking)을 진행하였다. 그 후 파지 100 μ L를 각 웰에 넣은 후 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TPBS로 5번 세척하였다. M13파지에 대한 항체에 HRP가 연결된 것을 이용하여 흡광도(OD₄₅₀)를 측정하였다. BSA 대비 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형을 코팅한 웰의 흡광도(OD₄₅₀)가 가장 높은 리피바디 후보들을 선별하고, 이들 각각의 아미노산 서열을 확인한 결과, 시스테인이 삽입된 파지를 제외한 후 한 종류의 리피바디 파지(Rb-H1)를 선별하였다(서열번호 13).
- [97] 실시예 2의 방법으로 Rb-H1을 기반으로 라이브러리를 제작한 후 실시예 3의 방법과 상기 방법을 추가적으로 수행하여 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에

대한 결합력이 더 증대된 리피바디 파지(Rb-H2)를 선별하였다(서열번호 14).

[98]

[99] 실시예 5: 선별된 리피바디들의 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형과의 결합력 확인

[100] 선별된 Rb-H0, Rb-H1, Rb-H2 리피바디를 이용하여 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 결합력을 확인하는 실험을 수행하였다. 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 세포막 외부 도메인을 96-웰 플레이트의 각 웰에 10 µg/mL으로 100µL씩 처리해 준다. 4°C에서 12시간 동안 코팅해준 후에 단백질이 붙지 않은 나머지 구역을 1% BSA와 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 용액 (TPBSA)를 처리하여 블로킹(blocking)과정을 상온에서 1시간 동안 수행하였다. 그 후 Rb-H0, Rb-H1, Rb-H2 리피바디를 1 µM를 시작으로 1/3씩 희석한 농도를 100 µL씩 각 웰에 처리해 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 다음에 TPBS로 5번 세척하였다. 리피바디를 잡을 수 있는 항체에 바이오틴(biotin)이 연결되어있는 것을 각 웰에 1 µg/mL으로 100 µL씩 처리해 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 다음에 TPBS로 5번 세척하였다. 그 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 streptavidin 를 처리한 후 다시 한 시간 동안 상온에서 반응시킨다. TPBS로 5번 세척한 후에 PBS로 3번 다시 세척한 후 HRP의 기질인 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)를 첨가하여 발색 반응을 진행한 후 1N H2SO4를 처리하여 발색 반응을 멈췄다. 그리고 발광 측정 장치를 통해 발광 정도(OD₄₅₀)를 측정하였다. 그 결과, Rb-H2의 결합력이 가장 높은 것을 확인하였다(도 5). Trastuzumab의 결합력은 인간 Fc에 대한 항체에 HRP가 연결된 것을 이용하여 확인하였다. 표면 플라즈몬 공명(SPR)(Biacore 3000 system, GE Healthcare)를 통해 해리상수를 측정한 결과 56 nM 수준의 가장 높은 결합력을 가지는 Rb-H2 리피바디를 확보하였다(서열번호 14, 도 6).

[101]

[102] 실시예 6: 선별된 리피바디들의 기존 항체와의 표적에 대한 경쟁 능력 확인

[103] 선별된 Rb-H0, Rb-H1, Rb-H2 리피바디가 trastuzumab과 표적에 대한 경쟁을 유지하고 있는지를 확인하는 실험을 수행하였다. 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 세포막 외부 도메인(Sino Biological, 중국)을 96-웰 플레이트의 각 웰에 10 µg/mL으로 100µL씩 처리해 주었다. 4°C에서 12시간 동안 코팅해준 후에 단백질이 붙지 않은 나머지 구역을 1% BSA와 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 용액 (TPBSA)를 처리하여 블로킹 (blocking)과정을 상온에서 1시간 동안 수행하였다. 그 후 Rb-H0, Rb-H1, Rb-H2 리피바디를 단독으로 10 µg/mL 혹은 trastuzumab 100 µg/mL과 같이 섞어서 100 µL씩 각 웰에 처리해 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 다음에 TPBS로 5번 세척하였다. 리피바디를 잡을 수 있는 항체에 바이오틴(biotin)이 연결되어있는 것을 각 웰에 1 µg/mL으로 100 µL씩 처리해 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 다음에 TPBS로 5번 세척하였다. 그 후 streptavidin-horseradish peroxidase(HRP)를 처리한 후 다시 한 시간 동안 상온에서

반응시킨다. TPBS로 5번 세척한 후에 PBS로 3번 다시 세척한 후 HRP의 기질인 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)를 첨가하여 발색 반응을 진행한 후 1N H₂SO₄를 처리하여 발색 반응을 멈췄다. 그리고 발광 측정 장치를 통해 흡광도(OD450)를 측정하였다. 그 결과, Rb-H0, Rb-H1, Rb-H2 모두 trastuzumab으로 인한 흡광도 감소가 나타난 것을 통해 도메인 4를 모두 타겟하고 있는 것을 확인하였다(도 7).

[104]

[105] 실시예 7: 선별된 리피바디의 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 대한 안정된 결합 능력 확인

[106] 선별된 Rb-H2 리피바디와 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 결합체가 안정적으로 결합력을 유지하고 있는지 확인하는 실험을 수행하였다. 리피바디와 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 세포막 외부 도메인을 1:5의 비율로 섞어 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)(GE Healthcare, Sweden)를 수행한 결과 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 세포막 외부 도메인이 리피바디 함께 같은 peak에서 나오는 것을 확인하였다 (도 8).

[107]

[108] 실시예 8: 선별된 리피바디의 인간 상피세포 증식인자 수용체 단백질 족에 대한 구별 능력 확인

[109] 인간 상피세포 증식인자 수용체 단백질 족에는 총 4개의 수용체가 있고 이들은 비슷한 구조를 공유하고 있기 때문에 선별된 리피바디가 2형에 특이적으로 결합할 수 있는지 확인하였다. 인간 상피세포 증식인자 수용체 1, 2, 3, 4형(Sino Biological, 북경, 중국)의 세포막 외부 도메인을 96-웰 플레이트의 각 웰에 10 µg/mL으로 100µL씩 처리해 준다. 4°C에서 12시간 동안 코팅해준 후에 단백질이 붙지 않은 나머지 구역을 1% BSA와 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 용액 (TPBSA)를 처리하여 블로킹 (blocking)과정을 상온에서 1시간 동안 수행하였다. 그 후 Rb-H2 리피바디를 10 µg/mL로 100 µL씩 각 웰에 처리해 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 다음에 TPBS로 5번 세척하였다. 리피바디를 잡을 수 있는 항체에 바이오틴(biotin)이 연결되어있는 것을 각 웰에 1 µg/mL으로 100 µL씩 처리해 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 다음에 TPBS로 5번 세척하였다. 그 후 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 streptavidin을 처리한 후 다시 한 시간 동안 상온에서 반응시킨다. TPBS로 5번 세척한 후에 PBS로 3번 다시 세척한 HRP 기질인 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)를 첨가하여 발색 반응을 진행한 후 1N H₂SO₄를 처리하여 발색 반응을 멈췄다. 그리고 발광 측정 장치를 통해 발광 정도(OD450)를 측정하였다. 그 결과, Rb-H2는 2형에만 결합하는 것을 확인하였다(도 9).

[110]

[111] 실시예 9: 선별된 리피바디의 암세포 표면에 발현된 인간 상피세포 증식인자

수용체 2형에 대한 결합 능력 확인

[112] 선별된 Rb-H2 리피바디가 암세포 표면에 발현된 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 대한 결합 능력을 확인하고자 형광물질인 FITC로 표지 하였다. 그 후 각 암세포를 8-웰 슬라이드글라스에 키운 후 FITC가 표지 된 Rb-H2를 1 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하고 37 °C, 5% CO₂ 챔버에서 30분간 반응시킨 후 DPBS로 5번 세척을 진행하였다. 암세포는 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형이 가장 많이 발현된 Sk-Br3(ATCC, VA, 미국; 인간 유방암 세포), 중간 수준인 Sk-Ov3(ATCC, VA, 미국; 인간 난소암 세포), 가장 낮은 수준인 MCF-7(ATCC, VA, 미국; 인간 유방암 세포)의 3가지 종류를 사용하였다. 공초점주사현미경(confocal microscopy)을 이용해 형광을 띠는 세포의 사진을 찍었다.

[113] 그 결과, Sk-Br3 세포에는 매우 강한 형광이 관측되었고 Sk-Ov3 세포에서는 그 보다는 낮은 중간정도의 형광이, MCF-7 세포에서는 매우 낮은 형광이 관찰되었다. 이를 통해 선별된 Rb-H2 리피바디가 암세포 표면에 발현된 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다 (도 10).

[114]

[115] 실시예 10: 선별된 리피바디의 암세포 성장 억제 능력 확인

[116] 실시예 9에 사용된 암세포(Sk-Br3, Sk-Ov3 및 MCF-7)에 대한 선별된 Rb-H2 리피바디의 증식 억제 능력을 확인하였다. 비교군으로 trastuzumab을 사용하였다. 96-웰 플레이트(well plate)에 각 암세포를 키운 후 Rb-H2 리피바디 혹은 trastuzumab을 1 μM 농도를 시작으로 1/10씩 희석하여 각 웰에 제공하였다. 그 결과, Rb-H2 리피바디가 trastuzumab과 유사한 암세포 성장 억제 능력을 가지고 있음을 확인하였다 (도 11). 또한 이를 통해 Rb-H2 리피바디가 trastuzumab과 같이 이합체 형성 방해를 통해 암세포 증식을 억제하는 것을 확인하였다.

[117]

산업상 이용가능성

[118] 본 발명에 따른 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 신규 폴리펩티드는 기존의 암 치료용 항체를 대체하여 암 치료 용도뿐만이 아니라 형광 혹은 방사성 물질을 표지하여 특정 암의 진단용으로도 사용이 가능하다.

[119]

[120] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[121]

서열목록 Free Text

[122] 전자파일 첨부하였음.

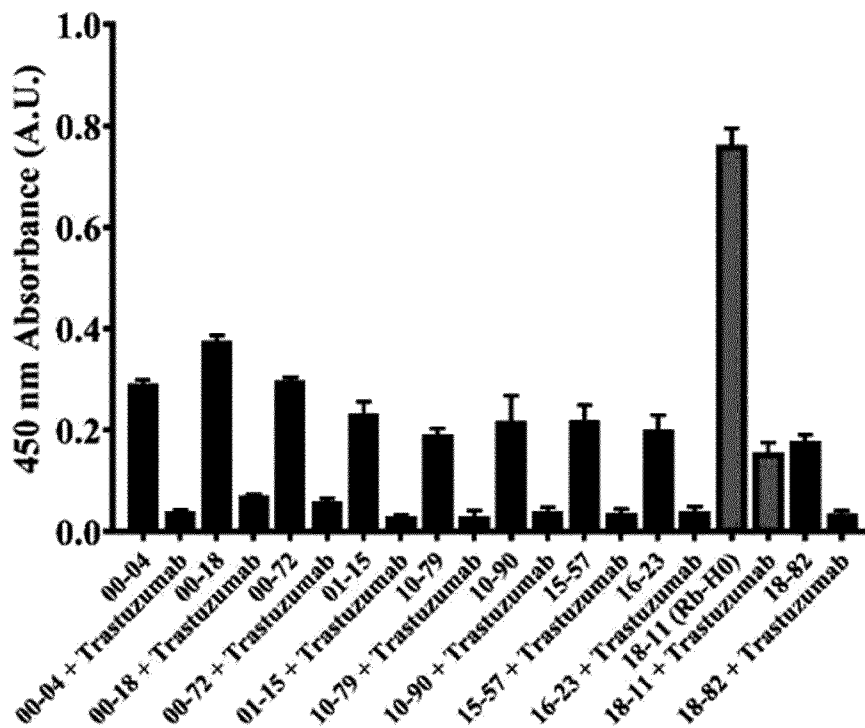
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 리피바디(repebody).
- [청구항 2] 제1항의 리피바디를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 3] 제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 4] 제2항의 폴리뉴클레오티드 또는 제3항의 재조합 벡터가 도입되어 있는 재조합 미생물.
- [청구항 5] 다음 단계를 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고, 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 리피바디의 제조방법:
(i) 제4항의 재조합 미생물을 배양하여 리피바디를 생성시키는 단계; 및
(ii) 상기 생성된 리피바디를 회수하는 단계.
- [청구항 6] 제1항의 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 리피바디를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 7] 제1항의 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형의 도메인 4에 특이적으로 결합하는 리피바디를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물.

[도1]

Model#	Energy
HER2_D4.10_0090	-734.955
HER2_D4.18_0082	-734.93
HER2_D4.00_0072	-734.351
HER2_D4.15_0057	-734.001
HER2_D4.18_0011	-733.642
HER2_D4.01_0018	-733.219
HER2_D4.16_0023	-732.401
HER2_D4.00_0004	-732.274
HER2_D4.01_0015	-731.852
HER2_D4.10_0079	-731.669
HER2_D4.16_0070	-731.648
HER2_D4.01_0089	-731.385
HER2_D4.16_0060	-731.33
HER2_D4.15_0004	-731.206
HER2_D4.16_0024	-730.981
HER2_D4.00_0050	-730.809
HER2_D4.01_0006	-730.712
HER2_D4.16_0039	-730.329

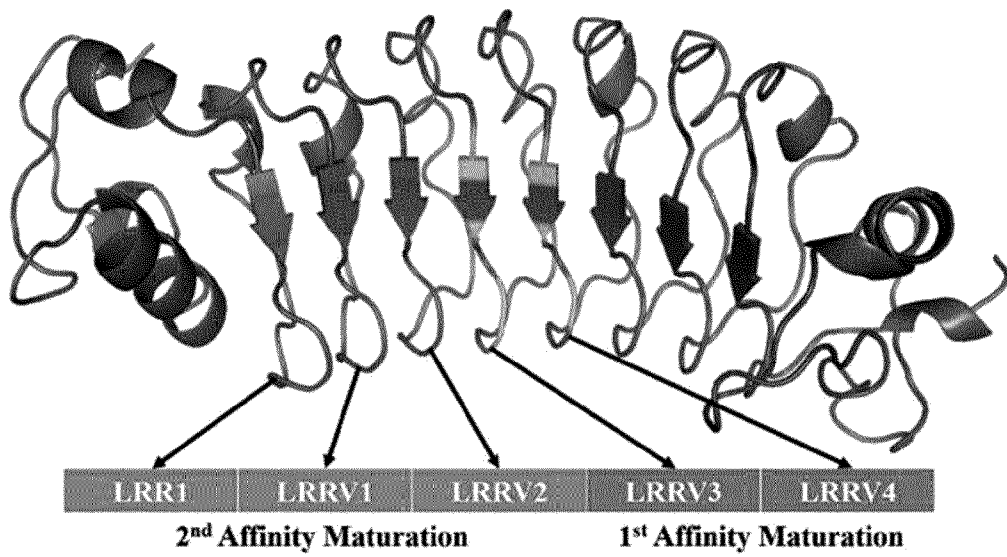
[도2]



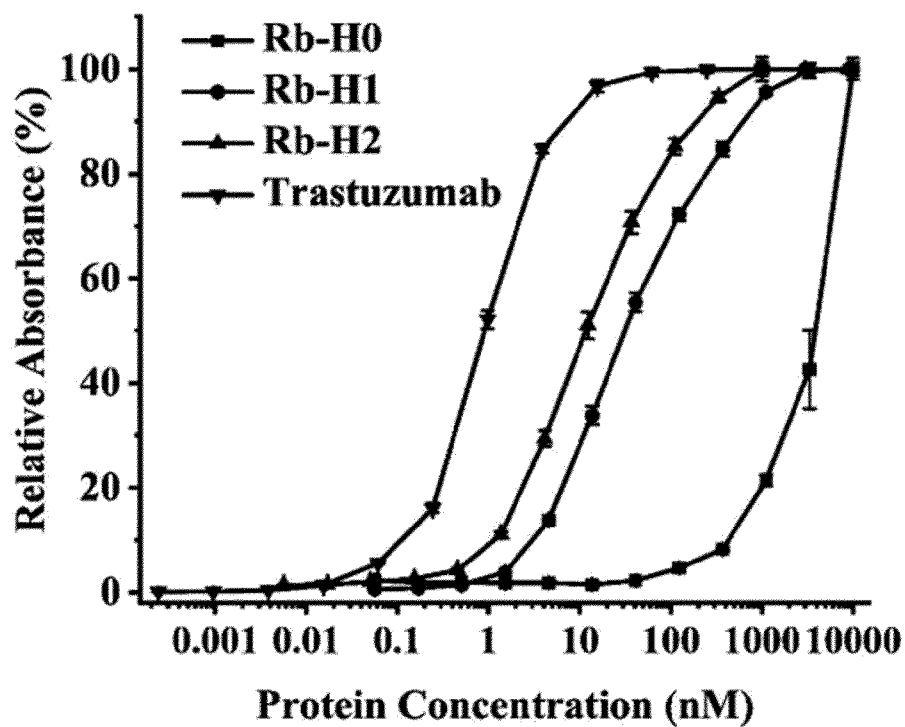
[도3]



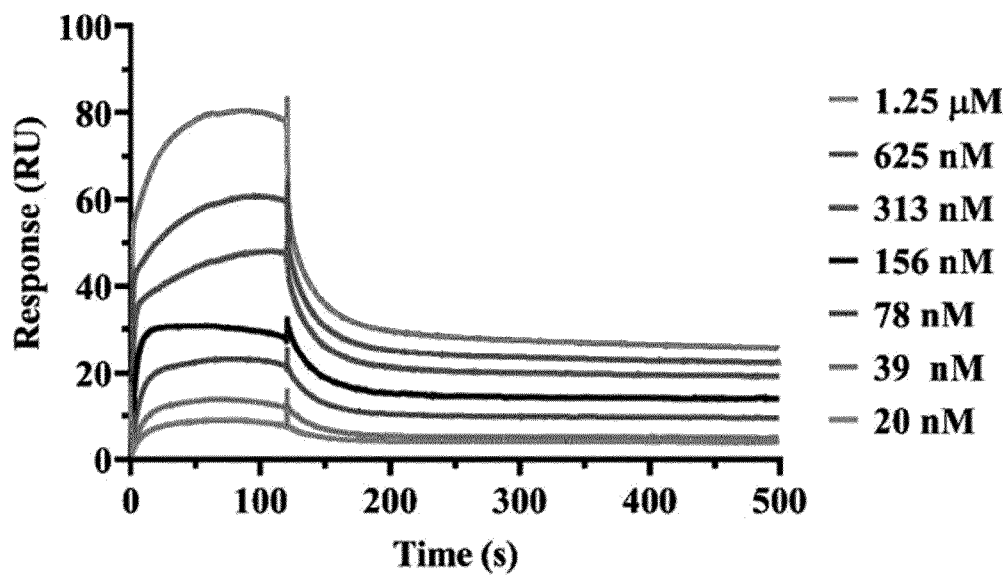
[도4]



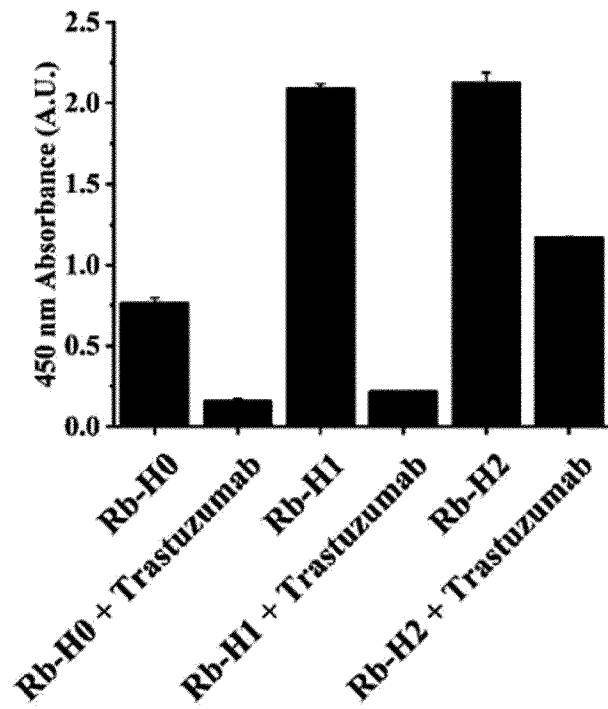
[도5]



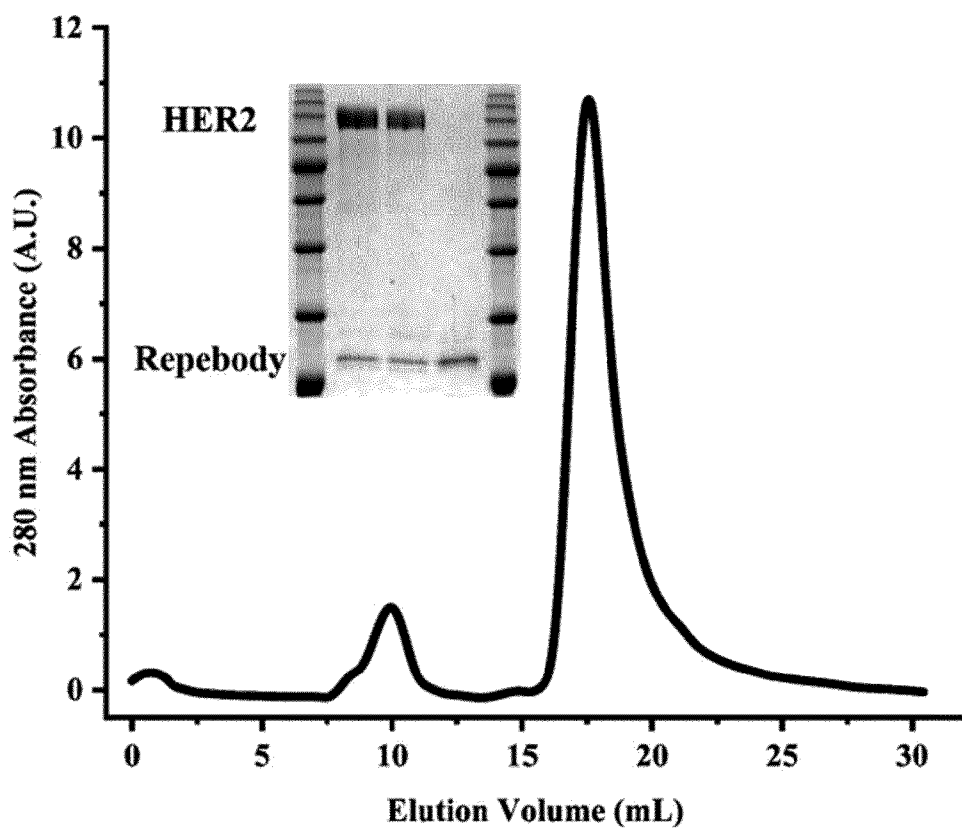
[도6]



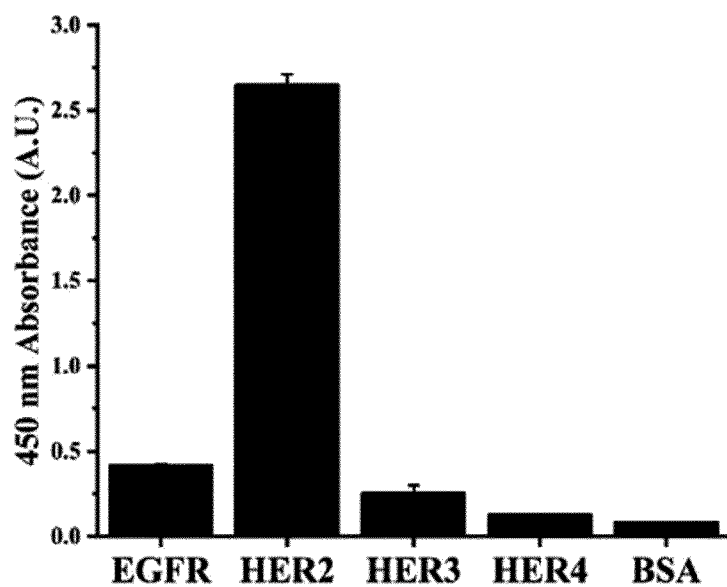
[도7]



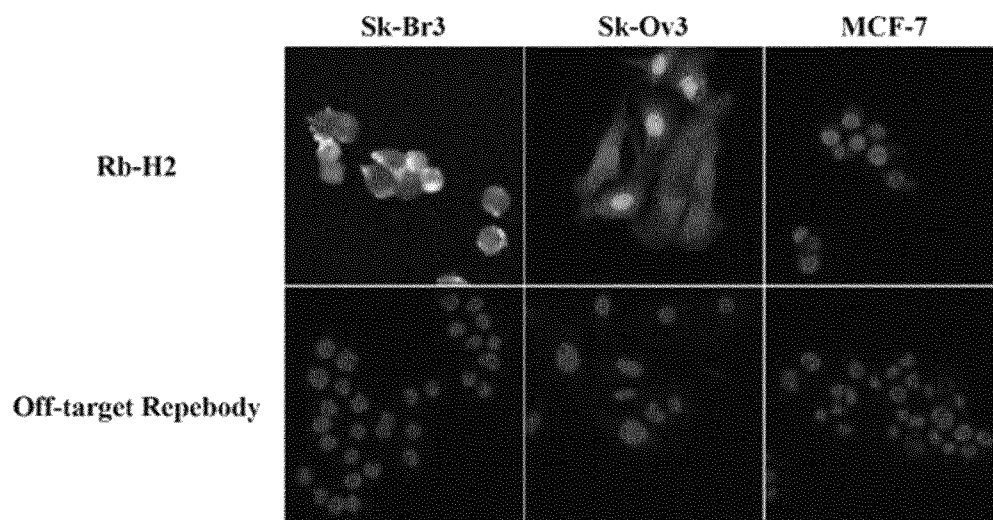
[도8]



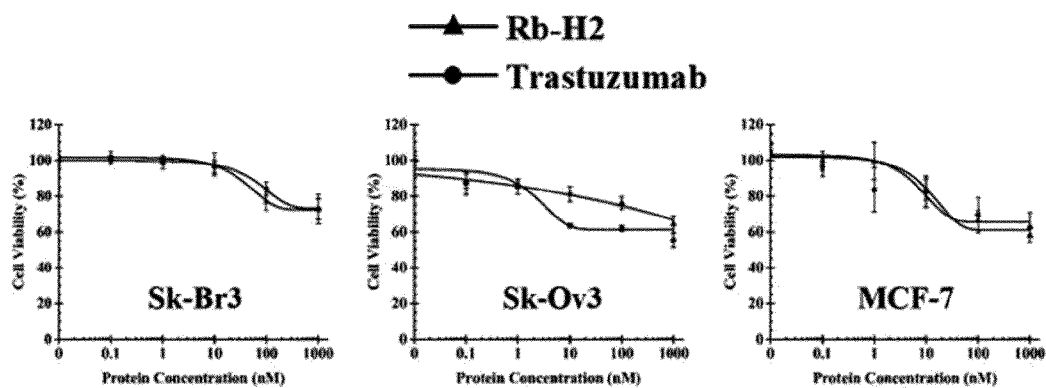
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/00(2006.01); A61K 38/16(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C07K 16/30(2006.01); C07K 16/32(2006.01);
C07K 19/00(2006.01); C40B 40/10(2006.01)

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: 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형(human epidermal growth factor receptor 2, HER2), 리피바디(repebody)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2017-0059729 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 31 May 2017 (2017-05-31) See claims 1 and 4.	1-7
A	KR 10-2015-0055397 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 21 May 2015 (2015-05-21) See entire document.	1-7
A	US 8975382 B2 (REVETS, H. A. P. et al.) 10 March 2015 (2015-03-10) See entire document.	1-7
A	CHO, H.-S. et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin. Nature. 13 February 2003, vol. 421, pp. 756-760. See entire document.	1-7
A	HAO, Y. et al. Cryo-EM Structure of HER2-trastuzumab-pertuzumab complex. Plos One. 01 May 2019, vol. 14, no. 5, e0216095(pp. 1-10). See entire document.	1-7



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

18 October 2021

Date of mailing of the international search report

18 October 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008641

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM, T. Y. et al. Computationally-guided design and affinity improvement of a protein binder targeting a specific site on HER2. Computational and Structural Biotechnology Journal. 27 February 2021, vol. 19, pp . 1325-1334, Supplementary Information See abstract; page 1327, left column, fourth paragraph; page 1329, left column; figure 3; and table S2.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008641

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/008641

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0059729	A	31 May 2017	KR	10-1751501	B1	11 July 2017
KR	10-2015-0055397	A	21 May 2015	KR	10-1572219	B1	30 November 2015
				US	2015-0133308	A1	14 May 2015
US	8975382	B2	10 March 2015	AU	2008-328779	A1	04 June 2009
				AU	2008-328779	B2	05 June 2014
				AU	2008-328781	A1	04 June 2009
				AU	2008-328784	A1	04 June 2009
				AU	2008-328784	B2	27 March 2014
				AU	2008-328785	A1	04 June 2009
				CA	2705890	A1	04 June 2009
				CA	2706200	A1	04 June 2009
				CA	2706425	A1	04 June 2009
				CA	2706675	A1	04 June 2009
				CN	101970490	A	09 February 2011
				EP	2215123	A1	11 August 2010
				EP	2215125	A1	11 August 2010
				EP	2220120	A2	25 August 2010
				EP	2225278	A2	08 September 2010
				EP	2650311	A2	16 October 2013
				EP	2650311	A3	04 June 2014
				IL	205734	A	30 November 2010
				JP	2011-504740	A	17 February 2011
				KR	10-2010-0097716	A	03 September 2010
				MX	2010005783	A	10 August 2010
				RU	2010126172	A	10 January 2012
				US	2011-0028695	A1	03 February 2011
				US	2011-0053865	A1	03 March 2011
				US	2011-0059090	A1	10 March 2011
				US	2011-0189203	A1	04 August 2011
				US	2015-0232562	A1	20 August 2015
				US	9969805	B2	15 May 2018
				WO	2009-068625	A2	04 June 2009
				WO	2009-068625	A3	06 August 2009
				WO	2009-068627	A2	04 June 2009
				WO	2009-068627	A3	01 October 2009
				WO	2009-068628	A1	04 June 2009
				WO	2009-068630	A1	04 June 2009
				WO	2009-068631	A1	04 June 2009
				ZA	201004057	B	28 April 2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/00(2006.01); A61K 38/16(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C07K 16/30(2006.01); C07K 16/32(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C40B 40/10(2006.01) 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: 인간 상피세포 증식인자 수용체 2형(human epidermal growth factor receptor 2, HER2), 리피바디(repebody)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2017-0059729 A (한국과학기술원) 2017.05.31 청구항 1, 4	1-7
A	KR 10-2015-0055397 A (한국과학기술원 등) 2015.05.21 전체 문헌	1-7
A	US 8975382 B2 (REVETS, H. A. P. 등) 2015.03.10 전체 문헌	1-7
A	CHO, H.-S. 등, 'Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin', Nature, 2003.02.13, 421권, 756-760 페이지 전체 문헌	1-7
A	HAO, Y. 등, 'Cryo-EM Structure of HER2-trastuzumab-pertuzumab complex', Plos One, 2019.05.01, 14 권, 5호, e0216095(1-10 페이지) 전체 문헌	1-7
☒ 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 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		
국제조사의 실제 완료일 2021년10월18일(18.10.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년10월18일(18.10.2021)
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

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM, T. Y. 등, 'Computationally-guided design and affinity improvement of a protein binder targeting a specific site on HER2', Computational and Structural Biotechnology Journal, 2021.02.27, 19권, 1325-1334 페이지, Supplementary Information 초록; 페이지 1327, 좌컬럼, 4번째 단락; 페이지 1329, 좌컬럼; 도면 3; 표 S2	1-7

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0059729 A	2017/05/31	KR 10-1751501 B1	2017/07/11
KR 10-2015-0055397 A	2015/05/21	KR 10-1572219 B1	2015/11/30
		US 2015-0133308 A1	2015/05/14
US 8975382 B2	2015/03/10	AU 2008-328779 A1	2009/06/04
		AU 2008-328779 B2	2014/06/05
		AU 2008-328781 A1	2009/06/04
		AU 2008-328784 A1	2009/06/04
		AU 2008-328784 B2	2014/03/27
		AU 2008-328785 A1	2009/06/04
		CA 2705890 A1	2009/06/04
		CA 2706200 A1	2009/06/04
		CA 2706425 A1	2009/06/04
		CA 2706675 A1	2009/06/04
		CN 101970490 A	2011/02/09
		EP 2215123 A1	2010/08/11
		EP 2215125 A1	2010/08/11
		EP 2220120 A2	2010/08/25
		EP 2225278 A2	2010/09/08
		EP 2650311 A2	2013/10/16
		EP 2650311 A3	2014/06/04
		IL 205734 A	2010/11/30
		JP 2011-504740 A	2011/02/17
		KR 10-2010-0097716 A	2010/09/03
		MX 2010005783 A	2010/08/10
		RU 2010126172 A	2012/01/10
		US 2011-0028695 A1	2011/02/03
		US 2011-0053865 A1	2011/03/03
		US 2011-0059090 A1	2011/03/10
		US 2011-0189203 A1	2011/08/04
		US 2015-0232562 A1	2015/08/20
		US 9969805 B2	2018/05/15
		WO 2009-068625 A2	2009/06/04
		WO 2009-068625 A3	2009/08/06
		WO 2009-068627 A2	2009/06/04
		WO 2009-068627 A3	2009/10/01
		WO 2009-068628 A1	2009/06/04
		WO 2009-068630 A1	2009/06/04
		WO 2009-068631 A1	2009/06/04
		ZA 201004057 B	2011/04/28