

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 1월 14일 (14.01.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/006873 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 7/08 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01) C12N 15/37 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006820
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 2일 (02.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0085781 2014년 7월 9일 (09.07.2014) KR
10-2014-0091245 2014년 7월 18일 (18.07.2014) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 120-749 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 임종백 (LIM, Jong Baeck); 137-040 서울시 서초구 신반포로 45 56 동 504 호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 정안 (HONESTY & JR PARTNERS INTELLECTUAL PROPERTY LAW GROUP); 135-833 서울시 강남구 선릉로 615 5 층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

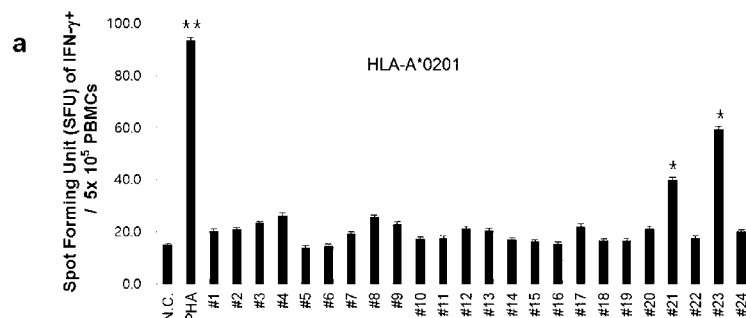
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

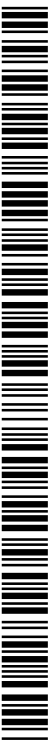
(54) Title: USE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS PEPTIDE FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CERVICAL CANCER

(54) 발명의 명칭 : 인유두종바이러스 펩타이드의 자궁경부암 진단 및 치료 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for treating cervical cancer, containing, as an active ingredient, HPV type 18 E7 peptide; or a composition for diagnosis, using the same. When the peptide of the present invention is used as a vaccine for treating cervical cancer, the peptide can bind to four types of HLA classes (HLA-A*0201, A*2402, A*1101, and A*3303) in duplicate, and thus it is expected that the peptide could be greatly utilized in the effective cervical cancer antibody production and treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 HPV type 18의 E7 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 자궁경부암 치료용 조성물 또는 이를 이용한 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 펩타이드를 자궁경부암 치료용 백신으로 이용하는 경우, 4 종류의 HLA 클래스(HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303)에 중복 결합 가능하므로 효과적인 자궁경부암 항체 생성 및 치료에 큰 활용이 기대된다.



WO 2016/006873 A1

명세서

발명의 명칭: 인유두종바이러스 펩타이드의 자궁경부암 진단 및 치료 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 4 종류의 HLA 클래스와 중복 결합 가능한 인유두종바이러스 펩타이드의 자궁경부암 진단 및 치료 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자궁경부암은 여성에게서 발생하는 악성 종양 가운데 두 번째로 발병 빈도가 높은 것으로, 매년 전세계적으로 35만 명 이상의 환자가 자궁경부암으로 사망하고 있으며, 그 수가 계속 증가하고 있다(Pisani P, 등. *Int J Cancer* 2002;97(1):72-81). 자궁경부암의 주원인은 인유두종 바이러스(human papillomavirus : HPV)로 알려져 있으며, 100여종이 넘는 HPV 중 40여종이 여성 생식기에서 작용하는 것으로 밝혀졌다(de Villiers EM, 등. *Virology* 2004;324:17-27). 여러 종류의 HPV 중에서 특히 HPV 타입 16과 HPV 타입 18이 자궁경부암 환자에게서 가장 흔하게 발견되어 종양발생에 중요하게 관여하고 있음을 예측할 수 있다(Munoz N, 등. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27).
- [3] HPV가 정상 세포에 감염되면 viral oncogene이 숙주세포(host cell)의 유전자에 삽입되어 여러 viral protein을 발현하게 되는데, 그 중 E6와 E7은 강력한 oncoprotein으로서 tumor suppressor인 p53과 RB의 작용을 억제하여 암세포로의 진행과 지속적인 성장을 촉진하는 것으로 밝혀졌다(zur Hausen H. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50). E7은 tumor suppressor 인 RB의 기능을 억제하며, S-phase 유전자인 cyclin A 와 cyclin E의 활성을 촉진하고(zur Hausen H. 등. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50;Phelps WC, 등. *Cell* 1988;53(4):539-47), 또한 cyclin-dependent kinase inhibitor인 CIP1(p21)과 KIP1(p27)의 기능을 억제하는 등의 작용으로 감염된 세포의 apoptosis를 저해하고 종양으로의 전환을 유발하는 것으로 알려졌다(Funk JO, 등. *Genes Dev* 1997;11(16):2090-100;Zerfass-Thome K, 등. *Oncogene* 1996; 13(11):2323-30). 이러한 viral oncoprotein들은 정상 세포에서는 발견되지 않아 다양한 종류의 암을 대상으로 하는 면역치료에 있어서 아주 유력한 target이 되고, 따라서 자궁경부암의 치료가 가능한 세포 독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte: CTL)를 생성하기 위해 HPV 펩타이드를 규명하고자 하는 연구가 진행되고 있는 추세이다.
- [4] 그러나 현재 개발된 HPV 에피토프들은 단일 HLA(Human leukocyte antigen) 클래스에 결합 가능한 펩타이드로서, 면역세포의 인지 저하에 따른 치료 효과 저하의 문제점이 있다. 실제로, 미국에서는 자궁경부암 예방 백신을 접종한 청소년의 32%에서 자궁 경부 감염 또는 병변에 대한 치료 효과가 발생되지 않았다(Hildesheim A 등. *JAMA* 2007;298:743-753; EMA. Annex I Summary of

Product Characteristics for the HPV Vaccine 'Gardasil' 2008. Updated 2012.
www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000703/WC500021142.pdf).

[5]

[6] 이와 같이, 자궁경부암의 진단, 치료, 백신 및 스크리닝 효율 증진을 위하여, 다양한 HLA 클래스에 중복 결합 가능한 HPV 펩타이드의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 상기와 같은 종래의 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 4 종류의 HLA 클래스(HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303)에 중복 결합 가능한 단일 HPV 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 자궁경부암 치료용 조성물 또는 이를 이용한 진단용 조성물에 관한 것이다.

[9]

[10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[13]

[14] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[15]

[16] 본 발명의 일 구체예에서 펩타이드란, 아미노산의 중합체로서, 아미노산 간의 연결은 아미드 결합 또는 펩타이드 결합으로 이루어진 폴리머를 의미한다.

[17]

[18] 본 발명의 일 구체예에서 핵산이란, 뉴클레오타이드가 긴 사슬 모양으로 중합된 고분자 유기물로서, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 유전 정보이다.

[19]

[20] 본 발명에서 개제된 펩타이드들과 그 펩타이드를 코딩하는 핵산은 HPV에 의하여 감염된 것으로 알려졌거나, HPV에 의하여 감염된 것이 의심스럽거나, HPV에 의하여 감염될 수 있는 대상에서 예방 또는 치료적인 백신으로 사용될 수 있다. 다른 적당한 대상들은 HPV 관련 질환의 증상을 나타내거나 질환이 발생할 것 같은 사람들을 포함한다. 본 발명의 펩타이드 및 백신은 HPV 균주 18의 감염과 관련된 질환들, 예를 들어 보웬성 구진(bowenoid papulosis), 항문 이형성(anal dysplasia), 호흡기 또는 결막 유두종, 자궁 경부 이형성증, 자궁경부암, 외음암(vulval cancer), 또는 전립선암을 치료하거나 예방하는 백신으로 사용될 수 있다. 면역 반응을 야기하는 본 발명의 펩타이드 및 핵산의 능력은 당업계에 주지된 면역 반응을 측정하는 방법들을 사용하여 분석할 수 있다. 예를 들어 세포 독성T 세포들의 생성은 MHC 테트라머를 사용하거나 세포내 사이토카인 발현을 측정하거나 표준 51Cr release 분석에서 나타낼 수 있다. ELISA 또는 ELISPOT와 같은 표준 분석도 T 세포 활성화에 기여하는 사이토카인 프로파일을 측정하는데 사용될 수 있다. T 세포 증식은 또 당업계에 공지된 다른 분석들과 3H-thymidine 업테이크와 같은 분석을 사용하여 측정될 수 있다. B 세포 반응들은 ELISA와 같은 분석을 사용하여 측정될 수 있다.

[21]

[22] 본 발명의 일 구체예에서 항체란, 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 HPV 펩타이드에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다.

[23]

[24] 본 발명의 일 구체예에서 백신이란, 특정 질병의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 조성물을 말한다. 백신은 항원으로서의 펩타이드를 포함하고 있든지, 또는 항원 발현이 가능하여 항원에 대한 면역응답을 유도할 수 있다. HPV에 의하여 감염될 수 있는 질병의 감염, 전파 및 유행의 예방 또는 치료를 위해 본 발명의 펩타이드를 포함하는 백신을 사용할 수 있다.

[25]

- [26] 본 발명의 일 구체예에서 진단이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 진단은 HPV 감염 여부를 확인하는 것이다. HPV 감염 의심 환자로부터의 검체(임상적으로는 세포, 혈액, 수액, 흉수, 복수, 관절액, 농(膿), 분비액, 담, 인두점액, 요(尿), 담즙, 대변 등) 내에 포함되어 있는 HPV 펩타이드에 대응하는 항체를 이용하는 방법 또는 HPV 핵산을 직접 검출하는 방법으로 HPV 감염 여부를 진단할 수 있다. 항원-항체 결합을 이용한 진단적 수단으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 핵산을 직접 검출하는 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [27]
- [28] 본 발명의 일 구체예에서 진단키트란, 특정한 목적을 위해 필요한 조성물 및 부속품들을 모아놓은 세트를 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 진단키트는 HPV 감염 여부를 확인하는 것이다. 본 발명의 키트에는 HPV 감염 여부를 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 펩타이드를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [29]
- [30] 본 발명의 일 구체예에서 약학 조성물이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물을 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 약학 조성물은 HPV에 감염된 세포를 파괴하는 것이며, HPV 펩타이드에 의해 감작된 면역세포, 면역세포의 활성 증가를 유도할 수 있는 물질 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [31] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 펩타이드에 상응하는 유효성분을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[32] 또한 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 고분자 다당체 또는 토란추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose), 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[33]

[34] 본 발명의 일 구체예에서 투여란, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 성인의 경우, 상기 치료용 약학조성물을 1회 50ml~500ml의 양으로 체내에 투여 가능하며, 화합물일 경우 0.1ng/kg-10mg/kg, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg-10mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여간격은 1일 1회 내지 12회일 수 있으며, 1일 12회 투여할 경우에는 2시간마다 1회씩 투여할 수 있다. 또한 본 발명의 펩타이드 또는 핵산들은 HPV 감염 또는 HPV 감염과 관련된 질환들을 치료하기 위하여 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법 예를 들어 화학요법제, 방사선 및 수술과 같이 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 펩타이드들 및 핵산들은 면역 반응을 증진하기 위하여 고안된 다른 치료, 예를 들어 당업계에 주지된 것과 같은 어쥬번트 또는 사이토카인(또는 사이토카인을 코딩하는 핵산)과 혼합하여 투여될 수 있다. 바이오리스틱(biolistic) 전달 또는

생체 외(ex vivo) 처리와 같은 다른 표준 전달 방법들이 사용될 수도 있다. 생체 외 처리에서 예를 들어 항원제시 세포들(APCs), 수지상세포들, 말초혈액 단핵구 세포들, 또는 골수세포들을 환자 또는 적당한 공여자로부터 얻어서 본 면역 조성물로 생체 외에서 활성화된 후 그 환자에게 투여될 수 있다.

[35]

[36] 또한 본 발명의 펩타이드는 면역세포의 활성을 촉진하는 목적으로 당업계에 주지된 지질, 텐드리머 또는 리포솜을 통하여 대상에 투여될 수 있다. 예를 들어 면역 펩타이드 또는 그 펩타이드를 코딩하는 핵산들을 운반하는 리포솜들은 인 비보에서 CTL 반응을 야기하는 것으로 알려졌다(Reddy et al., J. Immunol. 148:1585, 1992; Collins et al., J. Immunol. 148:3336-3341, 1992; Fries et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:358, 1992; Nabel et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 89:5157, 1992). 또한 본 발명의 펩타이드 및 핵산들은 사포닌 단독 또는 콜레스테롤 및 Quil A (사포닌)을 동시에 혼합하여 생성된 30-40 nm 크기의 (-) 차지된 케이지 유사 구조인 Immune Stimulating Complexes (ISCOMS)을 사용하여 투여될 수 있다. 본 발명의 펩타이드 및 핵산들은 ISCOMS와 동시 또는 별도로 투여될 수 있다.

[37]

[38] 본 발명의 일 구체예에서 스크리닝이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 스크리닝은, 자궁경부암 의심 개체에 자궁경부암 치료용 후보 물질의 투여 후 본 발명의 펩타이드 또는 본 발명의 핵산이 코팅하는 단백질에 의해 민감화된 CD8+ T세포 반응이 저해되는 경우에, 후보 물질을 자궁경부암 치료제로 결정하는 자궁경부암 치료제의 스크리닝 방법이다. 분자생물학적 어쎄이(assay), 디지털 이미징, 세포학적 질확대경 및 조직학적 검사와 같은 수단적 방법들이 유두종 바이러스 관련 병소 또는 유두종 바이러스 레벨에 대한 본 발명의 펩타이드와 핵산의 효과를 측정하는데 사용될 수 있다.

[39]

[40] 본 발명에서는 HPV 타입 18의 E7 단백질 중 세포면역반응을 유발하는 가장 최소단위인 HLA class I 에피토프와 반응하는 E7 펩타이드 백신을 개발하는 데 그 목적이 있으며, 특별히 HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303의 4종류의 HLA형에 중복 결합 가능한 단일 E7 펩타이드 백신인 것을 특징으로 하는 백신을 개발하였다. 세포 독성 T 림프구를 생성을 유도하는 특정한 HPV 타입 18 E7 에피토프를 개발하기 위해 합성된 HPV 타입 18 E7 펩타이드를 이용하여 유체 세포측정법(flow cytometry)을 실행한 결과 E7 펩타이드 가운데 #21(DDLRAFQQLFLNTLS)과 #23(LFLNTLSFVCPWCAS) 펩타이드가 높은 세포 독성 T 세포의 분화 및 활성을 유도 하는 것을 알 수 있었다. 그리고 실제 #21과 #23 펩타이드로 감작된 CTL과 자궁경부암 세포를 함께 배양하여 CTL의 암세포

살상능력을 실제 측정하는 세포 독성(cytotoxicity) 실험을 통해 #21과 #23 펩타이드가 자궁경부암 세포의 세포 사멸을 유발하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, CD8+ CTLs 세부에 인식 가능한 #21과 #23번 펩타이드의 세부 잔기(residue)를 분석하기 위해서, 전체 15mer 길이의 펩타이드들은 순차적으로 N- 과 C- 말단의 아미노산을 하나씩 떼어내는 방법으로 8 내지 14개의 아미노산 서열을 가지는 잔기 펩타이드들을 개발하였으며, 상기와 같은 방법으로 잔기 펩타이드들의 효과를 분석하였다. HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303의 4종류의 HLA형에 대하여, #21 펩타이드의 경우에는 #21-1(DLRAFQQFLNLTLS)이 가장 유용한 효과를 보임으로서 94번과 95번 위치의 아미노산이 CD8+ CTL 세포 자극을 위해 가장 중요하다는 것을 알 수 있었으며, #23 펩타이드의 경우에는 #23-10(LFLNLTLSFVCPW)이 가장 유용한 효과를 보임으로서 100번과 103 위치의 아미노산이 CD8+ CTL 세포 자극을 위해 가장 중요하다는 것을 알 수 있었다.

[41]

[42] 본 발명의 일 구체예에서, 서열번호 1을 포함하는 펩타이드를 제공하고, 서열번호 1의 N말단에 아미노산 아스파르트산(Aspartic acid, D)를 추가로 포함하는 펩타이드를 제공하며, 서열번호 1의 C말단에 2개의 아미노산을 추가하고, 상기 2개의 아미노산 중 어느 하나가 류신(Leucine, L)인 펩타이드를 제공하며, 서열번호 1의 N말단에 아미노산 아스파르트산(Aspartic acid, D)를 추가하고, C말단에 2개의 아미노산을 추가하며, 상기 2개의 아미노산 중 어느 하나가 류신(Leucine, L)인 펩타이드를 제공하며, 서열번호 1의 C말단에 3개의 아미노산을 추가하고, 상기 3개의 아미노산은 순차적으로 트레오닌(Threonine, T), 류신(Leucine, L), 세린(Serine, S)인 펩타이드를 제공하며, 상기 펩타이드는 서열번호 제 2, 3, 4 및 5 중 어느 하나인 펩타이드를 제공한다.

[43]

[44] 본 발명의 일 구체예에서, 서열번호 6을 포함하는 펩타이드를 제공하고, 서열번호 6의 C말단에 1개의 아미노산을 추가로 포함하는 펩타이드를 제공하며, 상기 펩타이드는 서열번호 7인 펩타이드를 제공하며, 서열번호 7의 C말단에 2개의 아미노산을 추가로 포함하는 펩타이드를 제공하며, 상기 펩타이드는 서열번호 8인 펩타이드를 제공한다.

[45]

[46] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기의 어느 하나 이상의 펩타이드를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[47]

[48] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 어느 하나 이상의 펩타이드와 결합하는 항체를 제공한다.

[49]

[50] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는

백신 조성물을 제공한다.

[51]

[52] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 어느 하나 이상의 펩타이드 및 약학적으로 수용 가능한 담체를 포함하는 HPV 감염 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하고, 상기의 HPV 감염 관련 질환은 보웬성 구진(bowenoid papulosis), 항문 이형성(anal dysplasia), 호흡기 또는 결막 유두종, 자궁 경부 이형성증, 자궁경부암, 외음암(vulval cancer), 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물을 제공하며, 상기 약제학적 조성물은 CD8+ T세포 자극 및 민감성 향상용인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물을 제공하며, 상기 약제학적 조성물은 HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303의 어느 하나 이상의 HLA 클래스 타입 환자 특이적인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[53]

[54] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 미세입자, 리포좀, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM)를 제공한다.

[55]

[56] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 핵산을 포함하는 미세입자, 리포좀, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM)를 제공한다.

[57]

[58] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 자궁경부암 진단 키트를 제공한다.

[59]

[60] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 핵산을 포함하는 자궁경부암 진단 키트를 제공한다.

[61]

[62] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기의 항체를 포함하는 자궁경부암 진단 키트를 제공한다.

[63]

[64] 본 발명의 또 다른 구체예에서, HPV 감염 의심 환자로부터의 검체와 상기 어느 하나 이상의 펩타이드의 반응 결과로 HPV 감염 여부를 진단하는 것에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[65]

[66] 본 발명의 또 다른 구체예에서, HPV 감염 의심 환자로부터의 검체와 상기의 핵산을 검출할 수 있는 물질의 반응 결과로 HPV 감염 여부를 진단하는 것에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[67]

[68] 본 발명의 또 다른 구체예에서, HPV 감염 의심 환자로부터의 검체와 상기의 항체의 반응 결과로 HPV 감염 여부를 진단하는 것에 관한 정보를 제공하는

방법을 제공한다.

[69]

[70] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 펩타이드 중 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 인유두종 바이러스 감염 진단용 바이오 마커를 제공한다.

[71]

[72] 본 발명의 또 다른 구체예에서, (a) HPV 감염 의심 환자에 항바이러스제를 투여한 후 HPV 펩타이드로 감작된 PBMCs의 활성을 측정하는 단계; (b) HPV 감염 의심 환자에 상기 항바이러스제 및 분석할 시료를 투여한 후 HPV 펩타이드로 감작된 PBMCs의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) (a) 단계에서의 PBMCs 활성보다 (b)단계에서의 PBMCs 활성이 더 높을 경우 상기 분석할 시료는 병용투여용 항 바이러스제로 판단하는 단계를 포함하는 병용투여용 항바이러스제 스크리닝 방법을 제공한다.

[73]

[74] 이하 상기 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.

[75]

발명의 효과

[76]

자궁경부암은 여성에게서 발생하는 악성 종양 가운데 두 번째로 발병 빈도가 높고, 발병 원인의 대부분이 HPV 타입 16과 HPV 타입 18의 감염에 의한 것으로 밝혀져 있음에도 불구하고, 백신 개발에 사용된 HPV 에피토프들이 단일 HLA(Human leukocyte antigen) 클래스에 결합 가능한 펩타이드이므로 치료 효과가 낮은 문제점이 있다. 그러나 본 발명의 HPV 타입 18의 E7 펩타이드는 4 종류의 HLA 클래스(HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303)에 중복 결합 가능한 단일 HPV 펩타이드로서, 용이하게 효율이 높은 자궁경부암 치료용 조성물 또는 이를 이용한 진단용 조성물로써의 큰 활용이 기대된다.

[77]

도면의 간단한 설명

[78]

도 1a-d는 본 발명의 일 실시예에 따른 15mer 길이의 HPV 후보군 펩타이드들의 IFN- γ + 스팟 형성율을 측정한 결과이다.

[79]

도 2a-d는 본 발명의 일 실시예에 따른 15mer 길이의 HPV 후보군 펩타이드들에 대한 CD8+ T 세포의 접힘 증가를 측정한 결과이다.

[80]

도 3a-d는 본 발명의 일 실시예에 따른 #21과 #23 펩타이드 감작된 PBMCs의 EBV-BLCs 세포 용해율을 측정한 결과이다.

[81]

도 4a-b는 본 발명의 일 실시예에 따른 #21과 #23 펩타이드 감작된 PBMCs의 자궁경부암 세포주 용해율을 측정한 결과이다.

[82]

도 5a-d는 본 발명의 일 실시예에 따른 #21과 #23 펩타이드의 세부 잔기 펩타이드들(truncated peptides)의 IFN- γ + 스팟 형성율을 측정한 결과이다.

[83]

도 6a-d는 본 발명의 일 실시예에 따른 #21 세부 잔기 펩타이드들로 감작된

PBMCs의 EBV-BLCs 세포 용해율을 측정한 결과이다.

- [84] 도 7a-d는 본 발명의 일 실시예에 따른 #23 세부 잔기 펩타이드들로 감작된 PBMCs의 EBV-BLCs 세포 용해율을 측정한 결과이다.

[85]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [86] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[87]

[88] 실시예 1: 말초혈액 단핵구의 준비

- [89] 말초 혈액 단핵구(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)는 네 종류(HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303)의 HLA 클래스 I을 가지는 건강한 공여자로부터 기증되었다. 각 공여자의 혈액에 존재하는 면역 글로불린 G(IgG) 또는 면역 글로불린 M(IgM) HCMV 항체는 수동 라텍스 응집(CMVSCAN 키트, 벡톤 디킨슨 미생물 시스템)을 사용하여 분석하였다. 거대 세포 바이러스(Cytomegalovirus, CMV) 혈청 검사 양성 공여자로부터의 거대 세포 바이러스(CMV) 특이 항원 결정기(epitope)가 양성 대조군으로서 사용되었다. 주요 조직 적합성 복합체(Major histocompatibility complex, MHC) 클래스 I 유전자형은 게놈 DNA를 이용한 염기 서열 특이 중합 효소 연쇄 반응(sequence-specific polymerase chain reaction)으로 분석하였고, 이것은 서울 의과학 연구소(서울, 한국)의 HLA 실험실에서 수행하였다. PBMC는 파마시아 바이오텍사의 피콜 시약(Ficoll-Hypaque 1.077, Pharmacia Biotech)을 사용하여 밀도 구배 원심 분리를 통해 분리하였고, 10% 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO, 시그마)를 포함하는 인간 AB + 혈청에 담긴 채로 영하 160°C에서 동결 보존 하였다. 본 명세서 상에 기재된 모든 연구는 공여자의 서면 동의를 받고, 연세대학교 연구윤리위원회의 승인을 얻어 실시되었다.

[90]

[91] 실시예 2: 펩타이드(peptide) 합성

- [92] 인유두종바이러스 18 타입 E7 단백질의 전체 아미노산 서열을 컴퓨터 알고리즘(computer algorithms)을 이용하여 각각 15mer의 크기로 중복(overlapping)되도록 나누어 합성한 후 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography : HPLC)기기를 이용하여 순도가 95% 이상 되는 펩타이드를 총 24개를 합성하였다. 면역 우세한 후보 펩타이드의 선별 후에, 네 종류(HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303)의 HLA 클래스 I과 결합 가능한 15-아미노산 펩타이드 후보군이 합성되었으며, 합성된 펩타이드는 1%의

디메틸설폭사이드가 포함된 디에틸피로카보네이트(diethylpyrocarbonate) 용액에 담긴 채로 영하 80°C에서 보관하였다.

[93]

[94] 실시예 3: PBMC로부터 자가 수지상 세포(Autologous dendritic cell)의 생성

[95] 원심분리를 통해 얻어진 PBMC를 RPMI 배양액(10% FBS, 5% antibiotics) 내에서 37°C 온도에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후, 5×10^6 세포/ml 농도의 세포(monocyte)에 인터루킨-4(IL-4, 1200U/ml)와 거대세포 자극 인자(GM-CSF, 1500U/ml)를 첨가하여 배양하고, 배양 시작 후 2일, 4일 및 6일째 되는 때에 IL-4와 GM-CSF를 신선하게 첨가해 주었다. 배양 시작 후 5일째 되는 때에, 수지상세포의 성숙을 위해 종양괴사인자- α (TNF- α , 10 ng/ml)를 첨가하였다(Lim JB, 등. Exp Hematol 2006;34(3):296-307;Provenzano M, 등. J Immunother 2002;25:342-351). 성숙 후에는, 최소 6시간 동안 수지상세포와 펩타이드를 감작시켜 주었다.

[96]

[97] 실시예 4: 펩타이드에 특이적인 polyclonal 세포 독성 T 세포의 생성

[98] 동결된 PBMC는 해동시켜 2×10^6 개의 세포를 24 well 배양용기의 각 well에 2ml의 RPMI 배양액과 함께 넣어주었다. PBMC 배양액에는 HPV18 E7 펩타이드 (10g/mL/well)와 1000 IU/ML의 제조합 인간 IL-2(rhIL-2; PeproTech)가 첨가되었고, 이틀에 한 번씩 배양액 내에 rhIL-2를 추가로 첨가하였다. PeproTech)가 well 마다 첨가되었다. 배양 시작 후 7일째 되는 때에 위에 언급한 방법으로 생성된 수지상 세포($4-10 \times 10^6$ /well)가 PBMC에 더해졌고, 수지상 세포가 처리된 PBMC는 일주일 더 배양하였다.

[99]

[100] 실시예 5: 유체 세포측정법(flow cytometry)를 이용한 분석

[101] 피코에리트린(Phycoerythrin, PE) 컨쥬게이션 된

안티-인터페론-감마(anti-IFN- γ), APC-Cy7 컨쥬게이션 된 안티-CD44, FITC 컨쥬게이션 된 안티-CD3, PerCp-Cy5.5 컨쥬게이션 된 안티-CD4 및 APC 컨쥬게이션 된 안티-CD8은 BD 바이오사이언스(BD Biosciences, CA)에서 구입하였다. 각 시료에서, 1×10^5 개의 세포가 유세포측정기(BD Biosciences, NJ)의 게이트를 통과하였고, 양성 세포는 각각의 전체 세포에 대한 비율로 표현하였다. phytohemagglutinin(PHA, Sigma)로 자극되고 펩타이드 감작된 PBMC (1×10^6 세포 / mL)와 자가 수지상세포로 자극된 PBMC가 각각 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용되었다. 펩타이드 자극 1시간 후, 10 마이크로그램(μ g)의 brefeldin A(BFA)를 각각 첨가해 준 뒤, 37°C에서 5시간 동안 배양하였다. 그 후, 각각의 well에서 세포를 채취하여 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척해 주었다. 세척 후 1mM 농도의 EDTA가 들어 있는 PBS를 넣어 주고 37°C에서 10분간 배양하였다. 배양이 끝나면, 5% FBS가 포함된 PBS로 2회 세척해 주고, 형광 표지된 항체인 안티-CD3, 안티-CD8, 안티-CD4, 안티-CD44 및

안티-인터페론-감마를 첨가한 뒤 4°C에서 15분간 빛을 가린 상태로 배양하였다.

[102]

[103] 실시예 6: 감마 인터페론(IFN- γ) 효소-연결 면역스팟 분석(ELISPOT)

[104] 안티-마우스 감마 인터페론(IFN- γ) 항체(Clone AN-18, Ebioscience, San Diego, CA) ELISPOT 플레이트를 4°C에서 하룻밤 동안 코팅 하였다. 항체 코팅된 플레이트에, 동결 보존하였던 PBMC를 배지(RPMI 1640 with 10% FBS)로 해동하여 각 well마다 5×10^5 cells개씩 넣고 배양하였다. 이어, HPV18 E7 펩타이드를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 48시간 동안 배양하였다. 바이오틴화 안티-마우스 IFN- γ 검출항체(100 μ L; 1 μ g/mL in PBS)을 각각의 웰에 첨가하고, PBS 세척 후, 스트렙타비딘-알칼린 포스파타아제 1:1,000 희석액 100 μ L를 첨가하였다. 그런 다음, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하고, 플레이트에 10ml의 Tris-MgCl₂ buffer 에 100 μ L의 NBT 용액(Bio-Rad, Berkeley, CA)과 100 μ L의 BCIP 용액(Bio-Rad)을 첨가한 발색 시약을 첨가하였다. 플레이트는 건조 후에 ELISPOT 리더(software version 3.5, AID ELISpot Reader System, Strassberg, Germany)로 정량화 하였다. 시험에는 2.5 μ g/mL의 Phytohemagglutinin (PHA) 가 첨가된 시료와 펩타이드 감작되지 않은 PBMC 시료를 각각 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용하였다.

[105]

[106] 실시예 7: 자궁경부암 세포주 배양

[107] 인간의 자궁경부암 세포주(HTB-34 for HLA-A*0201, SNU-1160 for HLA-A*2402)는 한국 세포주 은행(서울, 한국)에서 구매하였고, 37°C, 5% CO₂ 환경에서 DMEM 배지(10% FBS 및 1% 항생제 첨가)로 배양하였다. 각각의 HLA class I 제한된(kindly gifted from Dr. David Stroncek, in NIH) 불멸성 Epstein-Barr 바이러스-B 림프아구성 세포주(EBV-BLC)는 37°C, 5% CO₂ 환경에서 RPMI 배지(10% FBS 및 1% 항생제 첨가)로 배양하였다. 세포들은 정기적으로 마이코플라즈마(mycoplasma) 감염 여부를 시험하였다.

[108]

[109] 실시예 8: 세포 독성 실험(cytotoxicity assay)

[110] 자궁경부암 세포주를 표적 세포(target cell)로 하여 ⁵¹Cr 방출 검출법을 사용하여 세포 독성 실험을 실시하였다. 간략히 설명하면, 각각의 HLA 클래스 I 제한된 4×10^3 cells/well의 자궁경부암 세포주에 ⁵¹Cr(100 mCi/10⁶ cells; Perkin Elmer, Waltham, MA)를 첨가하여 37°C에서 45분간 배양하였다. Effector 로서 펩타이드 감작된 PBMC가 목표 세포에 10:1, 30:1, 50:1, 및 100:1의 비율로 첨가하였고, 배양된 세포 배지의 상층액을 WIZARD2 자동 감마 카운터기(Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer)로 측정하였다. 세포 독성 T 세포 특이적인 목표 세포 사멸의 정도는 [(experimental cpm-spontaneous cpm)/(maximum cpm-spontaneous cpm)] $\times$ 100의 공식을 이용하여 산정하였다(Bao L, 등. Biol Blood Marrow Transplant 2008;14:1156-1162).

[111]

[112] 상기 실시예의 결과는 다음과 같다.

[113]

[114] (1) Th1 세포와 반응 특이적인 15mer 길이의 HPV 타입 18 E7 펩타이드의 스크리닝

[115] 총 24개 종류의 15mer 길이의 후보군 펩타이드를 민감화된 PBMCs에 처리하였고, IFN- γ + 스팟 형성을(spot forming unit,SFU)을 ELISpot법을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 [도 1]에 나타내었다. 24 종류의 15mer 길이의 펩타이드 서열을 표 1에 나타내었다.

[116]

[117] [표1]

번호	아미노산 위치	아미노산 서열
#1	1-15	MHGPKATLQDIVLHL
#2	5-19	KATLQDIVLHLEPQN
#3	9-23	QDIVLHLEPQNEIPV
#4	13-27	LHLEPQNEIPVDLLC
#5	17-31	PQNEIPVDLLCHEQL
#6	21-35	IPVDLLCHEQLSDSE
#7	25-39	LLCHEQLSDSEEEND
#8	29-43	EQLSDSEEENDEIDG
#9	33-47	DSEEENDEIDGVNHQ
#10	37-51	ENDEIDGVNHQHLPA
#11	41-55	IDGVNHQHLPARRAE
#12	45-59	NHQHLPARRAEPQRH
#13	49-63	LPARRAEPQRHTMLC
#14	53-67	RAEPQRHTMLCMCK
#15	57-71	QRHTMLCMCKCEAR
#16	61-75	MLCMCKCEARIKLV
#17	65-79	CCKCEARIKLVVSS
#18	69-83	EARIKLVVSSADDL
#19	73-87	KLVVSSADDLRAFQ
#20	77-91	ESSADDLRAFQQLFL
#21	81-95	DDLRAFQQLFLNTLS
#22	85-99	AFQQLFLNTLSFVCP
#23	89-103	LFLNTLSFVCPWCAS
#24	93-107	TLFVCPWCASQQ

[118]

[119] HLA-A*0201, A*1101 및 A*3303에서, #23과 #21 펩타이드들은 각각 1번째, 2번째로 높은 IFN- γ + 스팟 형성을 나타내었다(도 1a, 1c, 1d). HLA-A*2402에서는, #21이 #23 펩타이드보다 조금 더 높은 스팟 형성을 보여주었다(도 1b). 그러나 모든 HLA 패밀리에서 #21과 #23 펩타이드들은 음성 대조군에 비하여 적어도

3배 이상의 높은 스팟 형성을 나타내었고, 이것으로 시험된 펩타이드가 양성 대조군에 거의 근접한 수준으로 PBMCs에 높은 감작을 보임을 알 수 있었다.

[120]

[121] **(2) CD8+ CTL 세포와 15mer 길이의 HPV 타입 18 E7 펩타이드의 반응 측정**

[122] 후보 펩타이드들이 공여자의 PBMCs의 HLA 클래스 I (HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303)을 자극하여 IFN- γ 을 생산하는 것을 측정함으로써, 펩타이드에 민감화된 PBMCs가 CD8+ CTL 반응을 유도할 수 있는가를 알 수 있다. PBMCs로부터 유도된 자가 수지상세포를 6시간 동안 재감작 후, CD8+ CTL 세포(CD3+CD8+IFN- γ +)의 IFN- γ 생산을 유세포 계측기로 측정하였다(도 2). 시험된 모든 HLA 패밀리에서, IFN- γ 생산을 유도하는 CD8+ T 세포의 접합 증가는 #21과 #23이 다른 펩타이드들에 비하여 월등히 높았으며, 음성대조군에 비해서는 2-2.5배 이상 높게 나타났다. 이러한 결과로 #21과 #23 펩타이드가 PBMC로부터 효과적인 CD8+ CTL 반응을 이끌어낼 수 있음을 알 수 있었다.

[123]

[124] **(3) #21과 #23 펩타이드 독성 분석**

[125] 각각의 HLA 클래스 I 에 대한 #21과 #23 펩타이드의 효과를 확인하기 위해서, 타겟 세포로서 HLA 매칭된 엡스테인바 바이러스-B림프구(Epstein Barr virus-B lymphoblastoid cell, EBV-BLCs)를 이용하여 세포독성 실험을 실시하였다. EBV-BLCs 세포는 표면에 #21과 #23 펩타이드에 결합 가능한 HLA-펩타이드 복합체(HLA-peptide complex)를 가지고 있다. 시험 결과, #21과 #23 펩타이드에 의해 감작된 모든 HLA class I 종류의 CTLs 세포는 #21과 #23 펩타이드를 로드(load)한 EBV-BLCs 세포를 더 많이 용해하였다(도 3). 세부적으로, #23 펩타이드에 의해 감작된 PBMCs 가 #23 펩타이드를 로드한 EBV-BLCs 세포를 용해하는 비율이 #21의 경우에 비하여 조금 더 높았다. 이러한 결과로, #21과 #23 펩타이드가 CD8+ CTLs 세포에 의해 성공적으로 인식됨을 알 수 있었다.

[126]

[127] **(4) #21과 #23 펩타이드로 감작된 PBMCs의 자궁경부암 세포주에 대한 독성 분석**

[128] #21과 #23 펩타이드로 감작된 PBMCs 가 자궁경부암 세포주에 미치는 세포 독성을 분석하기 위해서, 2 종류의 HLA 클래스 I(HLA-A*0201, A*2402) 타입 자궁경부암 세포주를 이용하여 51Cr 방출 검출법을 실시하였다. 시험 결과, #21과 #23 펩타이드로 감작된 PBMCs는 비감작된 세포에 비하여 더 많은 자궁경부암 세포를 용해하였다(도 4). HLA-A*0201 제한된 HTB-34 자궁경부암 세포주(도 4a)와 HLA-A*2402 제한된 SNU-1160 자궁경부암 세포주(도 4b)에서 같은 결과를 나타내었다. 이러한 결과로, #21과 #23 펩타이드가 자연 발생된 두 종류의 자궁경부암 세포주에서 모두 유효하며, HLA-A*0201과 HLA-A*2402 타입의 면역 항원결정기(에피토프)로서 유용함을 알 수 있었다.

[129]

[130] (5) CD8+ CTLs세포에 인식 가능한 #21과 #23 펩타이드의 세부 잔기(residue) 분석

[131] CD8+ CTLs 세부에 인식 가능한 #21과 #23 펩타이드의 세부 잔기(residue)를 분석하기 위해서, 전체 15mer 길이의 펩타이드들은 순차적으로 N- 과 C- 말단의 아미노산을 하나씩 떼어내는 방법으로 잘려졌고, 만들어진 잔기 펩타이드들을 표 2에 나타내었다.

[132]

[133] [표2]

번호	아미노산 위치	아미노산 서열	번호	아미노산 위치	아미노산 서열
#21-1	82-95	DLRAFQQLFLNTLS	#23-1	90-103	FLNTLSFVCPWCA S
#21-2	83-95	LRAFQQLFLNTLS	#23-2	91-103	LNTLSFVCPWCA S
#21-3	84-95	RAFQQLFLNTLS	#23-3	92-103	NTLSFVCPWCAS
#21-4	85-95	AFQQLFLNTLS	#23-4	93-103	TLFVCPWCAS
#21-5	86-95	FQQLFLNTLS	#23-5	94-103	LSFVCPWCAS
#21-6	87-95	QQLFLNTLS	#23-6	95-103	SFVCPWCAS
#21-7	88-98	QLFLNTLS	#23-7	96-103	FVCPWCAS
#21-8	81-94	DDLRAFQQLFLNTL	#23-8	89-102	LFLNTLSFVCPW CA
#21-9	81-93	DDLRAFQQLFLNT	#23-9	89-101	LFLNTLSFVCPW C
#21-10	81-92	DDLRAFQQLFLN	#23-10	89-100	LFLNTLSFVCPW
#21-11	81-90	DDLRAFQQLFL	#23-11	89-99	LFLNTLSFVCP
#21-12	81-89	DDLRAFQQLF	#23-12	89-98	LFLNTLSFVC
#21-13	81-88	DDLRAFQQL	#23-13	89-97	LFLNTLSFV
#21-14	81-87	DDLRAFQQ	#23-14	89-96	LFLNTLSFV

[134]

- [135] #21과 #23 펩타이드에서, 각각 총 14개씩의 잔기 펩타이드를 만들었고, IFN- γ + 스팟 형성을(spot forming unit, SFU)을 ELISpot법을 이용하여 측정하였다(도 5). #21 펩타이드의 경우, 모든 종류의 HLA 타입에서, N 말단의 순차적 잘림은 잔기 82의 제거 이후에 Th1 응답이 감소하였다(도 5a-d). 이러한 결과는 N 말단의 81과 82번 위치의 아미노산이 PBMCs 자극을 위해 중요하다는 것을 시사한다. C 말단의 경우에는, 92, 94, 및 95번 위치의 아미노산이 HLA-A*0201과 A*2402 타입의 CD8+ CTL 세포를 자극하는데 중요한 것으로 나타났으며(도 5a-b), HLA-A*1101과 A*33:03 타입의 CD8+ CTL 세포 자극을 위해서는 94와 95번 위치의 아미노산이 중요한 것으로 나타났다(도 5c-d).
- [136] #23 펩타이드의 경우, HLA-A*0201, A*1101 및 A*3303 타입의 CD8+ CTL 세포 자극을 위해서 C 말단의 100과 103 위치의 아미노산이 항원결정기(에피토프)로서 중요하다(도 5a, 5c-d). 그러나 HLA-A*2402 타입 CD8+ CTL 세포 자극을 위해서는 C 말단의 100, 101 및 103번 잔기의 존재가 중요한 것으로 나타났다(도 5b).
- [137]
- [138] **(6) #21과 #23 펩타이드의 세부 잔기의 세포독성 분석**
- [139] 각각의 HLA class I 에 대한 #21과 #23 펩타이드로부터 생성된 세부 잔기 펩타이드(Truncated peptides)의 효과를 확인하기 위해서, 타겟 세포로서 HLA 매칭된 엡스테인바 바이러스-B림프구(Epstein Barr virus-B lymphoblastoid cell, EBV-BLCs)를 이용하여 세포독성 실험을 실시하였다. #21 펩타이드의 경우(도 6), HLA-A*0201과 A*2402 타입의 CD8+ CTL 세포는 음성 대조군에 비하여 #21-1, #21-8 및 #21-10의 펩타이드에 의해 감작된 EBV-BLCs 세포를 더 많이 용해하였고(도 6a, 6b), HLA-A*1101과 A*3303 타입의 CD8+ CTL 세포는 #21-1과 #21-10의 펩타이드에 의해 감작된 EBV-BLCs 세포를 더 많이 용해하였다(도 6c, 6d).
- [140] #23 펩타이드의 경우(도 7), HLA-A*0201, A*1101 및 A*3303 타입의 CD8+ CTL 세포는 음성 대조군에 비하여 #23-10의 펩타이드에 의해 감작된 EBV-BLCs 세포를 더 많이 용해하였고(도 7a, 7c-d), HLA-A*2402 타입의 CD8+ CTL 세포는 #23-9와 #23-10의 펩타이드에 의해 감작된 EBV-BLCs 세포를 더 많이 용해하였다(도 7b).
- [141]
- [142] #21 펩타이드 및 #23 펩타이드의 세부 잔기(residue) 분석으로부터 얻어진 주요 아미노산 서열은 하기와 같다.
- [143]
- [144] 서열번호 1: DLRAFQQLFLN
- [145] 서열번호 2: DDLRAFQQLFLN
- [146] 서열번호 3: DDLRAFQQLFLNTL
- [147] 서열번호 4: DLRAFQQLFLNTLS

- [148] 서열번호 5: DDLRAFQQLFLNTLS
- [149] 서열번호 6: LFLNTLSFVCPW
- [150] 서열번호 7: LFLNTLSFVCPWC
- [151] 서열번호 8: LFLNTLSFVCPWCAS
- [152]

산업상 이용가능성

- [153] 본 발명의 HPV 타입 18의 E7 펩타이드는 4 종류의 HLA 클래스(HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303)에 중복 결합 가능한 단일 HPV 펩타이드로서, 용이하게 효율이 높은 자궁경부암 치료용 조성물 또는 이를 이용한 진단용 조성물로의 큰 활용이 기대된다.

[154]

서열목록 Free Text

- [155] 서열번호 1: DLRAFQQLFLN
- [156] 서열번호 2: DDLRAFQQLFLN
- [157] 서열번호 3: DDLRAFQQLFLNTL
- [158] 서열번호 4: DLRAFQQLFLNTLS
- [159] 서열번호 5: DDLRAFQQLFLNTLS
- [160] 서열번호 6: LFLNTLSFVCPW
- [161] 서열번호 7: LFLNTLSFVCPWC
- [162] 서열번호 8: LFLNTLSFVCPWCAS

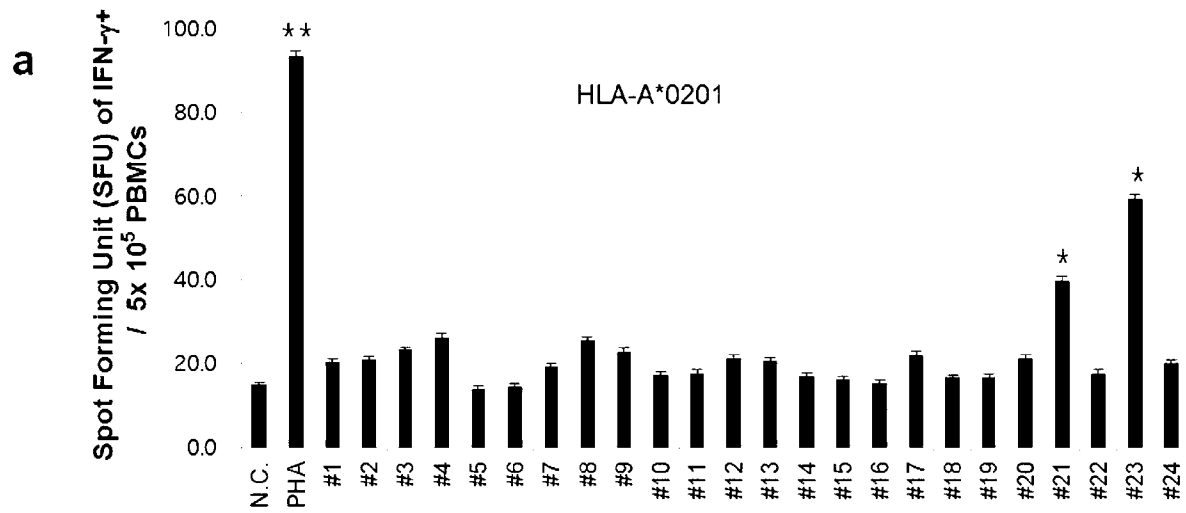
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1을 포함하는 펩타이드.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
서열번호 1의 N말단에 아미노산 아스파르트산(Aspartic acid, D)를 추가로 포함하는 펩타이드.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
서열번호 1의 C말단에 2개의 아미노산을 추가하고, 상기 2개의 아미노산 중 어느 하나가 류신(Leucine, L)인 펩타이드.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
서열번호 1의 N말단에 아미노산 아스파르트산(Aspartic acid, D)를 추가하고, C말단에 2개의 아미노산을 추가하며, 상기 2개의 아미노산 중 어느 하나가 류신(Leucine, L)인 펩타이드.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
서열번호 1의 C말단에 3개의 아미노산을 추가하고, 상기 3개의 아미노산은 순차적으로 트레오닌(Threonine, T), 류신(Leucine, L), 세린(Serine, S)인 펩타이드.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 펩타이드는 서열번호 제 2, 3, 4 및 5 중 어느 하나인 펩타이드.
- [청구항 7] 서열번호 6을 포함하는 펩타이드.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,
서열번호 6의 C말단에 1개의 아미노산을 추가로 포함하는 펩타이드.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서,
상기 펩타이드는 서열번호 7인 펩타이드.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서,
서열번호 7의 C말단에 2개의 아미노산을 추가로 포함하는 펩타이드.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 펩타이드는 서열번호 8인 펩타이드.
- [청구항 12] 제 1항 내지 11항 중 어느 하나의 펩타이드를 코딩하는 핵산.
- [청구항 13] 제 1항 내지 11항 중 어느 하나의 펩타이드와 결합하는 항체.
- [청구항 14] 제 1항 내지 11항 중 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 15] 제 1항 내지 11항 중 어느 하나 이상의 펩타이드 및 약학적으로 수용 가능한 담체를 포함하는 HPV 감염 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서,

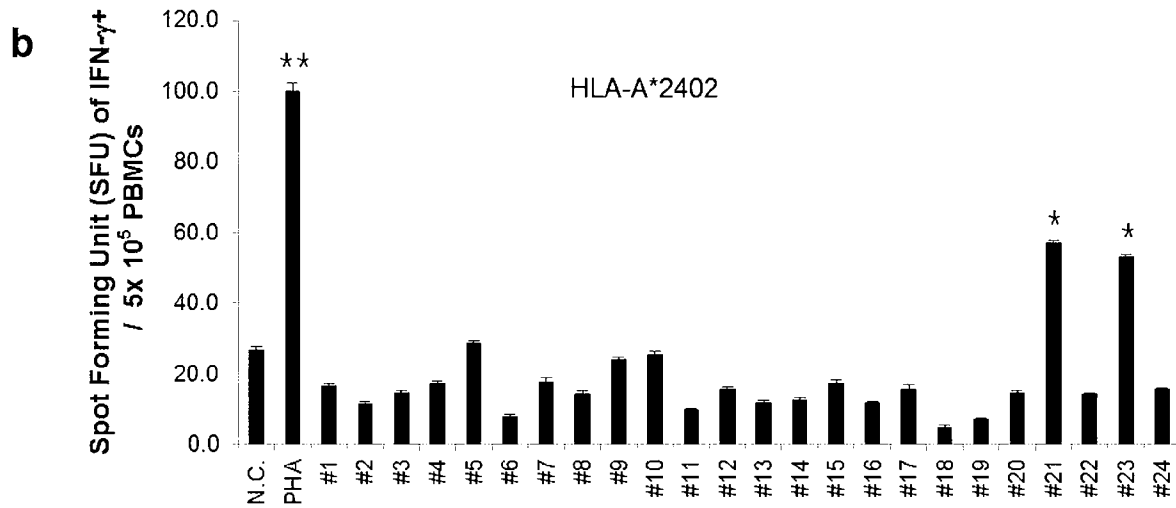
- 상기 HPV 감염 관련 질환은 보웬성 구진(bowenoid papulosis), 항문 이형성(anal dysplasia), 호흡기 또는 결막 유두종, 자궁 경부 이형성증, 자궁경부암, 외음암(vulval cancer), 또는 전립선암인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 17] 제 15항에 있어서,
상기 약제학적 조성물은 CD8+ T세포 자극 및 민감성 향상용인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 18] 제 15항에 있어서,
상기 약제학적 조성물은 HLA-A*0201, A*2402, A*1101 및 A*3303의 어느 하나 이상의 HLA 클래스 타입 환자 특이적인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.
- [청구항 19] 제 1항 내지 11항 중 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 미세입자, 리포솜, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM).
- [청구항 20] 제 12항의 핵산을 포함하는 미세입자, 리포솜, 또는 면역 자극 복합체(ISCOM).
- [청구항 21] 제 1항 내지 11항 중 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 자궁경부암 진단 키트.
- [청구항 22] 제 12항의 핵산을 포함하는 자궁경부암 진단 키트.
- [청구항 23] 제 13항의 항체를 포함하는 자궁경부암 진단 키트.
- [청구항 24] HPV 감염 의심 환자로부터의 검체와 제 1항 내지 11항 중 어느 하나 이상의 펩타이드의 반응 결과로 HPV 감염 여부를 진단하는 것에 관한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 25] HPV 감염 의심 환자로부터의 검체와 제 12항의 핵산을 검출할 수 있는 물질의 반응 결과로 HPV 감염 여부를 진단하는 것에 관한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 26] HPV 감염 의심 환자로부터의 검체와 제 13항의 항체의 반응 결과로 HPV 감염 여부를 진단하는 것에 관한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 27] 제 1항 내지 11항 중 어느 하나 이상의 펩타이드를 포함하는, 인유두종 바이러스 감염 진단용 바이오 마커.
- [청구항 28] (a) HPV 감염 의심 환자에 항바이러스제를 투여한 후 HPV 펩타이드로 감작된 PBMCs의 활성을 측정하는 단계;
(b) HPV 감염 의심 환자에 상기 항바이러스제 및 분석할 시료를 투여한 후 HPV 펩타이드로 감작된 PBMCs의 활성을 측정하는 단계; 및
(c) (a) 단계에서의 PBMCs 활성보다 (b)단계에서의 PBMCs 활성이 더 높을 경우 상기 분석할 시료는 병용투여용 항 바이러스제로 판단하는 단계를 포함하는 병용투여용 항바이러스제 스크리닝

방법.

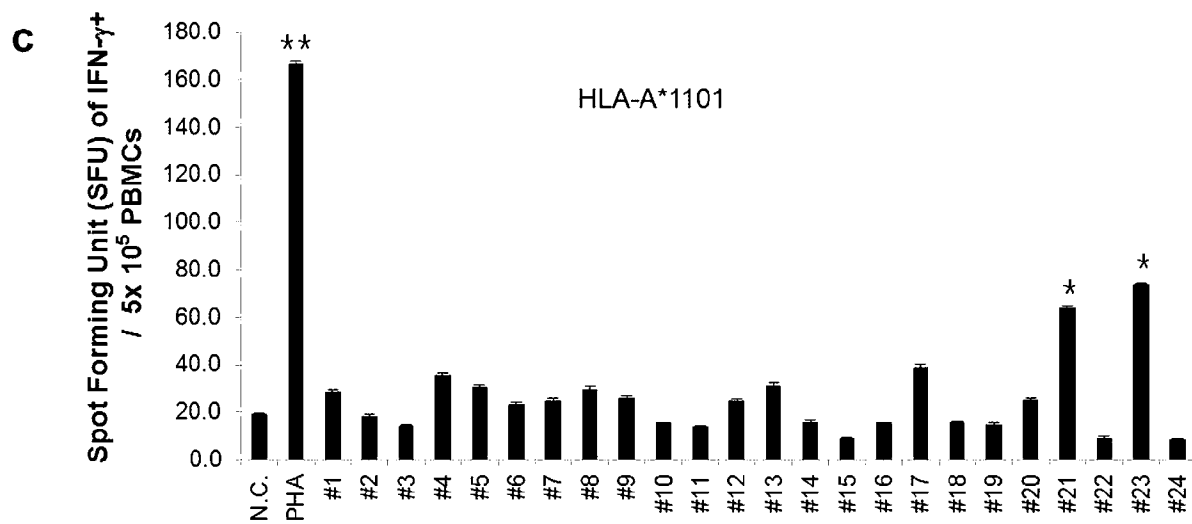
[도 1a]



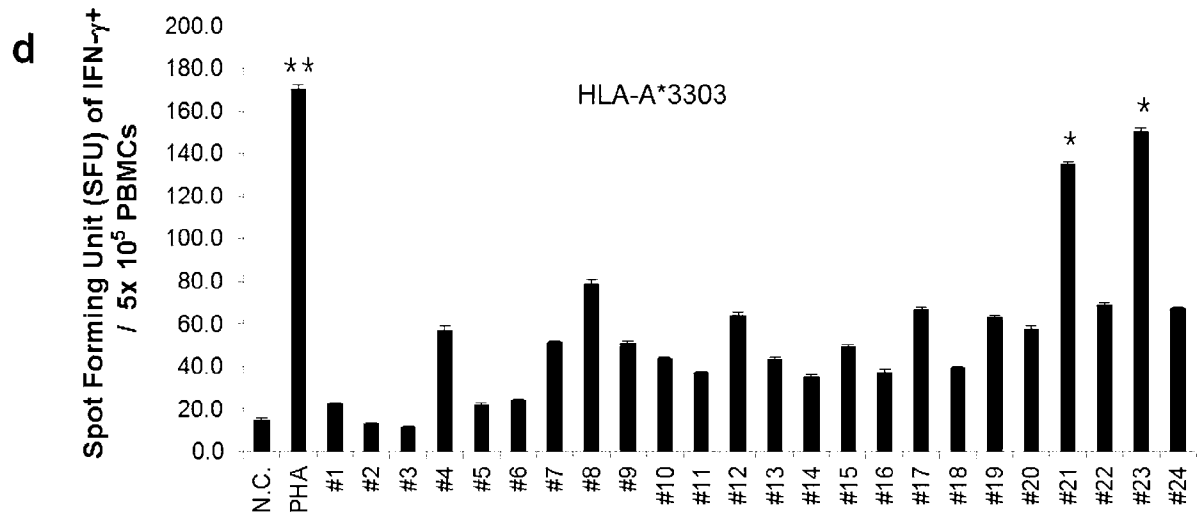
[도 1b]



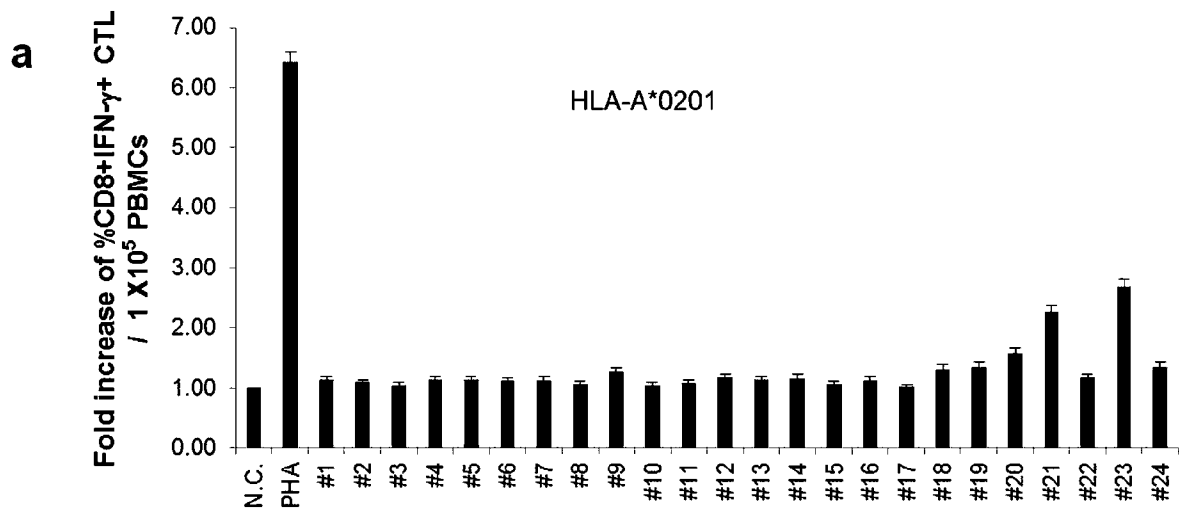
[도 1c]



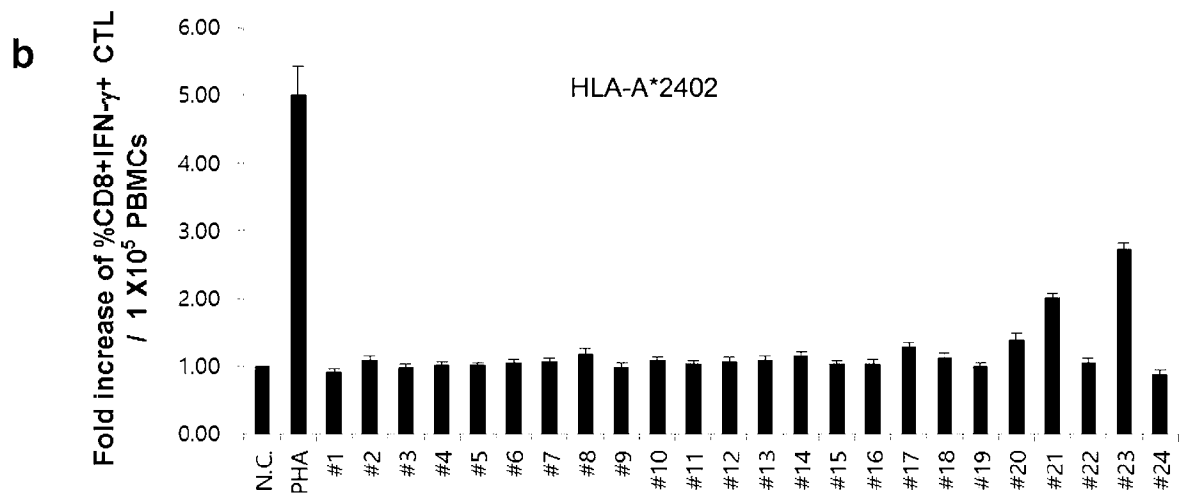
[도1d]



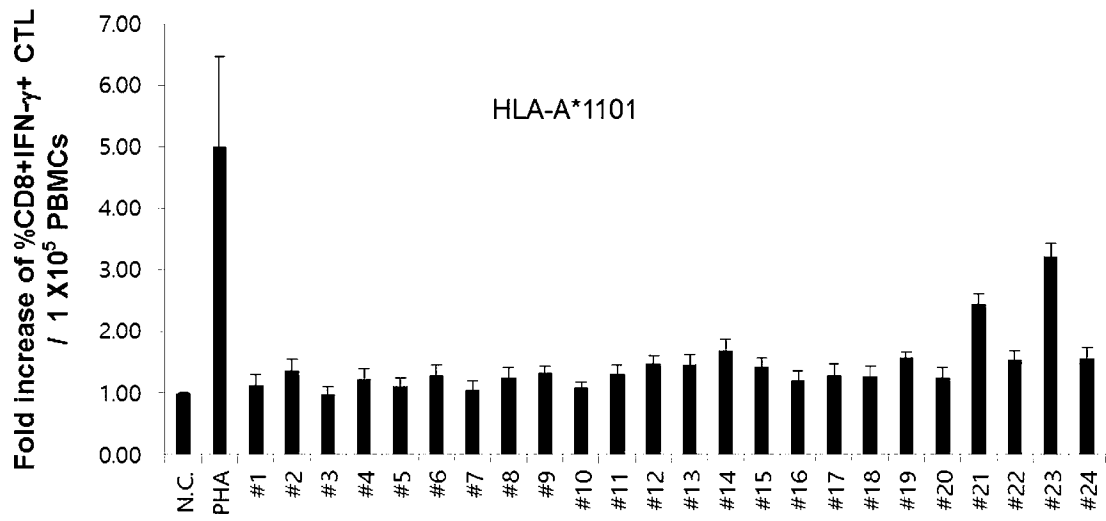
[도2a]



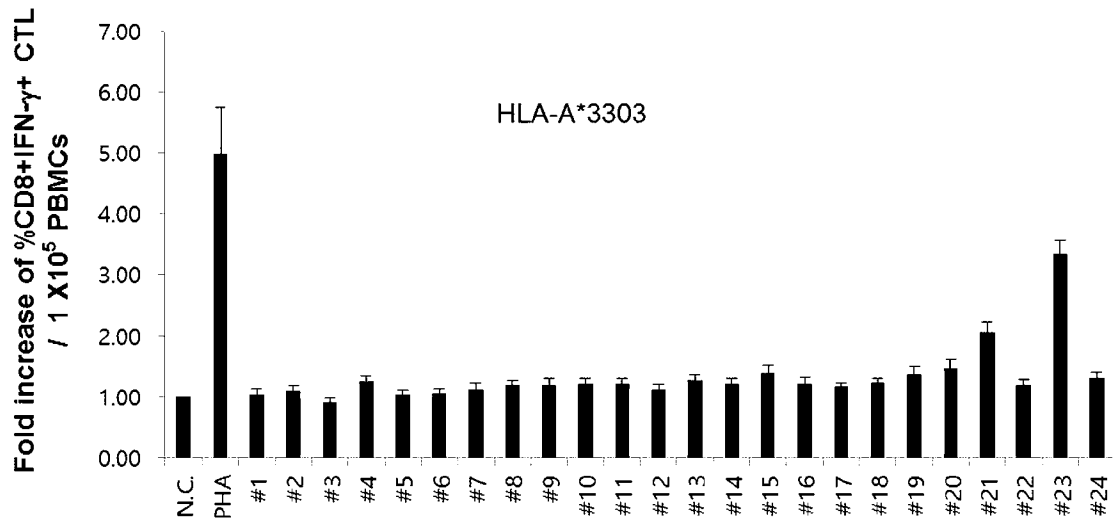
[도2b]



[도2c]

c

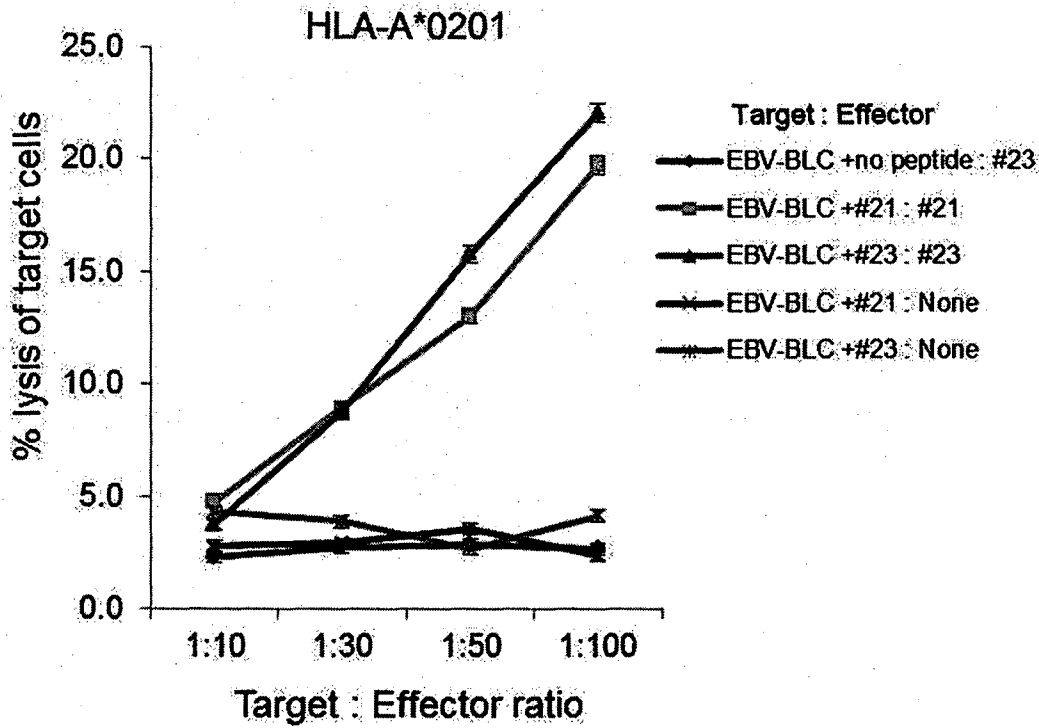
[도2d]

d

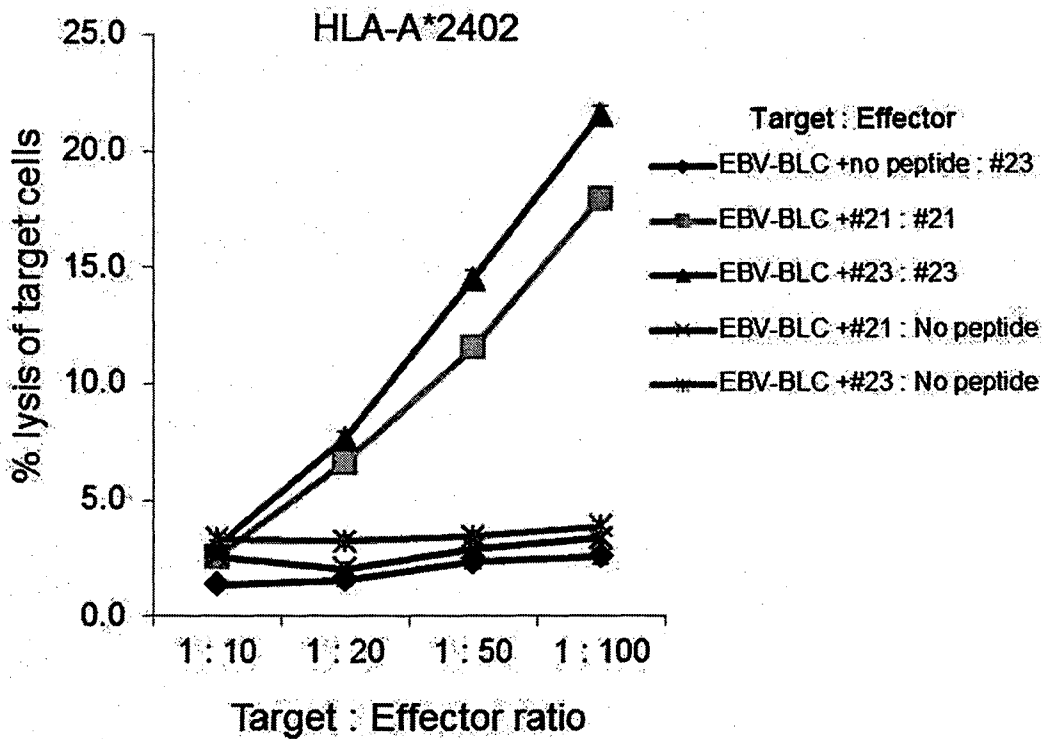
[도3a]

WO 2016/006873

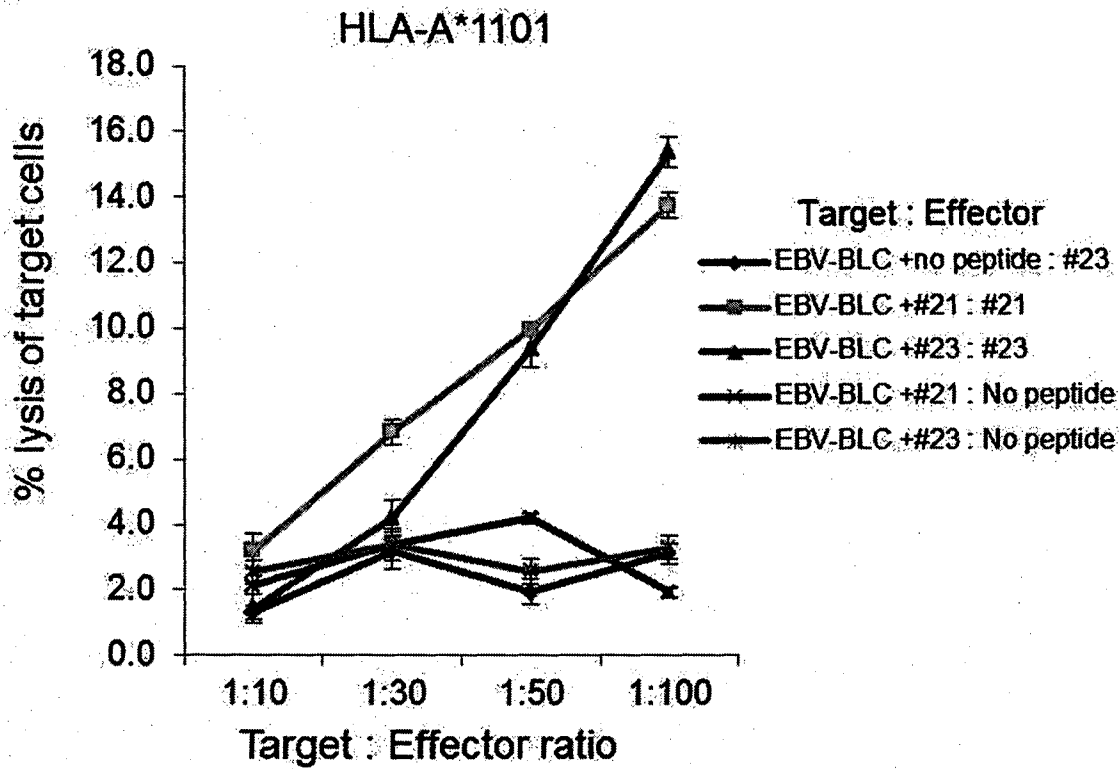
PCT/KR2015/006820

a

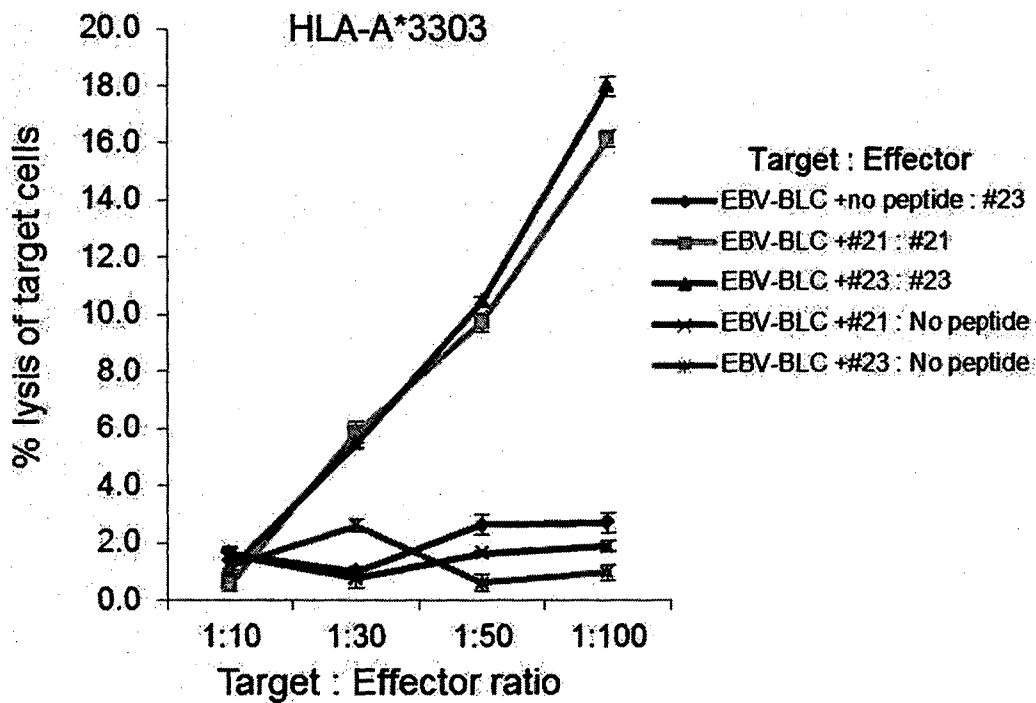
[도3b]

b

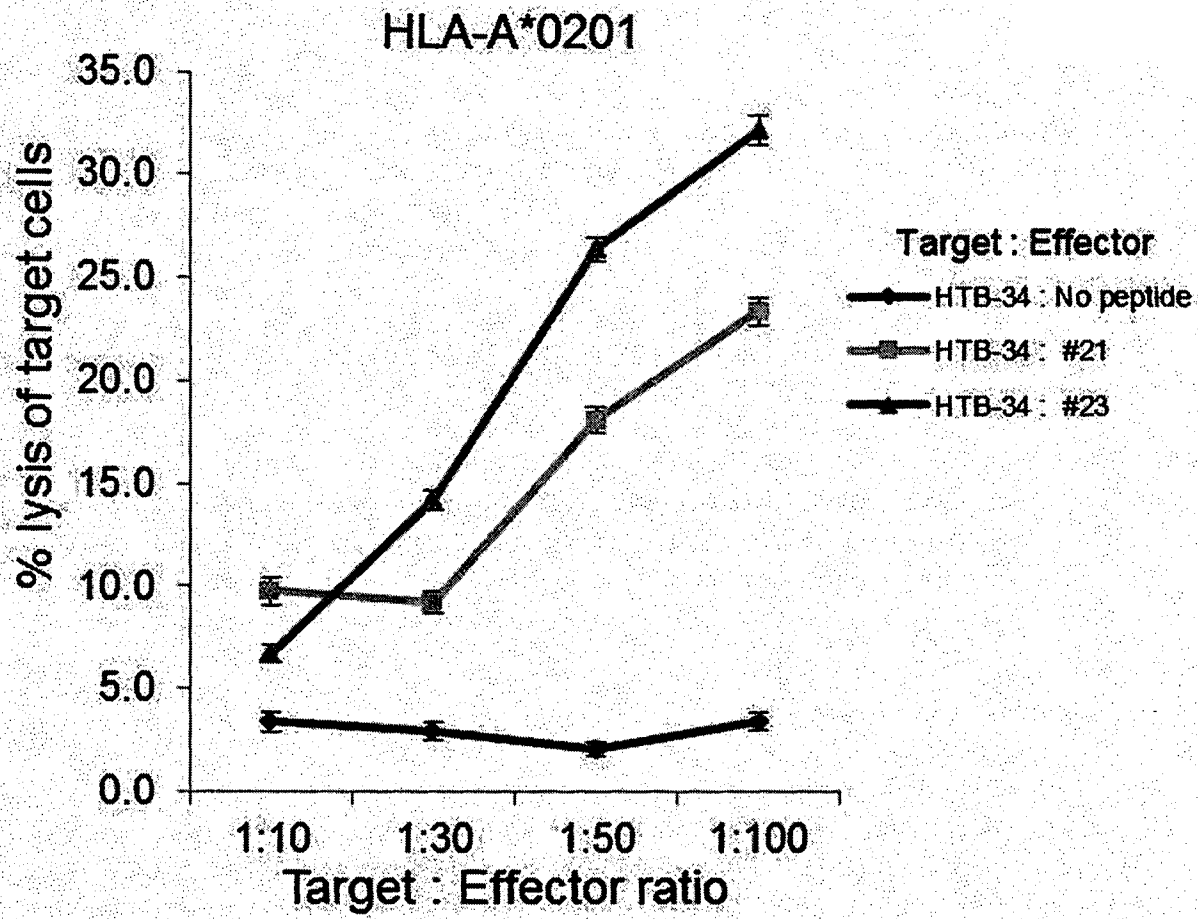
[도3c]

c

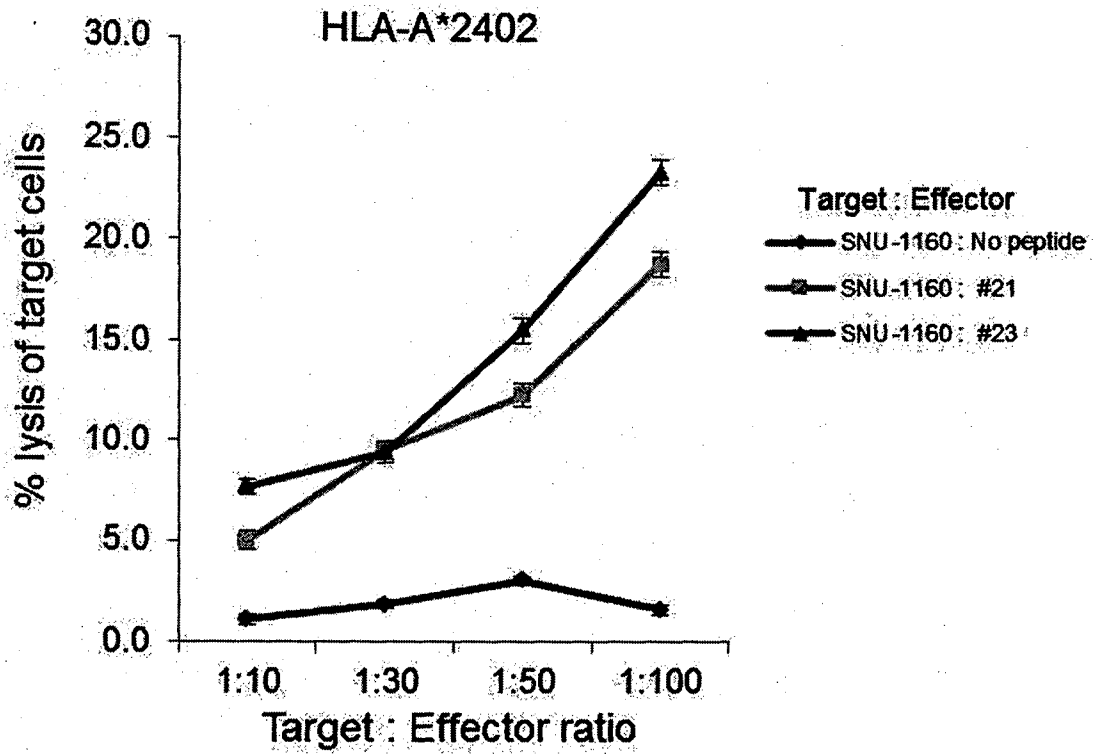
[도3d]

d

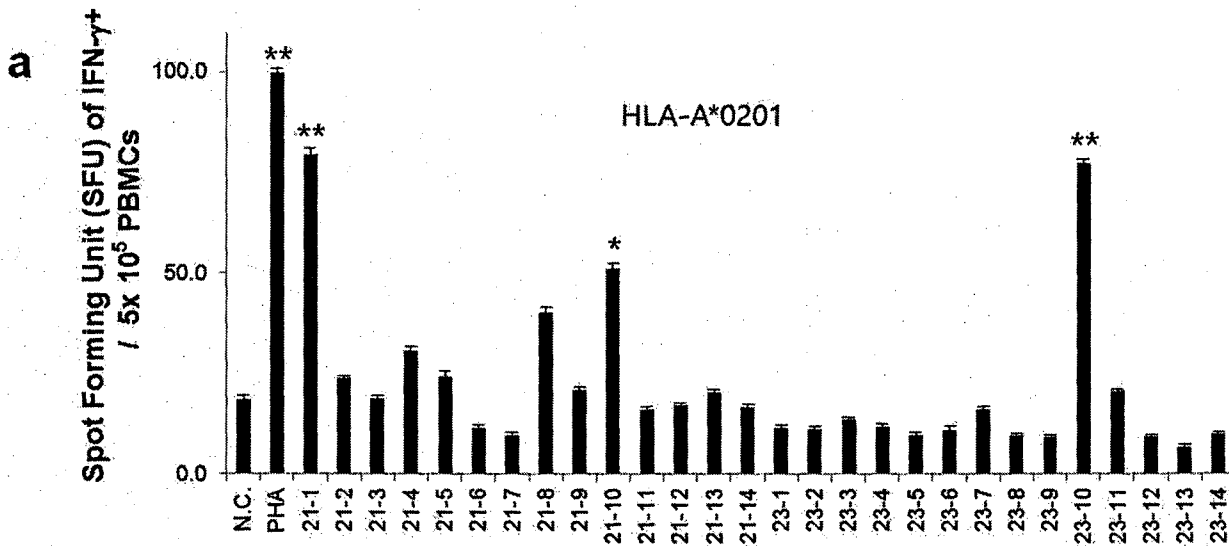
[도4a]

a

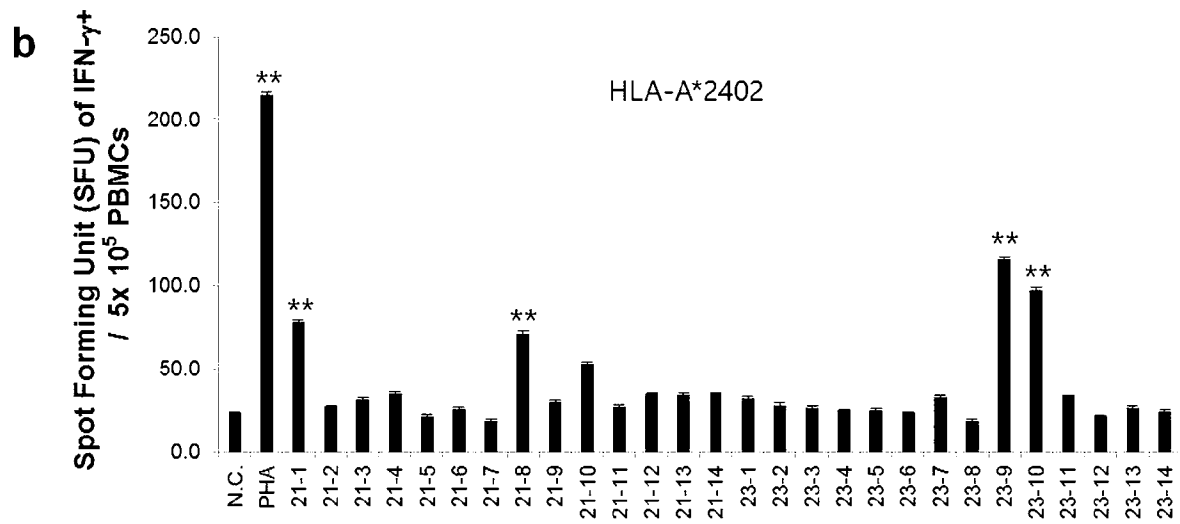
[도4b]

b

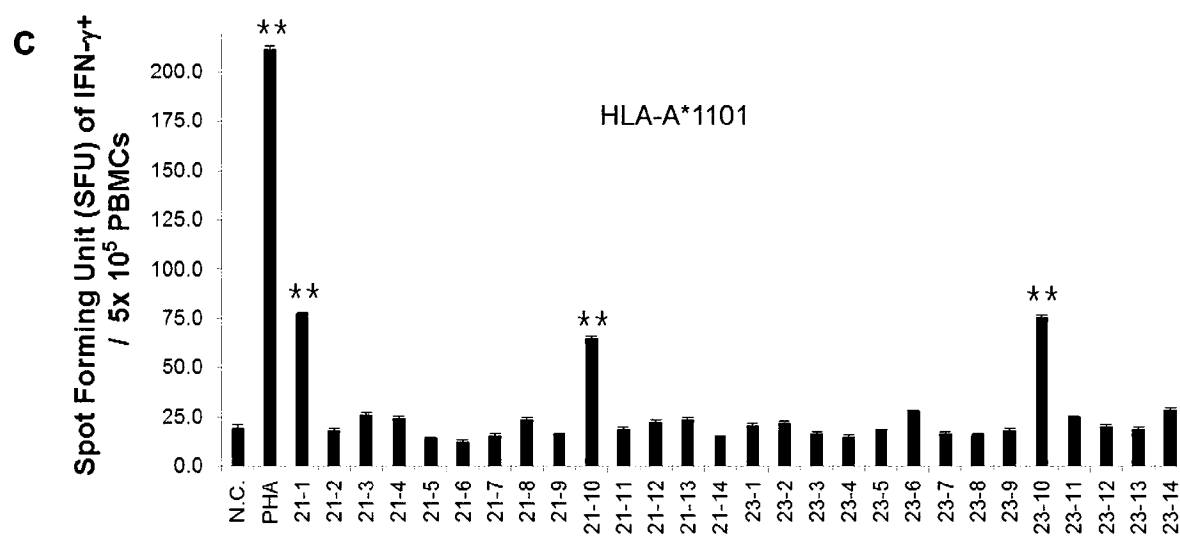
[도5a]



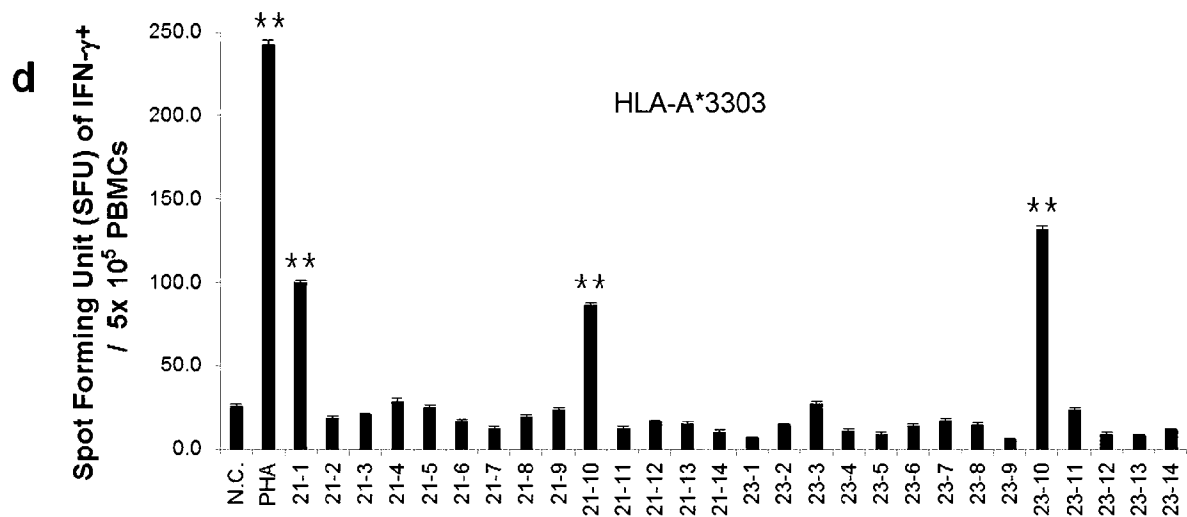
[도5b]



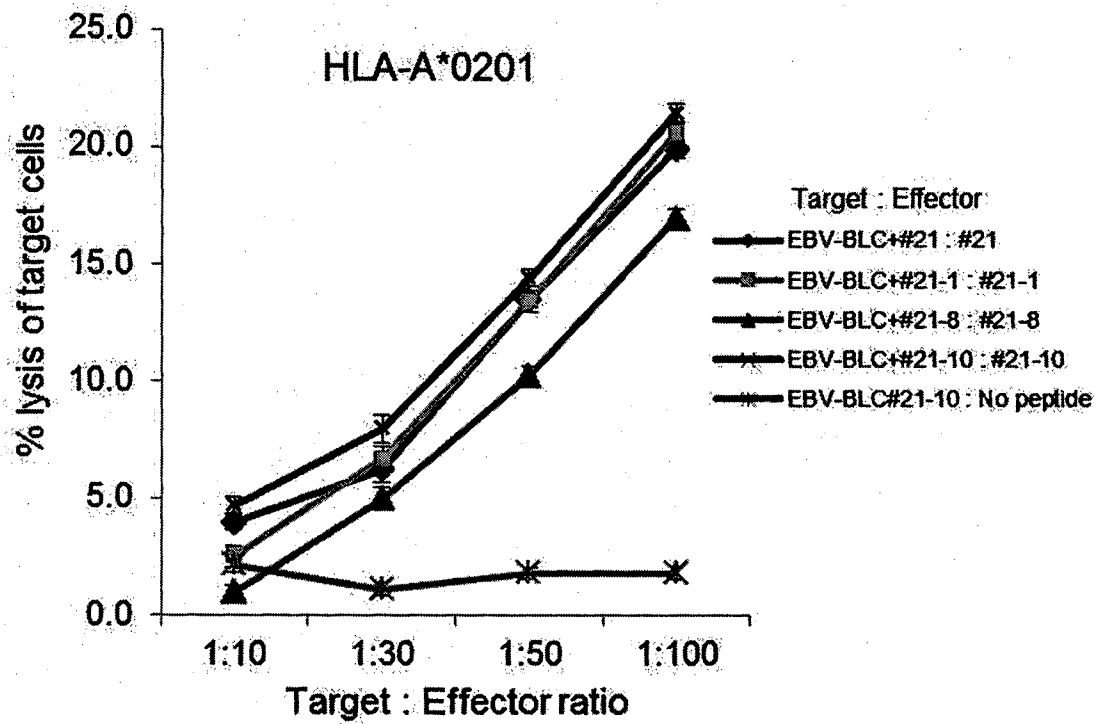
[도5c]



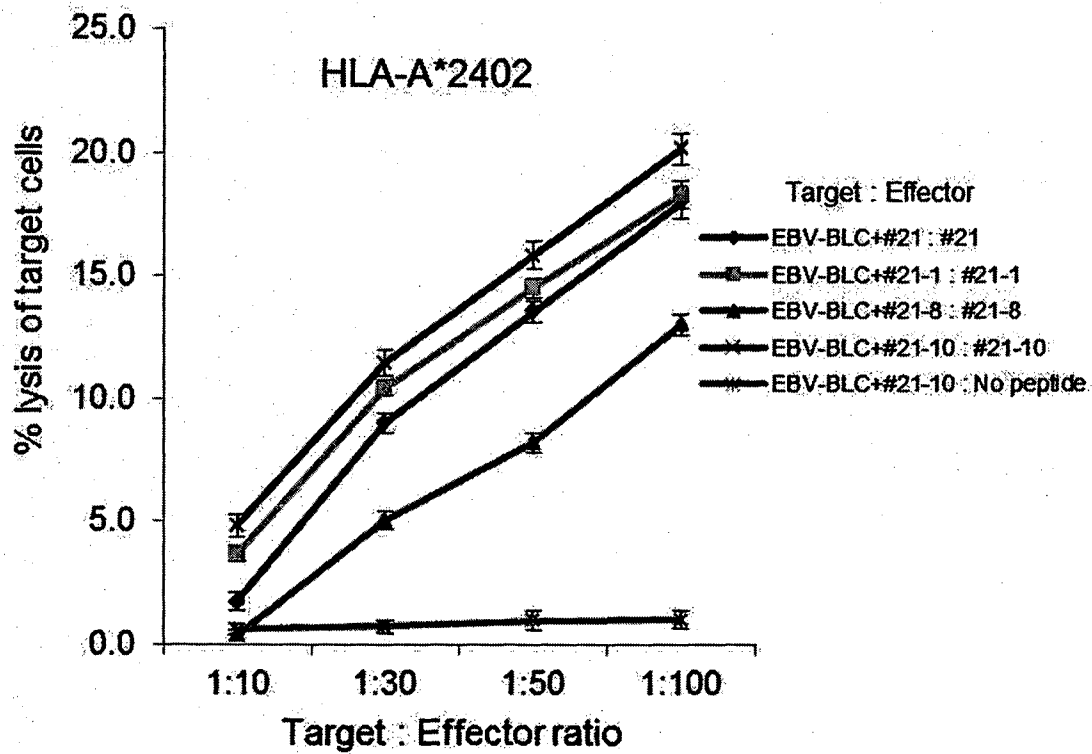
[도5d]



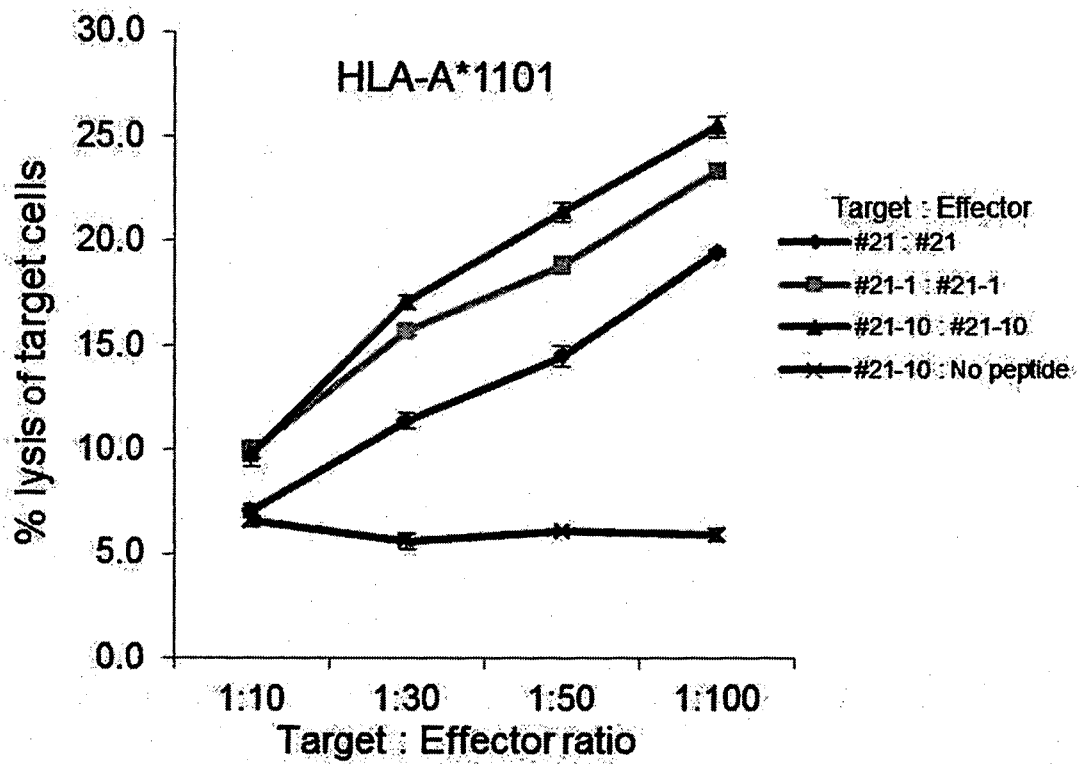
[도6a]

a

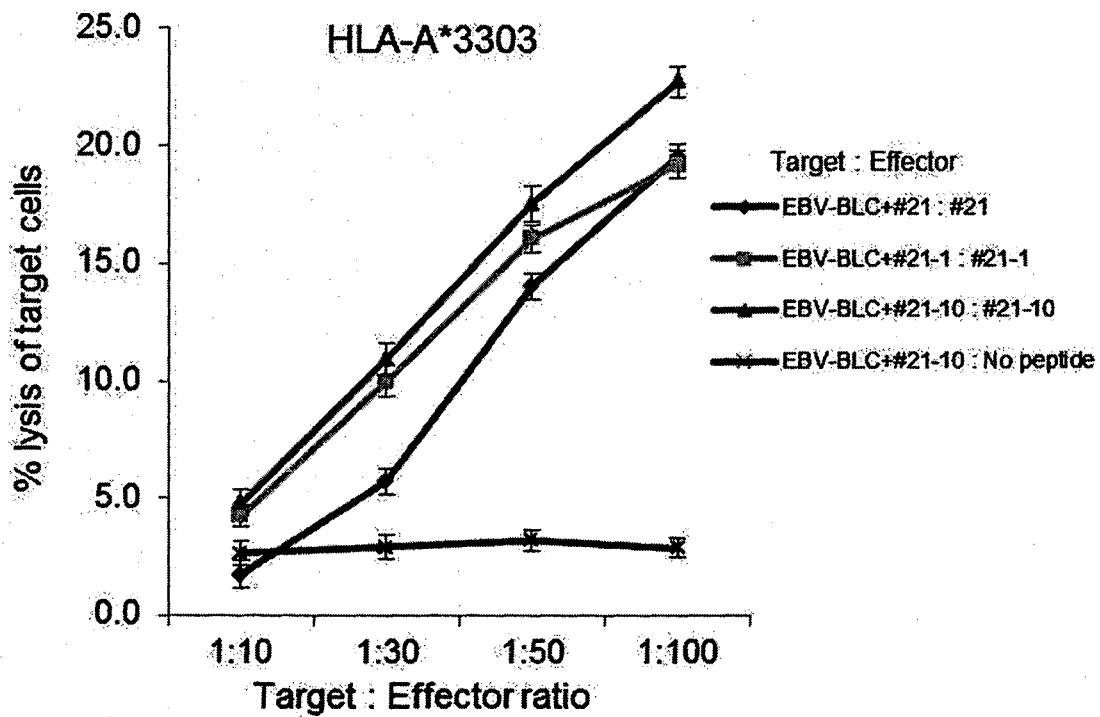
[도6b]

b

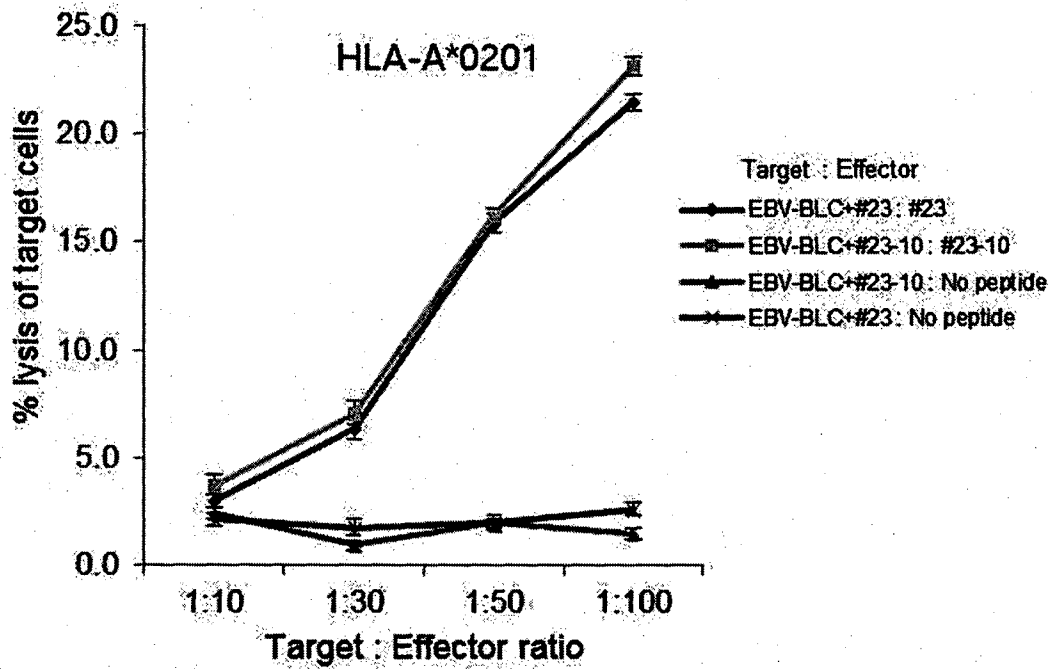
[도6c]

c

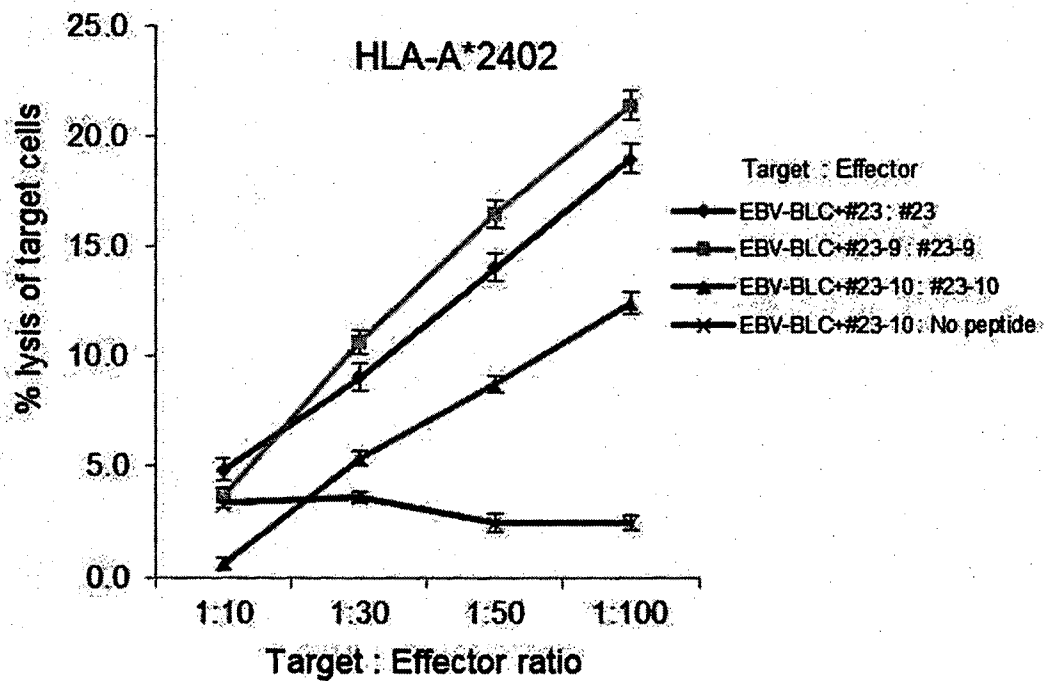
[도6d]

d

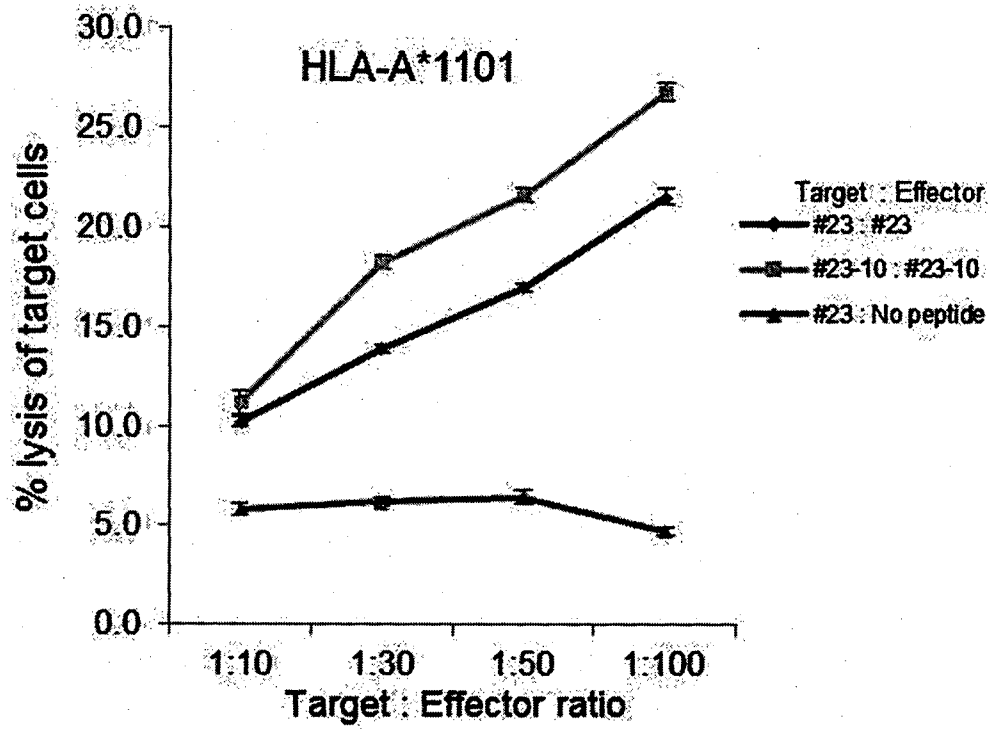
[도7a]

a

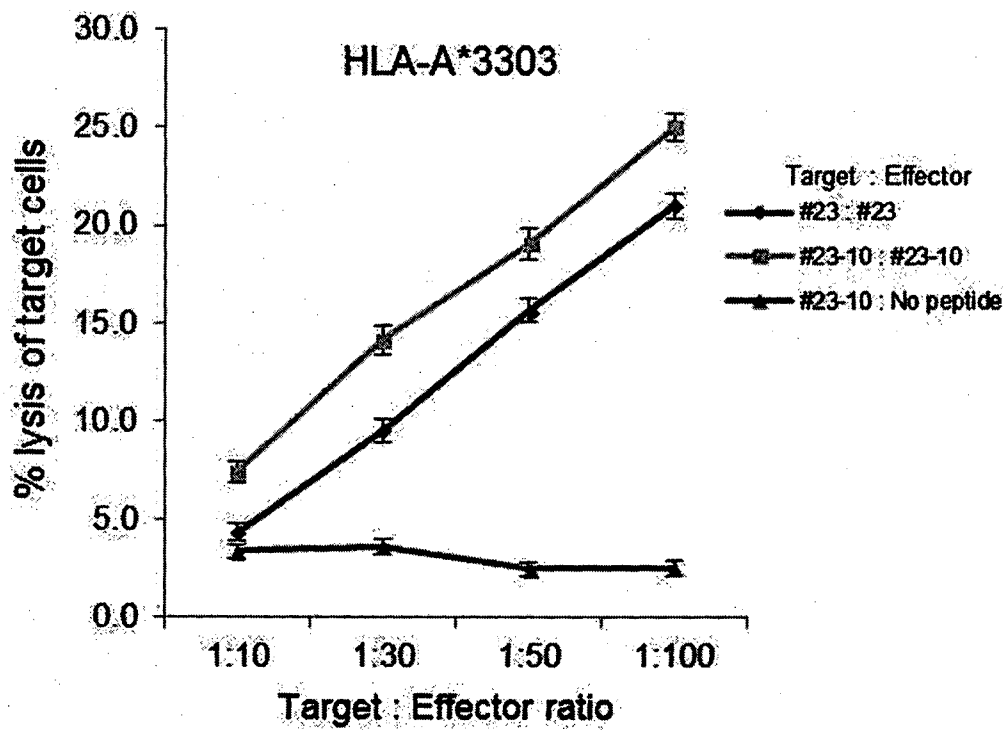
[도7b]

b

[도7c]

c

[도7d]

d

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006820**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 7/08(2006.01)i, C07K 14/025(2006.01)i, A61K 39/12(2006.01)i, C12N 15/37(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 7/08; A61K 39/285; C07K 9/00; C07K 14/00; A61K 39/12; C07K 14/025; C12N 15/37

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: HPV(Human papillomavirus), cervical cancer, peptide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004-0101533 A1 (MULLER, Rainer et al.) 27 May 2004 See table 1(Q51, Q52); claims; [0011]; [0043]; [0058]; [0083]; [0090]; [0109]; [0112]; [0115]	1-18,24-26
Y		19-23,27
Y	KR 10-2009-0103571 A (BIOCORE CO., LTD.) 01 October 2009 See claims; [0030]	19-20,27
A		1-18,21-26
Y	KR 10-0203547 B1 (BEHRINGWERKE AG.) 15 June 1999 See pages 1-2	21-23
A		1-20,24-27
A	SERESINI, S., et al., "CD4+ T cells against human papillomavirus-18 E7 in patients with high-grade cervical lesions associate with the absence of the virus in the cervix" IMMUNOLOGY, 2010, Vol. 131, pp. 89-98 See summary; materials and methods	1-27



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

19 OCTOBER 2015 (19.10.2015)

Date of mailing of the international search report

19 OCTOBER 2015 (19.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006820

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.: **28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as in claim 28 relates to a method for treatment of the human body by therapy, and thus relates to 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/KR2015/006820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2004-0101533 A1	27/05/2004	AU 2002-233220 A8	11/06/2002
		AU 2002-33220 A1	11/06/2002
		AU 3322002 A	11/06/2002
		DE 10059630 A1	06/06/2002
		WO 02-043757 A3	17/10/2002
		WO 02-43757 A2	06/06/2002
KR 10-2009-0103571 A	01/10/2009	WO 2009-120022 A2	01/10/2009
		WO 2009-120022 A3	23/12/2009
KR 10-0203547 B1	15/06/1999	CA 2042236 A1	11/11/1991
		CA 2042236 C	09/07/2002
		EP 0456197 A1	13/11/1991
		JP 03-401022B2	28/04/2003
		JP 03-676195B2	27/07/2005
		JP 03-717755B2	16/11/2005
		JP 04-227000A	17/08/1992
		JP 2001-017190A	23/01/2001
		JP 2001-026600A	30/01/2001
		US 05753233 A	19/05/1998
		US 6322794 B1	27/11/2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/08(2006.01)i, C07K 14/025(2006.01)i, A61K 39/12(2006.01)i, C12N 15/37(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/08; A61K 39/285; C07K 9/00; C07K 14/00; A61K 39/12; C07K 14/025; C12N 15/37

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:HPV(Human papillomavirus), 자궁경부암, 펩타이드

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2004-0101533 A1 (RAINER MULLER 등) 2004.05.27 Table 1(Q51, Q52); Claims: [0011]; [0043]; [0058]; [0083]; [0090]; [0109]; [0112]; [0115] 참조	1-18, 24-26
Y		19-23, 27
Y	KR 10-2009-0103571 A (바이오코아 주식회사) 2009.10.01 Claims: [0030] 참조	19-20, 27
A		1-18, 21-26
Y	KR 10-0203547 B1 (베링게르케아크티엔게젤샤프트) 1999.06.15 Pages 1-2 참조	21-23
A		1-20, 24-27
A	SERESINI, S., et al., `CD4+ T cells against human papillomavirus-18 E7 in patients with high-grade cervical lesions associate with the absence of the virus in the cervix` IMMUNOLOGY, 2010, Vol. 131, pp. 89-98 Summary; Materials and methods 참조	1-27

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 19일 (19.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 19일 (19.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

박정용

전화번호 +82-42-481-3355



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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 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:

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: 28
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 28 발명은 치료에 의한 사람의 처치방법을 포함하고 있으므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약 규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사 기관이 국제조사할 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 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2004-0101533 A1	2004/05/27	AU 2002-233220 A8 AU 2002-33220 A1 AU 3322002 A DE 10059630 A1 WO 02-043757 A3 WO 02-43757 A2	2002/06/11 2002/06/11 2002/06/11 2002/06/06 2002/10/17 2002/06/06
KR 10-2009-0103571 A	2009/10/01	WO 2009-120022 A2 WO 2009-120022 A3	2009/10/01 2009/12/23
KR 10-0203547 B1	1999/06/15	CA 2042236 A1 CA 2042236 C EP 0456197 A1 JP 03-401022B2 JP 03-676195B2 JP 03-717755B2 JP 04-227000A JP 2001-017190A JP 2001-026600A US 05753233 A US 6322794 B1	1991/11/11 2002/07/09 1991/11/13 2003/04/28 2005/07/27 2005/11/16 1992/08/17 2001/01/23 2001/01/30 1998/05/19 2001/11/27