

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2019년 7월 11일 (11.07.2019) WIPO | PCT

WO 2019/135668 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/735 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/000274
- (22) 국제출원일: 2019년 1월 8일 (08.01.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0002248 2018년 1월 8일 (08.01.2018) KR
- (71) 출원인: 주식회사 프로젠 (PROGEN CO., LTD.) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, 1201호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 성영철 (SUNG, Young Chul); 04385 서울시 용산구 서빙고로 67, 101동 404호, Seoul (KR). 양정윤 (YANG, Zungyoon); 22009 인천시 연수구 컨벤시아대로252번길 70, 1303동 602호, Incheon (KR).
- (74) 대리인: 제일특허법인(유) (FIRSTLAW P.C.); 06775 서울시 서초구 마방로 60, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

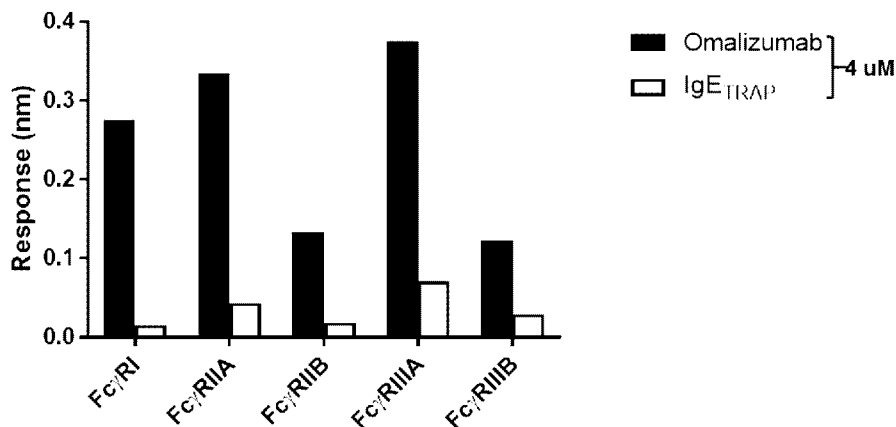
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

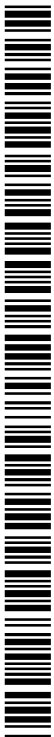
(54) Title: EXTRACELLULAR DOMAIN OF ALPHA SUBUNIT OF IGE FC RECEPTOR, PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 발명의 명칭: IGE FC 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention provides a polypeptide protein dimer comprising two monomers comprising an extracellular domain of an alpha subunit of an IgE Fc receptor (FcεRIa-ECD). The protein dimer according to the present invention is excellent in IgE binding ability and lacks ADCC and CDC functions when compared with a conventional therapeutic agent comprising an anti-IgE antibody, and has an advantage of fewer other side effects, and therefore, the protein dimer may be applied to medicine for therapeutic or prophylactic use against allergic diseases mediated by IgE.

(57) 요약서: 본원 발명은 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체 단백질을 제공한다. 본원 발명에 따른 이량체 단백질은 기존의 항 IgE 항체를 포함하는 치료제에 비하여 IgE 결합능이 우수하면서 ADCC 및 CDC 기능이 결여되어 있어 기타 부작용이 적은 장점이 있는 바, IgE에 의해 매개되는 알러지성 질환에 대한 치료 또는 예방 용도의 의약품에 적용될 수 있다.



WO 2019/135668 A1

명세서

발명의 명칭: IGE FC 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본원 발명은 변형된 IgE Fc 수용체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 천식을 비롯한 알러지비염, 아토피피부염, 식품알러지 등 알러지 질환은 산업화, 서구화된 현대사회에서 높은 속도로 확산되고 있으며, 중증 알러지 질환인 아나필락시스의 발생도 증가하고 있다. 이러한 만성 면역질환은 개인 삶의 질을 매우 떨어트리며 이에 따른 사회경제적 비용도 급증하고 있어, 이를 극복하기 위한 대책이 절실한 실정이다.
- [3] 대부분의 알러지 질환은 면역글로불린 E(IgE)의 과잉 면역반응에 의해 유발된다. IgE는 정상 상태에서는 혈청 중에 아주 낮은 농도로 존재하는 항체이다. IgE는 일반적으로 무해한 항원에 의해서 생성되기도 하며, 특별한 자극 없이도 IgE가 증가되는 경우가 있는데 이러한 경우에 알러지 질환이 야기될 수 있다. 비정상적으로 증가된 IgE가 비만 세포(Mast cell)와 호염기성 과립구(basophils) 등의 표면에 발현되는 고친화성 IgE Fc 수용체(FcεRI)에 결합할 수 있다. 이러한 결합에 의해 비만 세포나 호염기성 과립구는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 브라디키닌 및 혈소판-활성화 인자 등 화학 매개자를 방출 하게 된다. 이러한 화학 매개자의 방출에 의해 알러지 증상이 발생하게 된다. 특히, 알러지 질환은 IgE 및 FcεRI 사이의 결합으로 증상이 악화 될 수 있다. FcεRI-발현 세포는 알러지 환자에서 증가한다고 알려져 있다.
- [4] 현재 알러지 질환을 치료하기 위하여, 알레르겐 회피, 항알러지 약물 투여, 체내 IgE 합성 조절, 항 IgE 항체 개발 등 여러가지 방법이 제안되었다. 그러나, 현재까지 알려진 치료 방법은 알러지의 근본 원인을 치료할 수 없고, 약제의 효능이 불충분하거나, 심각한 부작용이 발생하는 등 많은 단점을 가지고 있다.
- [5] 또한, IgE 및 FcγRIIb에 고친화성으로 결합하며, IgE를 발현하는 세포를 억제할 수 있는 면역글로불린 조성물이 연구되고 있다(KR10-1783272B1). 이러한 조성물은 알러지 및 천식을 포함하여 IgE-매개된 장애를 치료하는데 유용하다고 보고된 바 있다. 또한, IgE 항체의 Fc 일부분을 표적으로 하는 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))이 개발되어 난치성 중증 천식과 난치성 두드러기 치료제로 사용되고 있다.
- [6] 하지만, 효과를 유지하기 위해서는 고용량으로 투여되어야 하기 때문에 비용부담이 크고, 혈관부종, 아나필락시스 반응 등의 부작용이 있다는 것이 보고되었다(The Journal of Clinical Investigation Volume 99, Number 5, March 1997, 915-925). 그뿐 아니라, 시판 후 결과를 통해 알러지성 육아종 혈관염, 특발성

중증 혈소판감소증이 보고되고 있어, 부작용 없이 알러지 질환을 효율적으로 치료할 수 있는 치료제 개발에 대한 필요성이 증가하고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본원 발명의 목적은 IgE 매개 알러지 질환을 치료하기 위한 폴리펩티드 이량체 단백질을 제공하는 것이다. 본원 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공하는 것이다. 본원 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리펩티드 이량체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 해결하기 위하여, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 제공한다. 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며, 상기 변형된 Fc 영역과 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 IgD 항체의 힌지를 통해 결합된 것을 특징으로 한다. 또 다른 측면으로, 상기 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본원 발명에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질은 기존에 사용되는 항-IgE 항체에 비하여 안전성 및 체내 지속성이 우수할 뿐만 아니라, IgE와의 결합력이 기존에 사용되는 항-IgE 항체인 오말리주맙 대비 70배로 높아 IgE에 매우 강하게 결합하므로, 투여 주기를 늘릴 수 있다. 또한, 본원 발명에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질은 IgE 만을 단일표적으로 하고, Fc gamma receptor에는 결합하지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 변형된 Fc가 적용된 물질이다. 따라서, IgG1 Fc 영역을 포함하고 있는 기존 항 IgE 항체와 달리 Fc gamma 수용체와 결합하지 않기 때문에 비만 세포 표면의 Fc gamma 수용체와의 결합에 의한 매개자 방출을 억제할 수 있어, IgG1과 비만세포의 Fc gamma 수용체 III와의 결합에 의해 유발될 수 있는 아나필락시스 발생 등의 심각한 부작용을 최소화할 수 있다. 따라서, 종래의 항-IgE 항체를 포함하는 치료제를 대체할 수 있는 새로운 약학적 조성물로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 각 세포주에서 생산된 단백질의 SDS-PAGE 및 Gel IEF(isoelectric focusing) 결과이다. 이때, 환원성 및 비환원성 모두에서 절단형이 생성되지 않고, 시알산 전이효소 유전자 도입에 의한 시알산 함량 증가로 인해 acidic 단백질의 함량이 증가하였음을 알 수 있다.
- [11] 도 2는 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질의 비환원된 형태 및 환원된 형태 단백질의 SDS-PAGE 결과이다. 특히, Input에 해당하는 배양

상등액에서도 폴리펩티드 이량체의 순도가 높은 것을 알 수 있다.

- [12] 도 3은 오말리주맙의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 그래프이다. 오말리주맙을 고정하고 IgE의 처리 농도에 따른 결합능을 분석한 결과이다.
- [13] 도 4는 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질의 IgE에 대한 결합능을 나타내는 그래프로써, 이량체 단백질을 고정하고 IgE의 처리 농도에 따른 결합능을 분석한 결과이다.
- [14] 도 5는 본 발명의 일 구체예인 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP})과 오말리주맙의 IgG 수용체 FcγRI(도 5a), FcγRIIA(도 5b), FcγRIIB(도 5c), FcγRIIIA(도 5d) 및 FcγRIIIB(도 5e)와의 상호 작용을 bio-layer interferometry(BLI) 분석법으로 확인한 결과이다.
- [15] 도 6은 IgE_{TRAP}과 IgG 수용체, 및 오말리주맙과 IgG 수용체의 결합력을 수치화한 그래프이다.
- [16] 도 7은 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP})의 농도에 따른 마우스 유래 비만 세포의 활성 억제력을 보여주는 그래프이다.
- [17] 도 8은 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질(IgE_{TRAP}) 및 Xolair(오말리주맙)의 농도에 따른 인간 FcεRI 발현 마우스 유래 비만 세포의 활성 억제력을 비교해서 보여주는 그래프이다.
- [18] 도 9는 식품 알러지 모델에서 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체 단백질의 투여 효과를 나타내는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 본원 발명은 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체에 대한 것으로서, 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며, 상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIa-ECD는 IgD 항체의 힌지를 통해 연결된 것을 특징으로 하는 폴리펩티드 이량체를 제공한다.
- [20] 본 명세서에서 사용한 용어, "IgE"는 면역글로불린 E로 알려진 항체 단백질을 의미한다. IgE는 비만세포나 혈중의 호염기구 등에 친화성을 가진다. 또한, IgE 항체와 그것에 대응하는 항원(알레르겐)이 반응하면 염증반응을 일으킨다. 또한, IgE는 비만 세포 또는 호염기구가 갑자기 분비되어 나타나는 아나필락시스(anaphylaxis)를 일으키는 항체로 알려져 있다.
- [21] 본 명세서에서 사용한 용어, "IgE Fc 수용체"란 Fcε수용체라고도 불리우며, IgE의 Fc 부분과 결합한다. 상기 수용체는 2 종류가 존재한다. IgE Fc에 대해 고친화성인 수용체는 Fcε수용체I(FcεRI)라고 한다. IgE Fc에 대해 저친화성인 수용체는 Fcε수용체II(FcεRII)라고 한다. FcεRI은 비만세포, 호염기구에서 발현된다. FcεRI에 결합한 IgE 항체가 다가 항원에 의해 가교되면, 비만세포 또는 호염기구에서 탈과립이 생겨 히스타민을 비롯한 여러 가지 화학 전달 물질을 방출한다. 이러한 방출에 의해 즉시형 알러지 반응이 나타난다.
- [22] 상기 FcεRI는 하나의 α사슬과 한 개의 β사슬 및 2황화 결합한 2개의 γ사슬로

구성된 막단백질이다. 이 중 IgE가 결합하는 부분은 α 사슬(Fc ϵ RI α)로서, Fc ϵ RI α 는 60 kDa 정도의 크기를 가지며, 세포막 안에 존재하는 소수성 도메인과 세포막 외부에 존재하는 친수성 도메인으로 구성된다. 특히, α 사슬의 세포외 도메인에 IgE가 결합하게 된다.

- [23] 구체적으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛은 NP_001992.1에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(Fc ϵ RI α -ECD)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 본 명세서에서 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 IgE와 결합을 할 수 있는 한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인의 단편 또는 변이체일 수 있다.
- [24] 상기 변이체는 Fc ϵ RI의 α 사슬의 기능을 변형시키지 않는 한, 야생형 Fc ϵ RI α -ECD(Extracellular domain)에서 하나 이상의 단백질을 치환, 결실 또는 추가하는 방법을 통하여 수행될 수 있다. 이러한 다양한 단백질 또는 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 것일 수 있다. 또한, 서열번호 1의 Fc ϵ RI α -ECD는 서열번호 5의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [25] 또한, 본 명세서에서 사용한 용어, "변형된 Fc 영역"은 항체의 Fc 부분 중 일부가 변형된 영역을 의미한다. 이때, 용어 "Fc 영역"는 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 특히, 변형된 Fc 영역은 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 서열번호 2의 변형된 Fc 영역은 서열번호 6의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [26] 또한, 본원 발명의 "변형된 Fc 영역"은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린 Fc 당쇄를 변형시킬 수 있다.
- [27] 이때, 본원 발명의 "변형된 Fc 영역"은 Fc γ R 또는 C1q에 대한 결합 부위를 갖지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 것일 수 있다. 또한, 상기 변형된 Fc 영역과 Fc ϵ RI α -ECD는 IgD 항체의 힌지를 통해 연결될 수 있다. 상기 IgD 항체의 힌지는 64개 아미노산으로 이루어져 있으며, 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 선택되어 포함될 수 있다. 일 구체예로 IgD 항체의 힌지는 하기의 30개 또는 49개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 IgD 항체의 힌지는 상기 힌지 영역을 변형시킨 힌지 변이체일 수 있으며, 상기 힌지는 적어도 하나의 시스테인을

포함할 수 있다. 이때, 상기 힌지 변이체는 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화하기 위해 IgD 항체의 힌지 서열에서 일부를 변형한 것일 수 있다.

[28] 일 실시예로, 힌지는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:

[29] Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 17), 이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly 일 수 있으며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 힌지는 서열번호 3 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[30] 힌지의 또 다른 실시예로 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:

[31] Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18)이며, 이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly 이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 힌지는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[32] 특히, 서열번호 4의 서열을 갖는 힌지에 있어서, Thr 중 적어도 하나는 글리코실레이션 될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 18의 아미노산 중, 13번째, 14번째, 18번째 및 19번째의 Thr이 글리코실레이션 될 수 있다. 바람직하게 4개의 아미노산이 모두 글리코실레이션 될 수 있다. 이때, 상기 글리코실레이션은 O-글리코실레이션일 수 있다.

[33] 또한, 본원 발명에서 제공하는 폴리펩티드 이량체는 상술한 바와 같이, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인과 변형된 Fc 영역이 결합된 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 상기 폴리펩티드 이량체는 동일한 두 개의 단량체가 힌지 부위에 위치한 시스테인에 의해 결합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리펩티드 이량체는 서로 상이한 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 예를 들어, 두 개의 단량체가 서로 다른 경우는, 하나의 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하고, 다른 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인의 단편을 포함한 형태일 수 있다. 이때, 상기 단량체의 일 구체에는 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[34] 또한, 본원 발명에서 제공하는 폴리펩티드 이량체는 항-IgE 항체인 오말리주맙 대비 10 내지 100배, 20 내지 90배, 20 내지 70배, 30 내지 70배, 40 내지 70배 높은 IgE 결합력을 나타내며, 바람직하게는 오말리주맙 대비 70배 높은 IgE 결합력을 나타낼 수 있다.

[35] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 변형된 Fc 영역이 결합된 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[36] 한편, 상기 폴리뉴클레오티드는 신호서열(signal sequence) 또는 리더

서열(leader sequence)을 추가적으로 포함할 수 있다. 여기에서 사용된 용어 "신호서열"은 목적 단백질의 분비를 지시하는 신호펩타이드를 코딩하는 핵산을 의미한다. 상기 신호펩타이드는 숙주 세포에서 번역된 후에 절단된다.

구체적으로, 본원 발명의 신호서열은 ER(endoplasmic reticulum) 막을 관통하는 단백질의 이동을 개시하는 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드이다. 본원 발명에서 유용한 신호서열은 항체 경쇄 신호서열, 예를 들면 항체 14.18(Gillies et al., *J. Immunol. Meth* 1989. 125:191-202), 항체 중쇄 신호서열, 예를 들면, MOPC141 항체 중쇄 신호서열(Sakano et al., *Nature*, 1980. 286: 676-683), 및 당업계에 알려진 다른 신호서열(예, Watson et al., *Nucleic Acid Research*, 1984. 12:5145-5164를 참조)을 포함한다.

- [37] 신호서열은 당업계에 그 특징이 잘 알려져 있으며, 통상 16 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함하나, 그보다 더 많거나 적은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 통상적인 신호 펩타이드는 기본 N-말단 영역, 중심의 소수성 영역, 및 보다 극성인(polar) C-말단 영역의 세 영역으로 구성된다. 중심 소수성 영역은 미성숙 폴리펩티드가 이동하는 동안 막지질 이중층을 통하여 신호서열을 고정시키는 4 내지 12개의 소수성 잔기를 포함한다.
- [38] 개시 이후에, 신호서열은 흔히 신호 펩티다아제(signal peptidases)로 알려진 세포 효소에 의하여 ER의 루멘(lumen) 내에서 절단된다. 이때, 상기 신호서열은 tPa(tissue Plasminogen Activation), HSV gDs(signal sequence of Herpes simplex virus glycoprotein D), 또는 성장 호르몬(growth hormone)의 분비신호서열일 수 있다. 바람직하게, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵 세포에서 사용되는 분비 신호서열을 사용할 수 있다. 또한, 분비 신호서열은 숙주세포에서 발현 빈도가 높은 코돈으로 치환하여 사용할 수 있다.
- [39] 한편, 신호서열, 변형된 Fc 영역이 결합된 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인 단량체는 서열번호 11 또는 서열번호 13의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 서열번호 11 또는 서열번호 13의 단백질은 각각 서열번호 12 및 서열번호 14의 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [40] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터를 제공한다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 12 및 서열번호 14의 서열을 가질 수 있다.
- [41] 본원 발명에서 사용된 용어 "벡터"는 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포 유전체 내로 재조합 및 삽입될 수 있다. 또는 상기 벡터는 에피솜으로서 자발적으로 복제될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 수단으로 이해된다. 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 플라스미드는 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커를 포함할 수 있고, 플라스미드를 유지하는 숙주 세포는 선택적인 조건하에서 배양될 수 있다.

- [42] 본원 발명에서 사용된 용어, 목적 단백질의 "유전자 발현" 또는 "발현"은, DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역 및 융합 단백질 생산물 또는 이의 단편의 분비를 의미하는 것으로 이해된다. 유용한 발현 벡터는 RcCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다. 상기 발현 벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 인간 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 및 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 우태 성장 인자(bovine growth hormone) 폴리아데닐레이션 신호서열을 포함할 수 있다.
- [43] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 발현 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다. 본원 발명에서 사용된 용어 "숙주 세포"는 재조합 발현 벡터가 도입될 수 있는 원핵 및 진핵 세포를 나타낸다. 본원 발명에서 사용된 용어, "형질주입된", "형질전환된" 및 "형질감염된"은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 세포 내로 핵산(예를 들어, 벡터)을 도입하는 것을 의미한다.
- [44] 본원 발명에 사용될 수 있는 바람직한 숙주 세포는 불사의 하이브리도마 세포, NS/O 골수종 세포, 293 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO cell), HeLa 세포, 인간 양수 유래 세포(CapT cell) 또는 COS 세포를 포함한다. 바람직하게는, CHO 세포일 수 있다. 한편, 상기 숙주 세포는 상기 벡터와 시알산 전이효소 유전자가 적재된 벡터가 도입된 것일 수 있다. 이때, 상기 시알산 전이효소는 2,3-시알산 전이효소 또는 2,6-시알산 전이효소 일 수 있다. 이때, 상기 2,6-시알산 전이효소는 서열번호 15의 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [45] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [46] 또 본 명세서에서, "알러지성 질환"은 비만세포의 탈과립 등 비만세포의 활성화가 매개된 알러지 반응으로 인하여 초래되는 병리적 증상을 의미하며, 이러한 알러지 질환에는 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 과민성(anaphylaxis), 두드러기, 소양증, 곤충 알러지, 만성 특발성 두드러기(Chronic idiopathic urticarial) 및 약품 알러지 등이 포함된다. 특히, 상기 알러지 질환은 IgE 매개성일 수 있다.
- [47] 본원 발명의 알러지 치료용 또는 예방용 조성물에서 그 유효성분은 항알러지 활성을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 20.0 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 항알러지 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [48] 이때, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 환자에게 전달하기에 적절한 비-독성 물질이면 어떠한 담체라도 가능하다. 증류수, 알코올, 지방, 왁스 및 비활성

고체가 담체로 포함될 수 있다. 약물학적으로 허용되는 애쥘벤트(완충제, 분산제) 또한 약물학적 조성물에 포함될 수 있다.

- [49] 구체적으로, 본원 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.
- [50] 본원 발명의 약제학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 약제학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.
- [51] 본원 발명의 약제학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다.
- [52] 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.
- [53] 본원 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg ~ 10 g/kg 범위, 바람직하게는 0.01 mg/kg ~ 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [54] 본원 발명의 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다. 본원 발명의 항알러지용 조성물은 유효성분 이외에, 항알러지 활성의 상승·보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 항알러지 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수

있다.

- [55] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 및 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [56] 이때, 상기 폴리펩티드 이량체는 장내로 효율적인 전달을 위해 적절한 전달 수단과 결합될 수 있다. 또한, 본원 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다. 또 본원 발명의 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분을 떨 수 있다. 예컨대 건강기능식품에 관한 법률에 따른 건강기능식품이거나, 식품위생법의 식품공전(식약처 고시, 식품의 기준 및 규격)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다. 본원 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련하여서는 식품위생법에 따른 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.
- [57] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 숙주 세포에 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 시알산 전이효소 유전자가 도입된 세포를 배양하는 단계; 및 폴리펩티드 이량체를 회수하는 단계를 포함하는 폴리펩티드 이량체 생산 방법을 제공한다.
- [58] 이때, 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터에 적재된 형태로 숙주 세포로 도입될 수 있다. 또한, 시알산 전이효소 유전자는 벡터에 적재된 형태로 숙주 세포로 도입될 수 있다.
- [59] 먼저, 숙주 세포에 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터와 시알산 전이효소 유전자가 적재된 벡터를 세포에 도입하는 단계를 수행한다. 이때, 상기 시알산 전이효소는 2,3-시알산 전이효소 또는 2,6-시알산 전이효소일 수 있다.
- [60] 다음으로는, 상기 형질전환된 세포를 배양하는 단계를 수행한다.
- [61] 마지막으로, 폴리펩티드 이량체를 회수하는 단계를 수행한다. 이때, 상기 폴리펩티드 이량체는 배양 배지 또는 세포 추출물로부터 정제될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 이량체가 분비된 배양배지의 상층액을 수득한 뒤, 이를 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 울트라여과 단위체를 이용하여 농축할 수 있다. 이후 상기 농축물을 당업계에 공지된 바와 같은 방법으로 정제할 수 있다. 예를 들어, 상기 정제는 단백질 A에 커플링된 매트릭스를 이용하여 수득할 수 있다.
- [62] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상술한 이량체 제조방법으로 제조된 폴리펩티드 이량체를 제공한다.
- [63] 이때, 상기 폴리펩티드 이량체는 시알산의 함량이 높아 이론 pI값 대비하여 acidic 단백질의 함량이 매우 높다.

- [64] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상술한 이량체 제조방법으로 제조된 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [65] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상술한 이량체 제조방법으로 제조된 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 또는 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [66] 본원 발명의 또 다른 측면으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [67] 상기 개체는 포유 동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 이때, 투여는 경구 또는 비경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [68] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [69] 실시예 1. FcεRIα-ECD과 변형된 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 제조
- [70] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD; Extracellular domain)의 C 말단이 변형된 폴리펩티드는 미국 특허 7,867,491에 개시된 방법에 따라 제조하였다.
- [71] 먼저, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 FcεRI의 α사슬의 세포외 도메인과 서열번호 2의 변형된 면역글로불린 Fc가 각각, 서열번호 19의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc1), 서열번호 3의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc2) 및 서열번호 4의 힌지로 연결된 단백질(FcεRIαECD-Fc3)을 발현시키기 위하여, 각각의 단백질을 코딩하는 유전자를 연결한 카세트를 pAD15 벡터(제넥신)에 클로닝하여, FcεRIαECD-Fc 단백질 발현 벡터를 제작하였다. 그 후, 상기 발현 벡터를 각각 CHO DG44 (from Dr. Chasin, Columbia University, USA) 세포에 형질주입하였다.
- [72] 이때, 세포주에 형질 주입시 pCI Hygro 벡터(Invitrogen)에 α-2,6-시알산 전이효소 유전자가 클로닝된 발현 벡터를 동시에 형질주입하여, 시알산이 부가된 FcεRIαECD-Fc2ST 및 FcεRIαECD-Fc3ST 단백질을 발현할 수 있는 세포주를 별도로 제조하였다.
- [73] 1차 스크리닝 과정으로 HT(5-hydroxytryptamine)가 없는 10% dFBS(Gibco, USA, 30067-334), MEMα(Gibco, 12561, USA, Cat No. 12561-049), HT+ (Gibco, USA, 11067-030)) 배지를 사용하여 HT 선별을 수행하였다. 이후, DHFR(dihydrofolate reductase)-시스템을 이용하여 생산성을 증폭시키기 위해, HT 선별된 클론들을 이용하여 메토포렉사트(MTX) 증폭을 수행하였다.

[74] MTX 증폭이 완료된 후 생산성 평가를 위한 세포 안정화를 위해 1~5회 정도 계대배양하였다. 그 후, MTX 증폭이 된 세포의 단위 생산성 평가를 수행하였고, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[75] [표1]

Version	Media	MTX conc.	Productivity		
			3-day culture		Batch culture(mg/ml)
			ug/mL	ug/10 ⁶ cells	
FcεRIαECD-Fc2	Ex-cellID	500nM	37.23	20.9	225
FcεRIαECD-Fc2+a2,6-ST	HFR	100nM	45.4	25.1	338.2
FcεRIαECD-Fc3		2uM	27.0	16.9	180.4
FcεRIαECD-Fc3+a2,6-ST		1uM	17.5	10.2	101.7

[76] 표 1에 기재된 바와 같이, FcεRIαECD-Fc3 세포주는 2 uM 메토틀렉사트 증폭 후 16.9 ug/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 반면, 2,6-시알산 전이효소가 공동형질주입된 FcεRIαECD-Fc3 세포주(FcεRIαECD-Fc3ST)는 1 uM 메토틀렉사트 증폭후 17.5 ug/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 또한, FcεRIαECD-Fc2 세포주는 0.5 uM 메토틀렉사트 증폭 조건에서 20.9 ug/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 또한, 2,6-시알산 전이효소가 공동형질주입된 FcεRIαECD-Fc2 세포주(FcεRIαECD-Fc2ST)는 0.1 uM 메토틀렉사트 증폭 후 25.1 ug/10⁶ cells 생산성을 나타내었다. 즉, 0.1 uM 메토틀렉사트 증폭 조건에서 선별된 2,6-시알산 전이효소가 공동형질주입된 FcεRIαECD-Fc2 세포주가 생산성이 가장 우수한 것을 확인하였다.

[77] 실시예 2. FcεRIα ECD 융합 단백질의 정제 및 순도 확인

[78] 상기 실시예 1에서 선별된 세포주 중 i) FcεRIαECD-Fc3, ii) FcεRIαECD-Fc3ST, iii) FcεRIαECD-Fc2ST를 60 ml 규모에서 배치배양법으로 배양하였다. 상기 배양된 배양액을 Protein-A affinity column을 이용하여 정제한 후, 정제된 단백질을 SDS-PAGE 및 크기-배제(Size-Exclusion) HPLC(SE-HPLC)를 수행하여 단백질의 순도를 확인하였다.

[79] 도 1에 나타난 바와 같이, SE-HPLC 방법으로 정제된 각 단백질의 순도는 모두 93% 이상인 것을 확인하였다. 또한, SDS-PAGE 분석결과, 비환원 조건 및 환원 조건에서 각각 약 150 kDa, 약 75 kDa 크기의 단백질이 검출되는 것으로 확인되었으며(도 1, Lane 1 내지 6), 이를 통해 Fc와 결합된 FcεRIαECD가 이량체를 형성하고 있음을 알 수 있었다. 또한, SDS-PAGE 결과에서 절단된 형태 등의 불순물이 나타나지 않았으며, 특히, 해동(thawing)/냉동(freezing)의 과정을

거친 후에도(도 1, Lane 7 내지 8) 모두 순도가 93% 이상이었고 불순물이 없는 것을 확인하였으며, 야생형 IgD hinge가 적용된 FcεRIαECD-Fc1 대비 단백질 절단형의 생산이 줄어들었음을 알 수 있었다.

[80] 이때, 시알산 전이효소 도입에 따른 단백질 시알산 함량 정도를 확인하기 위해 Gel-IEF를 아래의 시험조건으로 수행하였으며, 이를 통해 시알산 함량 증가로 인해 acidic 단백질의 함량이 증가되었음을 확인하였다.

[81] [표2]

시험 조건	
Gel	pH3-10 IEF gel 1.0mm
Sample buffer	IEF sample buffer (2X)
Loading condition	100V 1hr, 200V 1hr, 500V 2hr

[82] 또한, 정제 수율 재현성을 확인하기 위하여, FcεRIαECD-Fc2ST 세포주를 1L 플라스크에서 250 ml 규모에서 배치 배양하고, Protein-A affinity column을 이용하여 정제하였다. 그 후, 배양 상등액 및 정제물에 대해 4-15% TGX™ 겔(BIO-RAD사)에 트리스글라이신 SDS(TGS) 버퍼, 200V 조건으로 30분 동안 러닝 후 SDS PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과, 1 단계 정제만으로도 매우 높은 순도(98% 이상)의 단백질이 정제되었을 뿐 아니라, 배양 상등액에서도 매우 높은 순도로 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 이는 해당 세포주에서 발현된 FcεRIαECD-Fc 단백질을 의약품으로 개발하는 데 있어, 공정 개발 단계가 간소화될 수 있고 결과적으로 의약품으로의 개발 비용이 현저히 절감될 수 있는 가능성이 매우 높음을 의미한다.

[83] 실시예 3. FcεRIα ECD 융합 단백질과 IgE의 결합능 확인

[84] 상기 실시예 2의 방법을 통해 정제된 i) FcεRIαECD-Fc2, ii) FcεRIαECD-Fc2ST, iii) FcεRIαECD-Fc3 및 iv) FcεRIαECD-Fc3ST의 4 종 단백질과 시중에 판매되고 있는 항 IgE 항체인 오말리주맙(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))에 대하여 IgE 결합능을 비교 측정하였다. 구체적으로, IgE 결합능은 Protein GLC sensor chip(Bio-Rad, Cat #. 176-5011)의 채널에 IgE를 코팅하고, 오말리주맙 혹은 FcεRIαECD-Fc 단백질 각각을 여러 농도로 분당 30 ul의 속도로 흘려주었다.

[85] 실험은 재생 버퍼인 25 mM NaOH를 이용하여 제로베이스를 확인한 후, 상기 단계를 반복하여 진행하였다. 그 후, 단백질 결합 분석기기(Proton XPR36, BIO-RAD, USA)를 이용하여 결합곡선을 확인하였으며, 그 결과를 표 3, 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[86] [표3]

Samples Items		FcεRIα ECD-Fc		오말리주맵	비고
Drug type		Fc 융합 단백질		Anti-IgE Ab	
Binding affinity	ka(Association rate)	Fc2	2.14 x 10 ⁵	4.05 x 10 ⁵	오말리주맵 대비 1.9배 약함
		Fc2ST	2.64 x 10 ⁵		오말리주맵 대비 1.5배 약함
		Fc3	1.98 x 10 ⁵		오말리주맵 대비 2.0배 약함
		Fc3ST	2.40 x 10 ⁵		오말리주맵 대비 1.7배 약함
	kd (Dissociation rate)	Fc2	8.29 x 10 ⁻⁵	6.02 x 10 ⁻³	오말리주맵 대비 73배 좋음
		Fc2ST	5.69 x 10 ⁻⁵		오말리주맵 대비 106배 좋음
		Fc3	1.33 x 10 ⁻⁴		오말리주맵 대비 45배 좋음
		Fc3ST	1.49 x 10 ⁻⁴		오말리주맵 대비 40배 좋음
	KD (kd/ka)	Fc2	3.88 x 10 ⁻¹⁰	1.49 x 10 ⁻⁸	오말리주맵 대비 38배 좋음
		Fc2ST	2.16 x 10 ⁻¹⁰		오말리주맵 대비 69배 좋음
		Fc3	6.72 x 10 ⁻¹⁰		오말리주맵 대비 22배 좋음
		Fc3ST	6.21 x 10 ⁻¹⁰		오말리주맵 대비 24배 좋음

[87] 표 3에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 결합상수(Association rate, ka) 값은 오말리주맵과 비교하여 1.5 내지 2.0 배 작은 것으로 측정되었다. 즉, IgE 외의 물질과의 결합력이 오말리주맵에 비해 1.5 ~ 2.0 배 정도 낮은 것을 알 수 있었다. 또한, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의 해리상수(Dissociation rate, kd) 값은 오말리주맵과 비교하여 40 내지 106 배 큰 것으로 측정되었다. 또한, 도 3 및 도 4에서 개시된 바와 같이, 오말리주맵은 IgE와 결합한 후 일정 시간이 지나면 결합이 떨어지는 반면, 본원 발명의 FcεRIαECD 융합 단백질의 폴리펩티드 이량체는 일단 IgE와 결합한 후에는 IgE와 떨어지지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[88] 즉, 본원 발명의 폴리펩티드 이량체는 IgE와 쉽게 분리되지 않고, 결합된 상태로 유지되는 능력이 오말리주맵에 비해 월등히 좋은 것을 알 수 있다. 결과적으로, 본원 발명의 일 구체예에 따른 폴리펩티드 이량체의

평형상수(Equilibrium dissociation constant, $KD <ka/kd>$) 값은 오말리주맵과 비교하여 22 내지 69배 높은 것을 알 수 있으며, 이를 통해, 본원 발명의 FcεRIαECD 융합 단백질은 오말리주맵과 비교하여 IgE에 대한 결합능이 현저히 증가한 것을 확인하였다. 특히, 시알산이 부가된 FcεRIαECD-Fc2(FcεRIαECD-Fc2ST)가 오말리주맵 대비 69배로 IgE 결합력이 가장 우수함을 확인하였다.

- [89] 실시예 4. FcεRIα ECD 융합 단백질과 IgG 수용체의 결합능 확인
- [90] IgE TRAP와 오말리주맵의 IgG 수용체에 대한 결합 정도는 Octet RED384 시스템(Pall ForteBio, CA, USA)을 사용하여 확인하였다. 활성화된 AR2G 바이오 센서에 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA 및 FcγRIIIB 재조합 단백질(R & D 시스템, 5 μg/ml)을 300 mM 아세테이트 완충액(pH 5)에 고정화 하였다. Running buffer는 0.1 % Tween-20 및 1 % bovine serum을 포함한 PBS를 사용하였다. 모든 실험은 샘플 플레이트 셰이커 1000 rpm 속도로 30°C에서 이루어졌다. 그 결과는 도면 도 5a 내지 도 5e에 나타내었고, 오말리주맵과 IgE_{TRAP}의 IgG 수용체와의 결합능을 수치화하여 도 6에 나타내었다.
- [91] 실시예 5. 마우스 골수 유래 비만 세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 통한 FcεRIα ECD 융합 단백질의 활성 확인
- [92] 본원 발명의 FcεRIαECD 융합 단백질의 *in vitro* 활성 분석을 위하여 베타 헥소사미니다제 분석을 수행하였다. 구체적으로, 본원 발명의 일 구체예에 따른 FcεRIαECD-Fc2 단백질을 농도별로 마우스 IgE(1 ug/mL)와 혼합하여 상온(20°C)에서 30분간 인큐베이션(incubation)시켜 시료를 준비하였다. 비만 세포 활성화를 위해 배양중인 마우스 골수 유래 비만세포(mast cell)를 HBSS(Hank's balanced salt solution) 버퍼로 세척하여 배지를 제거하였으며, 세포수를 측정 한 후 5×10^5 개의 세포들이 40 uL의 HBSS 버퍼에 주입되도록 조절하였다.
- [93] 그 후, 상기 프리 인큐베이션을 통해 준비된 시료 용액 50 uL를 활성화된 비만 세포에 첨가하였다. 그 후, 37°C에서 30분간 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후 외래 항원인 DNP(2,4-dinitrophenol, 100 ng/mL)를 10 uL씩 첨가한 후, 다시 37°C에서 30분간 5% CO₂ 배양시킨 다음 상층액을 30 uL 분리하였다. 분리된 상층액 30 uL와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, 5.84 mM) 30 uL를 잘 혼합한 후 37°C에서 20분간, 5% CO₂에서 배양하였다. 그 후, 정지용액(Stop solution)인 0.1 M 소듐 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer)(pH 10) 140 uL를 넣고 반응을 종결시켰다. 이 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 활성화된 비만 세포에서 외래 항원에 의해 분비되는 베타-헥소사미니다아제(β-hexosaminidase)의 분비량을 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [94] 도 7에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 일 구체예의 폴리펩티드 이량체의 농도가 마우스 IgE의 절반(0.5 ug/mL)일 때 약 49.4%의 억제율을 보여주었으며,

마우스 IgE와 동일한 농도(1 ug/mL)일 때 약 99.4%의 비만 세포 억제율을 보여주었다. 즉, 본원 발명의 FcεRIα-ECD 폴리펩티드 이량체에 의해 IgE에 의한 골수 유래 비만세포의 활성이 크게 억제되는 것을 알 수 있다.

- [95] 실시예 6. 인간 FcεRI 발현 마우스 골수 유래 비만 세포에서 베타-헥소사미니다제 어세이를 이용한 FcεRIα ECD 융합 단백질 및 anti-human IgE 항체의 활성 비교
- [96] *in vitro* 활성 분석을 통해 FcεRIα ECD 융합 단백질의 Xolair 대비 우수성을 확인하기 위하여 베타-헥소사미니다제 분석을 진행하였다. 각 약물 FcεRIαECD-Fc2ST(IgE_{TRAP})과 Xolair를 농도별로 준비한 후 인간 IgE (1 ug/mL)와 혼합한 후 상온에서 30분간 인큐베이션 시켰다. 약물을 프리(pre)-인큐베이션 하는 동안 인간 FcεRI 유전자가 도입되고, 마우스 FcεRI 유전자가 제거된 마우스의 골수로부터 유래 및 분화된 비만세포를 준비하였다. 준비한 비만 세포들을 HBSS 버퍼로 세척해준 후, 5x10⁵ 개의 세포들을 60 uL의 HBSS 버퍼에 주입하였다. 준비가 끝난 비만세포에 프리(pre)-인큐베이션한 시료 20 uL를 비만세포에 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 배양하였다.
- [97] 이후 anti-human IgE 항체 (Biolegend, Cat No. 325502, 0.5 ug/mL)를 20 uL 첨가한 후 다시 37°C 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 이후 1,500 rpm, 4°C, 원심분리 한 후 상층액 30 uL를 분리하였다. 분리한 상층액 30 uL와 기질(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-glucosaminide, 5.84 mM) 30 uL를 잘 혼합한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 25분 동안 배양하였다. 그 후, 0.1 M 소듐 카보네이트 버퍼(sodium carbonate buffer) (pH 10) 140 uL를 넣고 반응을 종결시켰다.
- [98] 이후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 분비된 베타-헥소사미니다아제 (β-hexosaminidase)의 상대량을 비교하여 각 약물의 농도에 따른 비만 세포 억제효과를 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다. 도 8에 표시한 바와 같이, FcεRIα ECD 융합 단백질의 IC₅₀은 대략 11.16 ng/mL로 측정되었고, Xolair 단백질의 IC₅₀은 대략 649.8 ng/mL로 측정되었다. 따라서, FcεRIα ECD 융합 단백질은 Xolair에 비해 58배 정도 높은 비만 세포 활성 억제력이 있음을 확인하였다.
- [99] 실시예 7. FcεRIα ECD 융합 단백질의 *in vivo* assay(식품 알러지 모델)
- [100] Balb/c 마우스(오리엔트바이오)들에 대하여 OVA(ovalbumin) 50 ug 및 알룸(Alum) 1 mg을 14일 간격으로 2회 복강 투여하여 감작(sensitization)을 유발하였다. 이후, 28, 30, 32, 34, 36일째, 총 5회에 걸쳐 OVA 50 mg을 경구 투여하여 장에 음식물 알러지를 유발하였다.
- [101] 상기 OVA를 경구 투여 2회 후 즉, 31일째에 상기 마우스를 7마리씩 3개의 그룹으로 분류하였다. 제 1 그룹인 FcεRIαECD-Fc2ST 융합 단백질을 고농도(200 ug)로 투여하는 군, 제 2 그룹인 저농도(20 ug)로 투여하는 군 및 제 3 그룹인 투여하지 않는 군으로 분류하였다. 상기 OVA를 경구 투여하면서 음식물 알러지 유발에 따라 설사 발생 여부를 확인하였으며, 37일째 상기 마우스를 희생시켜 각

그룹에 속한 마우스에 대하여 소장 내 비만세포의 수, 혈중 IgE 농도 및 혈중 비만세포의 탈과립 효소 농도(MCPT-1, Mast cell protease-1)를 분석하였다.

[102] 도 9에 나타난 바와 같이, FcεRIαECD-Fc2ST인 폴리펩티드 이량체를 고농도로 투여한 군에 속한 마우스에서, 아무것도 투여하지 않은 군에 속한 마우스에 비하여 농도 의존적으로 식품 알러지가 완화되는 효과를 나타남을 확인하였다.

서열목록 Free Text

[103] 서열번호 1:

[104] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN
SSLNIVNAKF

[105] EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG
QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY

[106] YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYY CTGKVVQLDY ESEPLNITVI
KAPREKYWLQ

[107] 서열번호 2:

[108] SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
EVHNAKTKPR

[109] EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ
PREPQVYTLF

[110] PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
SFFLYSRLTV

[111] DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK

[112] 서열번호 3:

[113] RNTGRGGEEK KGSKEKEEQE ERETKTPECP

[114] 서열번호 4:

[115] AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK GSKEKEEQEE RETKTPECP

[116] 서열번호 5:

[117] gtgccccaga agcccaaggt gagcctgaac cctccctgga acagaatctt caaggcgag

[118] aacgtgacct tgacctgcaa cggcaacaac ttcttcgagg tgagcagcac caagtggttc

[119] cacaatggca gctgagcga ggagaccaac agctccctga acatcgtgaa cgccaagttc

[120] gaggacagcg gcgagtacaa gtgccagcac cagcaggtga acgagagcga gccctgttac

[121] ctggaggtgt tcagcgactg gctgctgctg caggccagcg ccgaggtggt gatggagggc

[122] cageccctgt tctgagatg ccacggctgg agaaactggg acgtgtacaa ggtgatctac

[123] tacaaggatg gcgaggccct gaagtactgg tacgagaacc acaacatctc catcaccaac

[124] gccaccgtgg aggacagcgg cacctactac tgcacaggca aggtgtggca gctggactac

[125] gagagcgagc ccctgaacat caccgtgatc aaggctccca gagagaagta ctggctgcag

[126] 서열번호 6:

[127] tgcgtggtcg tggatgtgag ccaggaagat cccgaagtgc agttcaactg gtacgtggat

- [128] ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag agcagttcaa ctccacctac
- [129] agagtgggtga gcgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag
- [130] tgcaagtggt ccaacaaagg cctgcccagc tccatcgaga agaccatcag caaagccaaa
- [131] ggccagccca gagaacccca ggtgtacacc ctgcctccca gccaggaaga gatgaccaag
- [132] aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaaa ggtttctacc ccagcgacat cgccgtggag
- [133] tgggaaagca acggccagcc cgagaacaat tacaagacaa cccctccctg gctggatagc
- [134] gatggcagct tctttctgta cagcagactg accgtggaca agagcagatg gcaggaagcg
- [135] aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgaa gcctgcaca accactacac ccagaagagc
- [136] ctgtccctga gcctgggcaa g
- [137] 서열번호 7:
- [138] aggaacaccg gcagaggagg cgaggaaaag aaaggaagca aggagaagga ggagcaggag
- [139] gaaagagaaa ccaagacccc cgagtgcacc agccacacc agcccctggg cgtgttctg
- [140] tccccccca agcccagga caccctgatg atcagcagaa cccccgaggt gacc
- [141] 서열번호 8:
- [142] gccagccccc aggccgaggg cagcctggct aaggccacca cagctcccgc caccaccag
- [143] aacaccggca gaggaggcga ggaagagaaa ggaagcaagg agaaggagga gcaggaggaa
- [144] agagaaacca agacccccga gtgcccagc cacaccagc cctgggctg gttctgttc
- [145] ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaaccc ccgaggtgac c
- [146] 서열번호 9:
- [147] MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHA
- [148] 서열번호 10:
- [149] atggacgcca tgetgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttctg
- [150] tcccctagcc acgcc
- [151] 서열번호 11:
- [152] MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHAVPQKP KVSLNPPWNR IFKGENVTLT
CNGNNFFEVS
- [153] STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKCQHQQVNE SEPVYLEVFS
DWLLQASAE
- [154] VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN
ISITNATVED SGTYYYCTGKV
- [155] WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQRNTGR GEEKKGSKE KEEQEERETK
TPECPSHTQP
- [156] LGVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA
KTKPREEQFN
- [157] STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSQEE
- [158] MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY
SRLTVDKSRW

[159] QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK

[160] 서열번호 12:

[161] atggacgcca tgetgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg
 [162] tcccctagcc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaacctcc ctggaacaga
 [163] atcttcaagg gcgagaacgt gaccctgacc tgcaacggca acaacttctt cgaggtgagc
 [164] agcaccaagt ggttccacaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc
 [165] gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag
 [166] agcgagcccg tgtacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgetgcaggc cagcggcgag
 [167] gtggtgatgg agggccagcc cctgttctct agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg
 [168] tacaagtgta tctactacaa ggatggcgag gcctgaagt actggtacga gaaccacaac
 [169] atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcaac aggcaaggtg
 [170] tggcagctgg actacgagag cgagccccctg aacatcaccg tgatcaaggc tcccagagag
 [171] aagtactggc tgcagaggaa caccggcaga ggaggcgagg aaaagaaagg aagcaaggag
 [172] aaggaggagc aggaggaaag agaaaccaag acccccagat gccccagcca caccagccc
 [173] ctgggcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacacce tgatgatcag cagaaccccc
 [174] gaggtgacct gcgtggctgt ggatgtgagc caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg
 [175] tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagaaga gcagttaac
 [176] tccacctaca gagtggtagc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag
 [177] gagtacaagt gcaaggtgic caacaaaggc ctgcccagct ccatcgagaa gaccatcagc
 [178] aaagccaaag gccagcccag agaaccaccag gtgtacacce tgctcccag ccaggaagag
 [179] atgaccaaga accaggtgic cctgacctgc ctggtgaaag gcttctacce cagcgacatc
 [180] gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc gagaacaatt acaagacaac cctcccctg
 [181] ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac agcagactga ccgtggacaa gagcagatgg
 [182] caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgaag cctgcacaa ccactacacc
 [183] cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag

[184] 서열번호 13:

[185] MDAMLRGLCC VLLLCGAVFV SPSHAVPQKP KVSLNPPWNR IFKGENVTLT
CNGNNFFEVS

[186] STKWFHNGSL SEETNSSLNI VNAKFEDSGE YKCQHQQVNE SEPVYLEVFS
DWLLLQASAE

[187] VVMEGQPLFL RCHGWRNWDV YKVIYYKDGE ALKYWYENHN
ISITNATVED SGTYYCTGKV

[188] WQLDYESEPL NITVIKAPRE KYWLQAQPPA EGSLAKATTA PATRNTGRG
GEEKKGSKEK

[189] EEQEERETKT PECPSHTQPL GVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

[190] VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
YKCKVSNKGL PSSIEKTISK

[191] AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

[192] DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALTHNHYTQ KSLSLSLGK

[193] 서열번호 14:

[194] atggacgcca tgetgagagg cctgtgctgt gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg
[195] tccccagacc acgccgtgcc ccagaagccc aaggtgagcc tgaacctcc ctggaacaga
[196] atctcaagg gcgagaacgt gaccctgacc tgcaacggca acaactctt cgaggtgagc
[197] agcaccaagt ggttccacaa tggcagcctg agcgaggaga ccaacagctc cctgaacatc
[198] gtgaacgcca agttcgagga cagcggcgag tacaagtgcc agcaccagca ggtgaacgag
[199] agcgagcccc tgtacctgga ggtgttcagc gactggctgc tgetgcaggc cagcgccgag
[200] gtggtgatgg agggccagcc cctgttctg agatgccacg gctggagaaa ctgggacgtg
[201] tacaagtgta tctactacaa ggatggcgag gccctgaagt actggtacga gaaccacaac
[202] atctccatca ccaacgccac cgtggaggac agcggcacct actactgcaac aggcaaggtg
[203] tggcagctgg actacgagag cgagccccctg aacatcaccg tgatcaaggc tcccagagag
[204] aagtactggc tgcaggccca gccccagcc gagggcagcc tggctaagge caccacagct
[205] cccgccacca ccaggaacac cggcagagga ggcgaggaaa agaaaggaag caaggagaag
[206] gaggagcagg aggaaagaga aaccaagacc cccgagtgcc ccagccacac ccagccccctg
[207] ggcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag
[208] gtgacctgcg tggctgtgga tgtgagccag gaagatcccc aagtgcagtt caactggtac
[209] gtggatggcg tggaaagtca caacgcccaag accaagccca gagaagagca gttcaactcc
[210] acctacagag tggtagcgt gctgacctg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag
[211] tacaagtca aggtgtccaa caaaggcctg cccagctcca tcgagaagac catcagcaaa
[212] gccaaaggcc agcccagaga accccaggtg tacacctgc ctcccagcca ggaagagatg
[213] accaagaacc aggtgtccct gacctgctg gtgaaagget tctaccccag cgacatgcc
[214] gtggagtggg aaagcaacgg ccagcccag aacaattaca agacaacccc tcccgtgctg
[215] gatagcgtg gcagcttct tctgtacagc agactgaccg tggacaagag cagatggcag
[216] gaaggaacg tttcagctg cagcgtgatg cacgaagccc tgcacaacca ctacaccag
[217] aagagcctgt cctgagcct gggcaag

[218] 서열번호 15:

[219] MIHTNLKKKF SCCVLVFLLF AVICVWKEKK KGSYYDSFKL QTKEFQVLKS
LGKLAMGSDS

[220] QSVSSSTQD PHRGRQTLGS LRGLAKAKPE ASFQVWNKDS SSKNLIPRLQ
KIWKNYLSMN

[221] KYKVSYSKPG PGIKFSAEAL RCHLRDHVNV SMVEVTDFFP NTSEWEGYLP
KESIRTKAGP

[222] WGRCAVVSSA GSLKSSQLGR EIDDHDAVLR FNGAPTANFQ QDVGTKTTIR
LMNSQLVTTE

[223] KRFLKDSLYN EGILIVWDPS VYHSDIPKWY QNPDYNFFNN YKTYRKLHPN

QPFYILKPQM

[224] PWELWDILQE ISPEEIQPNP PSSGMLGIII MMTLCDQVDI YEFLPSKRKT
DVCYYYQKFF

[225] DSACTMGAYH PLYEKNLVK HLNQGTDEDI YLLGKATLPG FRTIHC

[226] 서열번호 16:

[227] atgatccaca ccaacctgaa gaagaagttc agctgctgcg tgctggtgtt cctgctgttc
[228] gccgtgatct gcgtgtggaa ggagaagaag aaaggcagct actacgacag ctcaagctg
[229] cagaccaagg agttccaggt gctgaagagc ctgggcaagc tgccatggg cagcgacagc
[230] cagagcgtgt ccagctctc caccaggat ccccacagag gcagacagac cctgggcagc
[231] ctgagaggcc tggccaagc caagcccag gccagcttc aggtgtggaa caaggacagc
[232] agcagcaaga acctgatccc cagactgcag aagatctgga agaactacct gagcatgaac
[233] aagtacaagg tgagctaca aggaccgga cccggcatca agttcagcgc cgaggccctg
[234] aggtgccacc tgagagacca cgtgaacgtg agcatggtg aagtgaccga ctccccctc
[235] aacaccagc agtggggaag ctacctgcc aaggagagca tcaggacca ggctggcccc
[236] tggggcagat gcgccgtgt ggcagcctga agagctcca gctgggcaga
[237] gagatgcag accacgatgc cgtgctgagg tcaatggcg cteccaccgc caactccag
[238] caggacgtg gcaccaagac cacaatccg ctgatgaaca gccagctgt gacaaccgag
[239] aagcggttc tgaaggacag cctgtacaac gagggcatcc tgatcgtg ggatcccagc
[240] gtgtaccaca gcgacatccc caagtgttac cagaatccc actacaact ctcaacaac
[241] tacaagacct atagaaagct gcacccaac cagccttct acatcctgaa gccccagatg
[242] ccctgggagc tgtgggacat cctgcaggag atcagcctg aagagatcca gcccaccct
[243] ccctccagc gcctgctggg cattatcacc atgatgacct tgtgcgacca ggtggacatc
[244] tacgagttc tgcccagcaa gagaaagacc gacgtgtgt actactatca gaagttctc
[245] gacagcct gcaccatggg gcctaccac ccctgctgt acgagaagaa cctggtgaag
[246] cacctgaacc agggcaccga cgaggacatc tacctgctgg gcaaagccac cctgcccggc
[247] ttcagaacca tccactgc

[248] 서열번호 17:

[249] RNTGRGGEEK KXXKEKEEQE ERETKTPECP

[250] 서열번호 18:

[251] AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK XXKEKEEQEE RETKTPECP

[252] 서열번호 19:

[253] RNTGRGGEEK KKEKEKEEQE ERETKTPECP

[254] 서열번호 20:

[255] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLTCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN
SSLNIVNAKF

[256] EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLL QASAEVVMG
QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY

[257] YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTYY CTGKVVQLDY ESEPLNITVI

- KAPREKYWLQ
- [258] RNTGRGGEEK KKEKEKEEQE ERETKTPECP SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM
ISRTPEVTCV
- [259] VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
- [260] VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF
YPSDIAVEWE
- [261] SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLS
- [262] LSLGK
- [263] 서열번호 21:
- [264] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN
SSLNIVNAKF
- [265] EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG
QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY
- [266] YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTY Y CTGKVVQLDY ESEPLNITVI
KAPREKYWLQ
- [267] RNTGRGGEEK KGSKEKEEQE ERETKTPECP SHTQPLGVFL FPPKPKDTLM
ISRTPEVTCV
- [268] VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
- [269] VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF
YPSDIAVEWE
- [270] SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLS
- [271] LSLGK
- [272] 서열번호 22:
- [273] VPQKPKVSLN PPWNRIFKGE NVTLCNGNN FFEVSSTKWF HNGSLSEETN
SSLNIVNAKF
- [274] EDSGEYKCQH QQVNESEPVY LEVFSDWLLL QASAEVVMEG
QPLFLRCHGW RNWDVYKVIY
- [275] YKDGEALKYW YENHNISITN ATVEDSGTY Y CTGKVVQLDY ESEPLNITVI
KAPREKYWLQ
- [276] AQPQAEGSLA KATTAPATTR NTGRGGEEKK GSKEKEEQEE RETKTPECPS
HTQPLGVFLF
- [277] PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV
- [278] SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP

SQEEMTKNQV

[279] SLTCLVKGIFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDG FFLYSRLTVD
KSRWQEGNVF

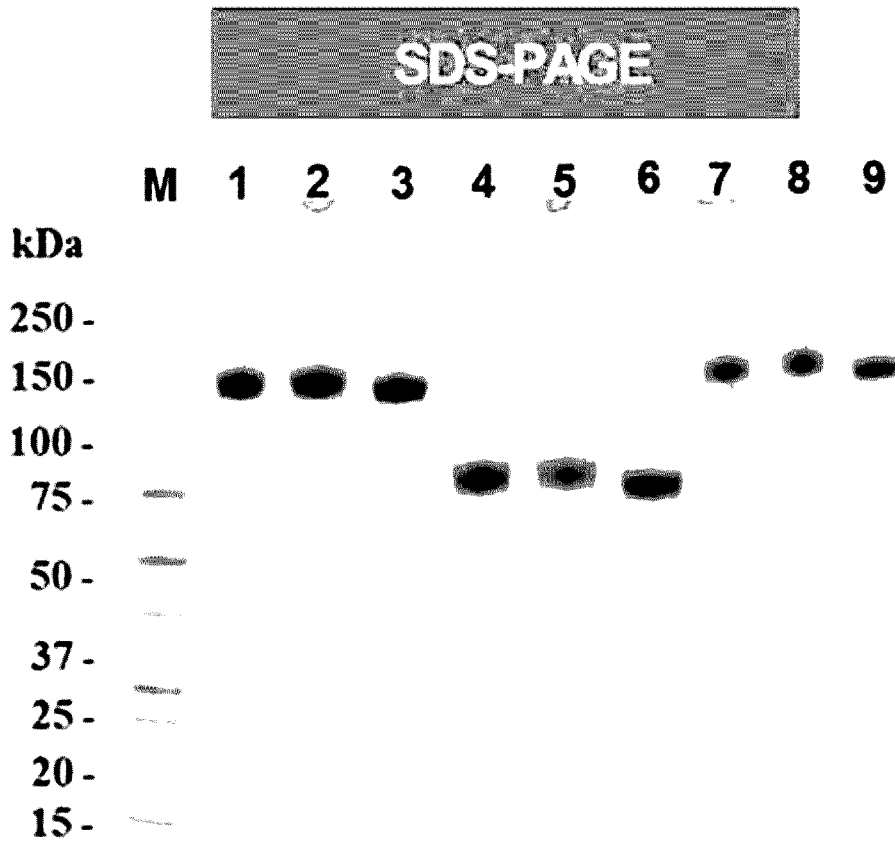
[280] SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK

청구범위

- [청구항 1] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 폴리펩티드 이량체로서, 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며, 상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIa-ECD는 힌지를 통해 결합된 것을 특징으로 하는, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이의 단편인, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2인, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 힌지는 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체인 것인, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 적어도 하나의 시스테인을 포함하는, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 17)이며, Xaa1은 Lys 또는 Gly 이며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser인, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 상기 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체는 Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro (서열번호 18)이며, Xaa1은 Lys 또는 Gly 이며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser인, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 힌지는 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 19로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 9] 제1항의 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIa-ECD)을 포함하는 단량체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 10] 제9항의 폴리뉴클레오티드가 적재된 발현 벡터.

- [청구항 11] 제10항의 발현 벡터가 도입된 숙주 세포.
- [청구항 12] 제1항 내지 제8항에 따른 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
 상기 알러지성 질환은 식품 알러지, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis), 알러지성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(Chronic idiopathic urticarial), 및 알러지성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제8항에 따른 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 또는 완화용 식품 조성물.
- [청구항 15] 제9항의 폴리뉴클레오티드와 시알산 전이효소 유전자가 도입된 세포를 배양하는 단계; 및
 폴리펩티드 이량체를 회수하는 단계를 포함하는,
 폴리펩티드 이량체 생산 방법.
- [청구항 16] 제15항에서 수득된 폴리펩티드 이량체.
- [청구항 17] 제16항의 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 질환 치료용 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제16항의 폴리펩티드 이량체를 유효성분으로 포함하는 알러지성 증상의 개선 또는 완화용 식품 조성물.
- [청구항 19] 제1항 및/또는 제16항의 폴리펩티드 이량체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알러지 질환 치료 또는 예방 방법.

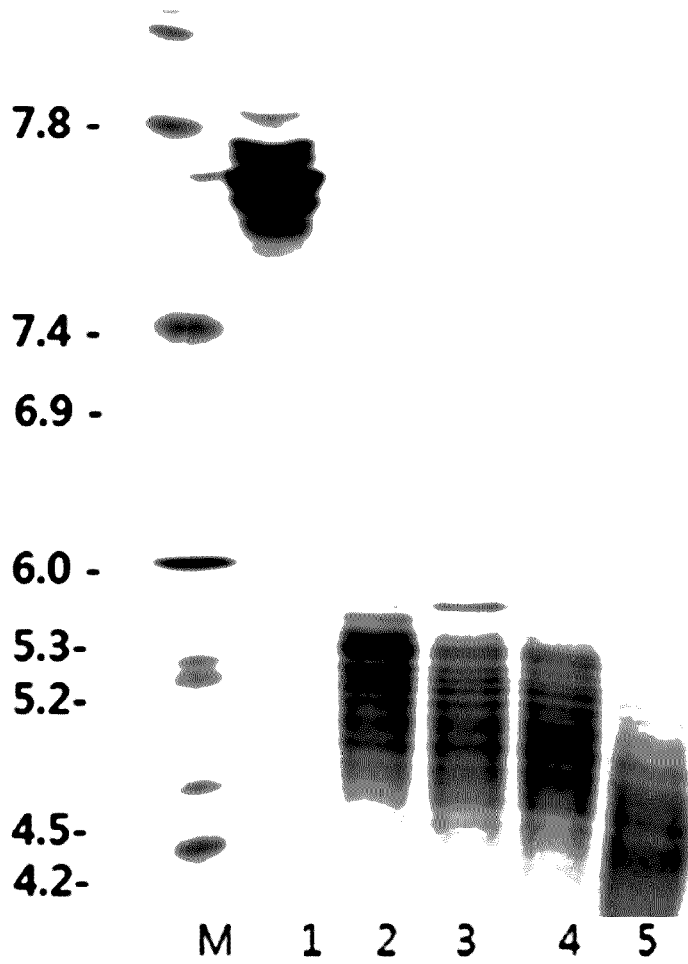
[도 1a]



[도 1b]

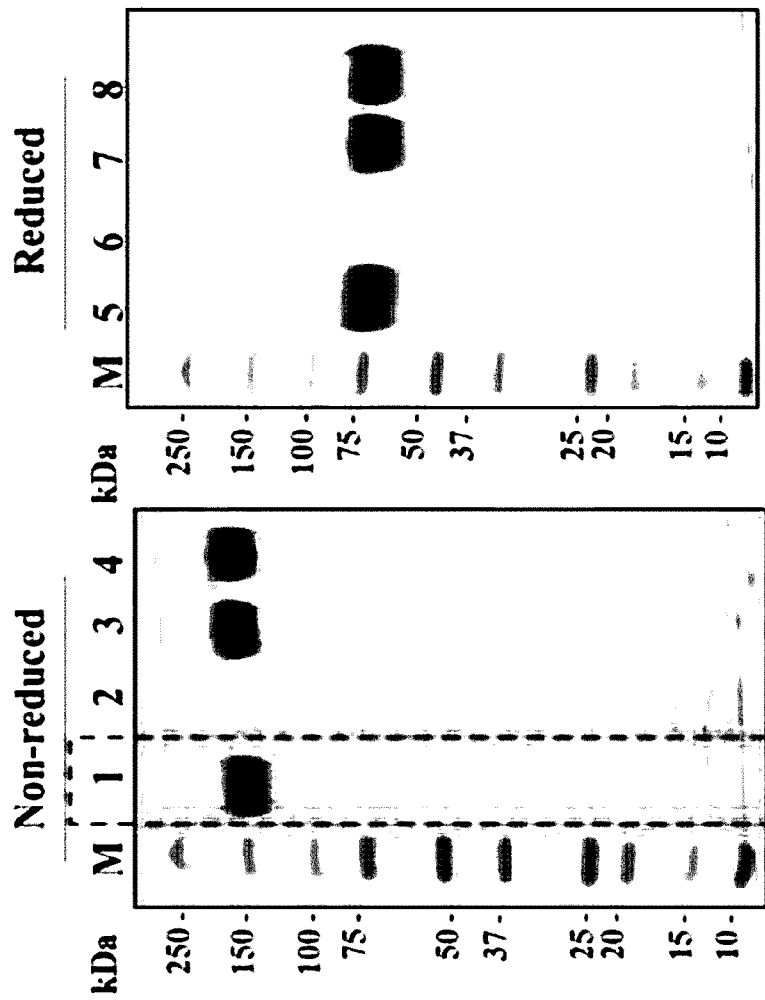
Lane #	Sample	Purification	Purity (SE-HPLC)	Sample condition	
M	Protein standard		.	.	.
1	FcεR1α ECD-Fc3	One-step (Protein-A column) purification	94.5%	.	Non-reducing
2	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
3	FcεR1α ECD-Fc2+2,6 ST		93.2%		
4	FcεR1α ECD-Fc3		94.5%	.	Reducing
5	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
6	FcεR1α ECD-Fc2+2,6 ST		93.2%		
7	FcεR1α ECD-Fc3		94.5%	Freezing/Thawing test	Non-reducing
8	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.7%		
9	FcεR1α ECD-Fc3+2,6 ST		93.2%		

[도 1c]



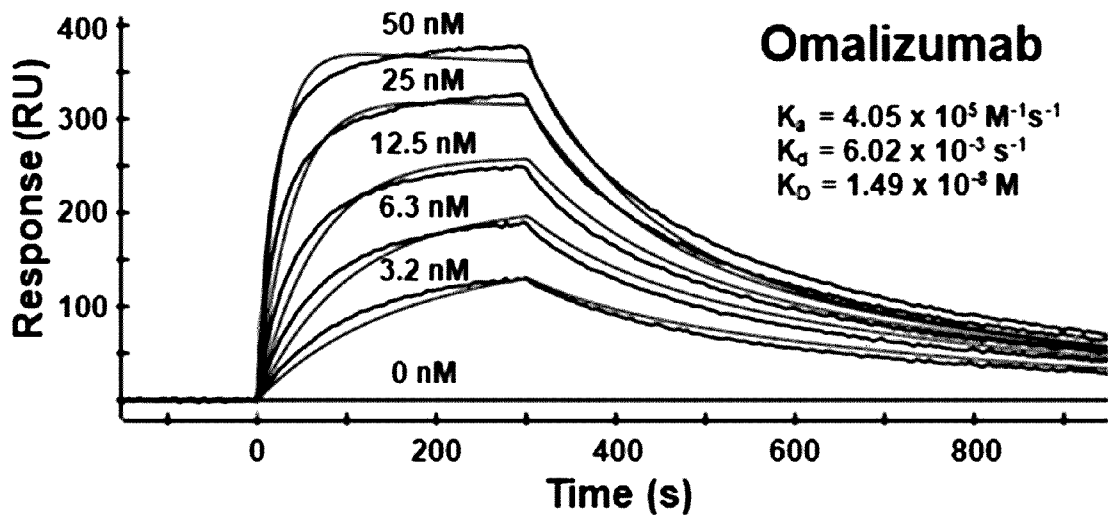
Lane	Loading sample	이론 pI
M	Marker (SERVA pH3-10, 5uL)	
1	Xolair	7.03
2	FcεRIα ECD-FC2	5.62
3	FcεRIα ECD-FC2+2,6 ST	5.62
4	FcεRIα ECD-FC3	5.63
5	FcεRIα ECD-FC3+2,6 ST	5.63

[도2]

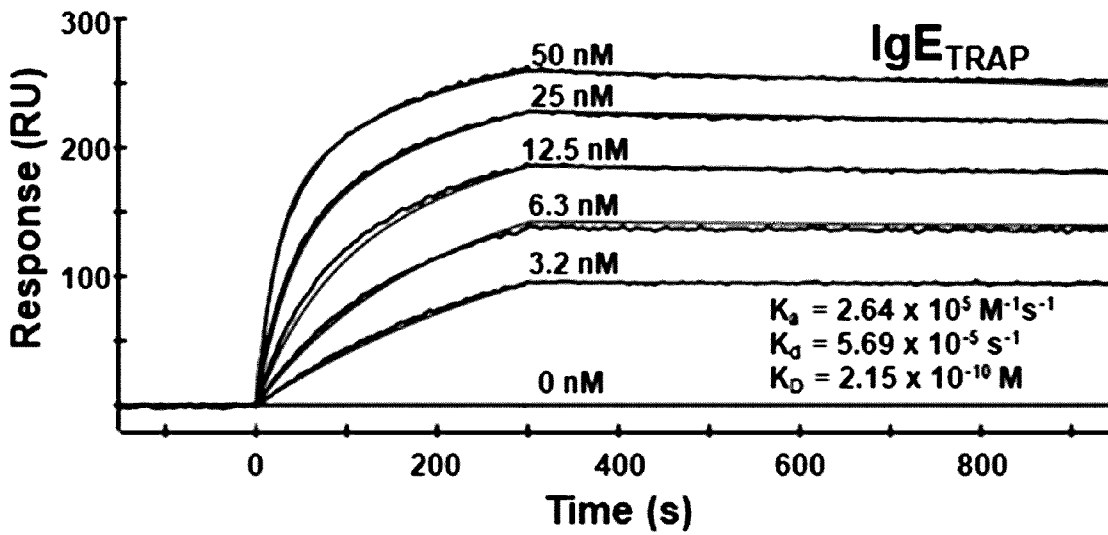


Lane	Sample name	Loading amount
M	Size Marker	3ul
1	Input	Max
2	FT	Max
3	Elute	3 ug
4	Elute_N	3 ug
M	Size Marker	3ul
5	Input	Max
6	FT	Max
7	Elute	3 ug
8	Elute_N	3 ug

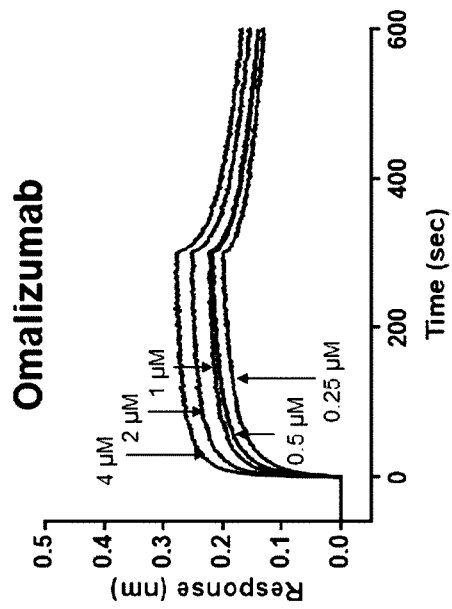
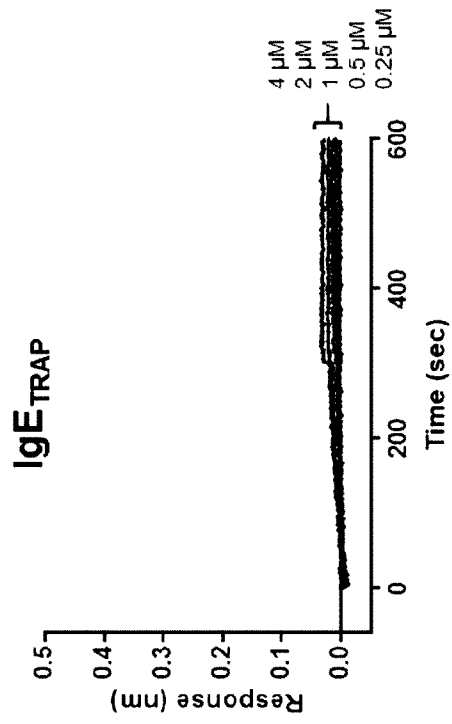
[도3]



[도4]

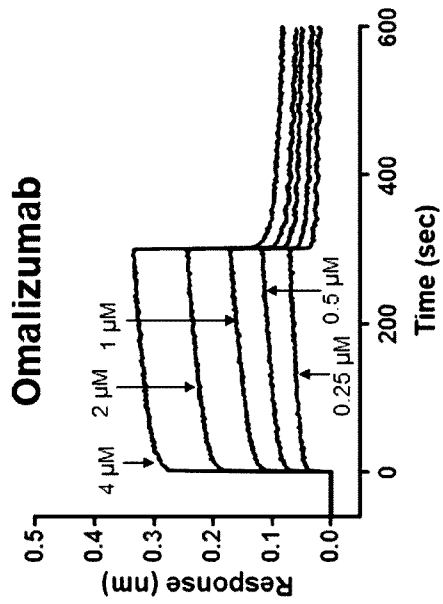
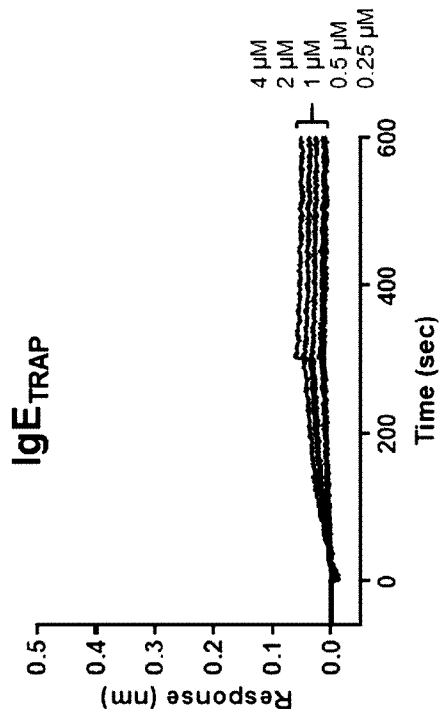


[도5a]



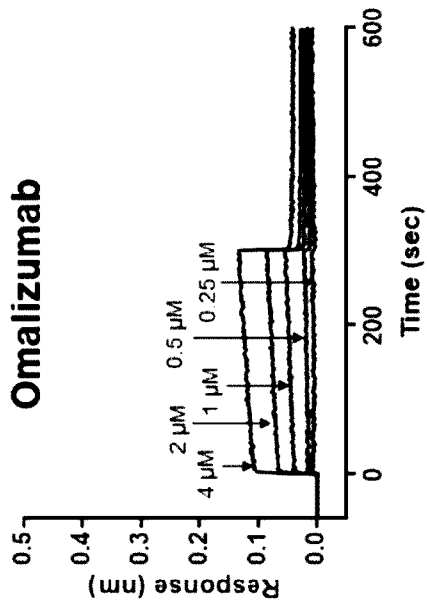
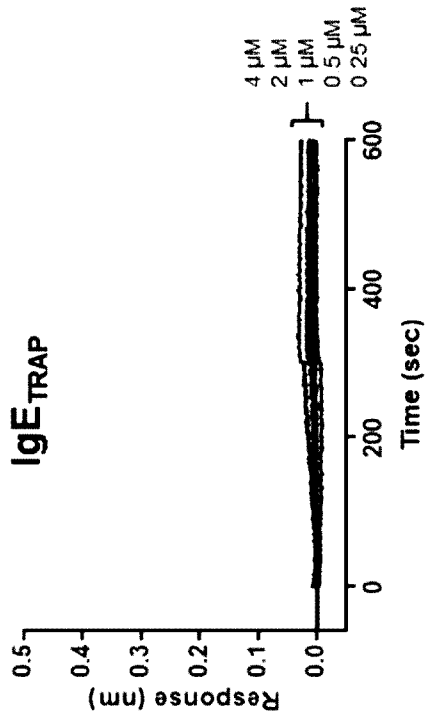
Fc γ RI

[도5b]



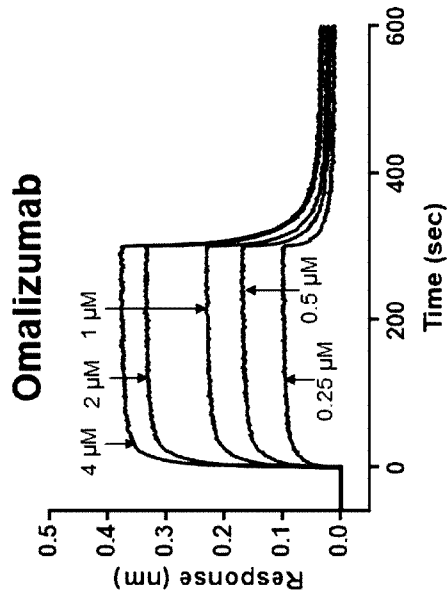
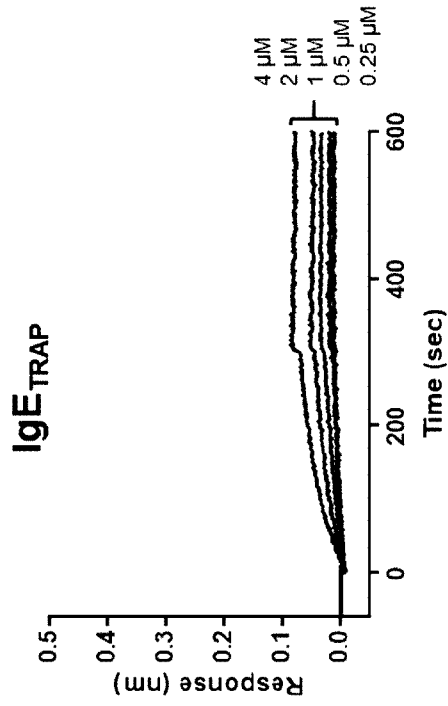
Fc γ RIIA

[도5c]



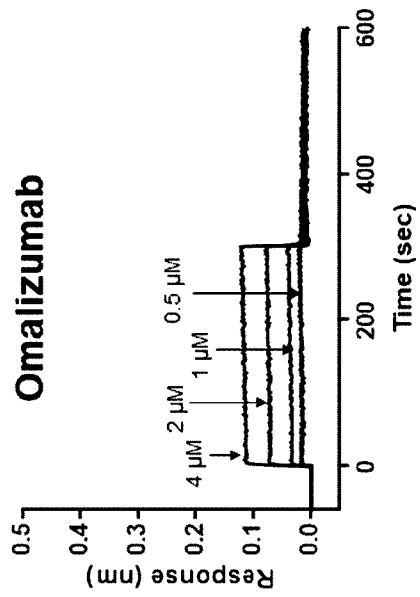
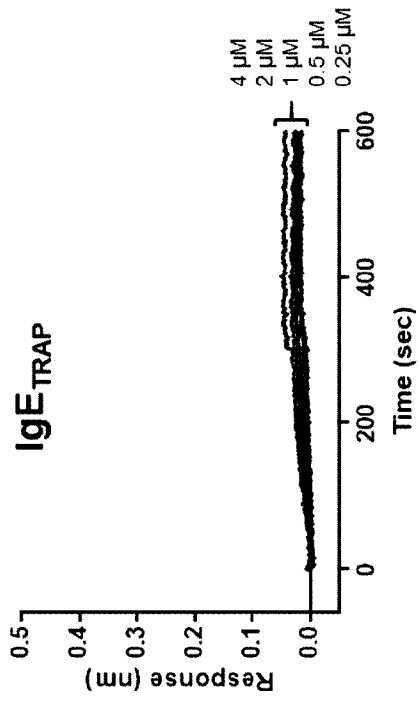
FcγRIIB

[도5d]



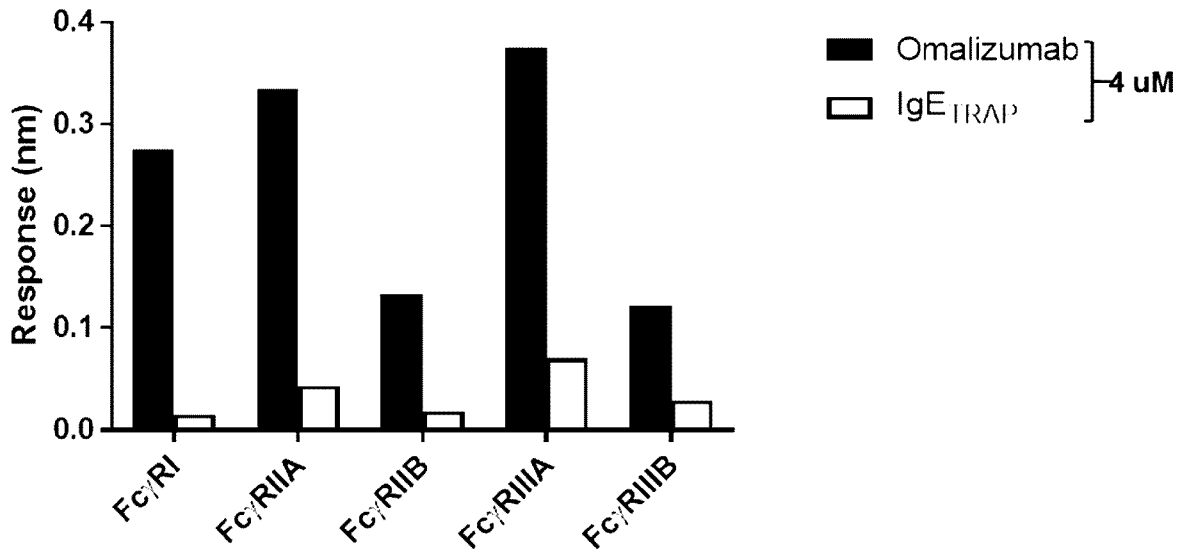
FcγRIIIA

[도5e]

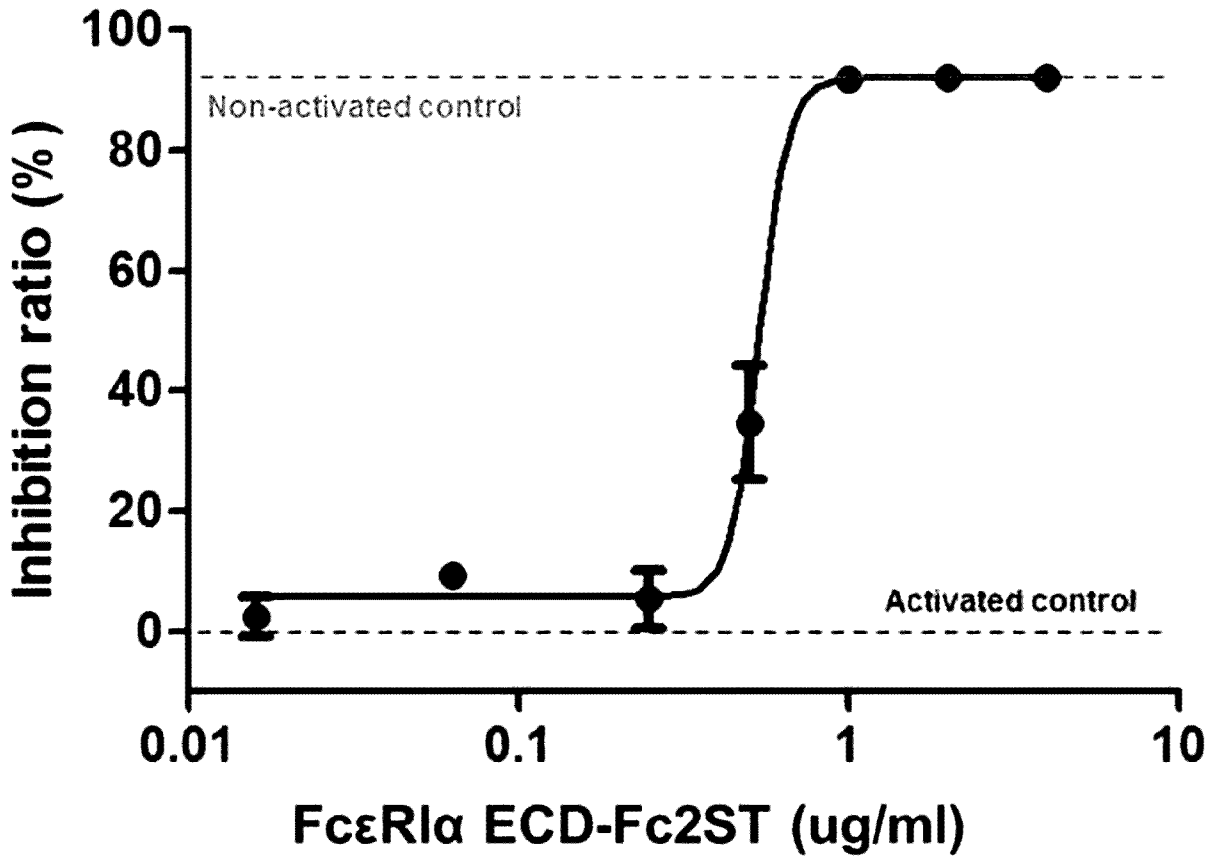


Fc γ RIIIB

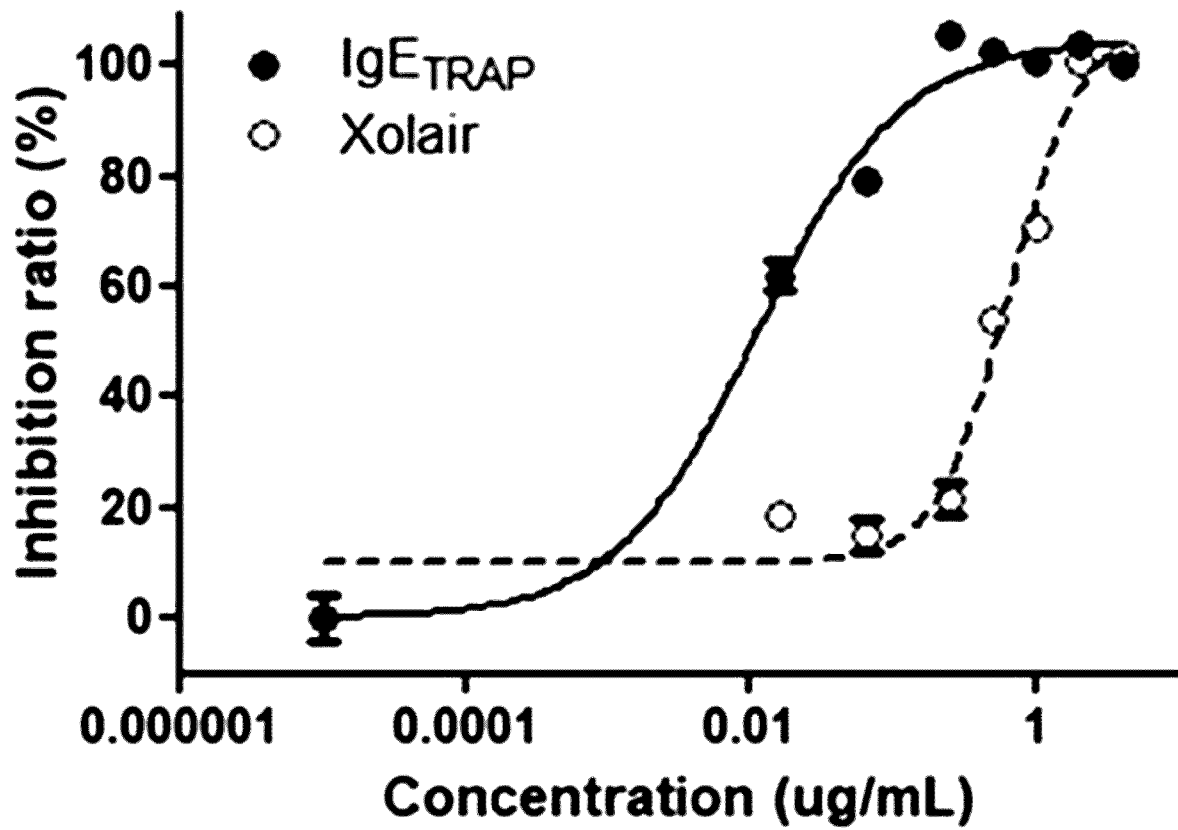
[도6]



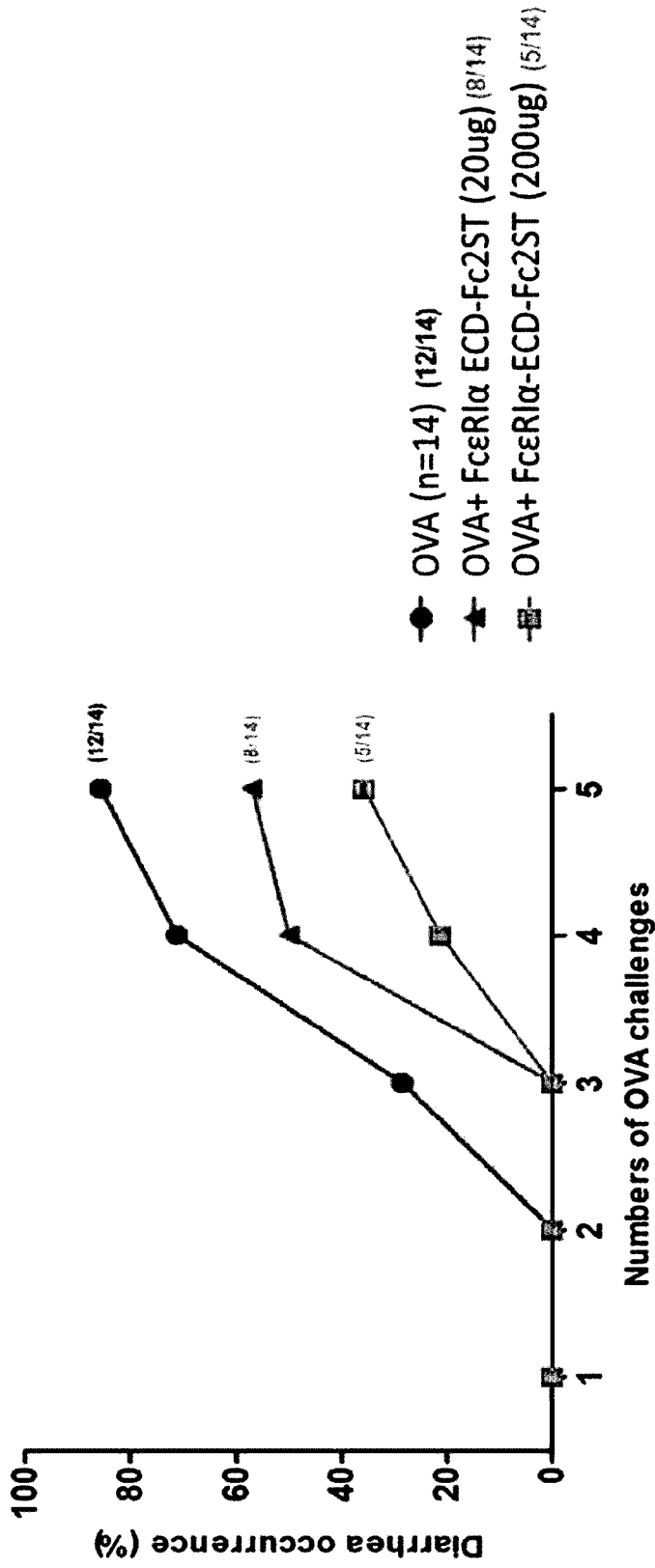
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/000274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/735(2006.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61K 38/00(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 14/735; C07K 14/43; A23L 33/18; A61K 38/00

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: FcεRIα-ECD, Fc fragment, dimer, allergy, IgD

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008-028068 A2 (GENENTECH, INC. et al.) 06 March 2008 See claims 1, 18-20; page 31, line 1-page 33, line 11 and page 36, lines 9-23.	1,4,5,9,10,11,15 .16
Y		2,3,6,7,8,17,18
Y	NCBI. GENBANK ACCESSION NO. IJ89A. Chain A, High Affinity Immunoglobulin Epsilon Receptor Alpha-Subunit. 10 October 2012 See all sequences.	2
Y	NCBI. GENBANK ACCESSION NO. AJD85779.1. Anti-human CD40 12E12 antibody HIV antigen fusion protein [synthetic construct]. 19 January 2015 See all sequences.	3
Y	NCBI. GENBANK ACCESSION NO. AAA52771.1. immunoglobulin delta-chain, partial [Homo sapiens]. 01 August 2016 See all sequences.	6
Y	NCBI. GENBANK ACCESSION NO. AAA52770.1. immunoglobulin delta-chain, partial [Homo sapiens]. 01 August 2016 See all sequences.	7,8



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

12 APRIL 2019 (12.04.2019)

Date of mailing of the international search report

15 APRIL 2019 (15.04.2019)

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/KR2019/000274

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAKAHASHI, K. et al. The High Affinity IgE Receptor as a Target for Anti-allergic Agents. Allergy International. 2005, vol. 54, no. 1, pages 1-5 See abstract; page 1, right column, lines 8-10.	17,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/000274

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.: **19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 19 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains 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.: **13**
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:
Claim 13 refers to a claim violating the provisions of PCT Rule 6.4(a), and thus is unclear.

3. Claims Nos.: **12, 14**
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/KR2019/000274

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2008-028068 A2	06/03/2008	WO 2008-028068 A3	24/12/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/735(2006.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61K 38/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/735; C07K 14/43; A23L 33/18; A61K 38/00 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: Fc ε RI α -ECD, Fc fragment, 이량체, 알레르기, IgD		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2008-028068 A2 (GENENTECH, INC. 등) 2008.03.06 청구항 1, 18-20; 페이지 31, 라인 1 - 페이지 33, 라인 11 및 페이지 36, 라인 9-23 참조.	1,4,5,9,10,11,15,16
Y		2,3,6,7,8,17,18
Y	NCBI, GENBANK ACESSION NO.1J89A, 'Chain A, High Affinity Immunoglobulin Epsilon Receptor Alpha- Subunit' 2012.10.10 전체 서열 참조.	2
Y	NCBI, GENBANK ACESSION NO.AJD85779.1, 'Anti-human CD40 12E12 antibody HIV antigen fusion protein [synthetic construct]', 2015.01.19 전체 서열 참조.	3
Y	NCBI, GENBANK ACESSION NO. AAA52771.1, 'immunoglobulin delta-chain, partial [Homo sapiens]', 2016.08.01 전체 서열 참조.	6
Y	NCBI, GENBANK ACESSION NO. AAA52770.1, 'immunoglobulin delta-chain, partial [Homo sapiens]', 2016.08.01 전체 서열 참조.	7,8
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2019년 04월 12일 (12.04.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 04월 15일 (15.04.2019)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	TAKAHASHI, K. 등, `The High Affinity IgE Receptor as a Target for Anti-allergic Agents' , Allergology International, 2005, 제54권, 제1호, 페이지 1-5 초록; 페이지 1, 우컬럼, 라인 8-10 참조.	17,18

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: 19
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제19항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항: 13
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제13항은 PCT 규칙 제6.4(a)을 위반하는 청구항을 인용하므로 불명료합니다.
- 3. 청구항: 12, 14
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
WO 2008-028068 A2	2008/03/06	WO 2008-028068 A3	2008/12/24