

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2011/132940 A2

PCT

(43) 국제공개일
2011년 10월 27일 (27.10.2011)

- (51) 국제특허분류:
C07K 1/107 (2006.01) C40B 40/10 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/002840
- (22) 국제출원일: 2011년 4월 20일 (20.04.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0036608 2010년 4월 20일 (20.04.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 광주광역시 북구 첨단과기로 261(오룡동 1번지), 500-712 Gwangju (KR).

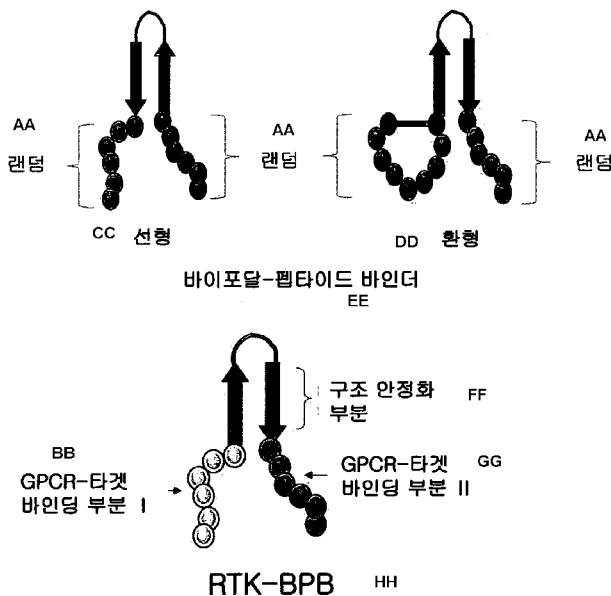
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 전상용 (JON, Sang Yong) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR). 김성현 (KIM, Sung Hyun) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR). 박세호 (PARK, Se Ho) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR). 김대진 (KIM, Dae Jin) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR). 이상현 (LEE, Sang Heon) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 Seoul (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: RTK-BPB SPECIFICALLY BINDING TO RTK

(54) 발명의 명칭: RTK에 특이적으로 결합하는 RTK-BPB

Fig. 1a



(57) Abstract: The present invention relates to a cytokine-bipodal peptide binder specifically binding to cytokine, comprising (a) a structure stabilizing region comprising parallel, antiparallel, or parallel and antiparallel amino acid strands in which an interstrand noncovalent bond is formed; and (b) a cytokine-target binding region I and a cytokine-target binding region II which bind to both ends of the structure stabilizing region and comprise n and m amino acids randomly selected, respectively. The cytokine-bipodal peptide binder of the present invention shows a very low level (for example, nM level) of KD value (dissociation constant) to cytokine, thereby showing very high affinity to a cytokine target. The cytokine-bipodal peptide binder of the present invention has medical use, can be used for *in vivo* molecular imaging and targeting for drug delivery, and is very useful as an escort molecule.

(57) 요약서: 본 발명은 (a) 가닥간(interstrand) 비공유결합이 형성된 패러럴(parallel), 안티패러럴(antiparallel) 또는 패러럴(parallel)과 안티패러럴(antiparallel)

[다음 쪽 계속]

AA ... random
BB ... GPCR- target binding region I
CC ... linear
DD ... cyclic
EE ... bipodal peptide binder
FF ... structure stabilizing region
GG ... GPCR- target binding region II
HH ... RTK-BPB



(81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

아미노산 가닥들을 포함하는 구조 안정화 부위(structure stabilizing region); 및 (b) 상기 구조 안정화 부위의 양 말단에 결합되어 있고 무작위적으로 선택된 각각 n 및 m 개의 아미노산을 포함하는 Cytokine-타겟 결합 부위 I(Cytokine-target binding region I) 및 Cytokine-타겟 결합 부위 II(Cytokine-target binding region II)를 포함하는 Cytokine 에 특이적으로 결합하는 Cytokine-바이포달 펩타이드 바인더에 관한 것으로서, 본 발명의 Cytokine-바이포달 펩타이드 바인더는 Cytokine 에 대하여 매우 낮은 수준(예컨대, nM 수준)의 KD 값(해리상수)을 나타내어, Cytokine 타겟에 매우 높은 친화도를 나타낸다. 본 발명의 Cytokine-바이포달 펩타이드 바인더는 의약으로서의 용도를 가질 뿐만 아니라, 인 비보 분자 이미징, 및 약물전달용 타겟팅을 하는 데 이용될 수 있으며, 에스코트 분자로도 매우 유용하게 이용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

RTK 에 특이적으로 결합하는 RTK-BPB

5 【기술 분야】

본 발명은 수용체 타이로신 키나아제(receptor tyrosine kinase: RTK)에 특이적으로 결합하는 RTK-BPB 에 관한 것이다.

【배경 기술】

10 항체는 B 세포가 생산하는 혈장단백질의 일종인 면역글로불린 단백질로써 외부에서 들어온 항원의 특정부위를 특이적으로 인식하여 결합함으로써 항원을 비활성화하거나 무력화시킨다. 이러한 항원-항체 반응의 특이성과 고도의 친화도 및 수천만 종류의 항원을 구별할 수 있는 항체의 다양성을 응용하여 오늘날 진단제와 치료제 등을 포함하는 많은
15 종류의 항체 제품이 출현하게 되었다. 현재 FDA 에서는 21 개의 단일클론항체를 승인하였으며 리텍시맵(Rituximab) 및 헤르셉틴(Herceptin)과 같은 항체는 다른 치료에서 전혀 반응을 보이지 않던 환자들의 50% 이상에서 효과를 보인바 있으며 실질적으로 여러 연구에서 단일클론항체를 이용하여 림프종, 대장암 또는 유방암 등에
20 성공적인 임상치료를 보여주고 있다. 치료용 항체의 전체 시장 규모는 2004 년 100 억 달러 규모에서 2010 년에는 300 억 달러로 연평균 20%의 성장률을 보일 것으로 추정하고 있으며, 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정되고 있다. 항체를 이용한 신약개발이 활발해지는 이유는 약품의 개발기간이 짧으며 투자비용이 작고 부작용을 쉽게 예측할
25 수 있기 때문이다. 또한 항체는 생약이어서 인체가 거의 영향을 받지 않으며 체내에서의 반감기가 저 분자량 약품에 비하여 압도적으로 길어서 환자에게 친화적이다. 이러한 유용성에도 불구하고 인간에서 단일클론항체는 외래 항원으로 인식하여 심한 알레르기 반응 또는 과민반응을 일으키기도 한다. 또한, 이러한 항암 기능의 단클론 항체를
30 임상적으로 사용할 경우 생산 단가가 높기 때문에 치료제로서의 가격이 급격히 상승한다는 단점이 있으며, 항체를 배양하는 방법 및 정제 방법 등

광범위한 분야의 기술들이 각종 지적 소유권에 의해 보호받고 있기 때문에
비싼 라이선싱비를 지불해야 한다.

따라서 이 문제를 해결하기 위해서 미국을 중심으로 유럽연합에서
항체 대체 단백질 개발이 태동기에 있다. 항체 대체 단백질은 항체와
5 같이 불변영역과 가변영역을 가질 수 있도록 만든 재조합 단백질로 크기가
작고 안정한 단백질의 일정부분을 무작위 서열의 아미노산으로 바꾸어
라이브러리를 만들고 이를 표적물질에 대해 스크리닝을 하여 높은 친화력과
좋은 특이성을 가진 물질을 찾을 수 있다. 예를 들어 항체 대체 단백질중
아비머(avimer)와 아피바디(affibody)는 표적물질에 대해 피코몰(picomole)
10 정도의 친화력을 가진 예시가 보고되어 있다. 이런 항체 대체 단백질은
크기가 작고 안정해서 암세포에 깊이 침투 가능하며 일반적으로 면역반응을
적게 일으킨다고 보고되어 있다. 그리고 무엇보다도 광범위한 항체 특허
문제에서 벗어 날 수 있으며 박테리아에서 쉽게 대량정제 할 수 있기
때문에 생산단가가 낮아 경제적으로 항체보다 큰 장점을 가진다. 현재
15 개발된 항체 대체 단백질은 40 개가 있으나 이 중 벤처 회사나 다국적
제약회사에서 상용화를 시도하고 있는 항체 대체 단백질은 피브로넥틴 타입
III 도메인, 리포칼린, LDLR-A 도메인, 크리스탈린, 프로테인 A, 안키린
리피트(Ankyrin repeat), BPTI 라는 단백질을 이용하고 있으며 타겟에 대한
피코몰에서 수 나노몰정도의 높은 친화력을 가지고 있다. 그 중
20 애드넥틴(Adnectin), 아비머, 쿠니츠(Kunitz) 도메인은 현재 FDA 임상
실험이 진행 중이다.

본 발명은 지금까지의 단백질을 이용한 항체대체 단백질과는 다른
펩타이드 기반 항체대체 단백질에 초점을 맞추었다. 펩타이드는 항체에
비해 적절한 약물동력학, 대량생산성, 낮은 독성, 항원성 억제 및 낮은
25 생산 단가 등으로 인해 현재 항체 치료제를 대체하여 다양하게 활용되고
있다. 치료용 약으로서의 펩타이드의 장점은 생산 단가가 낮고, 안전성
및 반응성이 높으며, 특허 로열티가 상대적으로 저렴하고, 원하지 않는
면역시스템에 덜 노출되어 펩타이드 자체에 대한 항체 생산을 억제 할 수
있으며, 합성을 통한 변형이 쉽고 정확하다는 것이다. 그러나 대부분의
30 펩타이드는 항체에 비해 특정 단백질 타겟에 대해 낮은 친화력 및 특이성을
보이기 때문에 여러 응용분야에 사용되지 못하는 단점이 있다. 따라서,

펩타이드의 단점을 극복할 수 있는 새로운 펩타이드 기반 항체 대체 단백질 개발에 대한 요구가 당업계에 대두되고 있다. 이에 본 발명자들은 생물학적 타겟 분자에 높은 친화성으로 특이적 결합이 가능한 펩타이드 물질을 개발하고자 노력하였다. 이는 현재 매우 많은 타겟에 대해 보고된 낮은 친화력을 가진 펩타이드를 이용하여 빠른 시간안에 높은 친화성 및 특이성을 가진 신약후보를 만들 수 있는 기술이 될 것으로 기대된다.

한편, 수용체 타이로신 키나아제는 많은 성장인자, 사이토카인 및 호르몬에 대한 세포표면 수용체이다. 인간 지놈에서 발견된 약 90 개의 타이로신 키나아제 유전자 중에서 58 개 유전자는 수용체 타이로신 키나아제를 코딩한다(Robinson DR et al., *Oncogene* 19(49):5548-5557(2000)). 수용체 타이로신 키나아제(RTKs)는 정상적인 세포 프로세스들에서 중요한 조절자의 역할을 할 뿐 아니라, 많은 암의 발생 및 발전에 중요한 역할을 한다(Zwick, E. et al., *Endocr. Relat. Cancer* 8(3):161-173(2001)). 따라서 RTKs 를 타겟으로 한 많은 의약 개발이 이루어지고 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 상세한 설명】

본 발명자들은 본 발명자들은 RTK 결합성 및 특이성에 기초하여 다양한 물질들을 세포 내 또는 세포 표면에 운반할 수 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 비교적 리지드(rigid)한 펩타이드 골격을 가지는 구조안정화 부위의 양 말단에 무작위적(random)으로 펩타이드를 결합시키고, 이 두 펩타이드를 공동으로 RTK 분자에 결합시키는 경우에는 크게 증가된 결합능 및 특이성을 가지는 바이포달 펩타이드 바인더(BPB)를 얻을 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 RTK(receptor tyrosine kinase)-바이포달 펩타이드 바인더(RTK-BPB)를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 RTK(receptor tyrosine kinase)-바이포달 펩타이드 바인더(RTK-BPB)를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

5

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 RTK(receptor tyrosine kinase)-바이포달 펩타이드 바인더(RTK-BPB)을 제공한다:

(a) 가닥간(interstrand) 비공유결합이 형성된 패러럴(parallel),
10 안티패러럴(antiparallel) 또는 패러럴(parallel)과 안티패러럴(antiparallel) 아미노산 가닥들을 포함하는 구조 안정화 부위(structure stabilizing region); 및

(b) 상기 구조 안정화 부위의 양 말단에 결합되어 있고 무작위적으로
15 선택된 각각 n 및 m 개의 아미노산을 포함하는 RTK-타겟 결합 부위 I(RTK-target binding region I) 및 RTK-타겟 결합 부위 II(RTK-target binding region II)를 포함하는 RTK 에 특이적으로 결합하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

본 발명자들은 본 발명자들은 RTK 결합성 및 특이성에 기초하여
20 다양한 물질들을 세포 내 또는 세포 표면에 운반할 수 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 비교적 리지드(rigid)한 펩타이드 골격을 가지는 구조안정화 부위의 양 말단에 무작위적(random)으로 펩타이드를 결합시키고, 이 두 펩타이드를 공동으로 RTK 분자에 결합시키는 경우에는 크게 증가된 결합능 및 특이성을 가지는 바이포달 펩타이드 바인더(BPB)를 얻을 수 있음을 확인하였다.

25 본 발명의 기본적인 전략은 리지드한 펩타이드 골격의 양 말단에 타겟에 결합되는 펩타이드를 연결하는 것이다. 이 경우 리지드한 펩타이드 골격은 바이포달 펩타이드 바인더의 전체적인 구조를 안정화시키는 작용을 하며, 타겟 결합 부위 I 및 타겟 결합 부위 II가 타겟 분자에 결합되는 것을 강화시킨다.

30 본 발명에서 이용 가능한 구조안정화 부위는 패러럴, 안티패러럴 또는 패러럴과 안티패러럴 아미노산 가닥들을 포함하며,

가닥간(interstrand) 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용, 양이온-파이 상호작용 또는 이들의 조합에 의한 비공유결합이 형성되는 단백질 구조 모티프들을 포함한다. 가닥간 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용, 양이온-파이 상호작용 또는 이들의 조합에 의한 형성되는 비공유결합은 구조안정화 부위의 견고성(rigidity)에 기여한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 구조안정화 부위에서의 가닥간(interstrand) 비공유결합은 수소결합, 소수성 상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용 또는 이들의 조합을 포함한다.

선택적으로, 구조안정화 부위에 공유결합이 있을 수 있다. 예를 들어, 구조안정화 부위에 이황화결합을 형성시켜 구조안정화 부위의 견고성을 더 증가시킬 수 있다. 이러한 공유결합에 의한 견고성 증가는 바이포달 펩타이드 바인더의 타겟에 대한 특이도 및 친화도를 고려하여 부여한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 구조 안정화 부위의 아미노산 가닥들은 링커로 연결되어 있다. 본 명세서에서 가닥을 언급하면서 사용되는 용어 “링커”는 가닥과 가닥을 연결시켜 주는 물질을 의미한다. 예컨대, 구조안정화 부위로서 β -헤어핀이 이용되는 경우에는 β -헤어핀에 있는 턴 서열이 링커의 역할을 하며, 루이신 지퍼가 이용되는 경우에는 루이신 지퍼의 두 C-말단을 연결하는 물질(예컨대, 펩타이드 링커)이 링커의 역할을 한다.

링커는 패러럴, 안티패러럴 또는 패러럴과 안티패러럴 아미노산 가닥들을 연결한다. 예컨대, 패러럴 방식으로 정렬된 최소 2 개의 가닥(바람직하게는 2 개의 가닥), 안티패러럴 방식으로 정렬된 최소 2 개의 가닥(바람직하게는 2 개의 가닥), 패러럴 및 안티패러럴 방식으로 정렬된 최소 3 개의 가닥(바람직하게는 3 개의 가닥)을 링커가 연결하게 된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 링커는 턴 서열 또는 펩타이드 링커이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 턴 서열은 β -턴, γ -턴, α -턴, π -턴 또는 ω -loop 이다(Venkatachalam CM (1968), *Biopolymers*, 6,

1425-1436; Nemethy G and Printz MP. (1972), *Macromolecules*, 5, 755-758; Lewis PN et al., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 303, 211-229; Toniolo C. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 9, 1-44; Richardson JS. (1981), *Adv. Protein Chem.*, 34, 167-339; Rose GD et al., (1985), *Adv. Protein Chem.*, 37, 1-109; Milner-White EJ and Poet R. (1987), *TIBS*, 12, 189-192; Wilmot CM and Thornton JM. (1988), *J. Mol. Biol.*, 203, 221-232; Milner-White EJ. (1990), *J. Mol. Biol.*, 216, 385-397; Pavone V et al. (1996), *Biopolymers*, 38, 705-721; Rajashankar KR and Ramakumar S. (1996), *Protein Sci.*, 5, 932-946). 가장 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 턴 서열은 β -턴이다.

턴 서열로서 β -턴이 이용되는 경우, 바람직하게는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II', 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, 보다 바람직하게는 타입 I, 타입 I'; 타입 II, 타입 II' 턴 서열이고, 보다 더 바람직하게는 타입 I' 또는 타입 II' 턴 서열이며, 가장 바람직하게는 타입 I' 턴 서열이다(B. L. Sibanda et al., *J. Mol. Biol.*, 1989, 206, 4, 759-777; B. L. Sibanda et al., *Methods Enzymol.*, 1991, 202, 59-82).

본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 턴 서열로서 이용될 수 있는 것은 H. Jane Dyson et al., *Eur. J. Biochem.* 255:462-471(1998)에 개시되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 턴 서열로 이용될 수 있는 것은 다음의 아미노산 서열을 포함한다: X-Pro-Gly-Glu-Val; Ala-X-Gly-Glu-Val (X 는 20 개의 아미노산으로부터 선택된다).

본 발명의 일 구현예에 따라, 구조안정화 부위로서 β -쉬트 또는 루이신 지퍼가 이용되는 경우, 패러럴 방식으로 정렬된 2 개의 가닥 또는 안티패러럴 방식으로 정렬된 2 개의 가닥을 펩타이드 링커가 연결하는 것이 바람직하다.

펩타이드 링커는 당업계에 공지된 어떠한 것도 이용 가능하다. 적합한 펩타이드 링커의 서열은 다음과 같은 요소를 고려하여 선택될 수 있다: (a) 유연한 연장된 컨포메이션(flexible extended conformation)에 적용될 수 있는 능력; (b) 생물학적 타겟 분자와 상호작용 하는 이차구조를 생성하지 않는 능력; 및 (c) 생물학적 타겟 분자와 상호작용하는 소수성 잔기 또는 전하를 갖는 잔기의 부재. 바람직한 펩타이드 링커는 Gly, Asn

및 Ser 잔기를 포함한다. Thr 및 Ala 과 같은 다른 중성 아미노산들도 링커 서열에 포함될 수 있다. 링커에 적합한 아미노산 서열은 Maratea et al., *Gene* 40:39-46(1985); Murphy et al., *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 83:8258-8562(1986); 미국 특허 제 4,935,233 호, 제 4,751,180 호 및
 5 제 5,990,275 호에 개시되어 있다. 펩타이드 링커 서열은 1-50 아미노산 잔기로 구성될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 구조안정화 부위는 β -헤어핀, 링커로 연결된 β -쉬트 또는 링커로 연결된 루이신 지퍼이고, 보다 바람직하게는 구조안정화 부위는 β -헤어핀 또는 링커로 연결된 β -
 10 쉬트이며, 가장 바람직하게는 β -헤어핀이다.

본 명세서에서 용어 " β -헤어핀"은 두 개의 β 가닥을 포함하는 가장 간단한 단백질 모티프를 의미하며, 이 두 개의 β 가닥은 서로 안티패러럴한 정렬을 나타낸다. 이 β -헤어핀에서 두 개의 β 가닥은 일반적으로 턴 서열에 의해 연결된다.

바람직하게는, β -헤어핀에 적용되는 턴 서열은 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II', 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, 보다 바람직하게는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 턴 서열이고, 보다 더 바람직하게는 타입 I' 또는 타입 II' 턴 서열이며, 가장 바람직하게는 타입 I' 턴 서열이다. 또한, X-Pro-Gly-Glu-Val; 또는 Ala-X-Gly-Glu-Val (X는
 15 20 개의 아미노산으로부터 선택된다)으로 표시되는 턴 서열도 β -헤어핀에 이용될 수 있다.

본 발명의 예시적인 실시예에 따르면, 타입 I 턴 서열은 Asp-Asp-Ala-Thr-Lys-Thr 이고, 타입 I' 턴 서열은 Glu-Asn-Gly-Lys 이며, 타입 II 턴 서열은 X-Pro-Gly-Glu-Val; 또는 Ala-X-Gly-Glu-Val (X는 20 개의
 25 아미노산으로부터 선택된다)이고, 타입 II' 턴 서열은 Glu-Gly-Asn-Lys 또는 Glu-D-Pro-Asn-Lys 이다.

β -헤어핀 콘포메이션을 갖는 펩타이드는 당업계에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,914,123 호 및 Andrea G. Cochran et al., PNAS, 98(10):5578-5583)에 개시되어 있는 트립토판 지퍼, WO 2005/047503 에
 30 개시되어 있는 주형-고정된 β -헤어핀 미믹틱, 미국 특허 제 5,807,979 호에 개시되어 있는 β -헤어핀 변형체들이 잘 알려져 있다. 이외에도, β -

헤어핀 콘포메이션을 갖는 펩타이드는 Smith & Regan (1995) Science 270:980-982; Chou & Fassman (1978) Annu. Rev. Biochem. 47:251-276; Kim & Berg (1993) Nature 362:267-270; Minor & Kim (1994) Nature 367:660-663; Minor & Kim (1993) Nature 371:264-267; Smith et al. Biochemistry 5 (1994) 33:5510-5517; Searle et al. (1995) Nat. Struct. Biol. 2:999-1006; Haque & Gellman (1997) J. Am. Chem. Soc. 119:2303-2304; Blanco et al. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115:5887-5888; de Alba et al. (1996) Fold. Des. 1: 133-144; de Alba et al. (1997) Protein Sci. 6:2548-2560; Ramirez-Alvarado et al. (1996) Nat. Struct. Biol. 3:604-612; Stanger & 10 Gellman (1998) J. Am. Chem. Soc. 120:4236-4237; Maynard & Searle (1997) Chem. Commun. 1297-1298; Griffiths-Jones et al. (1998) Chem. Commun. 789-790; Maynard et al. (1998) J. Am. Chem. Soc. 120:1996-2007; 및 Blanco et al. (1994) Nat. Struct. Biol. 1:584-590 에 개시되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

15 β -헤어핀 콘포메이션을 갖는 펩타이드를 구조안정화 부위로 이용하는 경우, 가장 바람직하게는 트립토판 지퍼를 이용한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 트립토판 지퍼는 다음 일반식 I 로 표시된다:

일반식 I

20 $X_1\text{-Trp}(X_2)X_3\text{-}X_4\text{-}X_5(X'_2)X_6\text{-}X_7$

X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고, X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His, Val, Ile, Phe 또는 Tyr 이며, X_3 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Phe 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 는 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

25 보다 바람직하게는, 상기 일반식 I 에서 X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고, X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His 또는 Val 이며, X_3 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II 또는 타입 II' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Phe 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 는 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

30 보다 더 바람직하게는, 일반식 I 에서 X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고, X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His 또는 Val 이며, X_3 는 Trp 이고, X_4 는

타입 I, 타입 I', 타입 II 또는 타입 II' 턴 서열이고, X₅는 Trp 이며, X₆는 Trp 이고, X₇는 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

보다 더욱 더 바람직하게는, 일반식 I 에서 X₁은 Ser 이고, X₂ 및 X'₂는 Thr 이며, X₃는 Trp 이고, X₄는 타입 I' 또는 타입 II' 턴 서열이고, X₅는 Trp 이며, X₆는 Trp 이고, X₇는 Lys 이다.

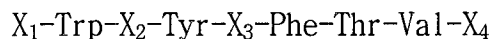
가장 바람직하게는, 일반식 I 에서 X₁은 Ser 이고, X₂ 및 X'₂는 Thr 이며, X₃는 Trp 이고, X₄는 타입 I' 턴 서열 (ENGK) 또는 타입 II' 턴 서열 (EGNK)이고, X₅는 Trp 이며, X₆는 Trp 이고, X₇는 Lys 이다.

본 발명에 적합한 트립토판 지퍼의 예시적인 아미노산 서열은 서열목록 제 1 서열 내지 제 3 서열 및 제 5 서열 내지 제 10 서열에 기재되어 있다.

본 발명에서 구조안정화 부위로서 이용가능한 β-헤어핀 펩타이드는 단백질 G의 B1 도메인으로부터 유래된 펩타이드, 즉 GB1 펩타이드이다.

본 발명에서 GB1 펩타이드가 이용되는 경우, 바람직하게는 구조안정화 부위는 다음 일반식 II로 표시된다:

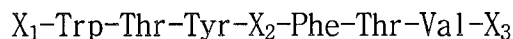
일반식 II



X₁은 Arg, Gly-Glu 또는 Lys-Lys 이고, X₂는 Gln 또는 Thr 이며, X₃는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X₄는 Gln, Thr-Glu 또는 Gln-Glu 이다.

보다 바람직하게는, 일반식 II의 구조안정화 부위는 다음 일반식 II'으로 표시된다:

일반식 II



X₁은 Gly-Glu 또는 Lys-Lys 이고, X₂는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X₃는 Thr-Glu 또는 Gln-Glu 이다.

본 발명에 적합한 GB1 β-헤어핀의 예시적인 아미노산 서열은 서열목록 제 4 서열 및 제 14 서열 내지 제 15 서열에 기재되어 있다.

본 발명에서 구조안정화 부위로서 이용 가능한 β -헤어핀 펩타이드는 HP 펩타이드이다. 본 발명에서 HP 펩타이드가 이용되는 경우, 바람직하게는 구조안정화 부위는 다음 일반식 III으로 표시된다:

일반식 III

5 $X_1-X_2-X_3-\text{Trp}-X_4-X_5-\text{Thr}-X_6-X_7$

X_1 은 Lys 또는 Lys-Lys 이고, X_2 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_3 는 Val 또는 Thr 이며, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Ala 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 은 Glu 또는 Gln-Glu 이다.

10 본 발명에서 구조안정화 부위로서 이용 가능한 또 다른 β -헤어핀 펩타이드는 다음 일반식 IV로 표시된다:

일반식 IV

$X_1-X_2-X_3-\text{Trp}-X_4$

15 X_1 은 Lys-Thr 또는 Gly 이고, X_2 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_3 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_4 는 Thr-Glu 또는 Gly 이다.

일반식 III 및 IV 의 β -헤어핀의 예시적인 아미노산 서열은 서열목록 제 11 서열 내지 제 12 서열, 제 15 서열 및 제 16 서열 내지 제 19 서열에 기재되어 있다.

20 본 발명에 따르면, 구조안정화 부위로서 링커로 연결된 β -쉬트를 이용할 수 있다. β -쉬트 구조에서 패러럴 또는 안티패러럴한, 바람직하게는 안티패러럴한 두 개의 아미노산 가닥이 뻗은 구조(extended form)로 되어 있으며, 아미노산 가닥 사이에 수소 결합이 형성된다.

25 β -쉬트 구조에서 두 개의 아미노산 가닥의 인접한 두 말단은 링커에 의해 연결된다. 링커로서는 상술한 다양한 턴-서열 또는 펩타이드 링커가 이용될 수 있다. 턴-서열이 링커로 이용되는 경우, β -턴 서열이 가장 바람직하다.

30 본 발명의 다른 변형예에 따르면, 구조안정화 부위로서 루이신 지퍼 또는 링커로 연결된 루이신 지퍼가 이용될 수 있다. 루이신 지퍼는 패러럴한 2 개의 α -사슬의 다이머화를 야기하는 보존성 펩타이드 도메인이며, 일반적으로 유전자 발현에 관여하는 단백질에 발견되는

다이머화 도메인이다("Leucine scissors". Glossary of Biochemistry and Molecular Biology (Revised). (1997). Ed. David M. Glick. London: Portland Press; Landschulz WH, et al. (1988) Science 240:1759-1764).

루이신 지퍼는 일반적으로 헵타드(heptad) 반복 서열을 포함하며, 루이신 잔기가 4 번째 또는 5 번째에 위치해 있다. 예를 들어, 본 발명에 이용될 수 있는 루이신 지퍼는 LEALKEK, LKALEKE, LKKLVGE, LEDKVEE, LENEVAR 또는 LLSKNYH 의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명에서 이용되는 루이신 지퍼의 구체적인 예를 서열목록 제 39 서열에 기재되어 있다. 루이신 지퍼의 각각의 반은 짧은 α -사슬로 이루어져 있으며, α -사슬간의 직접적인 루이신 접촉이 있다. 전사인자에 있는 루이신 지퍼는 일반적으로 소수성 루이신 지퍼 부위 및 염기성 부위(DNA 분자의 주 그루브와 상호작용하는 부위)로 이루어져 있다. 본 발명에서 루이신 지퍼가 이용되는 경우에는 염기성 부위는 반드시 필요로 하지 않는다. 루이신 지퍼 구조에서 두 개의 아미노산 가닥(즉, 두 개의 α -사슬)의 인접한 두 말단은 링커에 의해 연결될 수 있다. 링커로서는 상술한 다양한 턴-서열 또는 펩타이드 링커가 이용될 수 있으며, 바람직하게는 루이신 지퍼의 구조에 영향을 미치지 않는 펩타이드 링커가 이용된다.

상술한 구조안정화 부위의 양 말단에는 무작위 아미노산 서열이 결합된다. 상기 무작위 아미노산 서열이 RTK-타겟 결합 부위 I 및 RTK-타겟 결합 부위 II를 형성한다. 본 발명의 가장 큰 특징 중 하나는, 구조안정화 부위의 양쪽 말단에 RTK-타겟 결합 부위 I 및 RTK-타겟 결합 부위 II를 연결하여 바이포달 방식으로 펩타이드 바인더를 제작하는 것이다. RTK-타겟 결합 부위 I 및 RTK-타겟 결합 부위 II는 서로 협동적으로(cooperatively) 타겟에 결합함으로써, RTK 에 대한 친화도를 크게 증가시킨다.

RTK-타겟 결합 부위 I 의 아미노산 개수 n 은 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 2-100 의 정수, 보다 바람직하게는 2-50 의 정수, 보다 더욱 더 바람직하게는 2-20 의 정수, 가장 바람직하게는 3-10 의 정수이다.

RTK-타겟 결합 부위 II의 아미노산 개수 m 은 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 2-100 의 정수, 보다 바람직하게는 2-50 의 정수,

보다 더욱 더 바람직하게는 2-20 의 정수, 가장 바람직하게는 3-10 의 정수이다.

RTK-타겟 결합 부위 I 및 RTK-타겟 결합 부위 II에는 서로 각각 다른 또는 동일한 개수의 아미노산 잔기가 포함될 수 있다. RTK-타겟 결합 부위 I 및 RTK-타겟 결합 부위 II에는 서로 각각 다른 또는 동일한 아미노산 서열이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 서로 각각 다른 아미노산 서열이 포함된다.

RTK-타겟 결합 부위 I 및/또는 RTK-타겟 결합 부위 II에 포함되는 아미노산 서열은 선형의 아미노산 서열 또는 환형의 아미노산 서열이다. 타겟 결합 부위의 펩타이드 서열의 안정성을 증가시키기 위하여, RTK-타겟 결합 부위 I 및/또는 RTK-타겟 결합 부위 II에 포함되는 아미노산 서열 중에서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 변형될 수 있다.

생물학적 타겟 분자에 결합되는 본 발명의 RTK-BPB 는 생체 내 생리학적 반응의 조절, 생체 내 물질의 검출, 인 비보 분자 이미징, 및 약물전달용 타겟팅을 하는 데 이용될 수 있으며, 에스코트 분자로도 이용될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 구조 안정화 부위, RTK-타겟 결합 부위 I 또는 RTK-타겟 결합 부위 II(보다 바람직하게는, 구조안정화 부위, 보다 더 바람직하게는 구조안정화 부위의 링커)에 카르고가 결합되어 있다. 상기 카르고의 예는 검출가능한 신호를 발생시키는 레이블, 화학약물, 바이오약물 또는 나노입자를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 검출가능한 신호를 발생시키는 레이블은 T1 조영물질(예컨대, Gd 킬레이트 화합물), T2 조영물질(예컨대, 초상자성 물질(예: 마그네타이트, Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, 망간 페라이트, 코발트 페라이트 및 니켈 페라이트)), 방사성 동위 원소(예컨대, ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , P^{32} , S^{35} , ^{44}Sc , ^{45}Ti , ^{118}I , ^{136}La , ^{198}Tl , ^{200}Tl , ^{205}Bi 및 ^{206}Bi), 형광물질(플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민

(lissamine), 그리고 Cy3 와 Cy5), 화학발광단, 자기입자, 매스 표지 또는 전자밀집입자를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

RTK-타겟 결합 부위 I 및/또는 RTK-타겟 결합 부위 II는 RTK 에 결합하는 아미노산 서열을 포함한다.

5 **본 발명의 BPB 분자가 결합하는 RTK 은 당업계에 공지된 다양한 RTK 을 포함하며,** Epidermal growth factor receptor family, Insulin receptor family, Platelet derived growth factor receptor family, Fibroblast growth factor receptor family, Vascular endothelial growth factor receptor family, HGF receptor family, Trk receptor family, Eph
10 receptor family, AXL receptor family, LTK receptor family, TIE receptor family, ROR receptor family, DDR receptor family, RET receptor family, KLG receptor family 및 RYK receptor family, MuSK receptor family 를 포함한다.

본 발명의 RTK-BPB 는 RTK, 바람직하게는 RTK 의 세포외 도메인에
15 결합하여 RTK 에 대한 아고니스트 또는 안타고니스트 작용을 한다. RTK 에 대한 아고니스트는 RTK 에 의해 촉발되는 세포 내 시그널링을 촉진하며, RTK 에 대한 안타고니스트는 RTK 에 의해 촉발되는 세포 내 시그널링을 억제하는 작용을 한다.

본 발명의 RTK-BPB 는 세포 표면에 노출된 RTK 의 세포외 도메인에
20 결합할 수도 있지만, 세포 내 도메인에도 결합하여 GPCR 의 작용을 조절할 수 있다.

RTK-BPB 가 세포 내 도메인을 타겟팅 하는 경우, 바람직하게는 RTK-BPB 는 추가적으로 세포막투과 펩타이드(CPP)를 포함한다.

상기 CPP 는 당업계에 공지된 다양한 CPP 를 포함하며, 예를 들어
25 HIV-1 Tat 단백질, 올리고알지닌, ANTP 펩타이드, HSV VP22 전사조절단백질, vFGF 에서 유래된 MTS 펩타이드, Penetratin, Transportan, Pep-1 펩타이드, Pep-7 펩타이드, Buforin II, MAP(model amphiphatic peptide), k-FGF, Ku 70, pVEC, SynB1 또는 HN-1 를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 CPP 를 바이포달 펩타이드에 결합시키는 방법은 다양한 방법이 있으며,
30 예를 들어 바이포달 펩타이드의 구조 안정화 부위에 있는 루프 부분의 라이신 잔기와 CPP 를 공유결합 시킨다.

상술한 바와 같이, 본 발명의 바이포달 펩타이드 바인더는 전형적으로 "N-RTK-타겟 결합 부위 I-구조안정화 부위의 한 가닥-링커-구조안정화 부위의 다른 가닥-RTK-타겟 결합 부위 II-C"의 컨스트럭트를 갖는다.

5 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 RTK-바이포달 펩타이드 바인더에서 RTK-타겟 결합 부위 I 과 구조안정화 부위의 한 가닥 사이 및/또는 구조안정화 부위의 다른 가닥-RTK-타겟 결합 부위 II 사이에는, RTK-타겟 결합 부위와 구조안정화 부위 간의 상호 구조적 영향을 차단하는 구조영향 억제부위(structure influence inhibiting region)를
10 포함한다. 회전 부위에는 펩타이드 분자에서 ϕ 와 ψ 의 회전이 비교적 자유로운 아미노산이 위치한다. 바람직하게는, ϕ 와 ψ 의 회전이 비교적 자유로운 아미노산은 글라이신, 알라닌 및 세린이다. 구조영향 억제부위에는 1-10 개, 바람직하게는 1-8 개, 보다 바람직하게는 1-3 개의 아미노산 잔기가 위치할 수 있다.

15 상술한 컨스트럭트를 갖는 본 발명의 RTK-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 얻을 수 있다. 이 라이브러리에서 RTK-바이포달 펩타이드 바인더는 무작위 서열을 갖게 되며, 이는 RTK-타겟 결합 부위 I 및/또는 RTK-타겟 결합 부위 II의 어떤 위치에서도 서열 선호도(sequence preference)가 없거나 또는 지정(또는
20 고정)된 아미노산 잔기가 없다는 것을 의미한다.

예를 들어, RTK-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리는 고상지지체(예컨대, 폴리스틸렌 또는 폴리아크릴아미드 수지) 상에서 실시되는 스플리트-합성 방법(Lam et al. (1991) Nature 354:82; WO 92/00091)에 따라 구축될 수 있다.

25 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, RTK-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리는 세포 표면 전시(cell surface display)방식(예컨대, 파아지 디스플레이, 박테리아 디스플레이 또는 이스트 디스플레이)으로 구축된다. 바람직하게는, RTK-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리는 플라스미드, 박테리오파아지, 파아지미드, 이스트, 박테리아, mRNA 또는
30 라이보솜을 기반으로 하는 디스플레이방법을 통하여 제작될 수 있다.

파아지 디스플레이는 파아지의 표면 상의 코트 단백질에 융합된 단백질 형태로 다양한 폴리펩타이드를 디스플레이하는 기술이다(Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386; Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Clackson and Lowman, *Phage Display*, Oxford University Press(2004)). 필라멘트성 파아지(예컨대, M13)의 유전자 III 또는 유전자 VIII에 발현하고자 하는 유전자를 융합시켜 무작위 펩타이드를 디스플레이한다.

파아지 디스플레이에는 파아지미드가 이용될 수 있다. 파아지미드는 박테리아의 복제원점(예컨대, ColE1) 및 박테리오파아지의 인터제닉(intergenic) 부위의 한 카피를 갖는 플라스미드 벡터이다. 이 파아지미드에 클로닝된 DNA 단편은 플라스미드처럼 증식된다.

RTK-바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리를 파아지 디스플레이 방식으로 구축하는 경우, 본 발명의 바람직한 구현예는 다음의 단계를 포함한다: (i) 파아지 코트 단백질(예컨대, M13 과 같은 필라멘트성 파아지의 유전자 III 또는 유전자 VIII 코트 단백질)을 코딩하는 유전자와 바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 유전자가 융합된 융합 유전자; 및 상기 융합 유전자에 작동적으로 결합된 전사 조절 서열(예컨대, lac 프로모터)을 포함하는 발현 벡터의 라이브러리를 제작하는 단계; (ii) 상기 발현 벡터 라이브러리를 적합한 숙주 세포에 도입시키는 단계; (iii) 상기 숙주세포를 배양하여 재조합 파아지 또는 파아지미드 바이러스 파티클을 형성시켜 융합 단백질이 표면에 디스플레이 되도록 하는 단계; (iv) RTK 분자와 상기 바이러스 파티클을 접촉시켜 파티클을 타겟 분자에 결합시키는 단계; 및 (v) RTK 분자에 결합하지 않은 파티클을 분리하는 단계.

파아지 디스플레이를 이용하여 펩타이드 라이브러리를 구축하고 이들 라이브러리를 스크리닝 하는 방법은 미국 특허 제 5,723,286 호, 제 5,432,018 호, 제 5,580,717 호, 제 5,427,908 호, 제 5,498,530 호, 제 5,770,434 호, 제 5,734,018 호, 제 5,698,426 호, 제 5,763,192 호 및 제 5,723,323 호에 개시되어 있다.

바이포달 펩타이드 바인더를 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제작하는 방법은 당업계에 공지된 방법에 따라 실시될 수 있다. 예를

들어, 공지의 파아지미드 또는 파아지 벡터(예컨대, pIGT2, fUSE5, fAFF1, fd-CAT1, m663, fdtetDOG, pHEN1, pComb3, pComb8, pCANTAB 5E (Pharmacia), LamdaSurfZap, pIF4, PM48, PM52, PM54, fdH 및 p8V5)에 바이포달 펩타이드 바인더를 유전자를 삽입시켜 발현 벡터를 제작할 수 있다.

5 대부분의 파아지 디스플레이 방법이 필라멘트성 파아지를 이용하여 실시되지만, 람다 파아지 디스플레이(WO 95/34683; 미국 특허 제 5,627,024 호), T4 파아지 디스플레이(Ren et al. (1998) Gene 215:439; Zhu (1997) CAN 33:534) 및 T7 파아지 디스플레이(미국 특허 제 5,766,905 호)도 바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리를 구축하는 데
10 이용될 수 있다.

벡터 라이브러리를 적합한 숙주 세포에 도입시키는 방법은 다양한 형질전환 방법에 따라 실시될 수 있으며, 가장 바람직하게는 전기천공(electroporation) 방법에 따라 실시된다(참조: 미국 특허 제 5,186,800 호, 제 5,422,272 호, 제 5,750,373 호). 본 발명에 적합한
15 숙주는 세포는 *E. coli* 와 같은 그람 음성 박테리아 세포이며, 적합한 *E. coli* 숙주는 JM101, *E. coli* K12 strain 294, *E. coli* strain W3110 및 *E. coli* XL-1Blue (Stratagene)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 숙주세포는 형질전환 전에 컴피턴스 세포로 준비하는 것이 바람직하다(Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*,
20 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 형질전환된 세포의 선별은 일반적으로 항생제(예컨대, 테트라사이클린 및 암피실린)를 포함하는 배지에서 배양하여 실시된다. 선별된 형질전환 세포를 헬퍼 파아지의 존재 하에서 추가적으로 배양하여 재조합 파아지 또는 파아지미드 바이러스 파티클을 생성시킨다. 상기 헬퍼 파아지 파아지로 적합한 것은, Ex 헬퍼
25 파아지, M13-K07, M13-VCS 및 R408 을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

생물학적 타겟 분자와 결합하는 바이러스 파티클의 선별은 통상적으로 바이오패닝 과정을 통하여 실시될 수 있다(Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Clackson and Lowman, *Phage Display*, Oxford University
30 Press(2004)).

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 RTK-바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 RTK-바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더의
5 발현용 벡터를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 RTK-바이포달 펩타이드 바인더의 발현용 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성
10 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 RTK-
15 바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 핵산 분자 이외에 상기 핵산 분자에, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ} 프로모터, p_R^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독
20 종결 서열을 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 핵산 분자의 5' -방향쪽에 시그널 서열(예컨대, *pelB*)를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 바이포달 펩타이드 바인더가
25 파아지의 표면에 잘 발현되었는지를 확인하기 위한 태깅 서열(예컨대, *myc tag*)을 추가적으로 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 파아지 코트 단백질, 바람직하게는 M13 과 같은 필라멘트성 파아지의 유전자 III 또는 유전자 VIII 코트 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한다. 본 발명의
30 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 박테리아의 복제원점(예컨대, *ColE1*) 및/또는 박테리오파아지의 복제원점을 포함한다. 한편, 본 발명의

벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자를 포함할 수 있다.

5 본 발명의 형질전환체는 바람직하게는 *E. coli* 와 같은 그람 음성 박테리아 세포이며, 적합한 *E. coli* 숙주는 JM101, *E. coli* K12 strain 294, *E. coli* strain W3110 및 *E. coli* XL-1Blue (Stratagene)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl_2 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (미국 특허 제 5,186,800 호, 제 5,422,272 호, 제 5,750,373 호) 등에 의해 실시될 수 있다.

15 본 발명의 RTK-바이포달 펩타이드 바인더는 매우 낮은 수준(예컨대, nM 수준)의 K_D 값(해리상수)을 나타내어, RTK 분자에 매우 높은 친화도를 나타내는 펩타이드를 제공한다. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 모노포달 방식으로 제작된 바인더와 비교하여 바이포달 펩타이드 바인더는 약 10^2 - 10^5 배 (바람직하게는, 약 10^3 - 10^4 배) 높은 친화도를 나타낸다.

20 본 발명의 RTK-바이포달 펩타이드 바인더는 의약으로서의 용도를 가질 뿐만 아니라, 생체 내 물질의 검출, 인 비보 분자 이미징, 인 비트로 세포 이미징 및 약물전달용 타겟팅을 하는 데 이용될 수 있으며, 에스코트 분자로도 이용될 수 있다.

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

25 (i) 본 발명은 RTK 에 특이적으로 결합하는 RTK-BPB 를 제공한다.

(ii) 본 발명의 RTK-바이포달 펩타이드 바인더에서 구조안정성 부위의 양 말단에 결합되어 있는 이격된(distal) 두 개의 RTK-타겟 결합 부위는 서로 협동적으로(cooperatively), 시너지적(synergetically)하게 타겟에 결합한다.

(iii) 이에, 본 발명의 RTK-바이포달 펩타이드 바인더는 매우 낮은 수준(예컨대, nM 수준)의 K_D 값(해리상수)을 나타내어, 타겟에 매우 높은 친화도를 나타낸다.

(iv) 본 발명의 RTK-BPB 는 생체 내 RTK 에 결합하여, RTK 에 대한
5 antagonist 또는 agonist 작용을 할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a 는 구조안정화 부위로서 β -헤어핀(hairpin)을 포함하는
10 바이포달 펩타이드 바인더(bipodal-peptide binder) 및 RTK-BPB 의 모식도를 나타낸다.

도 1b 는 구조안정화 부위로서 링커로 연결된 β -쉬트를 포함하는 RTK-BPB 의 모식도를 나타낸다.

도 1c 는 구조안정화 부위로서 링커로 연결된 루이신 지퍼를
15 포함하는 RTK-BPB 의 모식도를 나타낸다.

도 1d 는 구조안정화 부위로서 링커로 연결된 루이신-리치 모티프(leucine-rich motif)를 포함하는 RTK-BPB 의 모식도를 나타낸다.

도 2 는 RTK-BPB 라이브러리를 클로닝하기 위한 전략을 나타낸다. pIGT2 파이지미드 벡터 맵에서, pelB 시그널서열, myc tag 은 목적 유전자가
20 파아지의 표면에 잘 발현되었는지를 확인하기 위한 태깅 서열이다. 프로모터로서 lac 프로모터가 이용되었다.

도 3 은 HER2 에 특이적인 파아지 펩타이드를 검색하기 위한 파아지 ELISA 의 실험 결과이다.

도 4a 는 피르로넥틴 ED-B 단백질에 결합하는 특정 바이포달
25 펩타이드 바인더의 친화력을 측정한 결과이다.

도 4b 는 바이포달 펩타이드 바인더 BPB 의 공동 작용 효과의 증명을 위한 친화력을 측정한 결과이다.

도 5 는 바이포달 펩타이드 바인더에서 구조 안정화 부위를 트립토판 지퍼 대신 여러 β -헤어핀 모티프로 바꾸어 바이포달 펩타이드 바인더의
30 친화력을 측정한 결과이다.

도 6 은 바이포달 펩타이드 바인더에서 구조 안정화 부위를 트립토판 지퍼 대신 루이신 지퍼로 바꾸어 바이포달 펩타이드 바인더의 친화력을 측정 한 결과이다.

도 7 은 HER2 에 대한 펩타이드를 합성하여 SPR Biacore system(Biacore AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 친화도를 측정 한 결과이다.

도 8 은 HER2 단백질에 특이적으로 결합하는 재조합 파아지를 여러 단백질에 대해서 ELISA 를 이용한 특이성 검사 결과이다.

도 9 는 HER2 과발현하는 BT-474 세포와 발현이 적은 CHO 세포를 이용하여 상기 펩타이드가 세포의 HER2 를 인식 민감도를 확인한 이미징 실험 결과이다.

도 10 은 VEGFR1-바인딩 BPB 콜로니의 ELISA 결과이다.

도 11 은 스크리닝을 통해 찾은 펩타이드의 BPB1_{VEGFR1} 특이성을 실험한 ELISA 결과이다.

도 12 는 BPB1_{VEGFR1} 의 친화력 측정결과이다.

【실시예】

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 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

25 실험재료 및 실험방법

실시예 1: 라이브러리의 제작

바이포달 펩타이드 바인더 유전자 제작 및 파아지미드 벡터에의 삽입

두 개의 올리고뉴클레오타이드 Beta-F1 (5'-TTCTATGCGGCCAGCTGGCC (NNK)₆GGATCTTGGACATGGGAAAACGGAAAA-3') 및 Beta-B1 (5'-AACAGTTTCTGCGGCCGCTCCTCC TCC(MNN)₆TCCCTTCCATGTCCATTTCCGTT-3')(N 은 A, T, G 또는 C; K 는 G 또는 T; M 은 C 또는 A)를 합성하였다. 이중 사슬을

만들기 위해서 Beta-F1 4 μ M, Beta-B1 4 μ M, 2.5 mM dNTP 혼합액 4 μ l, ExTaq DNA 중합효소 1 μ l(Takara, Seoul, Korea) 및 10 $\times$ PCR 버퍼 5 μ l를 혼합하여 총 50 μ l가 되도록 증류수를 첨가한 혼합액을 총 25 개 만들었다. 이 혼합액을 PCR 반응(94 $^{\circ}$ C에서 5 분, 60 싸이클: 30 $^{\circ}$ C에서 30 초, 72 $^{\circ}$ C에서 30 초 및 72 $^{\circ}$ C에서 7 분)을 하여 이중 사슬로 만든 후 PCR 정제 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하여, 바이포달 펩타이드 바인더 유전자를 얻었다. 바이포달 펩타이드 바인더에 삽입시킬 유전자를 pIGT2 파아지미드 벡터(Ig therapy, Chuncheon, Korea)에 연결하기 위해 인서트 유전자와 pIGT2 파아지미드 벡터에 제한효소를 처리하였다. 약 11 μ g의 인서트 DNA를 *Sfi*I(New England Biolabs(NEB, Ipswich) 및 *Not*I(NEB, Ipswich)으로 각각 4 시간 씩 반응시킨 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 또한, 약 40 μ g의 pIGT2 파아지미드 벡터를 *Sfi*I 및 *Not*I으로 각각 4 시간 씩 반응시킨 후 CIAP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)(NEB, Ipswich)를 넣고 1 시간 동안 반응시킨 후, PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 이들을 UV-가시광선 분광기(Ultrospec 2100pro, Amersham Bioscience)로 정량하여 2.9 μ g의 인서트 유전자를 T4 DNA 리가아제(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 pIGT2 파아지미드 벡터 12 μ g과 18 $^{\circ}$ C에서 15 시간 동안 연결한 후, 에탄올로 침전시켜 TE 버퍼 100 μ l로 DNA를 용해시켰다.

컴피턴트 세포의 준비

E. coli XL1-BLUE 세포(American Type Culture Collection, Manassas, USA)를 LB 아가-플레이트에 선상 도말하였다. 한천 평판 배지에서 자란 균락을 5 ml의 LB 배지에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 200 rpm의 속도로 혼합하면서 하루 동안 배양하였다. 배양된 10 ml의 세포들을 2 l의 LB 배지에 접종하고 같은 방식으로 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.3-0.4가 될 때까지 배양하였다. 배양된 플라스크를 30 분 동안 얼음에 방치한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 4,000 $\times$ g로 20 분 동안 원심 분리하여 가라앉은 세포들을 제외한 상층액을 모두 제거하고, 1 l의 냉각된 멸균 증류수로 현탁시켰다. 이것을 다시 같은 방법으로 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 1 l의 냉각된 멸균 증류수로 재현탁시키고 같은 방식으로 10% 글리세롤 용액 40 ml로 세척을

반복하여 원심 분리한 후, 마지막으로 10% 글리세롤 용액 4 ml로 현탁시킨 후, 200 μ l씩 분주하여 액체 질소에 냉동시킨 뒤 -80°C에 보관하였다.

5 전기 천공법

파아지미드 벡터 12 μ g과 바이포달 펩타이드 바인더에 인서트 DNA 2.9 μ g을 연결 반응시킨 100 μ l를 25 개로 분주하여 전기 천공을 수행하였다. 컴피턴트 세포를 얼음 위에서 녹이고, 200 μ l의 컴피턴트 세포를 연결 반응시킨 용액 4 μ l와 혼합한 후, 냉각하여 준비된 0.2 cm의 큐벳에 넣은 뒤 1 분 동안 얼음 위에 두었다. 전기 천공기 (BioRad, Hercules, CA)를 200 Ω 에서 25 μ F 및 2.5 kV의 조건으로 프로그램하고 준비된 큐벳의 물기를 제거하고 전기 천공기에 위치시킨 후 펄스를 주었다(시간 상수는 4.5-5 msec). 이후 즉시 37°C로 준비한 20 mM의 글루코오스가 포함된 1 ml의 LB 액체배지에 넣고 얻어진 총 25 ml의 세포를 100 ml 시험관에 옮겼다. 한 시간 동안 37°C에서 200 rpm의 속도로 혼합하며 배양한 후 라이브러리의 개수를 측정하기 위해 10 μ l를 희석해서 암피실린 아가 배지에 도말하였다. 남은 세포를 1 l의 LB에 20 mM 글루코오스 및 50 μ g/ml의 암피실린을 넣고 30°C에서 하루 동안 배양하였다. 4°C에서 4,000 $\times$ g로 20 분 동안 원심 분리하여 침전된 세포들을 제외한 상층액을 모두 제거하고, 40 ml의 LB로 재현탁시킨 후 글리세롤을 최종 농도 20% 이상 넣고 -80°C에 보관하였다.

라이브러리에서 재조합 파아지 생산과 PEG 침전

-80°C에 저장된 바이포달 펩타이드 바인더 라이브러리에서 재조합 파아지를 생산하였다. 500 ml 플라스크에 100 ml의 LB 액체배지에 암피실린(50 μ g/ml) 및 20 mM의 글루코오스를 넣은 후, -80°C에 보관된 라이브러리 1 ml를 추가하여 한 시간 동안 37°C에서 150 rpm의 속도로 혼합하며 배양하였다. 여기에 1×10^{11} pfu의 Ex 헬퍼 파아지(Ig therapy, Chuncheon, Korea)를 넣고 다시 한 시간 동안 같은 조건으로 배양하였다. 1,000 $\times$ g로 10 분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하고 여기에 암피실린(50 μ g/ml) 및 카나마이신(25 μ g/ml)이 포함된 LB 액체배지 100

ml을 넣고 하루 동안 배양하여 재조합 파아지를 생산하였다. 배양액을 3,000×g 로 10 분 동안 원심 분리하여 얻은 상층액 100 ml에 PEG/NaCl 25 ml을 혼합하고 얼음에 1 시간 동안 방치시킨 후, 4℃에서 20 분 동안 10,000×g 로 원심 분리하여 상층액은 조심스럽게 제거하고 2 ml의 PBS(pH 7.4)로 펠렛을 재현탁시켰다.

실시예 2: 바이오 패닝

RTK 의 대표적인 수용체로서 HER2 에 대하여 바이오 패닝을 하였다. 또한, BPB 의 기본적인 작동을 확인하기 위한 모델 단백질로서 피브로넥틴(Fibronectin) ED-B 를 선택하였고, 이에 대하여도 바이오 패닝을 하였다.

상기 실시예 1 에서 제작한 BPB(Bipodal-peptide binder) 라이브러리를 각각의 단백질에 대해 5 차에 걸쳐 바이오패닝을 실시하고 각 패닝 단계에서 회수한 파아지 펩타이드들의 output phage/input phage 비(ratio)를 결정하였다.

상기 단백질(5 µg/ml)을 96 웰 ELISA 플레이트(Corning)의 10 개의 웰에 50 µl씩 넣은 후, 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였고, 다음날 2% BSA 를 사용하여 상온에서 2 시간 동안 블로킹한 후, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST 로 3 회 세척하였다. 여기에 바이포달 펩타이드 바인더 재조합 파아지 포함용액 800 µl 및 10% BSA 200 µl을 혼합하여 GPR 39 단백질에 결합한 10 개의 웰에 옮겨 상온에서 1 시간 동안 방치하였다. 10 개 웰의 용액을 모두 제거하고 0.1% PBST 로 10 회 세척한 뒤 0.2 M 글리신/HCl(pH 2.2) 1 ml을 각 웰당 50 µl씩 넣어 20 분간 파아지를 용리시키고 1 ml을 튜브에 모아 여기에 2M Tris-base(pH 9.0) 150 µl를 넣어 용액을 중화시켰다. 각 바이오패닝마다 인풋 파아지 및 일루트 파아지의 수를 측정하기 위해 OD=0.7 인 XL-1 BLUE 세포에 섞어 주어 암피실린이 포함된 아가 배지에 도말하였다. 패닝을 반복하기 위해 10 ml의 *E. coli* XL1-BLUE 세포와 섞어 37℃에서 1 시간 동안 200 rpm 의 속도로 혼합하며 배양하였다. 암피실린(50 µg/ml) 및 20 mM 글루코오스를 혼합한 후, 2×10¹⁰ pfu 의 Ex 헬퍼 파아지를 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 200 rpm 의 속도로 혼합하며 배양하였다. 배양액을 1,000×g 로 10 분 동안 원심

분리한 후 상층액은 제거하고 침전된 세포들을 암피실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 카나마이신(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 40 ml LB 액체 배지로 재현탁하여 30°C에서 200 rpm 의 속도로 혼합하며 하루 동안 배양하였다. 배양액을 4,000×g, 20 분 및 4°C의 조건으로 원심 분리하였다. 상층액에 8 ml의 5x PEG/NaCl[20% PEG(w/v) 및 15% NaCl(w/v)]을 첨가한 후 4°C에서 1 시간 동안 정치시켰다. 원심분리 후 PEG 용액을 완전히 제거하고 1 ml의 PBS 용액으로 파아지 펩타이드 펠릿을 녹인 다음 2 차 바이오패닝에 사용하였다. 각 패닝 단계마다 상기와 동일한 방법을 사용했으며, 세척과정만 단계별로 각각 20 회 및 30 회(0.1% PBST) 증가시켰다.

10

실시에 3: HER2 의 인풋 파아지의 ELISA

바이포달 펩타이드 바인더 라이브러리의 각 인풋 파아지의 ELISA 를 HER2ECD, 스트렙타비딘, BSA 및 ED-B 에 대해 수행하였다. 96 웰 ELISA 플레이트에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HER2ECD 50 μl 씩 10 웰에 넣고, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 를 각 웰당 50 μl 씩 10 웰에 넣고, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙타비딘을 각 웰당 50 μl 씩 10 개의 웰에 넣고 4°C에서 하루 동안 방치하였다. 다음날 모든 wells 을 0.1% PBST 로 3 회 세척하고 PBS 로 희석한 2% BSA 를 사용하여 37°C 에서 1 시간 동안 blocking 한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST 로 3 회 세척하였다. 여기에 Bipodal-peptide binder 재조합 파아지인 첫번째, 두번째, 세번째 네번째, 다섯번째 Input phage 200ul 과 4% BSA 300ul 을 잘 혼합하여 50ul 씩 HER2ECD, Streptavidin, BSA wells 에 각각 2wells 씩 분주하고 37 °C 에서 1 시간 30 분 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 4 번 세척한 다음 HRP-conjugated anti-M13 항체 (GE Healthcare)를 1:1,000 으로 희석하여 37 °C 에서 1 시간 반응시켰다. 0.1% PBST 로 4 번 세척한 후 TMB 용액 50 μl 를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 50ul 의 1M HCl 를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

25

실시에 4: HER2 또는 피브로넥틴 ED-B 에 특이적인 파아지 펩타이드 검색(파아지 ELISA)

아웃풋 파아지/인풋 파아지 비율이 가장 높은 바이오패닝 단계에서 회수한 파아지를 XL1-BLUE 세포에 감염시킨 후 플라크가 플레이트당 100-

30

200 개 정도가 되도록 도말하였다. 멸균된 팁을 이용하여 플라크 60 개를 2 ml의 LB-암피실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 배양액에 접종한 후 37°C에서 5 시간 동안 진탕 배양하여 OD=0.8-1 에서 5×10^9 pfu 의 Ex 헬퍼 파아지를 첨가하여 37°C에서 1 시간 동안 200 rpm 의 속도로 혼합하며 배양하였다. 배양액을 1,000 $\times$ g 로 10 분 동안 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 침전된 세포들을 암피실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 카나마이신(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 1 ml의 LB 액체배지로 재현탁하여 30°C에서 200 rpm 의 속도로 혼합하며 하루 동안 배양하였다. 배양액을 10,000 $\times$ g, 20 분 및 4°C의 조건으로 원심 분리하여 상층액을 회수한 후 2%의 탈지 우유를 넣고 이를 파아지 펩타이드 검색에 사용하였다. 96 웰 ELISA 플레이트에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HER2 또는 Fibronectin ED-B 을 각 웰당 50 μl 씩 30 개의 웰에 넣고, 또한 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BSA 을 각 웰당 50 μl 씩 30 개의 웰에 넣어 4°C에서 하루 동안 방치하였다. 다음날 모든 웰을 0.1% PBST 로 3 회 세척하고 PBS 로 희석한 2% 탈지 우유를 사용하여 상온에서 2 시간 동안 블로킹한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST 로 3 회 세척하였다. 각 클론별로 증폭된 파아지 펩타이드 용액 100 μl 씩을 모든 웰에 분주하고 27°C에서 1 시간 30 분 동안 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 5 회 세척한 다음 HRP-컨쥬게이트 항-M13 항체(GE Healthcare)를 1:1,000 으로 희석하여 27°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.1% PBST 로 5 회 세척한 후 TMB 용액 100 μl 를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 100 μl 의 1 M HCl 를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm 에서 흡광도를 측정하여 BSA 에 비해 흡광도가 높은 클론들을 선택하였다. 이들의 파아지를 XL1 세포에 감염시킨 후 플라크가 플레이트당 100-200 개 정도가 되도록 도말하였다. 멸균된 팁을 이용하여 플라크를 4 ml의 LB-암피실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 배양액에 접종한 후 37°C에서 하루 동안 진탕 배양하여 플라스미드 프랩 키트를 이용하여 플라스미드를 정제하여 시퀀싱을 의뢰하였다(Genotech, Daejeon, Korea). 시퀀싱 프라이머는 벡터 시퀀스인 5'-TGC TAA ACA ACT TTC AAC-3'을 사용하였다.

실시예 5: 바인딩 어세이

DNA 시퀀싱에서 중복되어 나온 ED-B 에 특이적인 바이포달 펩타이드 바인더 펩타이드를 합성(애니젠, 한국)을 하였다. 친화도의 측정은

5 Biacore X(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 수행하였다. ED-B는 스트렙타비딘 SA 칩(Biacore)에 바이오틴-EDB을 2,000 RU 만큼 흘려주어 고정시켰다. 러닝 버퍼로는 PBS(pH 7.4)을 사용하였고, 플로우는 분당 30 μ l로 흘리면서 여러 농도로 동력학을 측정한 후 BIAevaluation 소프트웨어(Biacore AB, Uppsala, Sweden)로 친화도를 계산하였다.

실험 결과

실시예 6: 바이포달 펩타이드 바인더 라이브러리의 제작

10 바이포달 펩타이드 바인더의 구조 안정화 부위로는 안정한 베타-헤어핀 모티프를 사용하였다. 특히 트립토판-트립토판 아미노산의 상호작용에 의해 베타-헤어핀 모티프 구조를 안정하게 이루어 주는 트립토판 지퍼(Andrea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:5578-5583(2001))을 이용하였다. 뼈대인 트립토판 지퍼의 N- 및 C-말단 부분에 각각 6 개 아미노산을 무작위로 배열함으로써 두 부분에 가변적 부위를 생성하였다(도 15 1a). 이를 바이포달 펩타이드 바인더라고 명명하였으며 양쪽의 가변적 부위를 가지고 있어 항원에 공동작용으로 붙을 수 있어 높은 친화력 및 특이성을 가질 수 있다. 또한, 바이포달 펩타이드 바인더의 구조 안정화 부위는 도 1b 내지 도 1e와 같이 여러 가지로 구성될 수 있다.

20 합성한 2 개의 무작위 서열 올리고뉴클레오타이드를 PCR 반응을 통해 이중 사슬로 만든 후 제한효소인 *Sfi*I 및 *Not*I 으로 자른 후 pIGT2 파아지미드 벡터에 클로닝을 하여 8×10^8 이상의 라이브러리를 구축하였다(도 2).

실시예 7: 바이오 패닝 결과

25 바이포달 펩타이드 바인더 라이브러리를 피브로넥틴 ED-B 또는 HER2에 대해 3-6 차에 걸쳐 바이오 패닝을 실시하고 각 패닝 단계에서 회수한 파아지 펩타이드들의 아웃풋 파아지/인풋 파아지의 비율을 결정하였다(표 1a 및 1b).

30 【표 1a】

피브로넥틴 ED-B 단백질에 대한 바이오 패닝 결과

패닝단계	인풋 파아지(pfu)	일루트 파아지(pfu)	산출
1회	2.8×10^{11}	1.1×10^7	4.0×10^{-5}
2회	1.6×10^{11}	1.0×10^7	5.1×10^{-5}
3회	1.6×10^{11}	2.1×10^8	1.3×10^{-3}

【표 1b】

HER2 에 대한 바이오 패닝 결과

패닝 단계	인풋 파아지(pfu)	일루트 파아지(pfu)	산출
1 회	7.6×10^{12}	4.0×10^7	5.26×10^{-7}
2 회	7.0×10^{10}	6.5×10^6	9.28×10^{-5}
3 회	8.94×10^{11}	2.92×10^7	3.27×10^{-5}
4 회	9.0×10^{11}	4.9×10^7	5.44×10^{-5}
5 회	3.5×10^{11}	2.0×10^7	5.71×10^{-5}
6 회	6.0×10^{10}	2.0×10^7	3.33×10^{-4}

5 실시예 8: HER2 의 인풋 파아지의 파아지 ELISA 결과

바이포달 펩타이드 바인더의 라이브러리의 각 인풋 파아지를 HER2, 스트렙타비딘 및 BSA 에 대해 ELISA 를 수행하였다. 첫 번째 인풋 파아지의 반응성은 HER2, Streptavidin, BSA 모두 흡광도가 비슷하나 일곱번째 Input phage 에서 HER2 의 광도가 Streptavidin 에 비해 3.7 배, BSA 에 비해 3.14 배 높았다. 일곱번째 Input 에서 HER2 의 흡광도가

Streptavidin 과 BSA 보다 높은 반응성을 보여 AR-DBD 에 대해 성공적으로 Biopanning 이 이루어짐을 알 수 있다(도 3).

실시예 9: 타겟에 특이적인 파아지 펩타이드 검색(파아지 ELISA) 및 시퀀싱

- 5 각 라이브러리의 패닝 단계중 아웃풋/인풋의 비율이 가장 높은 단계에서 회수한 파아지를 플라크 형태로 확보하였다. 각 플라크로부터 60 개의 파아지를 증폭시킨 후 BSA 에 대해 ELISA 를 수행하였다. BSA 에 비해 흡광도가 높은 클론들을 선택하여 DNA 시퀀싱을 의뢰하였다. 이로부터 중복된 각각의 단백질에 특이적인 펩타이드 시퀀스를 얻었다(표 2a 및 표 2b).
- 10

【표 2a】

종류	Fibronectin ED-B 에 대한 특이적인 펩타이드 시퀀스
펩타이드 1	MSADKSGSWTWENGKWTWKGQVRTRD
펩타이드 2	HCSSAVGSWTWENGKWTWKG IIRLEQ
펩타이드 3	HSQGSPGSWTWENGKWTWKG RYSHRA

【표 2b】

종류	HER2 에 대한 특이적인 펩타이드 시퀀스
펩타이드 1	PFTPLAGSWTWENGKWTWKG HYRGKT

실시예 10: 피브로넥틴 ED-B 의 친화도의 측정

피브로넥틴 ED-B 에 대한 상기 펩타이드를 합성하여 SPR Biacore system(Biacore AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 친화도를 측정하였다. 피브로넥틴 ED-B 에 대한 친화도를 측정한 결과 펩타이드 1 은 620 nM 를 나타내었고, 펩타이드 2 는 75 nM 를 나타내었으며, 펩타이드 3 은 2.5 μ M 을 나타내었다(도 4a).

실시예 11: SPR(Surface Plasmon Resonance)에 의한 공동 작용 효과 확인

바이포달 펩타이드 바인더의 항원에 대한 공동 작용 효과를 증명하기 위해서 친화력이 가장 좋은 표 2a 의 ED-B 에 대한 펩타이드 2 의 N- 및 C-말단 한쪽 부위만 각각 제거한 펩타이드를 합성하여 친화력을 측정하였다. N-말단 부분은 592 μ M 을 가지며 C-말단 부분은 12.8 μ M 을 나타내었다(도 4b). 바이포달 펩타이드 바인더에서 양발(bipodal)을 가지고 있음으로써 나타내는 공동 작용 효과는 43 nM 의 친화력임을 증명하였다(도 4a).

실시예 12: 다른 β -헤어핀에 대한 바인딩 어세이

트립토판 지퍼 이외에 다른 β -헤어핀 골격인 GB1m3 및 HP7 에 ED-B 에 특이적으로 결합하는 Peptide2 의 N-말단 시퀀스(HCSSAV)와 C-말단 시퀀스(IIRLEQ)를 가지도록 펩타이드를 합성하였다(애니젠, 한국). 즉, 트립토판 지퍼를 포함한 바이포달 펩타이드 바인더의 시퀀스는 HCSSAVGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ 이며 GB1m3 을 포함한 바이포달 펩타이드 바인더는 HCSSAVGKKWTYNPATGKFTVQEGIIIRLEQ 이고, HP7 을 포함한 바이포달 펩타이드 바인더는 HCSSAVGKTWNPATGKWTEGIIIRLEQ 이다. 각 펩타이드의 친화도는 BIAcore X(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용하여 측정하였다. 스트랩타비딘 SA 칩(Biacore AB, Uppsala, Sweden)에 비오틴-EDB 를 2,000 RU 만큼 흘려주어 고정시켰다. 러닝 버퍼로는 PBS(pH 7.4)를 사용하였고 플로우는 분당 30 μ l 로 흘리면서 여러 농도로 동력학을 측정한 후 BIAevaluation 으로 친화도를 계산하였다. 친화도를 측정한 결과 GB1m3 가 70 nM, HP7 이 84 nM 로 트립토판 지퍼(43 nM)와 비슷한 친화력을 가짐을 확인하였다(도 5). 이는 모든 안정한 β -헤어핀 모티프가 구조 안정화 부위로서 가능함을 증명하는 결과이다.

실시에 13: 구조안정화 부위로서 루이신 지퍼를 포함하는 바이포달 펩타이드 바인더에 대한 바인딩 어세이

β -헤어핀 골격 대신 구조안정화 부위로서 루이신 지퍼에 ED-B 에 특이적으로 결합하는 펩타이드 2 의 N-말단 시퀀스(HCSSAV)와 C-말단 시퀀스(IIRLEQ)를 가지도록 CSSPIQGGSMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER 및 IIRLEQGGSMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER 펩타이드를 합성하였다(애니젠, 한국). 두 펩타이드를 다이머로 만든 다음 BIAcore X(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용하여 친화도를 측정하였다. 친화도를 측정한 결과, 루이신 지퍼는 5 μ M 의 친화도를 나타내었고 이는 트립토판 지퍼(43 nM)의 비슷한 친화도보다 떨어지는 친화도이기는 하지만 루이신 지퍼도 바이포달 펩타이드 바인더의 구조 안정화 부위로서 기능할 수 있음을 알 수 있다(도 6).

HER2 에 특이적인 바이포달 펩타이드 바인더의 특이성 측정

HER2 단백질에 특이적으로 결합하는 재조합 파아지를 여러 단백질에 대해서 특이성 검사를 ELISA 을 이용하여 시행하였다. 96-웰 ELISA 플레이트에 각각의 단백질을 5 μ g/ml을 50 μ l씩 웰에 넣고 다음날 0.1% PBST(Tween-20)로 3 회 세척하고 2% BSA 를 사용하여 상온에서 2 시간 동안 블로킹을 한 후, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST 로 3 회 세척하였다. 여기에 본 발명의 펩타이드를 가지는 재조합 파아지를 2% BSA 와 잘 혼합하여 100 μ l씩 10 개의 단백질이 결합되어 있는 웰에 분주하고 27°C에서 2 시간 동안 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 5 회 세척한 다음 HRP-컨쥬게이션 항-M13 항체(GE Healthcare)를 1:1,000 으로 희석하여 27°C에서 1 시간 반응하였다. 0.1% PBST 로 5 회 세척한 후 TMB 용액 100 μ l를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 1M HCl 100 μ l을 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HER2 에 특이적인 바이포달 펩타이드 바인더의 친화력 측정

DNA 시퀀싱에서 중복되어 나온 HER2 에 특이적인 바이포달 펩타이드 바인더 펩타이드를 합성(애니젠, 한국)을 하였다. 친화도의 측정은 BIAcore X(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 수행하였다. HER2 를

EDC/NHS 을 이용하여 CM5 칩(Biacore)에 고정하였다. 러닝 버퍼로는 PBS(pH 7.4)을 사용하였고, 플로우는 분당 30 μ l로 흘리면서 여러 농도로 동력학을 측정 한 후 BIAevaluation 소프트웨어(Biacore AB, Uppsala, Sweden)로 친화도를 계산하였다.

5

HER2 에 특이적인 바이포달 펩타이드 바인더의 HER2 과발현 세포 인식 실험

HER2 를 과발현하는 세포를 찾은 바이포달 펩타이드 바인더가 인식할 수 있는지 확인하기 위하여 HER2 과발현하는 세포인 BT-474 (American Type Culture Collection)와 HER2-결핍 세포인 CHO 세포(American Type Culture Collection)를 이용하여 세포 인식 실험을 진행하였다. 우선 시료를 처리하기 전날에 커버슬라이드에 BT-474 와 CHO 세포를 붙인다. 그 다음날 FITC (sigma)를 붙인 상기 펩타이드를 BT-474 와 CHO 세포에 4 $^{\circ}$ C에서 1h 동안 처리한 후에 PBS 로 washing 을 한 후에 컨포칼 현미경 (Carl zeiss)을 이용하여 이미지를 측정하였다.

15

BPB_{HER2} 의 친화도의 측정

HER2 에 대한 상기 펩타이드를 합성하여 SPR Biacore system(Biacore AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 친화도를 측정하였다. HER2 에 대한 친화도를 측정한 결과 89 nM 을 나타냈다.

20

HER2 에 대한 특이성 분석

각각의 단백질에 특이적으로 결합하는 재조합 파아지를 여러 단백질에 대해서 특이성 검사를 ELISA 을 이용하여 시행하였다. 96-웰 ELISA 플레이트에 각각의 단백질을 5 μ g/ml을 50 μ l씩 웰에 넣고 다음날 0.1% PBST(Tween-20)로 3 회 세척하고 2% BSA 를 사용하여 상온에서 2 시간 동안 블로킹을 한 후, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST 로 3 회 세척하였다. 여기에 본 발명의 펩타이드를 가지는 재조합 파아지를 2% BSA 와 잘 혼합하여 100 μ l씩 10 개의 단백질이 결합되어 있는 웰에 분주하고 27 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 5 회 세척한 다음 HRP-
컨쥬게이션 항-M13 항체(GE Healthcare)를 1:1,000 으로 희석하여 27 $^{\circ}$ C에서

30

1 시간 반응시켰다. 0.1% PBST 로 5 회 세척한 후 TMB 용액 100 μ l를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 1M HCl 100 μ l을 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이 펩타이드는 HER2 에 대하여 특이성을 갖는다는 것을 알 수 있다.

5

HER2 과발현하는 세포 인식 실험

HER2 과발현하는 BT-474 세포와 발현이 적은 CHO 세포를 이용하여 상기 펩타이드가 세포의 HER2 를 인식할 수 있는지 이미징 실험을 하였다. 아래 그림을 보듯이 이 펩타이드는 세포에 있는 HER2 도 충분히 특이적으로

10

VEGFR1 에 붙는 바이오파달 펩타이드 바인더를 찾기 위한 바이오패닝

VEGFR1 에 관한 바이오패닝도 HER2 와 같은 과정으로 진행했다. 각 panning 단계마다 상기 같은 방법을 사용했으며, 단 세척과정만 0.1% PBST

15

VEGFR1 단백질에 붙는 phage 의 특이성 실험

시퀀싱을 통해 찾은 펩타이드(BPB1_{VEGFR1}, BPB2_{VEGFR1}, BPB3_{VEGFR1})의 VEGFR1 에 대한 특이성을 조사하기 위해서 이 펩타이드들을 발현하는 재조합 파지들을 이용하여 VEGFR1, VEGFR2, 스트렙타비딘(streptavidin), HSA, TNF, VEGF 에 대해서 특이성을 조사하였다. 먼저 96well ELISA plate 에 5ug/ml VEGFR1, VEGFR2, 스트렙타비딘, HSA, TNF, VEGF 을 50 μ l/웰 씩 넣고 4 °C 에서 하룻밤 방치하였고, 다음날 모든 wells 을 0.1% PBST 로 3 회 세척하고 PBS 로 희석한 2% BSA 를 사용하여 상온에서 2 시간 동안 blocking 한 뒤, 용액을 모두 버리고 0.1% PBST 로 3 회 세척하였다.

여기에 BPB1_{VEGFR1}, BPB2_{VEGFR1}, BPB3_{VEGFR1} 의 각각의 재조합 파지 800ul 과 10% BSA 200ul 을 잘 혼합하여 100 μ l씩 스트렙타비딘, BSA, ovalbumin, VEGF 웰에 분주하고 27 °C 에서 1 시간 정치하였다. 0.1% PBST 용액으로 5 번 세척한 다음 HRP-conjugated anti-M13 항체 (GE Healthcare)를 1:1,000 으로 희석하여 27 °C 에서 1 시간 반응시켰다. 0.1% PBST 로 5 번 세척한 후

20

25

TMB 용액 100 μ l 를 분주하여 발색반응을 유도한 다음 100ul 의 1M HCl 를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

BPB1_{VEGFR1} 의 Binding assays (SPR)

- 5 BPB1_{VEGFR1} 를 합성(Anygen)하여 BIAcore X 을 이용하여 친화도를 측정하였다. CM5 칩(Biacore)에 VEGFR1 을 7000RU 만큼 흘려주어 고정시켰다. 러닝버퍼로는 PBS(pH7.4)을 사용했고 유속은 30 μ l/min 으로 흘리면서 여러 농도로 동력학을 측정을 한 후 BIAevaluation 으로 친화도를 계산하였다.

10

VEGFR1 에 붙는 바이포달 펩타이드 바인더의 바이오패닝 후에 파지 ELISA

- VEGFR1 에 붙는 바이포달 펩타이드 바인더의 마지막 패닝 단계에서 회수한 파아지를 플라크(plaque)형태로 확보하였다. 각 플라크로부터 30 개의 파아지를 증폭시킨 후 VEGFR1 과 BSA 에 대해 ELISA 를 시행하였다.
- 15 VEGFR1 보다 3 배 이상 흡광도를 보이는 클론 12 개를 DNA 시퀀싱을 해 보았다. 3 개의 중복된 펩타이드 시퀀스를 얻었다.

스크리닝을 통해서 찾은 펩타이드 시퀀스

- BPB1_{VEGFR1}: GNQWFIGGGSWTWENGKWTWKGRIPKNR
- 20 BPB2_{VEGFR1}: GNQWFIGGGSWTWENGKWTWKGLQNPM
- BPB3_{VEGFR1}: GNQWFIGGGSWTWENGKWTWKGGQQAIP

BPB1_{VEGFR1} 의 특이성 조사

- 최적화된 펩타이드인 특이성을 조사하기 위해서 VEGFR1, VEGFR2, streptavidin, HSA, TNF, VEGF 에 대해서 ELISA 를 하였다. 그림 8 에서 보듯이 세 개의 펩타이드들이 VEGFR1 에 대해서 특이적으로 결합함을 알 수 있다.

BPB1_{VEGFR1} 의 친화력 조사

최적화된 펩타이드 BPB1_{VEGFR1} 을 합성하여 SPR biacore system 을 이용하여 친화력을 측정하였다. Affinity 를 측정한 결과 BPB1VEGFR1 는 1.0 μ M 의 친화력을 가진다.

- 5 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 수용체 타이로신 키나아제(receptor tyrosine kinase: RTK) 타겟에 특이적으로 결합하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더(RTK-BPB)의 제조방법:

(a) (i) 가닥간(interstrand) 비공유결합이 형성되는 패러럴(parallel), 안티패러럴(antiparallel) 또는 패러럴(parallel)과 안티패러럴(antiparallel) 아미노산 가닥들을 포함하는 구조 안정화 부위(structure stabilizing region); (ii) 상기 구조 안정화 부위의 양 말단에 결합되어 있고 무작위적으로 선택된 각각 n 및 m 개의 아미노산을 포함하는 RTK-타겟 결합 부위 I(RTK-target binding region I) 및 RTK-타겟 결합 부위 II(RTK-target binding region II)를 포함하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더(RTK-BPB)의 라이브러리를 제공하는 단계;

(b) 상기 라이브러리와 타겟으로서의 RTK 을 접촉시키는 단계;

그리고,

(c) 상기 RTK 과 결합된 RTK-바이포달 펩타이드 바인더(RTK-BPB)를 선택하는 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위에 형성되는 가닥간 비공유결합은 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용, 양이온-파이 상호작용 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위의 아미노산 가닥들은 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위는 β -헤어핀, 링커로 연결된 β -쉬트, 루이신 지퍼, 링커로 연결된 루이신 지퍼, 루이신 리치 모티프 또는 링커로 연결된 루이신 리치 모티프인 것을 특징으로 하는 방법.

5 【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위는 β -헤어핀인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

10 제 5 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 서열목록 제 1 서열 내지 제 19 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

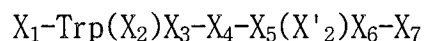
【청구항 7】

15 제 6 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 서열목록 제 2 서열, 제 14 서열 또는 제 18 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

20 제 5 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 I 로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

일반식 I

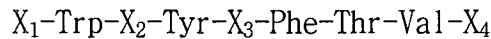


25 X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고, X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His, Val, Ile, Phe 또는 Tyr 이며, X_3 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Phe 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 는 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

【청구항 9】

30 제 5 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 II로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

일반식 II

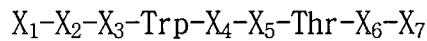


X_1 은 Arg, Gly-Glu 또는 Lys-Lys 이고, X_2 는 Gln 또는 Thr 이며, X_3 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_4 는 Gln, Thr-Glu 또는 Gln-Glu 이다.

【청구항 10】

제 5 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 III으로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

일반식 III

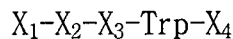


X_1 은 Lys 또는 Lys-Lys 이고, X_2 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_3 는 Val 또는 Thr 이며, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Ala 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 은 Glu 또는 Gln-Glu 이다.

【청구항 11】

제 5 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 IV로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

일반식 IV



X_1 은 Lys-Thr 또는 Gly 이고, X_2 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_3 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_4 는 Thr-Glu 또는 Gly 이다.

【청구항 12】

제 8 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 상기 일반식 I 에서 X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고, X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His 또는 Val 이며, X_3 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II 또는 타입 II' 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Phe 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 는 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

【청구항 13】

제 1 항에 있어서, 상기 RTK-타겟 결합 부위 I 의 아미노산 개수 n 은 2-20 인 것을 특징으로 하는 방법.

5

【청구항 14】

제 1 항에 있어서, 상기 RTK-타겟 결합 부위 II 의 아미노산 개수 m 은 2-20 인 것을 특징으로 하는 방법.

10 **【청구항 15】**

제 1 항에 있어서, 상기 라이브러리는 플라스미드, 박테리오파아지, 파아지미드로, 이스트 또는 박테리아로부터 제작된 것을 특징으로 하는 방법.

15 **【청구항 16】**

제 1 항에 있어서, 상기 RTK-타겟 결합 부위 I 및 RTK-타겟 결합 부위 II 는 RTK 에 공동으로 작용하여 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 17】

20 제 1 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위, RTK-타겟 결합 부위 I 또는 RTK-타겟 결합 부위 II 에 추가적으로 기능성 분자가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 18】

25 제 17 항에 있어서, 상기 기능성 분자는 검출가능한 신호를 발생시키는 레이블, 화학약물, 바이오약물, 세포막투과 펩타이드(CPP) 또는 나노입자인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 19】

30 (a) 가닥간(interstrand) 비공유결합이 형성된 패러럴(parallel), 안티패러럴(antiparallel) 또는 패러럴(parallel)과

안티패러럴(antiparallel) 아미노산 가닥들을 포함하는 구조 안정화 부위(structure stabilizing region); 및

- (b) 상기 구조 안정화 부위의 양 말단에 결합되어 있고 무작위적으로 선택된 각각 n 및 m 개의 아미노산을 포함하는 RTK-타겟 결합 부위 I(RTK-target binding region I) 및 RTK-타겟 결합 부위 II(RTK-target binding region II)를 포함하는 RTK 에 특이적으로 결합하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 20】

- 제 19 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위에 형성된 가닥간 비공유결합은 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성상호작용, 반데르 발스 상호작용, 파이-파이 상호작용, 양이온-파이 상호작용 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 21】

제 19 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위의 아미노산 가닥들은 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 22】

- 제 19 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위는 β -헤어핀, 링커로 연결된 β -쉬트, 루이신 지퍼 또는 링커로 연결된 루이신 지퍼, 루이신 리치 모티프인 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 23】

- 제 19 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위는 β -헤어핀인 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 24】

- 제 23 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 서열목록 제 1 서열 내지 제 19 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

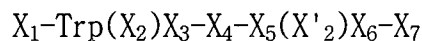
【청구항 25】

제 24 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 서열목록 제 2 서열, 제 14 서열 또는 제 18 서열로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 26】

제 23 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 I 로 표시되는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더:

10 일반식 I

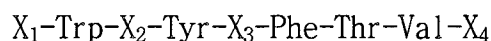


X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고, X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His, Val, Ile, Phe 또는 Tyr 이며, X_3 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Phe 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 는 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

【청구항 27】

제 23 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 II로 표시되는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더:

20 일반식 II

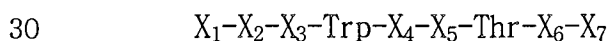


X_1 은 Arg, Gly-Glu 또는 Lys-Lys 이고, X_2 는 Gln 또는 Thr 이며, X_3 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_4 는 Gln, Thr-Glu 또는 Gln-Glu 이다.

【청구항 28】

제 23 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 III으로 표시되는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더:

일반식 III



X_1 은 Lys 또는 Lys-Lys 이고, X_2 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_3 는 Val 또는 Thr 이며, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Ala 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 은 Glu 또는 Gln-Glu 이다.

5

【청구항 29】

제 23 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 다음 일반식 IV로 표시되는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더:

일반식 IV10 $X_1-X_2-X_3-\text{Trp}-X_4$

X_1 은 Lys-Thr 또는 Gly 이고, X_2 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_3 는 타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II' 또는 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열이고, X_4 는 Thr-Glu 또는 Gly 이다.

15 **【청구항 30】**

제 24 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 상기 일반식 I 에서 X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고, X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His 또는 Val 이며, X_3 는 Trp 또는 Tyr 이고, X_4 는 타입 I, 타입 I', 타입 II 또는 타입 II' 서열이고, X_5 는 Trp 또는 Phe 이며, X_6 는 Trp 또는 Val 이고, X_7 는 Lys 또는 Thr-Glu 인 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

20

【청구항 31】

제 19 항에 있어서, 상기 RTK-타겟 결합 부위 I 의 아미노산 개수 n 은 2-20 인 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

25

【청구항 32】

제 19 항에 있어서, 상기 RTK-타겟 결합 부위 II 의 아미노산 개수 m 은 2-20 인 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

30 **【청구항 33】**

제 19 항에 있어서, 상기 RTK-타겟 결합 부위 I 및 RTK-타겟 결합 부위 II는 RTK 에 공동으로 작용하여 결합하는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

5 **【청구항 34】**

제 19 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위, RTK-타겟 결합 부위 I 또는 RTK-타겟 결합 부위 II에 추가적으로 기능성 분자가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

10 **【청구항 35】**

제 34 항에 있어서, 상기 기능성 분자는 검출가능한 신호를 발생시키는 레이블, 화학약물, 바이오약물, 세포막투과 펩타이드(CPP) 또는 나노입자인 것을 특징으로 하는 RTK-바이포달 펩타이드 바인더.

15 **【청구항 36】**

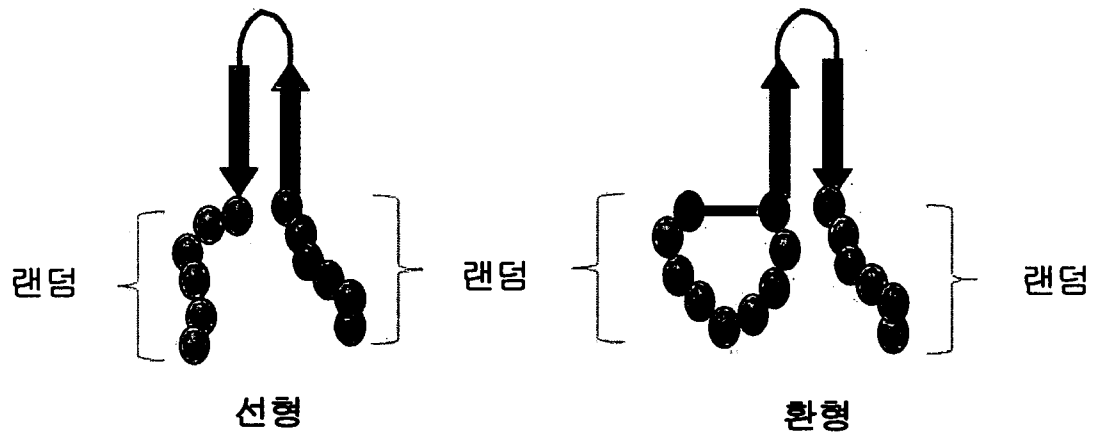
상기 제 19 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항의 바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 핵산 분자.

【청구항 37】

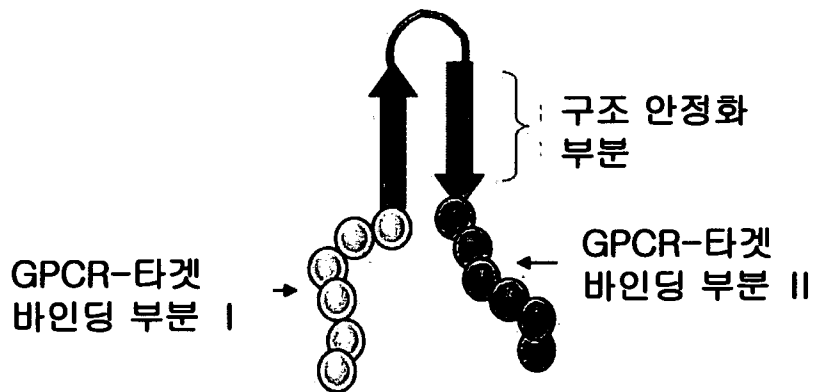
20 상기 제 36 항의 핵산 분자를 포함하는 바이포달 펩타이드 바인더의 발현용 벡터.

1/14

Fig. 1a



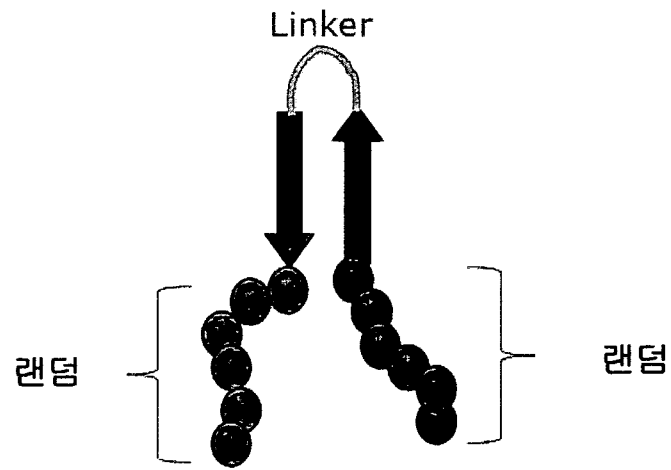
바이포달-펩타이드 바인더



RTK-BPB

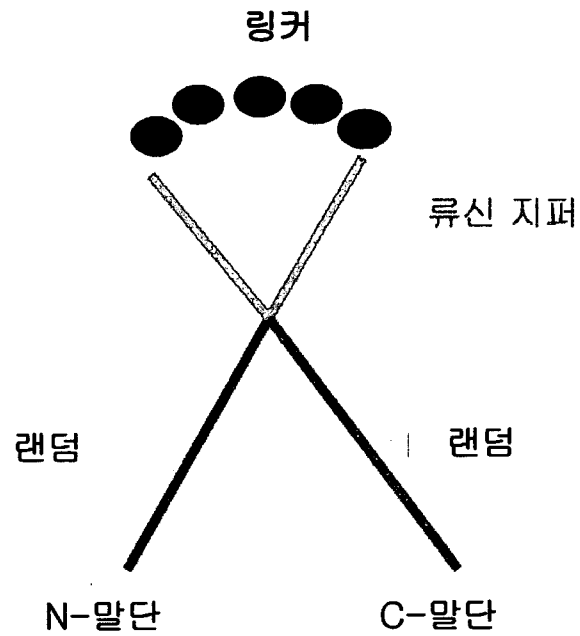
2/14

Fig. 1b



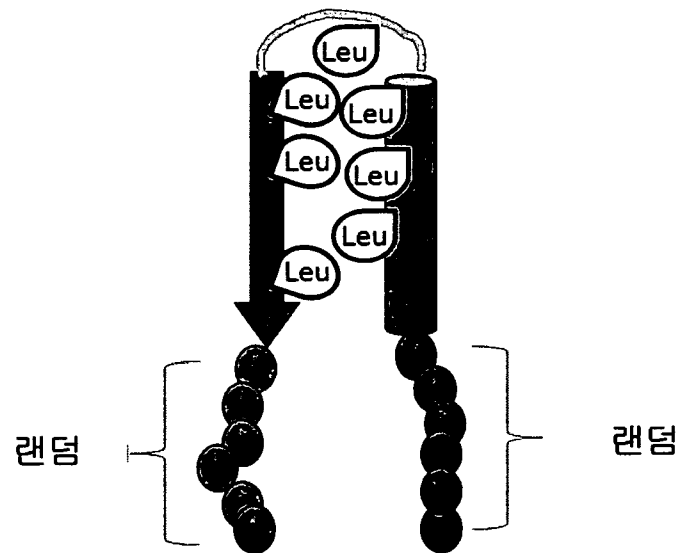
3/14

Fig. 1c



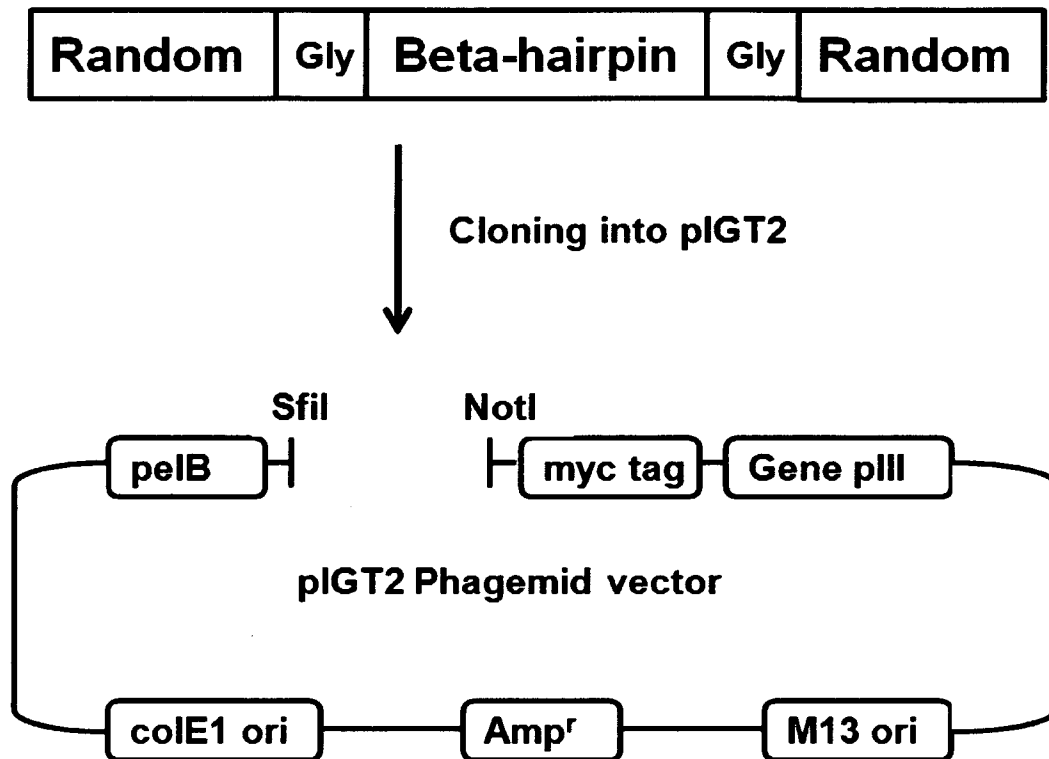
4/14

Fig. 1d



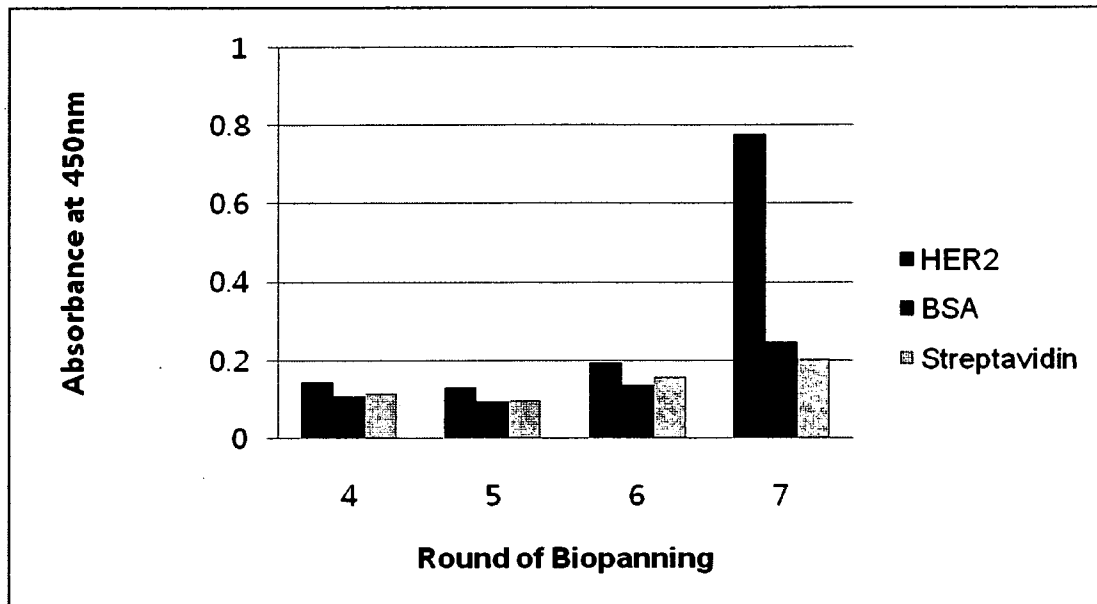
5/14

Fig. 2



6/14

Fig. 3



7/14

Fig. 4a

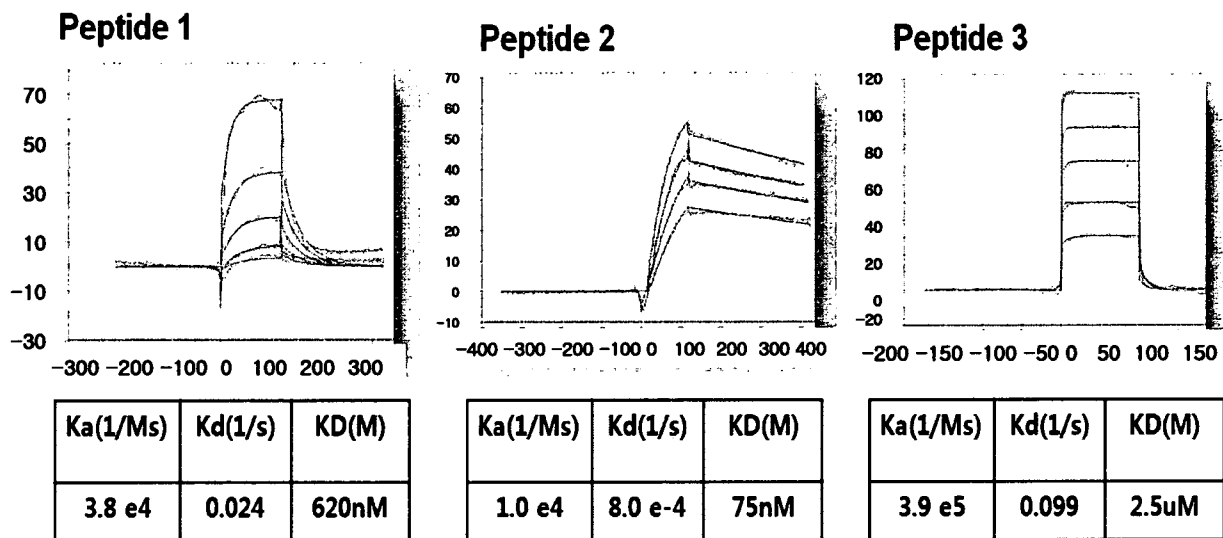
Fibronectin ED-B

Fig. 4b

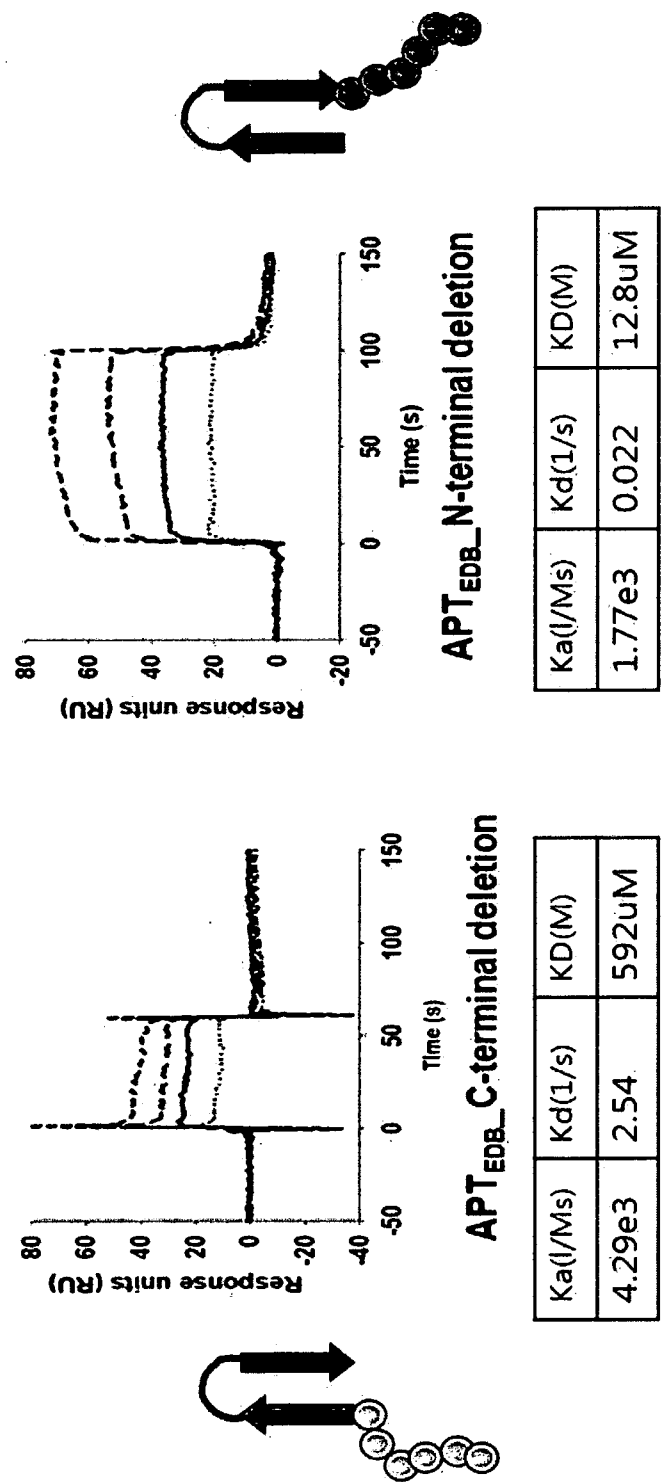
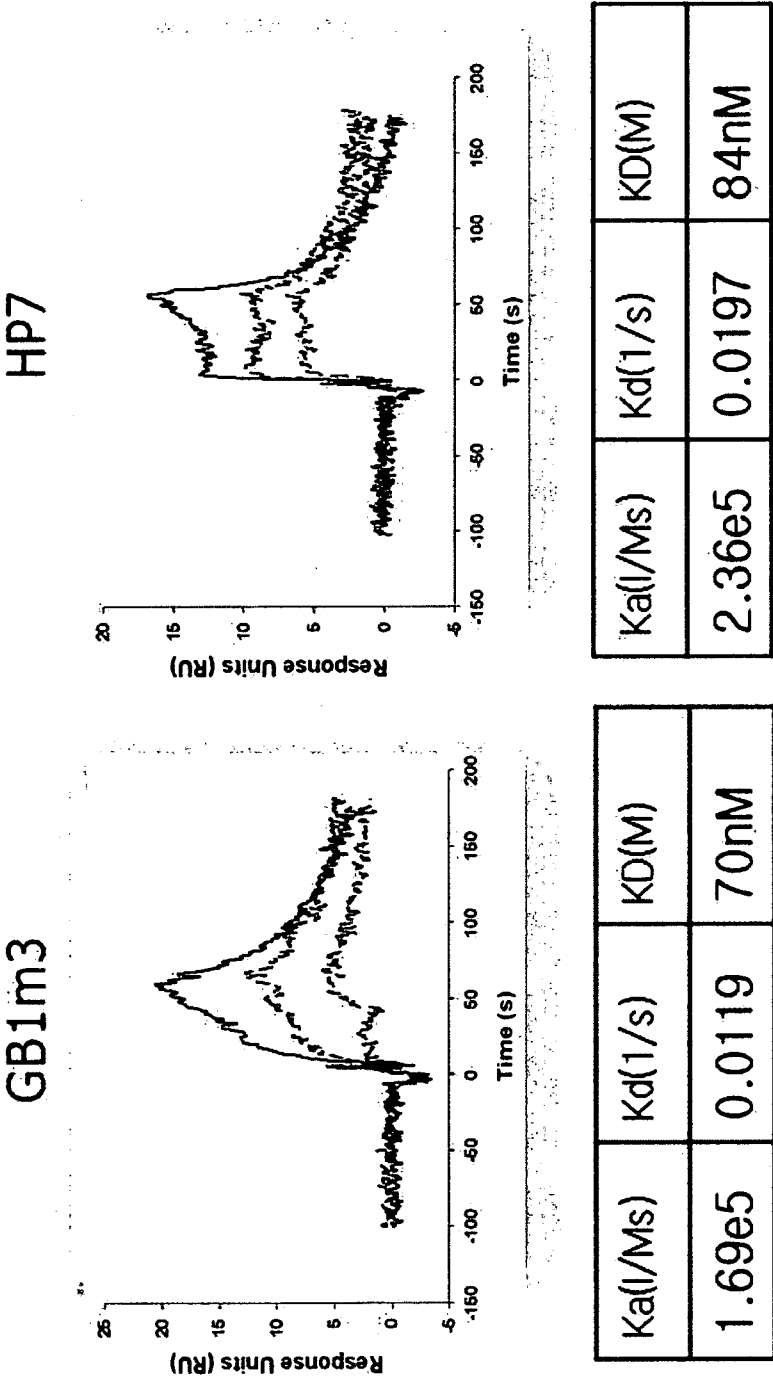
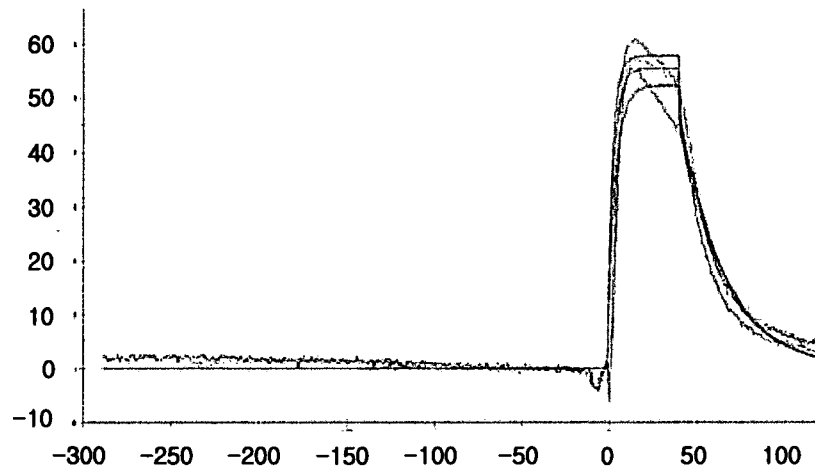


Fig. 5



10/14

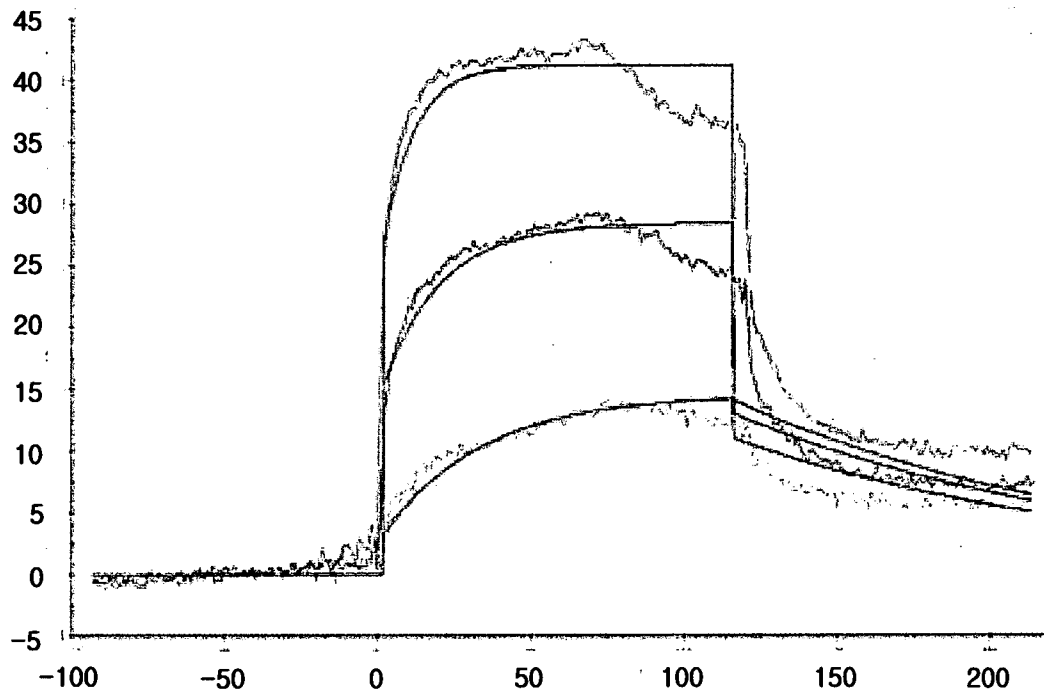
Fig. 6



Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
4 e3	0.02	5uM

11/14

Fig. 7



K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
9.0×10^4	8.0×10^{-3}	89 nM

12/14

Fig. 8

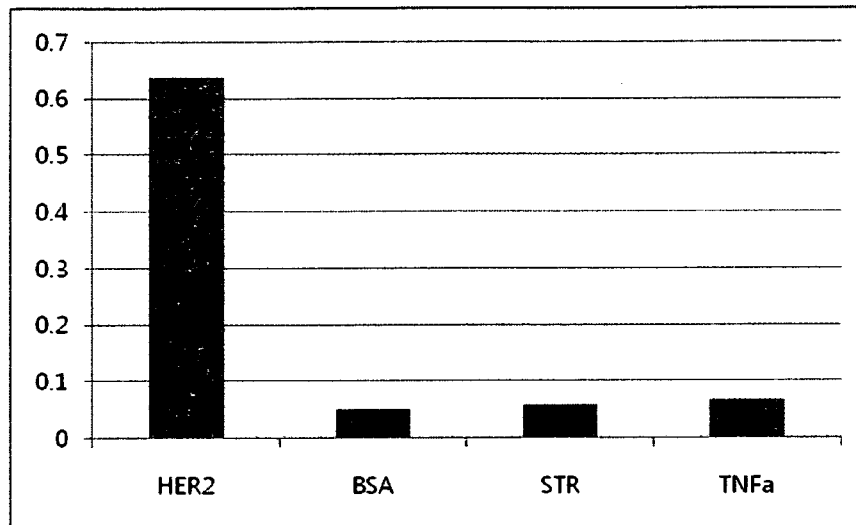
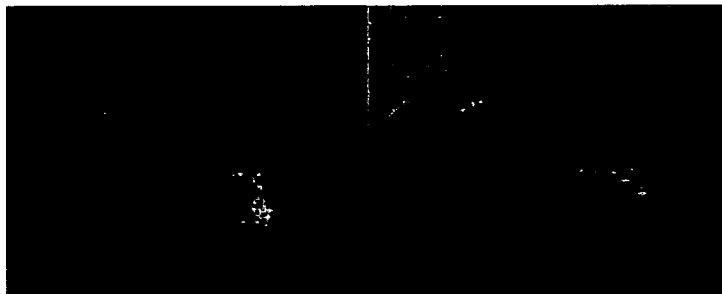


Fig. 9

BT-474 (HER2-positive)



CHO cell (HER2-negative)



13/14

Fig. 10

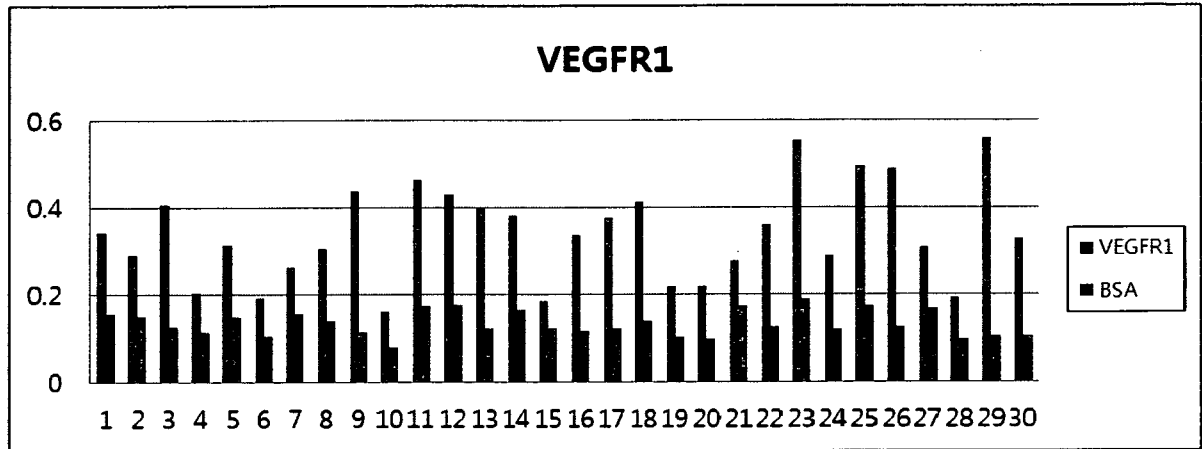
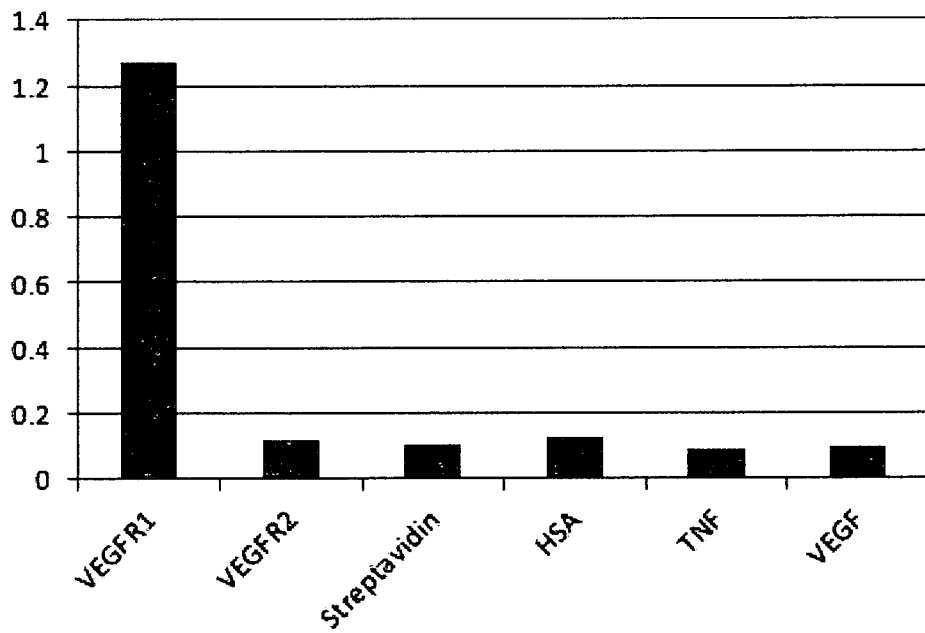


Fig. 11



14/14

Fig. 12

