

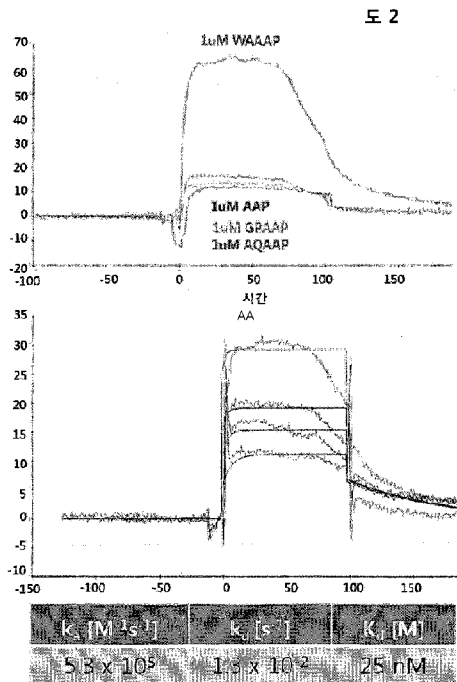


- (51) 국제특허분류:
C07K 14/485 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/011494
- (22) 국제출원일: 2014년 11월 27일 (27.11.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0162797 2013년 12월 24일 (24.12.2013) KR
- (71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 500-712 광주 서북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 전상용 (JON, Sang Yong); 305-340 대전시 유성구 대덕대로 556 번길 19, 305 호, Daejeon (KR). 김성현 (KIM, Sung Hyun); 331-775 충청남도 천안시 서북구 두정중 2길 12 대림 e편한세상아파트 104 동 301호, Chungcheongnam-do (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

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

(54) 발명의 명칭 : VEGF에 특이적으로 결합하는 VEGF-BPB



(57) Abstract: The present invention provides a VEGF-BPB specifically binding to a VEGF, a nucleic acid molecule coding same, a recombinant vector comprising the nucleic acid molecule, and a pharmaceutical composition for preventing or treating angiogenesis-related diseases, comprising the VEGF-BPB. In the VEGF-BPB according to the present invention, two distal VEGF-target binding regions, which are bound to either end of a structure stabilizing region, bind to targets cooperatively and synergetically, thereby inhibiting VEGF-induced angiogenesis.

(57) 요약서: 본 발명은 VEGF에 특이적으로 결합하는 VEGF-BPB, 이를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터 및 VEGF-BPB를 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 VEGF-BPB에서 구조 안정화 부위의 양 말단에 결합되어 있는 이격된(distal) 두 개의 VEGF-타겟 결합 부위는 서로 협동적으로(cooperatively), 시너지적(synergetically)하게 타겟에 결합하여 VEGF-유도 신생혈관형성(angiogenesis)을 억제한다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

VEGF 에 특이적으로 결합하는 VEGF-BPB

5 【기술 분야】

본 발명은 VEGF 에 특이적으로 결합하는 VEGF-BPB 에 관한 것이다.

【배경 기술】

신생혈관형성(Angiogenesis)은 혈관계의 배 발달(embryonic
10 development), 상처 치유(wound healing) 및 임신 동안의 여성 생식계의
순응과 같은 생리학적 과정에 있어 중요한 역할을 한다. 보통, 이러한
과정은 다양한 신생혈관형성 유발 및 억제 인자의 균형에 의하여 섬세하게
조절된다. 이러한 인자들 사이의 불균형은 비정상적인 혈관의 성장을
유도하여 류마티스 관절염, 당뇨병성 망막증 및 암과 같은 병적 상태를
15 초래한다.

VEGF(Vascular endothelial growth factor)는 내피세포의 증식과
이동을 유도하고, 루멘 형성을 촉진하는 내피세포-특이적
미토젠이다(Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K. & Paavonen, K.
Cardiovasc. Res. 65, 550-563 (2005)). 내피세포 표면의 VEGF 수용체의
20 두드러진 발현은 VEGF와 이의 수용체 사이의 상호작용을 억제하는 것을
기반으로 하는 항-신생혈관형성 전략에 모티브를 준다(Aiello, L.P. et al.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10457-10461 (1995)). 현재, FDA 승인받은
두 개의 항-VEGF 약품이 있다: VEGF 중화 단일클론항체 bevacizumab
(Avastin)(Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P. & Novotny, W. *Nat.*
25 *Rev. Drug Discov.* 3, 391-400 (2004)) 및 SELEX 유래 RNA 앵타머
Macugen(Ng, E.W.M. et al. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 123-132 (2006)).
비록 이들 약물이 암 치료와 연령 관련 황반변성(AMD)에 대한 치료효과를
보이고 있지만, 고혈압과 단백뇨와 같은 장기적인 부작용뿐만 아니라, 약물
내성의 발생과 눈 염증은 여전히 해결해야 할 문제로 남아있다.

30 펩타이드 약물은 항체와 RNA 앵타머와 같은 거대한 생물학적 분자의
유망한 대체 수단이다. 치료제로서 펩타이드의 장점은 생산단가가 낮고,

안전성 및 반응성이 높으며, 원하지 않는 면역시스템에 덜 노출되어 펩타이드 자체에 대한 항체 생산을 억제할 수 있으며, 합성을 통한 변형이 쉽고 정확하다는 것이다. 그러나, 대부분의 펩타이드는 항체에 비해 특정 단백질 타겟에 대해 낮은 친화력과 특이성을 보이기 때문에, 여러
 5 응용분야에서 사용되지 못하는 한계가 있다(Neri, D. & Bicknell, R. *Nat. Rev. Cancer* 5, 436-446 (2005)). 따라서, 이러한 펩타이드의 단점을 극복할 수 있는 새로운 펩타이드 기반 항체 대체 약물 개발에 대한 요구가 당업계에 대두되고 있다.

10 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.

15 【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

 본 발명자들은 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 펩타이드 분자를 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들에 의해 종전에 개발된 바이포달 펩타이드 바인더(BPB)의 기본 구조를 이용하여 VEGF-
 20 특이적 BPB(BPB2_{VEGF})를 개발하고, 이 BPB2_{VEGF}가 다른 VEGF를 타겟팅하는 BPB들 보다 타겟에 대한 친화도가 매우 높아 VEGF에 대한 타겟팅 능력이 매우 우수함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

 따라서, 본 발명의 목적은 VEGF에 특이적으로 결합하는 VEGF-바이포달 펩타이드 바인더(VEGF-BPB)를 제공하는 데 있다.

25 본 발명의 다른 목적은 VEGF-BPB를 코딩하는 핵산 분자를 제공하는 데 있다.

 본 발명의 또 다른 목적은 VEGF-BPB 발현용 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

 본 발명의 또 다른 목적은 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용
 30 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

 본 발명의 또 다른 목적은 혈관신생 관련 질환의 예방 또는

치료방법을 제공하는 데 있다.

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

5

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 구조안정화 부위(structure stabilizing region)로서 β -헤어핀; 및 상기 구조 안정화 부위의 양 말단에 직접 또는 링커를 통하여 각각 결합된 서열목록 제 1 서열의
10 아미노산 서열을 포함하는 타겟 결합 부위 I(target binding region I) 및 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 타겟 결합 부위 II(target binding region II)를 포함하는 VEGF 에 특이적으로 결합하는 VEGF-바이포달 펩타이드 바인더(VEGF-BPB)를 제공한다.

15 본 발명자들은 인간 VEGF 에 특이적으로 결합하는 펩타이드 분자를 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들에 의해 종전에 개발된 바이포달 펩타이드 바인더(BPB)의 기본 구조를 이용하여 VEGF-특이적 BPB(BPB2_{VEGF})를 개발하고, 이 BPB2_{VEGF} 가 다른 VEGF 를 타겟팅하는 BPB 들 보다 타겟에 대한 친화도가 매우 높아 VEGF 에 대한 타겟팅 능력이
20 매우 우수함을 규명하였다.

본 발명은 기본적으로 BPB 의 구조를 채택한다. BPB 는 본 발명자들에 의해 최초로 제안된 친화성 펩타이드로서, 리지드한 펩타이드 골격의 양 말단에 타겟에 결합되는 펩타이드가 연결되어 있다.

본 발명의 VEGF-BPB 는 리지드한 펩타이드 골격으로서 β -헤어핀을
25 구조 안정화 부위로서 포함하는데, β -헤어핀은 BPB 의 전체적인 구조를 안정화시키는 작용을 하며, 타겟 결합 부위 I 및 타겟 결합 부위 II 가 타겟 분자(VEGF)에 결합되는 것을 강화시킨다.

본 명세서에서 사용된 용어, " β -헤어핀"은 두 개의 β 가닥을 포함하는 가장 간단한 단백질 모티프를 의미하며, 이 두 개의 β 가닥은
30 서로 안티패러럴 한 정렬을 나타낸다. 이 β -헤어핀에서 두 개의 β 가닥은 일반적으로 턴 서열에 의해 연결된다. β -헤어핀에 적용되는 턴 서열은

타입 I, 타입 I', 타입 II, 타입 II', 타입 III 또는 타입 III' 턴 서열일 수 있다. 또한, X-Pro-Gly-Glu-Val; 또는 Ala-X-Gly-Glu-Val(X 는 20 개의 아미노산으로부터 선택된다)으로 표시되는 턴 서열도 β -헤어핀에 이용될 수 있다.

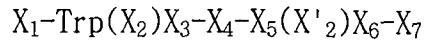
본 발명의 일구현예에 따르면, 타입 I 턴 서열은 Asp-Asp-Ala-Thr-Lys-Thr 이고, 타입 I' 턴 서열은 Glu-Asn-Gly-Lys 이며, 타입 II 턴 서열은 X-Pro-Gly-Glu-Val; 또는 Ala-X-Gly-Glu-Val(X 는 20 개의 아미노산으로부터 선택된다)이고, 타입 II' 턴 서열은 Glu-Gly-Asn-Lys 또는 Glu-D-Pro-Asn-Lys 이다.

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 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 (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 & 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.

본 발명의 일구현예에 따르면, β -헤어핀 콘포메이션을 갖는 펩타이드를 구조안정화 부위로 이용하는 경우, 트립토판 지퍼를 이용한다.

본 발명에서 이용되는 트립토판 지퍼는 다음 일반식 I 로 표시될 수 있다:

일반식 I



- 5 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 은 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 은 Trp 또는 Val 이고, X_7 은 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

- 하나의 특정예에서, 상기 일반식 I 에서 X_1 은 Ser 또는 Gly-Glu 이고,
10 X_2 및 X'_2 는 서로 독립적으로 Thr, His 또는 Val 이며, X_3 은 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.

- 다른 특정예에서, 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, X_5 는 Trp 이며, X_6 는 Trp 이고, X_7 는 Lys 또는 Thr-Glu 이다.

또 다른 특정예에서, 일반식 I 에서 X_1 은 Ser 이고, X_2 및 X'_2 는 Thr 이며, X_3 는 Trp 이고, X_4 는 타입 I' 또는 타입 II' 턴 서열이고, X_5 는 Trp 이며, X_6 는 Trp 이고, X_7 는 Lys 이다.

- 20 또 다른 특정예에서, 일반식 I 에서 X_1 은 Ser 이고, X_2 및 X'_2 는 Thr 이며, X_3 는 Trp 이고, X_4 는 타입 I' 턴 서열(ENGK) 또는 타입 II' 턴 서열(EGNK)이고, X_5 는 Trp 이며, X_6 는 Trp 이고, X_7 는 Lys 이다.

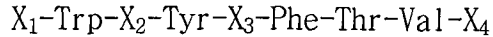
본 발명에 적합한 트립토판 지퍼의 예시적인 아미노산 서열은 서열목록 제 3 서열 내지 제 11 서열에 기재되어 있다.

- 25 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 트립토판 지퍼는 서열목록 제 4 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명에서 구조안정화 부위로서 이용 가능한 다른 β -헤어핀 펩타이드는 단백질 G 의 B1 도메인으로부터 유래된 펩타이드, 즉 GB1 헤어핀 펩타이드이다.

- 30 본 발명에서 GB1 펩타이드가 이용되는 경우, 구조안정화 부위는 다음 일반식 II로 표시될 수 있다:

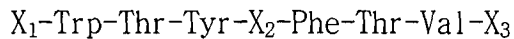
일반식 II



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.

본 발명의 일구현예에 따르면, 일반식 II의 구조안정화 부위는 다음 일반식 II'으로 표시된다:

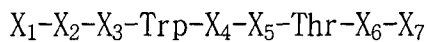
일반식 II'



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

본 발명에서 구조안정화 부위로서 이용 가능한 또 다른 β -헤어핀 펩타이드로는 HP 펩타이드가 있다. 본 발명에서 HP 펩타이드가 이용되는 경우, 구조안정화 부위는 다음 일반식 III으로 표시될 수 있다:

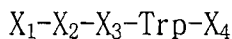
일반식 III



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.

본 발명에서 구조안정화 부위로서 이용 가능한 또 다른 β -헤어핀 펩타이드는 다음 일반식 IV로 표시될 수 있다:

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.

상기 구조 안정화 부위의 양 말단에는 VEGF-타겟 결합 부위 I 및 VEGF-타겟 결합 부위 II가 직접 혹은 링커를 통하여 간접적으로 결합된다. 본 발명의 큰 특징 중 하나는, 구조안정화 부위의 양쪽 말단에 VEGF-타겟

결합 부위 I 및 II를 연결하여 바이포달 방식으로 펩타이드 바인더를 제작하는 것이다. 상기 VEGF-타겟 결합 부위 I 및 II는 서로 협동적으로(cooperatively) 타겟에 결합함으로써, VEGF에 대한 친화도를 크게 증가시킨다.

5 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 VEGF-BPB는 VEGF-타겟 결합 부위와 구조 안정화 부위 간의 상호 구조적 영향을 차단하는 링커를 타겟 결합 부위와 구조안정화 부위의 사이에 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 링커는 구조영향 억제부위(structure influence inhibiting region)로서 기능한다.

10 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 링커는 아미노산 링커이다. BPB 펩타이드 분자에서 ϕ 와 ψ 의 회전이 비교적 자유로운 아미노산을 상기 아미노산 링커로 사용할 수 있다. ϕ 와 ψ 의 회전이 비교적 자유로운 아미노산은 글라이신, 알라닌 및 세린 등이다.

본 발명의 다른 일구현예에 따르면, 상기 링커는 펩타이드 링커이다.
 15 펩타이드 링커는 당업계에서 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
 20 전하를 갖는 잔기의 부재. 펩타이드 링커는 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 포함할 수 있다. Thr 및 Ala과 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 4,935,233호, 제 4,751,180호 및 제 5,990,275호에 개시되어
 25 있다.

 펩타이드 링커의 서열은 1-50 개의 아미노산 잔기로 구성될 수 있으며, 하나의 특정예에서는 1-10 개의 아미노산, 다른 특정예에서는 1-8 개, 또 다른 특정예에서는 1-3 개, 또 다른 특정예에서는 1-2 개의 아미노산 잔기로 구성될 수 있다. 상기 아미노산 잔기로는 글라이신, 알라닌 및
 30 세린을 들 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 바이포달 펩타이드 바인더는 서열목록 제 12 서열의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 VEGF-BPB 에는 VEGF 에 대한 결합 활성을 나타내는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 VEGF-BPB 의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물들도 포함된다. 예를 들면, VEGF-BPB 의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 타겟 결합 부위의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 아미노산 서열 잔기의 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 스레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제 4,554,101 호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스팔테이트(+3.0±1); 글루타메이트(+3.0±1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5±1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).

분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu 및 Asp/Gly 간의 교환이다.

상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 VEGF-BPB 는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* (1981) 2:482; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* (1970) 48:443; Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, *Gene* (1988) 73:237-44; Higgins and Sharp, *CABIOS* (1989) 5:151-3; Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* (1988) 16:10881-90; Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* (1992) 8:155-65 및 Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* (1994) 24:307-31 에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search

Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-10)은 NBCI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn 및 tblastx 와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT 는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을

5 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html 에서 확인할 수 있다.

또한, 본 발명의 VEGF-BPB 는 L-아미노산뿐만 아니라, D-아미노산으로도 제조될 수 있으며, VEGF 에 대한 결합 활성을 나타내는 범위 내에서, 일부의 아미노산 잔기가 비천연 아미노산 및/또는 아미노산

10 유도체로 치환될 수 있다.

또한, 본 발명의 VEGF-BPB 는 펩타이드 서열의 안정성을 증가시키기 위하여, VEGF-타겟 결합 부위 I 및/또는 VEGF-타겟 결합 부위 II에 포함되는 아미노산 서열 중에서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기,

15 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 등으로 변형될 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 구조 안정화 부위, VEGF-타겟 결합 부위 I 또는 VEGF-타겟 결합 부위 II(바람직하게는 구조안정화 부위)에 추가적으로 기능성 분자가 결합되어 있다.

상기 기능성 분자의 예는, 검출 가능한 신호를 발생시키는 레이블, 화학약물, 바이오약물 또는 나노입자를 포함하나, 이에 한정되는 것은

20 아니다.

상기 검출 가능한 신호를 발생시키는 레이블은 T1 조영물질(예컨대, Gd 킬레이트 화합물), T2 조영물질(예컨대, 초상자성 물질(예: 마그네타이트, Fe₃O₄, γ -Fe₂O₃, 망간 페라이트, 코발트 페라이트 및 니켈 페라이트)), 방사성 동위 원소(예컨대, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, P³², S³⁵, ⁴⁴Sc, ⁴⁵Ti, ¹¹⁸I, ¹³⁶La, ¹⁹⁸Tl, ²⁰⁰Tl, ²⁰⁵Bi 및 ²⁰⁶Bi), 형광물질(플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3 와 Cy5), 화학발광단, 자기입자, 매스 표지 또는 전자밀집입자를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

25

상기 화학약물은 예를 들어, 항염증제, 진통제, 항관절염제, 진경제, 항우울증제, 항정신병약물, 신경안정제, 항불안제, 마약길항제,

30

항과킨스질환 약물, 콜린성 아고니스트, 항암제, 항혈관신생억제제, 면역억제제, 항바이러스제, 항생제, 식욕억제제, 진통제, 항콜린제, 항히스타민제, 항편두통제, 호르몬제, 관상혈관, 뇌혈관 또는 말초혈관 확장제, 피임약, 항혈전제, 이노제, 항고혈압제, 심혈관질환 치료제, 5 미용성분(예컨대, 주름개선제, 피부노화 억제제 및 피부미백제) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 바이오약물은 인슐린, IGF-1(insulin-like growth factor 1), 성장호르몬, 에리쓰로포이에틴, G-CSFs(granulocyte-colony stimulating factors), GM-CSFs (granulocyte/macrophage-colony stimulating factors), 10 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터루킨-1 알파 및 베타, 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 인터루킨-2, EGFs(epidermal growth factors), 칼시토닌(calcitonin), ACTH(adrenocorticotrophic hormone), TNF(tumor necrosis factor), 아토비스반(atobisban), 부세레린(buserelin), 세트로렉릭스(cetrorelix), 데스로레린(deslorelin), 데스모프레신 15 (desmopressin), 디노르핀 A(dynorphin A), 엘카토닌(elcatonin), 엘레이도신(eleidosin), 엠티피바타이드(eptifibatide), GHRH-II(growth hormone releasing hormone-II), 고나도레린(gonadorelin), 고세레린(goserelin), 히스트레린(histrelin), 류프로레린(leuprorelin), 라이프레신(lypressin), 옥트레오타이드(octreotide), 옥시토신(oxytocin), 20 피트레신(pitressin), 세크레틴(secretin), 신칼라이드(sincalide), 테르리프레신(terlipressin), 티모펜틴(thymopentin), 티모신(thymosine) α1, 트리프트레린(triptorelin), 바이발리루딘(bivalirudin), 카르베토신(carbetocin), 사이클로스포린, 엑세딘(exedine), 란레오타이드(lanreotide), LHRH(luteinizing hormonereleasing hormone), 25 나파레린(nafarelin), 부갑상선 호르몬, 프람린타이드(pramlintide), T-20(enfuvirtide), 타이말파신(thymalfasin), 지코노타이드, RNA, DNA, cDNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 siRNA 가 될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

30 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 VEGF-BPB 를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 VEGF-BPB 를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 VEGF-BPB 발현용 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 VEGF-BPB 발현용 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

5 본 명세서에서 용어 "핵산 분자" 는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide
10 Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 VEGF-BPB 를 코딩하는 핵산 분자 이외에 상기 핵산 분자에, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, pL^{λ} 프로모터, pR^{λ} 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터,
15 *recA* 프로모터, SP6 프로모터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함한다.

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

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 형질전환체는 *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)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로
25 운반하는 방법은, $CaCl_2$ 방법 (Cohen, S.N. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al. *Proc. Natl. Acad. 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.

30 본 발명의 VEGF-BPB는 매우 낮은 수준(25 nM 수준)의 K_d 값(해리상수)을 나타내어, VEGF 분자에 매우 높은 친화도를 나타내는

펩타이드를 제공한다. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명의 BPB2_{VEGF}는 BPB1_{VEGF} 보다 6배 정도 높은 친화도를 나타낸다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 VEGF-BPB 를
5 약제학적 유효량으로 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 VEGF-BPB 를 약제학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

10 본 발명의 VEGF-BPB 는 VEGF 에 높은 친화도로 결합하여 신생혈관형성을 억제할 수 있으므로, 혈관신생과 관련된 다양한 질환의 예방 및 치료에 적용할 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 개체는 인간을 포함하는 포유동물이다.

15 본 발명의 약제학적 조성물로 예방 및 치료할 수 있는 혈관신생 관련 질환으로는, 예를 들면, 암, 황반 변성, 연령 관련 황반변성(AMD), 당뇨 망막병증, 혈관신생 녹내장, 건선, 각막 궤양, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 각막 이식거부, 아테롬성 동맥경화증, 켈로이드, 신사구체병증, 재협착, 염증성 장 질환(IBD), 류마티스 관절염,
20 골관절염, 혈관종 및 혈관섬유종 등을 들 수 있다.

상기 암으로는, 예를 들면, 흉부암, 폐암, 위암, 식도암, 대장암, 결장직장암, 간암, 난소암, 난포악종, 남화아세포종, 경부암, 자궁내막암, 자궁내막과형성, 자궁내막증, 섬유육종, 맥락막염, 두경암, 비인강암, 후두암, 간종양, 키포시 육종, 색소세포종, 피부암, 혈관종, 해면상혈관종,
25 혈관아세포종, 췌장암, 망막아종, 성상세포종, 교아세포종, 신경초종, 콧지 신경교종, 수아세포종, 신경아세포종, 횡문근육종, 골형성 육종, 평활근 육종, 요로암, 갑상선암, 빌름종양, 신장세포암 및 전립선암 등을 들 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할
30 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's
10 Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
15 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 성인 기준으로 1일 당 0.00001-100 mg/kg이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써
20 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 VEGF 에 대한 특이성 검사를 하기 위해 BPB2_{VEGF} 를 가지고
25 있는 재조합 파아지를 여러 단백질에 대해 ELISA 를 수행하여 흡광도를 측정한 결과이다. 왼쪽 막대부터 VEGF, S-tag 항체, 스트렙트아비딘, HSA 및 TNF- α 에 대한 결과이다.

도 2 는 VEGF 에 결합하는 BPB 의 친화력을 측정한 결과이다. AAP 는 BPB1_{VEGF} 이고, WAAAP 는 BPB2_{VEGF} 이며, GPAAP 는 BPB3_{VEGF} 이고, AQAAP 는
30 BPB4_{VEGF} 이다.

도 3 은 VEGF 에 결합하는 BPB 의 HUVEC 증식 억제효과를 보여준다. AAP 는 BPB₁VEGF 이고, WAAAP 는 BPB₂VEGF 이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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

실시예

실험재료 및 실험방법

인간 VEGF₁₂₁ 제작

인간 VEGF₁₂₁ 을 코딩하는 cDNA 를 인간 VEGF₁₆₅ 의 전체 DNA 서열을 포함하는 플라스미드로부터 PCR 증폭하였다. 클론은 싸이토카인 은행(Bank for Cytokine Research, Korea)으로부터 공급받았다. 프라이머 5'-ATA GAA TTC GCA CCC ATG GCA GAA-3'(정방향, 서열목록 제 13 서열) 및 5'-ATT AAG CTT TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA ATT TTC TTG TCT TGC-3'(역방향, 서열목록 제 14 서열)를 사용하여 인간 VEGF₁₂₁ 을 pET32a 플라스미드(Novagen)로 클로닝하였다. 수득한 발현 플라스미드를 사용하여 *E. coli* AD494(Stratagene)를 형질전환하였다. 단백질 발현과 정제는 이전의 방법(Kim, J.-W. et al. *Exp. Mol. Med.* 42, 514-523 (2010))에 따라 실시하였다. 대장균의 형질전환 후, 20℃에서 15 시간 동안 1 mM 의 IPTG 를 처리하여 티오레독신(Trx)-VEGF₁₂₁ 발현을 유도하였다. 이후, 박테리아를 모으고, 용해 버퍼(50 mM 인산나트륨 pH 8.0, 300-mM NaCl, 5 mM 이미다졸)에 재현탁 시킨 후, 초음파 처리하여 용해시켰다. 용해물을 4℃에서 1 시간 동안 1550 g 로 원심 분리하였다. 용해버퍼(배양액 리터당 3 ml 의 BV(bed volume))로 전-처리된(pre-equilibrated) Ni-NTA 친화성 레진(Peptron)을 구비하는 gravity-flow 컬럼(Bio-Rad)에 상청액을 로딩하였다. 용해 버퍼로 컬럼과 매트릭스를 세척한 후, 50 mM 의 인산나트륨(pH 8.0), 300 mM 의 NaCl 및 300 mM 의 이미다졸이 함유된 용액을 사용하여 His-tag 융합 단백질을 용출시켰다. Trx-VEGF₁₂₁ 에

트롬빈(Sigma)을 4°C에서 12 시간 동안 처리하여 티오레독신을 제거하고, Ni-NTA 친화성 레진을 사용하여 Trx-his 를 제거하였다. PBS(pH 7.4)로 전-처리(pre-equilibrated)된 Superdex 2000 컬럼(Pharmacia Biotech)을 사용한 겔 여과를 통하여 S-tagged-VEGF₁₂₁ 을 추가 정제하였다. S-tagged-VEGF₁₂₁ 의 다이머 형태를 포함하는 분획물을 다시 모았다. 일부 실험에서는 VEGF₁₆₅(R&D Systems)를 사용하였다.

BPB_{VEGF} 라이브러리 제작

BPB_{VEGF}(AAPTSGSWTWENGKWTWKGWQMWHR, 서열목록 제 15 서열) 최적화 라이브러리를 만들기 위해 두 개의 올리고뉴클레오타이드(5'-TTC TAT GCG GCC CAG CTG GCC NNK NNK GCG GCC CCG ACC AGC TTT GGA TCT TGG ACA TGG GAA AAC GGA AAA-3', 서열목록 제 16 서열)(BPB_{VEGF}_F1)와 (5'-AAC AGT TTC TGC GGC CGC TCC TCC TCC MNN MNN GCG ATG CCA CAT CTG CCA TCC CTT CCA TGT CCA TTT TCC GTT-3', 서열목록 제 17 서열)(BPB_{VEGF}_B1)를 합성하였다(N = A, T, G 또는 C; K = G 또는 T; M = C 또는 A).

BPB_{VEGF} 이중가닥을 만들기 위해서 BPB_{VEGF}_F1 4 μM(최종 농도), BPB_{VEGF}_B1 4 μM(최종 농도), 2.5 mM dNTP 혼합물 4 μl, Ex TaqDNA 중합효소 1 μl(10 U)(Takara, Seoul, Korea), 10 x PCR 완충액 5 μl를 섞고 총 50 μl가 되도록 증류수를 추가한 혼합액을 10 개 만들었다. 이 혼합액을 PCR 반응(94°C 5 분, 60 사이클: 30°C 30 초와 72°C 30 초, 72°C 7 분)을 하여 이중가닥으로 만든 후 PCR 정제 키트(GeneA11, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다. BPB_{VEGF} 의 인서트 유전자를 pIGT2 phagemid 벡터(Ig therapy, Chuncheon, Korea)에 연결하기 위해 인서트 유전자와 pIGT2 phagemid 벡터에 제한효소 처리를 시행하였다. 약 10 μg의 인서트 DNA 를 *Sfi*I(NEB)와 *Not*I(NEB)로 각각 4 시간씩 반응시킨 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 그리고 약 40 μg의 pIGT2 phagemid 벡터를 *Sfi*I(NEB)와 *Not*I(NEB)로 각각 4 시간씩 반응시킨 후 CIP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)(NEB, Ipswich)를 1 시간 반응한 후 PCR 정제 키트를 이용하여 정제하였다. 이들을 UV-가시광선 분광기(Ultrospec 2100pro, Amersham Bioscience)로 정량하여 2.9 μg의 인서트 유전자를 T4 DNA 리가아제(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 pIGT2 파아지미드 벡터 12

μg 과 18°C 에서 15 시간 동안 연결한 후, 에탄올로 침전시켜 TE 버퍼 $100\ \mu\text{l}$ 로 DNA 를 용해시켰다. 이를 *E. coli* XL-1 컴피턴트 세포에 전기천공으로 형질전환시켜 최종적으로 각각 1×10^7 의 BPB_{VEGF} 최적화 라이브러리를 만들었다.

5

파아지 디스플레이 선별

항 S-tag 항체(Abcam, 4 $\mu\text{g/ml}$ in PBS)를 4°C 에서 96-웰 플레이트에 하룻밤 동안 고정시킨 후, S-tagged-VEGF₁₂₁ 과 함께 인큐베이션 하여 플레이트에 결합된 타겟 단백질(S-tagged-VEGF₁₂₁)을 제조하였다.

10 플레이트를 25°C 에서 1 시간 동안 블로킹 버퍼(2% 소혈청 알부민이 포함된 PBS)에서 인큐베이션 하여 플레이트 표면의 비특이적 결합을 방지하였다. 파아지 라이브러리 풀을 항 S-tagged-항체가 고정된 플레이트 상에서 25°C 에서 1 시간 반 동안 인큐베이션 하여 항 S-tag 항체에 결합한 파아지를 제거하였다. 항체 결합 파아지를 제거한 후, 남아있는 파아지를 S-tagged-

15 VEGF₁₂₁ 고정된 플레이트에서 25°C 의 온도로 1 시간 동안 인큐베이션 하였다. 0.1% 트윈-20 이 포함된 PBS 로 세척하여 비결합 파아지를 제거하였다(라운드 1 에서 7 번, 라운드 2 에서 15 번, 라운드 3 에서 15 번, 라운드 4 에서 25 번). 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 VEGF₁₂₁ 을 사용하여 37°C 에서 상온에서 20 분간 0.2 M 의 글라이신-HCl(pH 2.2)과 함께 인큐베이션한 후, 1 M 의

20 Tris-HCl(pH 8.8)으로 즉시 중화하여 결합 파아지를 용출시켰다. 용출 파아지를 log-phase *E. coli* ER(Stratagene)을 감염시키는데 사용하였다(37°C , 1 시간). 파아지 감염 세포를 37°C 에서 1 시간 동안 Ex12 헬퍼 파아지로 중복감염 시켰다. 50 mg/L 암피실린과 10 mg/L 카나마이신이 함유된 LB 배지를 중복감염된 세포에 첨가한 다음, 37°C 에서 하룻밤 동안

25 인큐베이션 하였다. 패닝 동안 모든 분획의 파아지의 역가를 측정하였다. 5 라운드의 패닝 후, 파아지 ELISA 를 실시하였다. 파아지 감염 *E. coli* ER 로부터 분리된 콜로니는 각 BPB-포함 파아지를 생산하였다. 위에서 언급한 방법에 따라 각 파아지를 타겟 단백질이 코팅된 플레이트에 첨가하였다. PBS/0.1% 트윈-20 으로 마이크로타이터 플레이트를 세척하고,

30 PBS/0.1% 트윈-20 에서 HRP-컨쥬게이트 항 M13 항체(GE Healthcare)와 함께 인큐베이션한 후 결합 파아지를 검출하였다. 기질(BD OptEIA)로서

TMB(tetramethylbenzidine)를 사용하여 450 nm 에서 흡광도를 모니터링하여 결합된 HRP 의 양을 측정하였다. 파아지미드 프라이머 5'-GAT TAC GCC AAG CTT TGG AGC-3'(Genotech, 서열목록 제 18 서열)를 이용하여 양성 클론의 DNA 서열분석을 하였다.

5

파아지 ELISA

특이성을 측정하기 위하여 파아지 ELISA 를 실시하여, rhVEGF₁₂₁, 항-S-tag 항체(Abcam), 인간 TNF α (hTNF α , R&D Systems), 스트렙트아비딘((New England Biolabs) 및 HSA(Sigma)에 대하여 BPB_{VEGF}-
 10 파아지를 테스트하였다. 모든 단백질들(PBS 내 10 ug/ml)을 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션 하여 96-웰 플레이트에 직접 고정시켰다. 플레이트를 블로킹 버퍼(2% BSA 를 함유하는 PBS)에서 25℃의 온도로 두 시간 동안 인큐베이션 한 다음, 25℃에서 1 시간 동안 BPB_{VEGF}-파아지(10^8)가 결합하도록 하였다. PBS/0.1% 트윈-20 으로 마이크로타이터 플레이트를 다섯 번
 15 세척하고, PBS/0.1% 트윈-20 에서 HRP-컨쥬게이트 항 M13 항체(GE Healthcare)와 함께 인큐베이션 한 후, 결합파지를 검출하였다. 기질(BD OptEIA)로서 TMB 를 사용하고, 450 nm 에서 흡광도를 확인하여 HRP 결합량을 측정하였다.

표면 플라즈몬 공명에 의한 친화도 측정

20 BIAcore X 장비(BIAcore)를 사용하여 친화도를 측정하였다. 모든 펩타이드는 Anygen Inc.에서 합성하였다. BPB_{VEGF} 와 VEGF₁₂₁ 사이의 상호작용을 CM5 칩(BIAcore)에 VEGF₁₂₁ 을 고정하여 분석하였다. 다른 농도의 BPB1_{VEGF}, BPB2_{VEGF}, BPB3_{VEGF} 또는 BPB4_{VEGF} 를 주입한 후, VEGF₁₂₁ 과의
 25 상호작용을 러닝 버퍼로서 PBS/0.1% NaN₃ 을 사용하여 30 ul/분의 흐름 속도로 측정하였다. 상호작용의 모든 동역학 데이터는 BIA evaluation 3.1 소프트웨어를 사용하여 평가하였다.

HUVEC 증식 어세이

30 HUVEC 를 내피세포 성장 배지 2(PromoCell) 내 0.2% 젤라틴 코팅 플레이트에서 배양하여 컨플루언시까지 성장시켰다. 굶김 배지(starving

media; 1% PBS 와 25 mM HEPES pH7.4 가 함유된 M199)에서 '하룻밤
 인큐베이션한 후, HUVEC 를 굽김 배지가 담긴 96-웰 조직 배양 플레이트에
 5,000 세포/웰의 밀도로 재분주하였다. 세포를 12 시간 동안 부착하도록 한
 뒤, 배지를 억제제(BPB1_{VEGF}, BPB2_{VEGF})를 함유하는 굽김 배지로 rhVEGF₁₂₁(200
 5 ng/ml)과 함께 혹은 없이 교체해 주었다. 세포를 37℃에서 72 시간 동안
 추가 인큐베이션 하였다. 실험 끝에 세포를 세척하고, EZ-cytox 세포
 생존율 분석 키트(Daeillab Service Co.)를 사용하여 증식율을 평가하였다.
 플레이트는 37℃에서 4 시간 동안 인큐베이션 하였고, 450 nm 에서
 측정하였다.

10

실험결과

BPB 라이브러리로부터 VEGF-결합 파아지의 선별

VEGF 의 억제력이 가장 높은 BPB1_{VEGF} 펩타이드를 최적화하기 위하여
 양쪽 끝에 두 개의 가변 부위를 추가하는 라이브러리
 15 (XXAAPTSGSWTWENGKWTWKGWQMWHRXX, X= 무작위 아미노산, 서열목록
 제 19 서열)를 10⁷ 개 만들었다. 이를 이용하여 VEGF 단백질에 대해
 바이오패닝을 실시한 후 30 개의 시퀀싱을 한 다음 특이성이 좋은 최종
 3 개의 후보군을 선택하였다. 특이성이 좋은 것으로 선정된 3 개 후보군의
 서열정보는 표 1에 나타내었다.

20

【표 1】

타겟	BPB	시퀀스	서열번호
VEGF ₁₂₁	BPB1 _{VEGF}	AAPTSGSWTWENGKWTWKGWQMWHR	15
	BPB2 _{VEGF}	WAAAPTSGSWTWENGKWTWKGWQMWHRFR	12
	BPB3 _{VEGF}	GPAAPTSGSWTWENGKWTWKGWQMWHRPQ	20
	BPB4 _{VEGF}	AQAAPTSGSWTWENGKWTWKGWQMWHRLS	21

도 1 은 상기 3 종의 후보군 중 BPB2_{VEGF} 의 특이성 검사 결과로서,
 VEGF 에 대해 특이성 검사를 하기 위하여 BPB2_{VEGF}-재조합 파아지를 여러
 단백질에 대해 ELISA 를 수행하여 흡광도를 측정한 결과이다. 도 1 에
 25 나타난 바와 같이, BPB2_{VEGF} 은 VEGF 에 대하여 특이성을 갖는다(도 1 참조).

표면 플라즈몬 공명에 의한 친화도 측정 결과

화학적으로 합성한 BPB1-4_{VEGF} 펩타이드의 VEGF₁₂₁에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명 기술로 분석하였다. rhVEGF₁₂₁ 타겟 단백질이 표면에 결합된 BIAcore 칩을 사용하여, 상기 BPB 펩타이드의 결합 특성을 실시간 분석하였다. 측정결과는 표 2 및 도 2에 나타내었다.

【표 2】

타겟	BPB	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_d [M]
VEGF ₁₂₁	BPB1 _{VEGF}	4.0×10^4	6.1×10^{-3}	154×10^{-9}
	BPB2 _{VEGF}	5.3×10^5	1.3×10^{-2}	25×10^{-9}
	BPB3 _{VEGF}	BPB1과 비슷	BPB1과 비슷	BPB1과 비슷
	BPB4 _{VEGF}	BPB1과 비슷	BPB1과 비슷	BPB1과 비슷

그 결과, 가장 높은 친화도를 보인 펩타이드는 BPB2_{VEGF}였으며, 상기 BPB2_{VEGF}는 $\sim 5.3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 의 k_a (association rate constant), $\sim 1.3 \times 10^{-2} s^{-1}$ 의 k_d (dissociation rate constant), ~ 25 nM의 K_d (equilibrium binding constant) 값을 나타내었다(표 2 및 도 2 참조). 이러한 결과는, 최적화된 BPB2_{VEGF}가 BPB1_{VEGF}보다 VEGF에 대해 6배 향상된 친화도를 가지고 있음을 보여준다.

HUVEC 증식 어세이 결과

내피세포 증식은 VEGF 의존적이며, VEGFR-2 활성화에 의하여 주로 매개된다. BPB가 내피세포에 대한 VEGF의 작용을 억제하는지 알아보기 위하여, 내피세포에서 VEGF 유도 분열촉진 활성(mitogenic activity)에 대한 BPB1_{VEGF} 및 BPB2_{VEGF}의 영향을 평가하였다. HUVEC를 200 ng/ml rhVEGF₁₂₁로 활성화시키고, 다른 농도의 펩타이드를 72시간 동안 처리하였다.

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 최적화된 BPB2_{VEGF}는 BPB1_{VEGF}보다 VEGF에 의한 내피세포 증식을 보다 더 효과적으로 억제하였다(도 3 참조).

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 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
5 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

구조안정화 부위(structure stabilizing region)로서 β -헤어핀; 및
 상기 구조 안정화 부위의 양 말단에 직접 또는 링커를 통하여 각각
 5 결합된 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 타겟 결합 부위
 I(target binding region I) 및 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을
 포함하는 타겟 결합 부위 II(target binding region II)를 포함하는 VEGF 에
 특이적으로 결합하는 VEGF-바이포달 펩타이드 바인더.

10 【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 β -헤어핀은 트립토판 지퍼인 것을 특징으로
 하는 바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 3】

15 제 2 항에 있어서, 상기 트립토판 지퍼는 서열목록 제 3 서열 내지
 제 11 서열의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산
 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이포달 펩타이드 바인더.

【청구항 4】

20 제 1 항에 있어서, 상기 바이포달 펩타이드 바인더는 서열목록
 제 12 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이포달
 펩타이드 바인더.

【청구항 5】

25 제 1 항에 있어서, 상기 타겟 결합 부위 I 및 타겟 결합 부위 II는
 공동으로 작용하여 VEGF 에 결합하는 것을 특징으로 하는 바이포달 펩타이드
 바인더.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 구조 안정화 부위, 타겟 결합 부위 I 또는 타겟 결합 부위 II에 추가적으로 기능성 분자가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 바이포달 펩타이드 바인더.

5 【청구항 7】

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 VEGF-바이포달 펩타이드 바인더를 코딩하는 핵산 분자.

【청구항 8】

10 제 7 항의 핵산 분자를 포함하는 VEGF-바이포달 펩타이드 바인더 발현용 재조합 벡터.

【청구항 9】

15 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 VEGF-바이포달 펩타이드 바인더를 약제학적 유효량으로 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

【청구항 10】

20 제 9 항에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 암, 황반 변성, 연령 관련 황반변성(AMD), 당뇨 망막병증, 혈관신생 녹내장, 건선, 각막궤양, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 각막 이식거부, 아테롬성 동맥경화증, 켈로이드, 신사구체병증, 재협착, 염증성 장 질환(IBD), 류마티스 관절염, 골관절염, 혈관종 및 혈관섬유종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 11】

30 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 VEGF-바이포달 펩타이드 바인더를 약제학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 관련 질환의 예방 또는 치료방법.

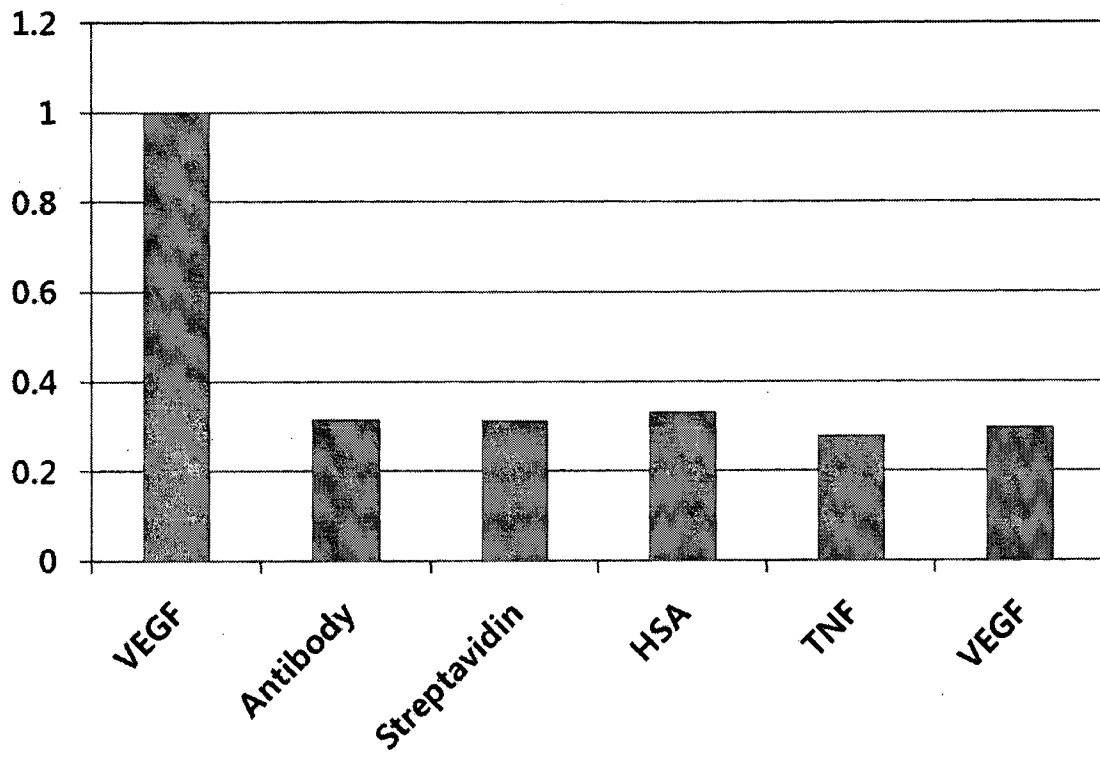
【청구항 12】

- 제 11 항에 있어서, 상기 혈관신생 관련 질환은 암, 황반 변성, 연령 관련 황반변성(AMD), 당뇨 망막병증, 혈관신생 녹내장, 건선, 각막궤양, 증식성 유리체 망막병증, 미성숙 망막병증, 안과 염증, 각막 이식거부, 아테롬성 동맥경화증, 켈로이드, 신사구체병증, 재협착, 염증성 장 질환(5 IBD), 류마티스 관절염, 골관절염, 혈관종 및 혈관섬유종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

1/3

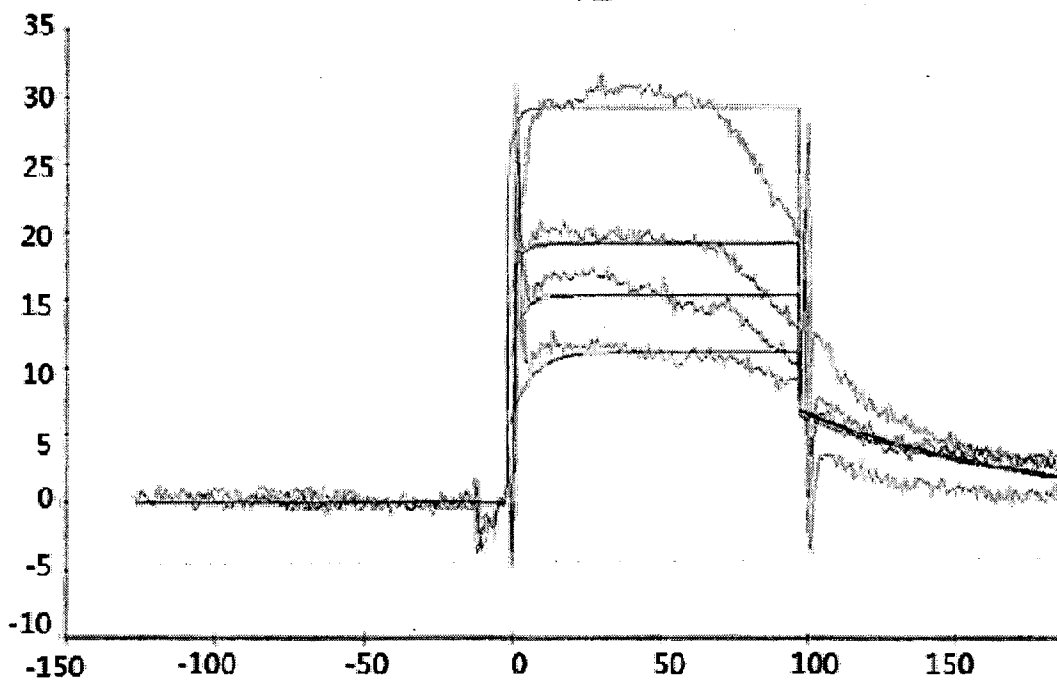
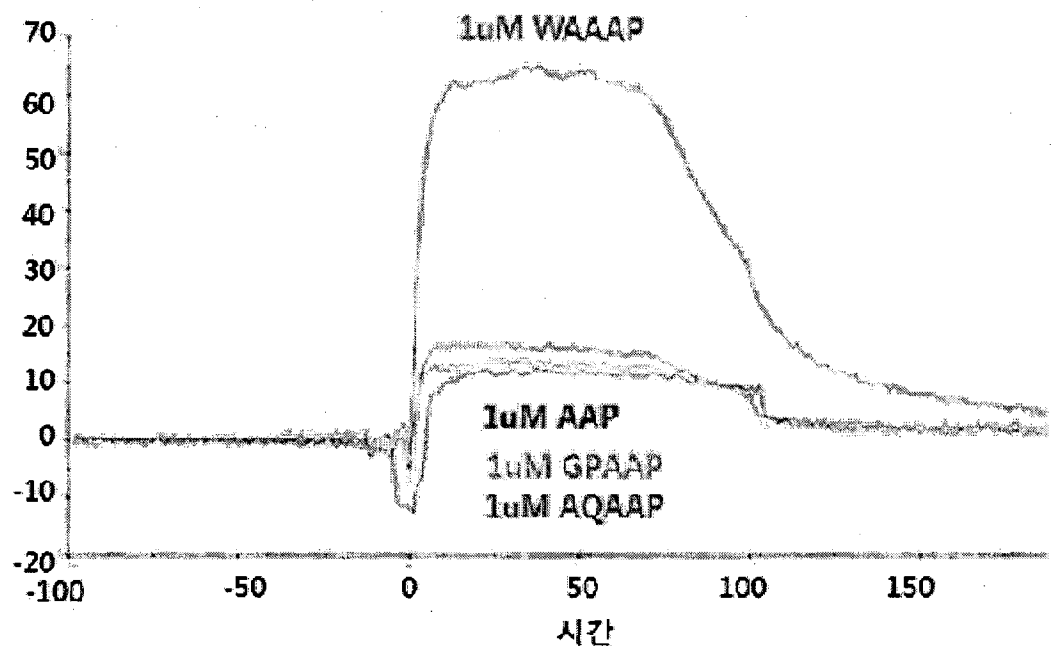
도 1

<WAAAP의 특이성>



2/3

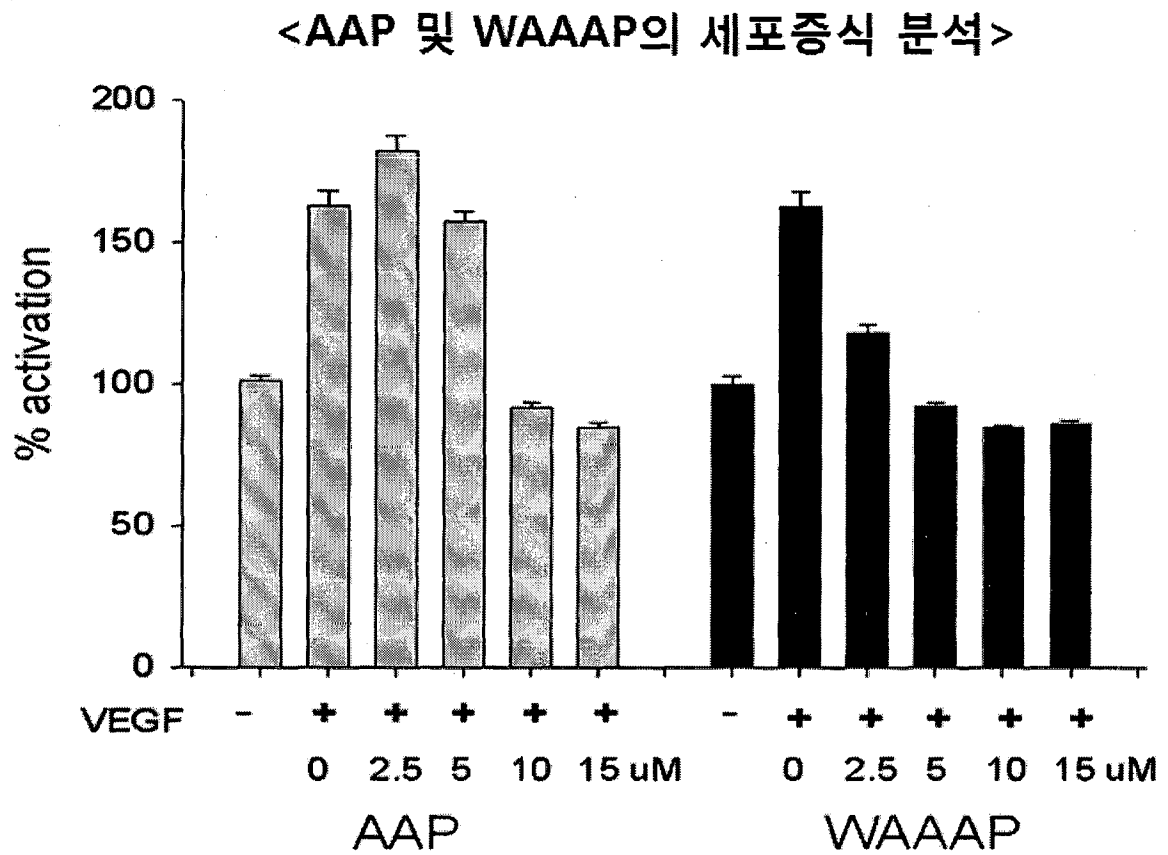
도 2



k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_d [M]
5.3×10^5	1.3×10^{-2}	25 nM

3/3

도 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011494**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 14/485(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i, A61K 38/18(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 14/485; C07K 19/00; C07K 7/08; C07K 7/06; C07K 1/107; A61K 47/42; A61K 9/133; C40B 30/04; C12N 15/12; A61K 38/18

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: bipodal peptide, VEGF

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0125455 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 November 2012 See claims 21, 23, 25, and 26; table 3b.	1-10
A	KR 10-2011-0117038 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 26 October 2011 See claims 1, 3, 5.	1-10
A	KR 10-2013-0103300 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 23 September 2013 See claims 19, 21, 23.	1-10
A	KR 10-2012-0084900 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 31 July 2012 See abstract.	1-10
A	KR 10-2012-0106763 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 26 September 2012 See claim 1.	1-10



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

03 MARCH 2015 (03.03.2015)

Date of mailing of the international search report

03 MARCH 2015 (03.03.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011494

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.: **11, 12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as in claim 11 and the invention as in claim 12 pertain to a method for treatment of human diseases, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/011494

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0125455 A	15/11/2012	JP 2013-513382 A	22/04/2013
		US 2012-0309934 A1	06/12/2012
		WO 2011-071280 A2	16/06/2011
		WO 2011-071280 A3	10/11/2011
KR 10-2011-0117038 A	26/10/2011	AU 2009-307249 A1	29/04/2010
		CA 2741040 A1	29/04/2010
		CN 102224162 A	19/10/2011
		EP 2360172 A2	24/08/2011
		JP 05-390621 B2	15/01/2014
		JP 2012-505929 A	08/03/2012
		KR 10-1151805 B1	01/06/2012
		US 2011-0152500 A1	23/06/2011
		WO 2010-047515 A2	29/04/2010
		WO 2010-047515 A3	29/07/2010
KR 10-2013-0103300 A	23/09/2013	WO 2011-132938 A2	27/10/2011
		WO 2011-132938 A3	10/05/2012
KR 10-2012-0084900 A	31/07/2012	KR 10-1323845 B1	31/10/2013
KR 10-2012-0106763 A	26/09/2012	JP 2013-513601 A	22/04/2013
		US 2012-0321697 A1	20/12/2012
		WO 2011-071279 A2	16/06/2011
		WO 2011-071279 A3	10/11/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/485(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i, A61K 38/18(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/485; C07K 19/00; C07K 7/08; C07K 7/06; C07K 1/107; A61K 47/42; A61K 9/133; C40B 30/04; C12N 15/12; A61K 38/18

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: 바이포달 펩타이드, VEGF

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2012-0125455 A (광주과학기술원) 2012.11.15. 청구항 21, 23, 25, 및 26; 표3b 참조.	1-10
A	KR 10-2011-0117038 A (광주과학기술원) 2011.10.26. 청구항 1, 3, 5 참조.	1-10
A	KR 10-2013-0103300 A (광주과학기술원) 2013.09.23. 청구항 19, 21, 23 참조.	1-10
A	KR 10-2012-0084900 A (광주과학기술원) 2012.07.31. 요약 참조.	1-10
A	KR 10-2012-0106763 A (광주과학기술원) 2012.09.26. 청구항 1 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 03월 03일 (03.03.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 03월 03일 (03.03.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

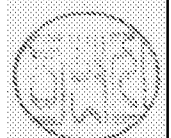
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 7140

심사관

이현지

전화번호 +82-42-481-8745



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

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

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

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

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 11, 12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11 발명 및 12 발명은 인간의 질병에 대한 치료방법에 관한 것이므로 PCT
조약 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조
사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 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
KR 10-2012-0125455 A	2012/11/15	JP 2013-513382 A US 2012-0309934 A1 WO 2011-071280 A2 WO 2011-071280 A3	2013/04/22 2012/12/06 2011/06/16 2011/11/10
KR 10-2011-0117038 A	2011/10/26	AU 2009-307249 A1 CA 2741040 A1 CN 102224162 A EP 2360172 A2 JP 05-390621 B2 JP 2012-505929 A KR 10-1151805 B1 US 2011-0152500 A1 WO 2010-047515 A2 WO 2010-047515 A3	2010/04/29 2010/04/29 2011/10/19 2011/08/24 2014/01/15 2012/03/08 2012/06/01 2011/06/23 2010/04/29 2010/07/29
KR 10-2013-0103300 A	2013/09/23	WO 2011-132938 A2 WO 2011-132938 A3	2011/10/27 2012/05/10
KR 10-2012-0084900 A	2012/07/31	KR 10-1323845 B1	2013/10/31
KR 10-2012-0106763 A	2012/09/26	JP 2013-513601 A US 2012-0321697 A1 WO 2011-071279 A2 WO 2011-071279 A3	2013/04/22 2012/12/20 2011/06/16 2011/11/10